

UNIVERSIDAD NACIONAL
“Campus Omar Dengo”
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA

NANOTRANSPORTADORES DE ÁCIDOS NUCLEICOS A BASE DE COMPLEJOS
POLÍMERO-FOSFOLÍPIDOS

Trabajo sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Química,
como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial

Jeffry Badilla Núñez

Tutor:

Dr. Óscar Rojas Carrillo

Asesores:

Dr. Randall Loaiza Montoya

Dr. Giovanni Sáenz Arce

Heredia, Costa Rica

Octubre, 2022

“Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial”

Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación:

	NOMBRE	FIRMA
Decano (a)		_____
Director (a) de la Escuela		_____
Tutor	Dr. Oscar Rojas Carrillo	_____
Asesores:	Dr. Randall Loaiza Montoya	_____
	Dra. Priscila Tonon Baschiroto	_____
Lector		_____
Proponente	BQI. Jeffry Badilla Núñez	_____

RESUMEN

Los recientemente avances tecnológicos y científicos buscan el desarrollo de nuevos vehículos que permitan el transporte, protección y liberación de moléculas bioactivas que resulten eficaces y seguros para aun posible tratamiento terapéutico. En el presente trabajo de investigación se desarrolló un nanosistema a base de biopolímero y fosfolípidos, el cual tiene gran potencial en la vehiculación de los ácidos nucleicos. Primeramente, se prepararon mezclas de los fosfolípidos 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y N- (carbonil-metoxipolietilenglicol 2000) -1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal sódica (PE 18:0/18:0-PEG 2000 o PE-PEG2000) a diferentes relaciones molares en buffer de ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico (HEPES) y se caracterizaron respecto a tamaño de partícula y potencial zeta por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Los resultados obtenidos muestran tamaños entre 125 y 175 nm y un potencial zeta entre -11 y -15 mV. Estos resultados se complementaron por medio de las técnicas de microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Paralelamente, se formularon complejos de quitosano y ácido desoxirribonucleico (ADN) a diferentes relaciones nitrógeno: fósforo (N:P), los cuales se caracterizaron por medio de DLS, registrando tamaños de partícula entre 100 y 450 nm, así como cargas superficiales entre -5 y 38 mV dependiendo de variables como el pH y relación N:P. Finalmente, basados en la interacción electrostática entre el complejo quitosano/ADN y fosfolípidos, se obtuvieron complejos modificados superficialmente con una capa fosfolipídica. Las nanopartículas modificadas registraron un tamaño entre 200 y 400 nm, el cual fue medido por medio de DLS y complementado con el resultado obtenido por AFM. La carga superficial de los complejos macromoleculares resultó entre 0 y +30 mV. Los resultados obtenidos por la técnica de electroforesis en gel de agarosa indican una adecuada estabilidad de los complejos a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica. Subsecuentemente, se observa que la eficiencia de transfección aumenta conforme se aumenta la relación N:P de los complejos quitosano: ADN. La adición de fosfolípidos a los complejos macromoleculares indica un aumento en la eficiencia de transfección sobre células HeLa llegando a valores cercanos al 20%. Finalmente se puede notar una alta viabilidad celular por parte de todos los complejos formulados.

RECONOCIMIENTOS

Al Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA) y a todo su personal, por su apoyo en el presente trabajo de investigación tanto con sus conocimientos como con sus instalaciones. Especialmente a mi tutor Óscar Rojas Carrillo por su apoyo incondicional desde antes del inicio del proyecto hasta el final de este.

Al Laboratorio del Centro de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) y todo su equipo de trabajo por su contribución interdisciplinaria en este proyecto, así como por el aprendizaje brindado en el campo especialmente de la biotecnología.

A la empresa Speratum y su equipo de trabajo por la ayuda con los recursos biológicos, conocimiento y seguimiento al proyecto desde el inicio.

A la Escuela de Química de la Universidad Nacional y todo su personal docente por toda el tiempo y la enseñanza brindada siempre de la mejor manera posible durante los años de carrera.

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios, por la vida, salud y todo lo que me ha dado. Segundo a mi familia por todo el amor, apoyo económico, emocional, psicológico y demás incondicional que me han brindado desde que tengo memoria y durante todo el desarrollo de mi proyecto de tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todos los buenos principios, valores, experiencias, cariño y enseñanzas que me han transmitido a través de los años, proporcionándome siempre motivación y felicidad para seguir adelante.

A mi tutor del presente proyecto de tesis, el Dr. Oscar Rojas Carrillo por su esfuerzo, apoyo, paciencia, persistencia, perseverancia, confianza y tiempo dedicado durante el proyecto. Además, por todas las experiencias y enseñanzas que me ha brindado como profesor y tutor, pero también como persona.

Al Centro de Innovaciones Biotecnológicas en general, mayormente al Dr. Randall Loaiza Montoya, la Dra. Priscila Tonon Baschiroto y la Licda. Mónica Baizan Rojas por su tiempo, apoyo y conocimientos proporcionados durante el desarrollo del proyecto.

A la empresa Speratum en general, mayormente al Dr. Christian Marín Müller, a la Licda. Laura Chaves y al M. Sc. Osvaldo Vega Martínez por su apoyo, tiempo y conocimiento brindados en el proyecto.

Al Dr. Giovanni Sáenz Arce y sus estudiantes asistentes por su asesoramiento y colaboración brindadas al proyecto.

A la empresa Lipoid por la donación de los fosfolípidos con los que se trabajó en el presente trabajo de investigación.

Al Fondo para el Fortalecimiento de Capacidades Estudiantiles en Iniciativas de Extensión (FOCAES) por su apoyo económico que ayudaron de manera significativa al proyecto para seguir adelante.

A compañeros de carrera que me asistieron durante el desarrollo del proyecto tales como Ricardo Araya González, Adeliza Vargas Chavarría y Roberto Camacho Campos.

Tabla de contenido

RESUMEN	iii
RECONOCIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación y antecedentes	1
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Sistemas nanotransportadores de compuestos bioactivos.....	3
2.2 Transportadores virales y no virales de genes	4
2.2.1 Transportadores virales.....	5
2.2.2 Transportadores no virales	6
2.3 Citometría de Flujo	11
CAPÍTULO III: OBJETIVOS	12
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y METODOLOGÍA	13
4.1 Materiales.....	13
4.2 Preparación y caracterización de las disoluciones de quitosano.....	13
4.3 Preparación y caracterización de las vesículas liposomales	14
4.4 Preparación de nanopartículas de quitosano-ácido nucleico	15
4.5 Preparación de partículas de quitosano/ácido nucleico/fosfolípidos (Lipoquitoplejos)	16
4.6 Caracterización de las partículas formuladas.....	16
4.7 Evaluación de la viabilidad celular de los complejos	17
4.8 Evaluación de la eficiencia de transfección de los complejos	18
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1 Preparación y caracterización de las suspensiones liposomales	19
5.2 Preparación y caracterización de disoluciones de quitosano a diferentes valores de pH	24
5.3 Preparación y caracterización de los complejos quitosano: ADN	26
5.4 Determinación de la capacidad de encapsulamiento del ADN.....	32
5.5 Preparación y caracterización de complejos quitosano/ADN modificados con fosfolípidos (lipoquitoplejos).....	38

5.6 Determinación de la eficiencia de transfección de los complejos formulados	42
5.7 Determinación de la viabilidad celular de los complejos	45
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
6.1 Conclusiones	48
6.2 Recomendaciones	49
CAPÍTULO VII: REFERENCIAS	50
CAPÍTULO VIII: ANEXOS	64
8.1 Anexo 1. Cálculo de las relaciones N:P teóricas en los complejos quitosano: ADN .	64
8.2 Anexo 2. Determinación de aminos libres en el quitosano mediante el método de ninhidrina	65
8.3 Anexo 3. Cálculo de las relaciones N:P en los complejos quitosano: ADN utilizando el resultado obtenido por el ensayo con ninhidrina	67
8.4 Anexo 4. Evaluación de la estabilidad de las dispersiones liposomales en el tiempo por medio de la técnica de DLS	67
8.5 Anexo 5. Evaluación de la estabilidad de los complejos quitosano: ADN por medio de la técnica de electroforesis	69
8.6 Anexo 6. Determinación de los valores de pH de los complejos quitosano: ADN en Opti-MEM	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del quitosano	7
Figura 2. Estructuras químicas de los fosfolípidos a) PE-PEG2000 y b) DPPC.....	9
Figura 3. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los liposomas a diferentes relaciones molares DPPC: PE-PEG2000.	19
Figura 4. Representación esquemática de la estructura de un liposoma a base de los fosfolípidos DPPC y PE-PEG2000.	21
Figura 5. Micrografía TEM de los liposomas formados por los fosfolípidos DPPC: PE-PEG2000 en la relación molar 1:1, donde “A”, “B” y “C” representan algunas de las aglomeraciones observadas.	22
Figura 6. Micrografía de AFM sobre mica para la formulación liposomal con una relación molar DPPC: PE-PEG2000 3:1 tomada a una escala de 2x2 μm	23
Figura 7. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de disoluciones de quitosano a diferentes valores de pH.	24
Figura 8. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN ampliado a más relaciones N:P, utilizando el quitosano disuelto en ácido acético a un valor de pH de 4,0.	27
Figura 9. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN a las diferentes relaciones N:P, utilizando el quitosano disuelto en ácido acético a un valor de pH de 5,0.	28
Figura 10. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN ampliado a más relaciones N:P, utilizando el quitosano disuelto en ácido acético a un valor de pH de 5,5.	28
Figura 11. Promedio de tamaño de partícula y carga superficial de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN a diferentes relaciones N:P formulados con quitosano en buffer de ácido acético-acetato de sodio a pH 4,0.....	30
Figura 12. Promedio de tamaño de partícula y carga superficial de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN a diferentes relaciones N:P formulados con quitosano en buffer de ácido acético-acetato de sodio a pH 4,5.....	30

Figura 13. Promedio de tamaño de partícula y carga superficial de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN a diferentes relaciones N:P formulados con quitosano en buffer de ácido acético-acetato de sodio a pH 5,0.....	31
Figura 14. Micrografía de AFM de los complejos quitosano: ADN a una relación N:P 9:1, utilizando el quitosano en buffer de ácido acético-acetato de sodio a pH 4,0 sobre mica. ..	32
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa realizada a las muestras de complejos quitosano: ADN luego de 1h de haber sido formulados (A: control ADN plasmídico; B: Relación N:P 2:1 pH 4,0; C: Relación N:P 6:1 pH 4,0; D: Relación N:P 9:1 pH 4,0; E: Relación N:P 12:1 pH 4,0; F: Relación N:P 2:1 pH 5,5; G: Relación N:P 6:1 pH 5,5; H: Relación N:P 9:1 pH 5,5; I: Relación N:P 12:1 pH 5,5), utilizando el quitosano disuelto en ácido acético.	33
Figura 16. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa a diferentes formulaciones de quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético), después de una hora de haber sido diluidas en Opti-MEM y haber alcanzado un pH final de 6,0.	34
Figura 17. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa para la formulación 2:1 quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético). a) En medio Opti-MEM a un pH de 8 y b) a 10 mM NaCl.	35
Figura 18. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa a las formulaciones de quitosano: ADN (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio), a diferentes relaciones N:P.	36
Figura 19. Electroforesis realizada a los complejos quitosano: ADN (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio) diluidos en medio Opti-MEM a diferentes relaciones N:P.	36
Figura 21. Promedio de tamaño de partícula y carga superficial de tres muestras preparadas independientemente de las diferentes formulaciones del diseño ortogonal (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio).	39
Figura 22. Representación gráfica de la posible estructura final de un lipoquitoplejo.	40
Figura 23. Promedio de eficiencia de transfección (%) de tres muestras preparadas independientemente de cada una de las formulaciones analizadas en el citómetro de flujo a las 24h de crecimiento.	44

Figura 24. Promedio de eficiencia de transfección (%) de tres muestras preparadas independientemente de cada una de las formulaciones analizadas en el citómetro de flujo a las 48h de crecimiento.	45
Figura 25. Promedio de viabilidad celular (%) de tres muestras preparadas independientemente de cada una de las formulaciones analizadas en el citómetro de flujo a las 24h de crecimiento.	46
Figura 26. Promedio de viabilidad celular (%) de tres muestras preparadas independientemente de cada una de las formulaciones analizadas en el citómetro de flujo a las 48h de crecimiento.	47
Figura 27. Curva de calibración realizada con glicina para la determinación de aminas libres en quitosano.	65
Figura 28. Muestras de quitosano de 2 mg/mL preparadas para el análisis espectrofotométrico con ninhidrina.	65
Figura 29. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los liposomas en una relación molar DPPC:PE-PEG2000 1:1 con el fin de evaluar estabilidad en el tiempo.	67
Figura 30. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los liposomas en una relación molar DPPC:PE-PEG2000 3:1 con el fin de evaluar estabilidad en el tiempo.	68
Figura 31. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los liposomas en una relación molar DPPC:PE-PEG2000 6:1 con el fin de evaluar estabilidad en el tiempo.	68
Figura 32. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa a diferentes formulaciones de quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético) después de 24 h de haber sido diluidas en Opti-MEM y haber alcanzado un pH final de 6,0.	69
Figura 33. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa a diferentes formulaciones de quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético) después de 48 h de haber sido diluidas en Opti-MEM y haber alcanzado un pH final de 6,0.	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Objetivos generales, específicos y actividades del proyecto.	12
Cuadro 2. Diseño ortogonal planteado, elaborado y tomado como guía para cada una de las formulaciones (usando la relación N:P 9:1).	39
Cuadro 3. Análisis estadístico del diseño ortogonal sobre la variable tamaño de partícula.	41
Cuadro 4. Análisis estadístico del diseño ortogonal sobre la variable carga superficial (potencial Z).	41
Cuadro 5. Resultados obtenidos en el ensayo de ninhidrina para el quitosano de ultra bajo peso molecular.	66
Cuadro 6. Medición de los valores de pH de los complejos quitosano: ADN (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio) formulados antes y después de haber sido diluidos con Opti-MEM.	70
Cuadro 7. Cambios en el pH realizados a formulaciones quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético) diluidos en Opti-MEM para analizar su estabilidad por electroforesis.	70

LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

DLS	Dispersión Dinámica de Luz
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
N:P	Nitrógeno: Fósforo
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
DMEM	Medio Águila Modificado de Dulbecco
FBS	Suero Fetal Bovino
NPS	Nanopartículas
Opti-MEM	Medio Águila Mínimo Esencial Optimizado
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
POLIUNA	Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional
CENIBiot	Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina
PE-PEG2000	N- (carbonil-metoxipolietilenglicol 2000) -1,2- diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal sódica
nm	Nanómetros
PEG	Polietilenglicol
PEI	Poliéterimida
PE	Fosfatidiletanolamina
RES	Sistema Reticuloendotelial
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
mg	Miligramos
mL	Mililitros
°C	Grados Celsius
v/v	Volumen/volumen
HEPES	Ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico

mM	Milimolar
μm	Micrómetros
Min	Minutos
CO ₂	Dióxido de carbono
ng	Nanogramos
mV	Milivoltios
ULMW	Ultra Bajo Peso Molecular
kDa	Kilodaltons
NaCl	Cloruro de sodio
HeLa	Tipo particular de células de cultivo celular
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GelRed	Tinte fluorescente de ácidos nucleicos (buffer de carga)
IBM	International Business Machines
≤	Menor o igual
PM	Peso Molecular
h	Horas
SnCl ₂	Cloruro de estaño (II)
TBE	Tris-Borato-EDTA
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimetilamonio-propano (sal de cloruro)
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
LQPS	Lipoquitoplejos
TPP	Tripolifosfato de sodio
PDI	Índice de polidispersidad

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación y antecedentes

La investigación relacionada con el diseño de nuevos sistemas de encapsulación y liberación de fármacos o moléculas bioactivas es un tema de gran interés en la actualidad.¹

El desarrollo de vehículos transportadores de agentes bioactivos ha estado en estudio recientemente y se ha notado que los mismos pueden estar compuestos generalmente de moléculas lipídicas, materiales poliméricos, entre otros. Estos sistemas buscan mejorar la farmacocinética y biodistribución de los fármacos que vehiculizan.²

Desde el descubrimiento de los oligonucleótidos antisentido para la inhibición específica de la expresión génica y más recientemente el RNA de interferencia (siRNA), el transporte de ácidos nucleicos se ha venido empleando ampliamente para el tratamiento de diversas patologías, tales como el cáncer, enfermedades infecciosas, inflamatorias o incluso para bloquear la proliferación celular y así evitar la aparición de otras enfermedades.^{3,4} Además, los ácidos nucleicos ofrecen alternativas únicas para la actividad terapéutica en sitios previamente intratables, tales como factores de transcripción activando o desactivando la expresión de grupos completos de genes. Por otro lado, la inclusión de ácidos nucleicos puede ser utilizada para incorporar funciones deseadas en el sistema diana (terapia génica).⁵

No obstante, la administración de genes de una manera segura y eficiente ha sido un obstáculo para la terapia génica humana. Los agentes de administración sintéticos de genes, aunque son más seguros que los virus recombinantes, generalmente no poseen la eficacia requerida.⁶

Recientemente, las estrategias de liberación de genes incluyen, sistemas de administración basados en métodos físicos, vectores virales y vectores no virales.⁷ Se ha visto que a nivel general, las eficiencias de transfección logradas con vectores virales son mayores en comparación con las obtenidas con métodos no virales, sin embargo, los vectores no virales no presentan ciertos efectos secundarios importantes encontradas en los virales, tales como su alta inmunogenicidad y citotoxicidad. Asimismo, otra de las desventajas del uso de vectores virales es que se ha observado la generación del fenómeno conocido como

mutagénesis por inserción. Por otro lado, debido a su patogenicidad reducida demostrada, menor inmunogenicidad, bajo costo, facilidad de producción y bioseguridad, los vectores no virales poseen una importante ventaja sobre los virales.⁸

En este contexto, la terapia génica no viral es la administración de ADN o ácido ribonucleico (ARN) plasmídico codificando un gen local o sistémicamente produciendo o eliminando la expresión de una proteína, empleando un sistema de administración constituido por liposomas o por materiales poliméricos.^{9,7} En particular, durante los últimos años se ha utilizado dicha técnica para el tratamiento de diversas enfermedades como diabetes¹⁰, enfermedades neurológicas¹¹, cáncer¹², ente otras.

Por tanto, la motivación de este estudio se centra en el uso de quitosano como acomplejante y encapsulante de las macromoléculas de ácidos nucleicos. Dado a las propiedades catiónicas del quitosano, así como las características biodegradables y biocompatibles, lo hacen un material adecuado y atractivo para su uso en la formulación de sistemas que puedan ser usados en medicina, farmacia y en la formulación de productos cosméticos.¹³ A la vez, tomando en cuenta la posibilidad de interacción con moléculas aniónicas, se pretende realizar un recubrimiento a base de fosfolípidos con el fin de aumentar la efectividad del encapsulado y su liberación. Este trabajo final de graduación se enmarca en el proyecto “Aplicación de la nanobiotecnología para el desarrollo de sistemas de transporte Carrier-in-a-Carrier para la transfección de ácidos nucleicos”. Se pretende con este trabajo unir los esfuerzos de dos grupos de investigación, como lo son el POLIUNA y el CENIBiot para la elaboración de un transportador de genes que en un futuro permita el tratamiento eficaz contra alguna o varias enfermedades.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Sistemas nanotransportadores de compuestos bioactivos

Un campo de potencial interés es el desarrollo de vehículos para el encapsulamiento y liberación de ácidos nucleicos. La molécula de ADN no solamente ha sido la base para el entendimiento de la vida humana, sino que recientemente con la terapia génica ha sido de gran interés incluyendo en investigaciones plásmidos que contienen transgenes, oligonucleótidos para aplicaciones antisentido y antigénicas, ribozimas, ADNzimas, aptámeros y RNA de interferencia. A pesar de que estas clases de compuestos han sido investigados y parecen ser promisorios para el tratamiento de un amplio rango de enfermedades tales como el cáncer, SIDA, Parkinson, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares, aún no se encuentra la manera de aumentar su captación celular, disminuir su rápida degradación *in vivo*. Por lo anteriormente dicho, se requiere de un sistema de administración que pueda facilitar la internalización celular y preservar la actividad del compuesto activo.¹⁴

El uso de nanoportadores como vehículo de liberación se ha convertido en una herramienta fuerte en el área de la biotecnología para el transporte de moléculas bioactivas hasta su sitio diana, ya sea de forma directa (*in vivo*) en la que la modificación genética de la célula es en el interior del organismo o indirecta (*ex vivo*) cuando la manipulación genética ocurre fuera del organismo, en un tubo de ensayo.^{15,16}

La reciente investigación en el área de la nanobiotecnología ha proporcionado numerosos avances básicos y aplicados en el sector de la salud. Los nanotransportadores o nanoportadores se han desarrollado para la administración de fármacos o como herramientas de diagnóstico eficientes. Esto ya que los mismos permiten una interacción biomolecular dirigida y efectiva para reducir los posibles efectos secundarios causados durante el tratamiento.

Actualmente existen diferentes métodos para la introducción de material genético: técnicas eléctricas, transfección mecánica y sistema de liberación asistidos por vectores. Entre las técnicas eléctricas y mecánicas se encuentran la microinyección,¹⁷ bombardeo de partículas,¹⁸ el uso de presión¹⁸ y la electroporación.¹⁹ Sin embargo, son técnicas que podrían resultar invasivas, destructivas y producir efectos secundarios considerables en el paciente.

Es por esto por lo que el sistema asistido por vectores ha sido el mayormente investigado durante los últimos años. Entre las propiedades ideales a tener en un sistema para la administración o entrega de ADN con fines terapéuticos están una alta eficiencia de transfección con una alta especificidad en células diana, baja citotoxicidad e inmunogenicidad, biodegradabilidad y estabilidad de la formulación, además de ser un sistema simple de formular y de fácil modificación para la personalización en la administración, entrega y expresión del ADN.¹⁴ Los nanotransportadores son en general nanopartículas coloidales ampliamente utilizadas para el transporte de un agente terapéutico o cualquier otra sustancia hacia un sitio objetivo en específico.^{20,21} Entre los diferentes nanotransportadores usados para esta aplicación se encuentran los nanoportadores orgánicos tales como: los nanotransportadores de lípidos sólidos, liposomas, dendrímeros, nanopartículas poliméricas y micelas. Así como también nanoportadores inorgánicos tales como: nanotubos de carbono, nanopartículas de oro, nanopartículas magnéticas, puntos cuánticos y sílice mesoporosa. Además, se han estudiado también sistemas híbridos en los cuales se pueden mezclar dos o más tipos de nanoportadores.²⁰

No obstante, los sistemas de administración se puede clasificar en dos grandes grupos, los sistemas de administración asistidos por vectores virales y los asistidos por vectores no virales.¹⁴ A pesar de que se ha visto que los vectores virales logran altas eficiencias de transfección incluso en tipos de células difíciles de transfectar,²² también generan efectos secundarios, debido a la toxicidad del virus y siendo así de alto potencial en la generación de fuertes respuestas inmunes debido a su cápside proteica.^{23,24}

2.2 Transportadores virales y no virales de genes

El desarrollo de medicamentos ha incluido una estrecha interacción de varios campos como la biología, la química y la farmacología para diseñar medicamentos de alta eficiencia. Durante los últimos 10 años, se han diseñado varios vectores virales y no virales para mejorar la administración de genes y fármacos. Sin embargo, a la hora de la elaborar un sistema eficiente de liberación de genes se deben tomar varios aspectos clave como lo son: i) el tipo de transportador que se desea y su composición química; ii) posible interacción del vehículo con los componentes del suero sanguíneo; iii) su tiempo de circulación en el cuerpo y su biodistribución; iv) su escape de las células del sistema inmune y de los macrófagos; v) su

interacción con la superficie de la célula; vi) su activación de vías de apoptosis; vii) su penetración a través de la membrana plasmática; viii) su liberación desde los endosomas ix) su entrada al núcleo; x) persistencia del mismo en el núcleo, entre otros aspectos a tomar en cuenta.²⁵

2.2.1 Transportadores virales

Con el paso de los años los virus han desarrollado diversos mecanismos de entrada a las células, de preservación prolongada de su propio material genético dentro de las mismas, así como también varios mecanismos de supresión o modificación de los mecanismos de protección en el organismo huésped. La genética inversa se viene desarrollando desde aproximadamente 40 años. Para la mayoría de los virus, se pueden generar variantes recombinantes y la mayoría de ellos se han considerado como posibles vectores para la terapia génica.²⁶

Aunque en la actualidad solamente se utilizan pocos sistemas de administración viral, uno de los sistemas más exitosos para la entrega de fármacos en terapia génica disponibles en la actualidad son los vectores virales como los retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus de la viruela, virus espumoso humano, y lentivirus. Para esto, todos los genomas de los dichos vectores virales son modificados eliminando algunas áreas de sus genomas de manera que su replicación se altere y los haga más seguros, sin embargo, los sistemas de transportadores virales presentan algunos problemas tales como su marcada inmunogenicidad que provoca la inducción del sistema inflamatorio conduciendo a la degeneración de las células transducidas y producción de toxinas resultando en mortalidad, mutagénesis por inserción y limitación en su capacidad transgénica.²⁷

Uno de los mayores problemas que han surgido con el uso de vectores virales para la terapia génica ha sido su ineficacia, estos al ser usados como vehículos no persistían en las células huésped lo que hacía que la expresión del gen de interés fuera en la mayoría de los casos de corta duración. No obstante, no solamente este tipo de situaciones se veían evidenciadas, sino que también otro tipo de resultados no deseados eran obtenidos, tales como reacciones adversas al tratamiento. En 1999 un paciente que fue tratado haciendo uso de un vector viral del tipo adenovirus, presentó síntomas de fiebre alta, daño hepático e incluso coagulación intravascular diseminada lo que lo llevó tiempo después incluso hasta la muerte, todo esto debido a una respuesta inflamatoria masiva que provocó una falla

multiorgánica.²⁸⁻³⁰ Un año después, se obtuvo por primera vez éxito en el tratamiento por terapia génica de 3 niños con un trastorno de inmunodeficiencia fatal haciendo uso de vectores virales, sin embargo este mismo tratamiento fue aplicado en otros pacientes, de los cuales algunos no obtuvieron resultados satisfactorios, desarrollando una enfermedad similar a la leucemia.²⁸ Por estos y otras evidencias en los últimos años la terapia génica viral queda en segundo plano como última opción para el tratamiento de enfermedades genéticas.

2.2.2 Transportadores no virales

Los vehículos de liberación de genes no virales han sido reportados en la literatura, y se basan generalmente en lípidos y polímeros catiónicos. Los vehículos de administración catiónica interactúan electrostáticamente con la membrana celular e imitan efectivamente los vectores virales al entrar a través de varias vías de captación celular, dependiendo de sus formulaciones.³¹

Uno de los nanotransportadores o nanopartículas no virales más investigadas que actualmente ya se utilizan en el ámbito clínico son los liposomas (con tamaños entre los 20 nm y 1 μ m).^{32,33}

2.2.2.1 Vehículos de base polimérica

Los polímeros o partículas poliméricas son otro tipo de nanotransportador no viral estudiado recientemente con los cuales se forma un nanosistema de conjugado polímero-fármaco que sirve para la administración de fármacos donde varias moléculas del fármaco se unen covalente o electrostáticamente al polímero. Entre los polímeros más estudiados para este fin se encuentran el polietilenglicol (PEG), la poliéterimida (PEI), el dextrano, la dextrina y el quitosano.^{34,35}

El quitosano es un polímero derivado del biopolímero de quitina, un polisacárido natural muy abundante, que se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos como el cangrejo y el camarón. Químicamente el quitosano es un copolímero de la unión de β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosas y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosas (figura 1). Este es soluble en disoluciones acuosas ácidas (pH < 6,0), donde los grupos amino primarios en las unidades monoméricas de glucosamina se cargan al ser sensibles al pH.³⁶

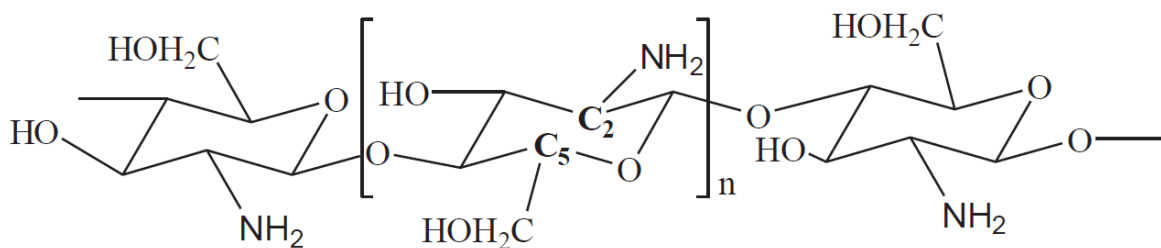


Figura 1. Estructura química del quitosano.³⁷

El valor de la pKa de los grupos amino de las unidades de D-glucosamina tiende a 6,5 cuando el grado de desacetilación es superior al 75%, lo que origina que el quitosano experimente una transición de líquido a gel en medios acuosos.^{38,39}

Debido a sus características únicas de biodegradabilidad, biocompatibilidad, bioadhesión y carácter no tóxico, las partículas de quitosano son usadas en sistemas de liberación de fármacos, nanofibras, biosensores y películas comestibles.^{40,41} Además, con respecto a su actividad biológica, el quitosano provee grandes beneficios, se ha reportado que el mismo posee la capacidad de mejorar la resistencia a las infecciones virales en las plantas, inhibir las infecciones virales en las células animales o prevenir las infecciones por medio de fagos en cultivos bacterianos, asimismo este es conocido como un potenciador inmunológico.^{42,43}

Lee y colaboradores sintetizaron un quitosano hidrofóticamente modificado mediante una reacción de acoplamiento. Las moléculas de dicho polímero se autoagregan y forman partículas de tamaño nanométrico que al interactuar con las moléculas de ADN forman complejos. Dichos complejos retienen el escape del ácido nucleico hacia el entorno y logran una transfección en células mamíferas *in vitro* convirtiéndolo en un potencial sistema de liberación *in vivo*.⁴⁴

Los dendrímeros son macromoléculas sintéticas ramificadas pequeñas (entre 1-20 nm de diámetro) con un núcleo rodeado por múltiples capas con grupos terminales superficiales activos, las múltiples cavidades hidrófobas o hidrófilas que se forman en el interior de la estructura tridimensional del dendrímero son adecuadas para el encapsulamiento de moléculas.⁴⁵

2.2.2.2 Vehículos de base lipídica

Los liposomas, son vesículas compuestas por fosfolípidos organizados en bicapas, poseen una fase acuosa interna y están suspendidas en una fase acuosa externa. Estos sistemas pueden encapsular en su estructura moléculas o compuestos activos de carácter hidrosoluble, liposoluble o anfifílicos, ya sea de forma conjunta o separada. Son de gran ayuda como protectores y transportadores de sustancias y compuestos activos que presentan problemas de solubilidad o son sensibles a factores físicos, químicos, degradativos y de desactivación (sistema inmunológico). Además, presentan biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad.^{31,46,47}

Los lípidos son biomoléculas insolubles en agua, pero que presentan gran solubilidad en disolventes orgánicos como el cloroformo. Estos tienen cuatro diferentes funciones biológicas: sirven como moléculas comestibles, como almacenes de energía altamente concentrada, como moléculas señal o moléculas guía y como componentes de las membranas celulares. Los tres tipos principales de lípidos de la membrana celular son los glicolípidos, el colesterol y los fosfolípidos. De estos tres, los fosfolípidos son los lípidos más importantes de las membranas, ya que son muy abundantes en todas las membranas biológicas. Una molécula de fosfolípido está constituida básicamente por cuatro componentes: ácidos grasos, un esqueleto de glicerol al que se unen los ácidos grasos, un grupo fosfato y un grupo alcohol unido al fosfato. La función de los ácidos grasos es generar una barrera hidrofóbica, mientras que la función del resto de la molécula es proporcionar propiedades hidrofílicas de modo que le permita a la molécula interactuar con el entorno.⁴⁸

La formulación liposomal que contiene fosfolípidos (por ejemplo, DPPC, cuya estructura se muestra en la figura 2) ofrece espacio para la optimización en términos de carga superficial y estabilidad mecánica que tienen un efecto significativo en la transfección.^{31,49,50} Además, se ha reportado que este mismo fosfolípido es termosensitivo, cuya temperatura de transición de fase es de 41°C, haciéndolo útil para una liberación controlada del compuesto activo en el sitio diana.⁵¹

Lenzo y colaboradores⁵² estudiaron el comportamiento *in vivo* de las emulsiones utilizando diferentes fosfolípidos: EPC, DOPC, DMPC, DPPC y 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) como emulsionante. En ese estudio, las emulsiones se prepararon en un tamaño de aproximadamente 150 nm, y la tasa de eliminación en plasma

de rata dependió principalmente de los tipos de fosfolípidos. Cuando estas emulsiones se inyectaron en la sangre de ratas conscientes, la tasa de eliminación de formulaciones utilizando DPPC como emulsionante fue la más lenta, lo que confiere una mayor biodisponibilidad a la formulación.

El estudio de un lípido sintético que puede extender los tiempos de circulación finalmente da lugar al desarrollo de bicapas de injerto de polímero en el fosfolípido. Varios lípidos poliméricos conducen a tiempos de circulación prolongados, pero los más bien estudiados son los que consisten en PEG injertado en fosfatidiletanolamina (PE). Un ejemplo de este tipo de moléculas se muestra en la figura 2.^{51,53}

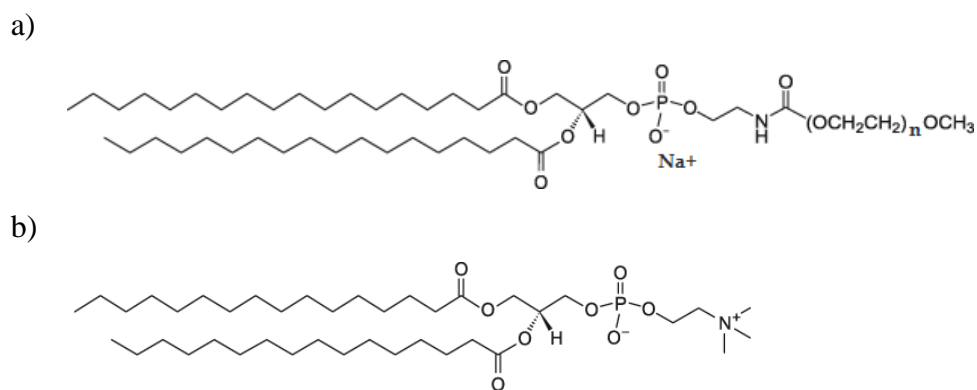


Figura 2. Estructuras químicas de los fosfolípidos a) PE-PEG2000 y b) DPPC.⁵⁴

Ciani y colaboradores realizaron un estudio en el cual liposomas con carga superficial de +48 mV fueron sintetizados haciendo uso de un fosfolípido de naturaleza zwitterión (DOPE) y otro catiónico (DOTAP) con el fin de formar complejos lípido-ADN o “lipoplejos” con tamaños menores a los 800 nm con posible potencial en transfección.⁵⁵ Por otro lado, en la investigación realizada por Pierrat y compañeros se sintetiza un vector no viral al conjugar el fosfolípido DOPC con polietilenglicol, que puede entregar ADN de manera eficiente a las células diana, formando un complejo con el mismo y liberándolo con una toxicidad mínima.⁵⁶

Para aumentar la estabilidad de los liposomas, estos se pueden recubrir con polímeros. Por ejemplo, el recubrimiento con polietilenglicol ha permitido a los liposomas alcanzar tiempos de circulación estables, además de esta manera son acumulados selectivamente en

los sitios objetivos a través del efecto potenciado de permeación y retención, y tienen una mejor eficacia terapéutica. Por otra parte, la disminución de la carga superficial por el polietilenglicol también puede mejorar la vida media y la biodisponibilidad en el sitio de destino, y puede reducir los efectos secundarios.⁵⁷

Por otra parte, se sabe que los lípidos modificados con PEG se agregan usualmente a las formulaciones de vesículas con fosfolípidos usadas para la administración de fármacos para proporcionar un recubrimiento estérico en la superficie y de esta manera impedir la eliminación de las partículas por el sistema reticuloendotelial (RES). Esto prolonga la vida media plasmática circulante de la droga. La vida media plasmática del fármaco se puede ajustar o sintonizar desde varias horas hasta días, dependiendo del tamaño del PEG y los ácidos grasos unidos al anclaje lipídico.^{58,59}

Por tanto, para este estudio se utilizarán dos fosfolípidos en específico para la formación de los liposomas: DPPC y PE-PEG2000.

Otro tipo de nanotransportadores no virales estudiados similar a los liposomas son las micelas, las cuales poseen tamaños menores, aproximadamente entre los 10 y 100 nm de diámetro.^{60,61} Las micelas son dispersiones coloidales que consisten en moléculas tensoactivas anfifílicas discretas o polímeros anfifílicos que se agregan espontáneamente cuando están en agua, formando una estructura esférica con un núcleo hidrofóbico que tiene la capacidad de encapsular moléculas hidrofóbicas.⁶²

Las nanopartículas de lípidos sólidos son dispersiones coloidales compuestas por lípidos sólidos como ceras, ácidos grasos o glicéridos estabilizados por tensoactivos. En dichas nanopartículas el fármaco puede quedar atrapado dentro de la matriz lipídica, encapsulado o adsorbido a la superficie de las partículas preparado para ser liberado posteriormente dentro de las células diana.³⁴

Finalmente, también se pueden encontrar otras nanopartículas que sirvan como nanotransportadores no virales de biomoléculas activas tales como puntos cuánticos, niosomas y nanotubos de carbono.^{34,63}

2.3 Citometría de Flujo

La citometría es el proceso en el cual las características físicas y/o químicas de cada una de las células o partículas, de tamaños similares, son medidas.⁶⁴

La citometría de flujo es una técnica biofísica que permite analizar y cuantificar simultáneamente varias características celulares, donde las células son transportadas por medio de un fluido y que generan una señal al interferir con un haz de luz, todo esto haciendo uso de un citómetro de flujo. Este último, mide el tamaño, la granulosidad y la fluorescencia relativa de cada una de las células usando un sistema óptico en conjunto con uno electrónico que registra la forma en la que cada célula dispersa el haz de luz y emite fluorescencia.⁶⁵

La transfección de plásmidos es el primer paso en la generación de células eucariotas establemente transformadas, además es una herramienta útil utilizada para evaluar la expresión génica. En términos de transfección celular, con el fin de monitorear y maximizar la eficiencia de la transfección y el nivel de expresión del plásmido introducido, se utiliza frecuentemente un vector de tipo plasmídico que expresa la proteína de fluorescencia verde (GFP) en conjunto con la citometría de flujo, obteniéndose la información deseada de manera rápida y eficiente al tratarse de una técnica de alta sensibilidad y que permite la medición de varias muestras de manera simultánea.⁶⁶ La técnica de citometría de flujo ha sido ampliamente utilizada durante los últimos años en estudios de terapia génica, como ejemplo de ello, se puede observar el trabajo realizado por Homann y colaboradores, en el cual se desarrolló un método de citometría de flujo confiable, reproducible, simple y rápido para potencialmente optimizar la eficiencia de transfección.⁶⁷

CAPÍTULO III: OBJETIVOS

Cuadro 1. Objetivos generales, específicos y actividades del proyecto.

Objetivo general	
Estudiar el comportamiento físico-químico en nanotransportadores de ácidos nucleicos a base de complejos polímero-fosfolípidos, su viabilidad celular y eficiencia de transfección en células cancerosas.	
Objetivos específicos	Actividades
1. Formular nanotransportadores a base de complejos de polímeros hidrofílicos con vesículas fosfolipídicas.	<ul style="list-style-type: none"> • Determinar la concentración de quitosano adecuada para lograr la formación del complejo. • Determinar las condiciones de pH, tamaño de partícula y carga superficial de las partículas de quitosano usadas para la formación del complejo. • Formular los nanotransportadores estables a base de los complejos de quitosano con vesículas fosfolipídicas.
2. Caracterizar estructuralmente los complejos polímero-fosfolípidos con ácidos nucleicos.	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterizar las formulaciones por Dispersión de Luz Dinámica (DLS), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). • Evaluar la estabilidad en función del tiempo de las diferentes formulaciones. • Evaluar el efecto de los diferentes componentes de las formulaciones sobre sus características finales.
3. Evaluar la viabilidad celular y eficiencia de transfección en células cancerosas de los complejos formulados.	<ul style="list-style-type: none"> • Encapsular el agente terapéutico en los nanotransportadores. • Evaluar la viabilidad celular de los complejos en células cancerosas. • Evaluar la eficiencia de transfección de los complejos en células cancerosas.

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Materiales

Los fosfolípidos N- (Carbonil-metoxipolietilenglicol 2000) -1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal sódica (PE 18:0/18:0-PEG 2000) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) fueron proporcionados por Lipoid. El quitosano de ultra bajo peso molecular fue obtenido de Glentham Life Sciences (PM de 20 kDa y grado de desacetilación del 90%). El ADN de tipo plasmídico con GFP (PM de $4,912 \times 10^3$ kDa) fue proporcionado por la empresa Speratum. Las células HeLa (ATCC® CCL-2™) fueron obtenidas por la empresa American Type Culture Collection (ATCC), la Lipofectamina® 3000, Tripsina, Agarosa, solución tampón salina de fosfato (PBS), el AlamarBlue, TBE, 2-propanol y los medios DMEM y Opti-MEM, fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific. El HEPES ($\geq 99.5\%$), ácido cítrico (99%), cloruro de estaño (II) dihidrato, ácido clorhídrico (37%), la ninhidrina y doxorrubicina (98.0-100.0%) fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich. El GelRed de la empresa Biotium. La glicina ($\geq 99.5\%$), el cloroformo, acetato de sodio y cloruro de sodio fueron adquiridos de J.T Baker. El dietilenglicol monoetil éter, ácido acético glacial (100%) y metanol fueron adquiridos de Merck. El hidróxido de sodio en pellets se obtuvo de Macron Chemical.

4.2 Preparación y caracterización de las disoluciones de quitosano

Una disolución de quitosano 0,5 mg/mL se preparó disolviendo el quitosano de ultra bajo peso molecular en una disolución amortiguadora de ácido acético y acetato de sodio (0,2M). Simultáneamente, otra disolución de quitosano fue preparada a la misma concentración en una disolución de ácido acético diluida. Ambas mezclas se dejaron agitando durante toda la noche a temperatura ambiente, posteriormente se esterilizaron en una autoclave y se almacenaron a 4 °C aproximadamente para su uso posterior. El tamaño de partícula y la carga superficial fue caracterizada mediante la técnica de DLS en un Zetasizer (Malvern Instruments, Nano-ZS90). Para la determinación del tamaño hidrodinámico, cada medición se realizó con un ángulo de 90 °C utilizando un láser de He-Ne y a una temperatura

de 25 °C. Además, cada una se realizó cinco veces con un mínimo de cinco corridas, cada una con una duración de 5s.

El número de aminas libres presentes en el quitosano se determinó por medio del método de ninhidrina.⁶⁸ Este método consiste en la reacción que se lleva a cabo entre aminas primarias y ninhidrina a pH 5,0 y a 100°C que resulta en compuestos de color púrpura detectables a 570 nm. Para esto se preparó una disolución madre de glicina 2 mM de la cual se obtuvieron por dilución concentraciones: 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, y 2.0 mM de esta para realizar una curva de calibración (anexos, figura 27), así como también un blanco. A 50µL de la muestra y estándares se les agregó 0,175 mL de la disolución de ninhidrina-buffer de citrato-SnCl₂ y se calentó a 100 °C por 20 minutos en un baño de agua. Luego de enfriarse a temperatura ambiente se añadió 1,25 mL de disolvente (2-propanol), se agitó por un minuto y se dejó reposar por 15 min desde que se sacó la muestra del baño maría. Finalmente se leyó la absorbancia de cada muestra (anexos, figura 28) a 570 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Evolution™ 220).

4.3 Preparación y caracterización de las vesículas liposomales

Se siguió la metodología descrita por Baghdan y colaboradores para la elaboración de los liposomas.³¹

Los liposomas fueron preparados añadiendo los fosfolípidos DPPC y PE-PEG2000 a diferentes relaciones molares (1:1, 3:1 y 6:1 DPPC:PE-PEG2000) y se disolvieron en una mezcla de cloroformo: metanol 2:1 (v/v) usando un balón de fondo redondo de 50 mL. Por medio de un evaporador rotatorio (R-200, Büchi) se logró evaporar a 40°C el disolvente para obtener una película fosfolipídica delgada.

Luego, se añadió una disolución amortiguadora de HEPES 10 mM (pH 7,4) a la película obtenida y se dejó agitando durante una noche. Posteriormente, se homogenizó la suspensión obtenida mediante el uso de un sonicador (Misonix S-4000).

Se utilizó un miniextrusor (Avestin, Liposofast) para la reducción de diámetros de partículas. Este proceso consiste en hacer pasar a bajas presiones los liposomas a través de un filtro de policarbonato con cierto tamaño de poro (generalmente de los 100 a los 200 nm) varias veces de manera secuencial hasta obtener una distribución de tamaños razonablemente homogénea que rondará el tamaño del poro del filtro utilizado.⁶⁹ Seguidamente la suspensión

se extruyó (21 veces) a través de membranas de policarbonato de 100 nm usando el miniextrusor. Las vesículas fueron analizadas en términos de tamaño de partícula y carga superficial mediante la técnica de DLS y AFM.

Para complementar los análisis de caracterización de los liposomas, se empleó la técnica de TEM haciendo uso de un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi, H-7100). Se tomaron alrededor de 200 μL de muestra, añadiéndose a la rejilla de cobre, secándose a temperatura ambiente la misma y tomando la micrografía a un voltaje de aceleración de 100 kV.

4.4 Preparación de nanopartículas de quitosano-ácido nucleico

Se siguió la metodología descrita por Bravo-Anaya y colaboradores para este apartado.⁷⁰ Una disolución de quitosano previamente preparada a una concentración de 0,5 mg/mL se filtró utilizando un filtro de jeringa de 0,5 μm . Para optimizar el completo acomplejamiento del ácido nucleico se realizaron diferentes formulaciones con diferentes relaciones nitrógeno: fósforo (N:P), agregando mediante micropipeta volúmenes de la disolución de quitosano sobre la disolución del ácido nucleico. Posteriormente la mezcla se agitó vigorosamente haciendo uso de un vórtex y se dejó incubando estáticamente a temperatura ambiente por 30 min.

Con el fin de evaluar la estabilidad de los complejos y su capacidad de retención del ácido nucleico se analizaron los complejos quitosano: ADN por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la preparación del gel se adicionó 1g de agarosa en 100 mL de buffer TBE 1X, luego se calentó la mezcla usando un horno microondas para lograr una disolución homogénea. Seguidamente se adicionó cuidadosamente en la bandeja y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se colocaron las muestras con buffer de carga (GelRed) en cada uno de los pozos y se corrió el gel a 100 volts por una hora. Para observar el avance de las muestras en el gel se utilizó un transiluminador (SlimlineTM, Spectroline). Además, se realizaron varias formulaciones a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) con el fin de observar el comportamiento o estabilidad de los complejos en presencia de un medio salino. Igualmente haciendo uso de disoluciones previamente preparadas de ácido clorhídrico (0,1M) e hidróxido de sodio (0,1M) se

modificaron los valores de pH de algunas formulaciones con el objetivo de observar su estabilidad.

4.5 Preparación de partículas de quitosano/ácido nucleico/fosfolípidos (Lipoquitoplejos)

La formulación de lipoquitoplejos (LQPS) se llevó a cabo basado en la metodología descrita por Baghdan y colaboradores.³¹ La suspensión de vesículas liposomales filtradas y esterilizadas con un filtro 0,22 μm se adicionaron al complejo quitosano-ácido nucleico y se mezcló vigorosamente con el uso de un vórtex. Para optimizar la formulación de las nanopartículas del complejo final, diferentes relaciones molares PE-PEG2000: ADN y DPPC:PE-PEG2000 fueron evaluadas. Finalmente, la mezcla se incubó estáticamente durante una hora a temperatura ambiente.

Para el ajuste del tamaño y la morfología de las nanoestructuras (lipoquitoplejos), se realizó un diseño experimental (ortogonal) basado en el método de Taguchi, pudiendo así estudiar los diferentes factores e interacciones que pueden afectar la formulación dentro de un número razonable de ensayos.^{71,72} Este método es una combinación de técnicas matemáticas y estadísticas incorporadas en un estudio empírico⁷², y se ha aplicado previamente a otras investigaciones como el desarrollo de fármacos y biosensores.^{71,73,74} La serie de ensayos que se establecieron tienen como objetivo determinar la combinación óptima de los parámetros que tienen mayor influencia en el rendimiento y la menor variación del objetivo del diseño.⁷⁵ Con la información recolectada se espera determinar el impacto de cada variable sobre las propiedades físicas de los agregados, que indirectamente afectan los resultados obtenidos en los ensayos biológicos.^{76,77}

4.6 Caracterización de las partículas formuladas

La caracterización del tamaño y carga superficial de las partículas formuladas se realizó por medio de la técnica de DLS y AFM. Los resultados fueron complementados por medio de la técnica de TEM.

Para la toma de las micrografías por AFM primeramente se exfolió la superficie de mica donde se agrega la muestra, es decir, se le desprendió una capa superficial para aplanarla, usando cinta. Luego se extrajo 20 μL de la muestra y se depositaron sobre la mica.

Para fijar la muestra se utilizó nitrógeno gaseoso que se aplicó aproximadamente a 60° de la superficie para así poder eliminar los excedentes de líquido. Una vez fijada la muestra se colocó en el Microscopio de Fuerza Atómica (Park Systems, Park NX10) para la toma de datos. Finalmente, la misma se realizó en modo “no contacto”, utilizando dos tipos de puntas (PPP-NCHR y AC160TS).

4.7 Evaluación de la viabilidad celular de los complejos

La evaluación de la viabilidad celular se realizó tomando como base el método descrito por Zamora-Mora y colaboradores, en el cual se utiliza AlamarBlue como reactivo de ensayo de viabilidad celular, el cual contiene resazurina, un indicador redox fluorescente permeable a la membrana celular.⁷⁸ Para esto, se utilizó la línea celular de cáncer HeLa, manteniendo las células por pasajes continuos o congeladas a -80 ° C. Las células se sembraron a una densidad de 12 500 células por pozo en placas de 96 pocillos de fondo transparente y paredes oscuras para fluorescencia y se incubaron por 24 h en un ambiente controlado de humedad, temperatura, y dióxido de carbono (CO₂) en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10%. Finalizado el tiempo de incubación se eliminó el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS para luego agregar las nanoestructuras en una concentración que contenga 800 ng de ácido nucleico/pozo en el medio Opti-MEM y se incubaron las células por 24 h. Para el ensayo se realizaron dos controles con un fin comparativo, los controles realizados fueron Doxorrubicina como control negativo y Lipofectamina como control positivo. A las 24 h posteriores a la adición de los ácidos nucleicos se removió el medio de cultivo (Opti-MEM), se realizó un lavado con PBS y se agregó el medio de crecimiento DMEM con 10% de FBS. Se dejó incubando por un período de 24 y 48h. Pasado el tiempo de incubación se agregó el AlamarBlue, se incubó por 2h a 37 °C y después se procedió a realizar la medición de fluorescencia en el lector de microplacas (Synergy H1, Bio Tek) según las instrucciones del fabricante de la sal de resazurina (AlamarBlue). Los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad celular promedio usando un control negativo de células HeLa sin tratar y como blanco el medio de cultivo con reactivo de AlamarBlue sin células con que interaccionar. Las pruebas se realizaron para tres muestras preparadas independientemente de cada formulación.

4.8 Evaluación de la eficiencia de transfección de los complejos

La evaluación de la eficiencia de transfección se realizó tomando como base el método descrito por Huang y compañeros.⁷⁹ Se sembraron 12 500 células HeLa por pocillo en una placa de 96 pocillos en DMEM con 10% FBS y se incubaron por 24 h con el objetivo de obtener una confluencia del 80% al día siguiente. Finalizado el tiempo de incubación se eliminó el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS para luego agregar las formulaciones de tal manera que cada pocillo contenga 800 ng de ADN en el medio Opti-MEM. Para los ensayos se realizó un control positivo de Lipofectamina con un fin comparativo. Una vez agregadas las formulaciones se dejaron en contacto las nanopartículas con las células por un período de 24h como espacio para que se pueda efectuar la transfección. Pasadas las 24h de transfección se removió el medio de cultivo (Opti-MEM), se realizó un lavado con PBS y se agregó el medio de crecimiento DMEM con 10% de FBS. Se dejó incubando por un período de 24 y 48h. Pasado el tiempo de incubación se procedió a remover el medio de cultivo de crecimiento y desprender las células con Tripsina. Finalmente se lee la placa de 96 pocillos utilizando un citómetro de flujo (Guava® easyCyte™ HT) que realiza el conteo de células de acuerdo con la fluorescencia emitida. Para la medición de cada muestra se recolectaron un total de 10000 eventos, el flujo utilizado fue de 0,59 $\mu\text{L/s}$ con un tiempo de adquisición máximo de 210 s y a una temperatura de 22 °C. El equipo graficó automáticamente los datos para luego ser analizados y obtener la eficiencia de transfección de cada muestra, todo esto fue posible con el software del equipo. Las pruebas se realizaron para tres muestras preparadas independientemente de cada formulación.

CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Preparación y caracterización de las suspensiones liposomales

Se formularon diferentes relaciones de los fosfolípidos DPPC y PE-PEG2000 y se caracterizaron en cuanto a tamaño y carga superficial.

Todas las dispersiones se prepararon en HEPES como solución tampón con el fin de simular el pH fisiológico (pH 7,0-7,4) a una concentración de 10 mM.^{80,81}

En la figura 3 se presentan los resultados de tamaño y potencial zeta de las diferentes dispersiones fosfolipídicas dispersadas en HEPES.

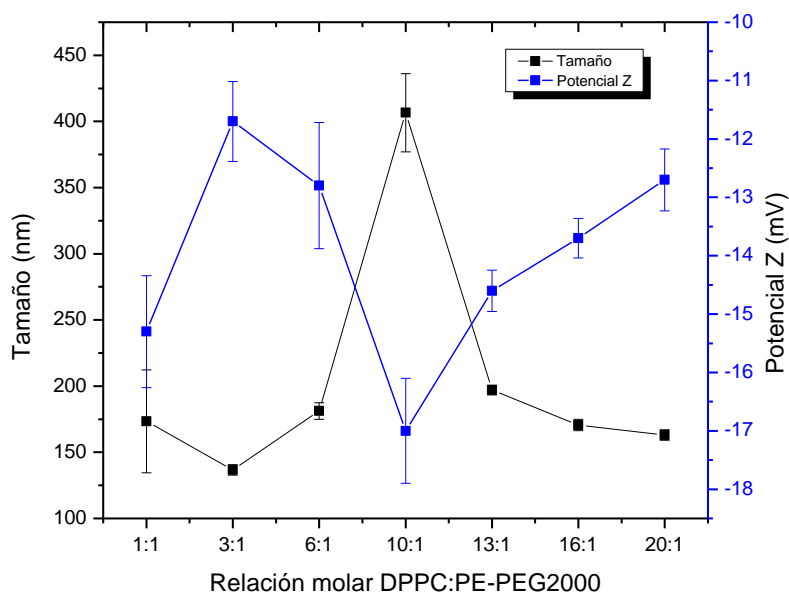


Figura 3. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los liposomas a diferentes relaciones molares DPPC: PE-PEG2000.

Nótese que, la relación 1:1 mostró una polidispersidad mayor entre sus tres mediciones a la del resto de las formulaciones, la cual puede explicarse en términos de una mayor proporción de PE-PEG2000 que contribuye con la introducción de grupos voluminosos induciendo posiblemente la variación de la forma y del tamaño del liposoma. Este comportamiento ha sido observado por otros investigadores, tal como Li y compañeros donde sugieren que la estructura física y propiedades los liposomas puede ser afectada de

acuerdo con la concentración de “PE-PEG” al interno de la formulación, ya que los fosfolípidos compuestos por esta estructura tienden a tener una forma de cuña.⁸² De tal manera, la polidispersidad también puede relacionarse por la presencia de distintas morfologías de liposoma, la cual podría depender del contenido de PE-PEG2000 presente en la formulación.

Como se puede observar la mayoría de las formulaciones mantienen un tamaño relativamente constante, dentro del intervalo de 100 a 200 nm. Sin embargo, la formulación de liposomas con la relación molar DPPC:PE-PEG2000 10:1 obtuvo un tamaño que supera los 400 nm (PDI de 0,336), desviándose completamente de la tendencia resultante; esto podría explicarse debido a un particular autoensamblado o a la agregación de los liposomas a esta relación, producto de las interacciones entre los extremos polares de los fosfolípidos. Claramente, la interacción a esta proporción induce la formación de agregados de mayor tamaño y polidispersidad, los cuales se podrían evidenciar por la desviación de los resultados de potencial zeta.

En particular, el potencial zeta, depende de la naturaleza de la suspensión, las propiedades fisicoquímicas de las partículas como tamaño, concentración, composición y morfología.⁸³ Los potenciales Z obtenidos para las formulaciones de los distintos liposomas se mantuvieron relativamente constantes dentro de un intervalo negativo (-11 a -16 mV). El aumento en la proporción molar del fosfolípido PE-PEG2000 no parece afectar significativamente el potencial zeta. No obstante, la formulación fosfolipídica con relación molar 10:1 presenta valores de potencial zeta variables desviándose de la tendencia completamente confirmando la presencia de agregación. Esta dependencia del potencial Z y la morfología de las partículas fue reportada por Retamal Marín y colaboradores, empleando partículas de dióxido de silicio (SiO₂) y mediante la determinación de la movilidad de las partículas y su agregación sobre la distribución de sus cargas en dispersión.⁸⁴ Una posible representación de la estructura del liposoma formado se muestra en la figura 4.

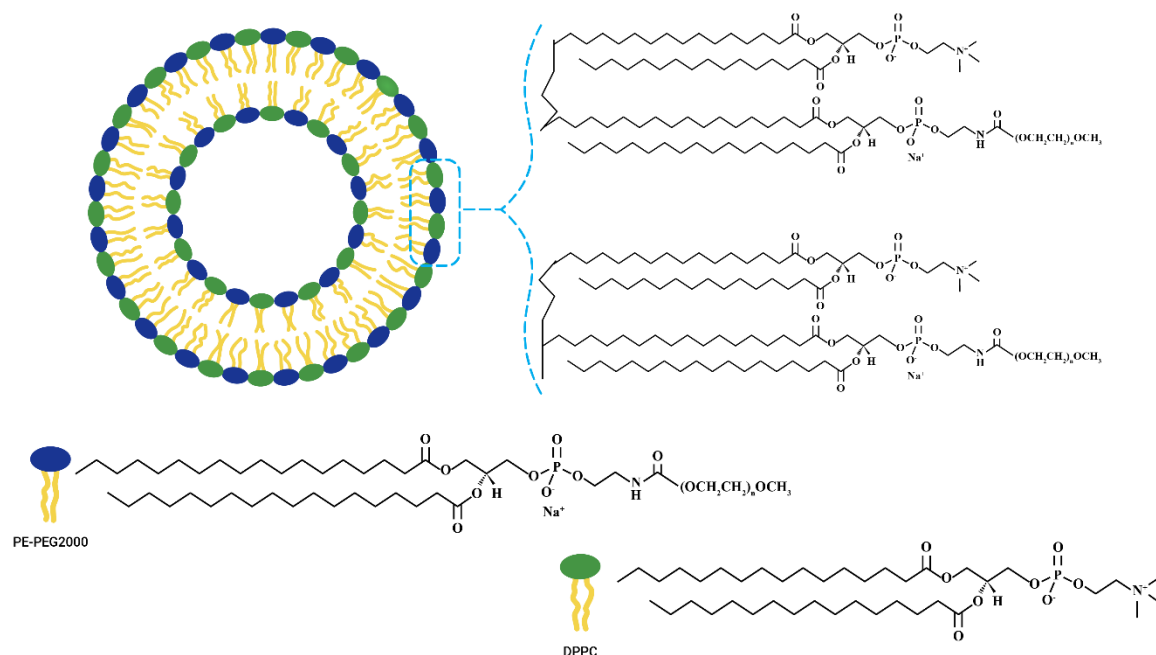


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de un liposoma a base de los fosfolípidos DPPC y PE-PEG2000.

Se determinó que durante tres semanas las distintas formulaciones presentaron una adecuada estabilidad (figuras 29, 30 y 31). En el caso de la relación DPPC:PE-PEG2000 1:1, los tamaños se mantuvieron constantes dentro del intervalo de 180-200 nm; mientras que las formulaciones con relaciones de 3:1 y 6:1 no presentaron cambios respecto al tamaño. Como se mencionó anteriormente, la polidispersidad en el tamaño de las vesículas presentado por la relación molar 1:1 podría ser explicado en términos de atracciones intermoleculares debido a la presencia de la cadena polimérica de PEG2000 favoreciendo las interacciones de van der Waals. Un fenómeno similar fue observado en la investigación realizada por Abreu y colaboradores, donde las formulaciones liposomales que contenían una cadena polimérica de PEG resultaron en tamaños mayores.⁸⁵

Por otro lado, el potencial zeta de la formulación con una relación molar 1:1 tuvo un aumento a lo largo de las tres semanas de estudio. En contraste, los resultados obtenidos por los liposomas formulados con la relación molar 6:1, no registraron una variación significativa. Las ligeras variaciones podrían atribuirse a cambios a nivel estructural, los cuales a su vez podrían depender de la estabilidad de los liposomas en función del tiempo.

Los resultados de tamaño determinados mediante DLS fueron comparados con los obtenidos por medio de la técnica de TEM.⁸⁶

En la figura 5 se muestra la micrografía obtenida por la técnica de TEM de los liposomas formulados al mezclar los fosfolípidos DPPC:PE-PEG2000 en una relación molar 1:1. Como se puede observar en la micrografía, los liposomas tienden a aglomerarse durante el proceso de preparación de la muestra, resultando en estructuras de forma irregular y de tamaño variable, tales como las marcadas como “A”, “B” y “C” en dicha figura.

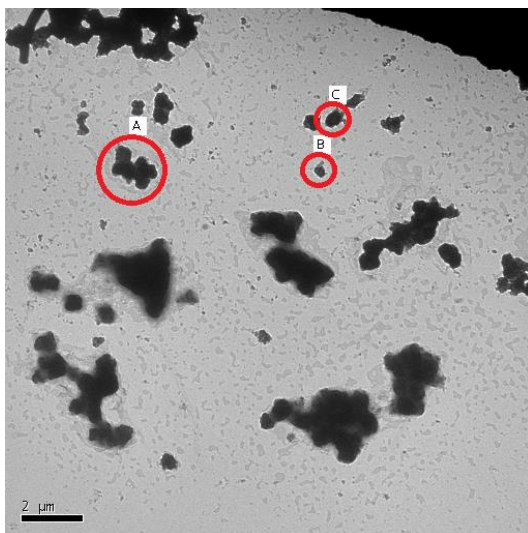


Figura 5. Micrografía TEM de los liposomas formados por los fosfolípidos DPPC: PE-PEG2000 en la relación molar 1:1, donde “A”, “B” y “C” representan algunas de las aglomeraciones observadas.

Los resultados obtenidos por TEM fueron contrastados con los obtenidos mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica. Esta técnica se basa en la percepción de fuerzas generadas entre una punta sumamente delgada (adjunta a un cantiléver) y la superficie de interés. Bajo principios de interferometría óptica es posible detectar la desviación del cantiléver y por lo tanto generar una imagen de la topografía de la superficie estudiada.⁸⁷ No obstante, la obtención de imágenes correspondientes a muestras de liposomas, se dificultó inicialmente debido a su tendencia a aglomerarse y formar secciones de gran tamaño tras el proceso de secado.

En la figura 6 se muestra la micrografía de los liposomas formulados con la relación molar DPPC:PE-PEG2000 3:1, los cuales fueron utilizados en formulaciones posteriores.

Como se observa en la figura 6, los liposomas formulados presentan tamaños entre los 100 y 200 nm aproximadamente, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por medio de DLS.

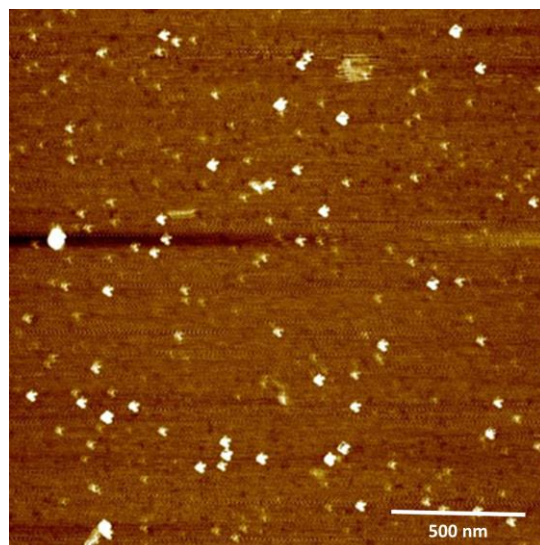


Figura 6. Micrografía de AFM sobre mica para la formulación liposomal con una relación molar DPPC: PE-PEG2000 3:1 tomada a una escala de $2 \times 2 \mu\text{m}$.

Para esta aplicación, la técnica de AFM retiene su mayor atractivo en el hecho de que la muestra no necesita ser modificada de alguna manera para poder ser detectada, además de que las mediciones generan imágenes de alta resolución incluso a escala nanométrica y medidas en tiempo real. Interesante notar en la figura 6, que a pesar de que la mayoría de los liposomas obtenidos en la micrografía de AFM resultaron en tamaños que concuerdan con los obtenidos por la técnica de DLS, también se pueden observar partículas con tamaños relativamente mayores. Este fenómeno fue estudiado por Ruozi y colaboradores donde efectivamente evidenciaron que después de varios minutos de estar la muestra depositada en la superficie de mica se observa una deformación en la forma de los liposomas resultando en formas más aplanadas y menos esféricas debido a una deshidratación progresiva de los mismos con el tiempo.⁸⁸

5.2 Preparación y caracterización de disoluciones de quitosano a diferentes valores de pH

Se preparó una disolución de quitosano a una concentración de 0,5 mg/mL y se evaluó el tamaño de la partícula y su carga superficial en función del pH. Los resultados se muestran en la figura 7, donde se registran valores de tamaño superiores a 300 nm y potenciales zeta entre +30 mV y +45 mV en un rango de pH entre 3,5 y 5,5. Se puede observar que conforme el pH aumenta, el valor de tamaño y potencial zeta disminuye, tendiendo a alcanzar valores cercanos a los 200 nm y +10 mV, respectivamente. Nótese que, a pH entre 4,5 y 5,5, los cambios no son significativos, permaneciendo los mismos tamaños de partícula y potenciales zeta. Este efecto ha sido observado también en otras investigaciones, tal como la realizada por Saïed y Aïder, quienes observaron que tanto para quitosano de bajo peso molecular, como también para quitosano de alto peso molecular los valores de potencial zeta resultaban menos positivos (disminuían) conforme el valor de pH aumenta.⁸⁹

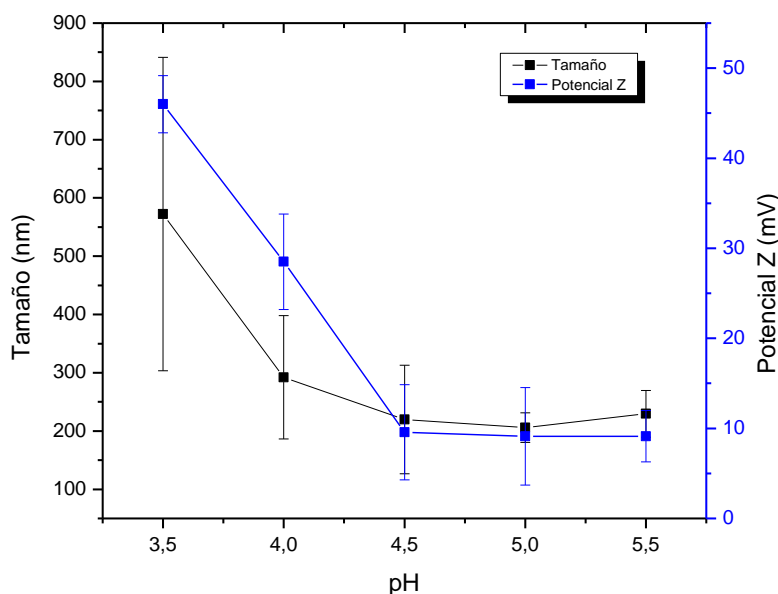


Figura 7. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de disoluciones de quitosano a diferentes valores de pH.

En la figura 7, se nota la dependencia del tamaño de partícula y potencial zeta del quitosano en función del pH, en la cual, a su vez, se demuestra la sensibilidad del polímero por los cambios de pH.

El quitosano está constituido por un alto porcentaje de aminas primarias en su estructura que a valores de pH ácidos (menores a su pKa de 6,5) se protonan permitiendo al polímero solubilizarse en disoluciones ácidas diluidas. Conforme el pH de la disolución se vuelve más ácido es de esperar que aumente tanto el tamaño de partícula, así como el potencial zeta. Esto se puede explicar en términos de una mayor proporción de aminas protonadas que inducen la repulsión entre las cadenas del polímero, causando que su estructura de ovillo estadístico se expanda resultando en tamaños mayores y una carga superficial positiva. En contraste, conforme se aumenta el pH de la disolución, se observa una disminución en el tamaño de partícula, debido a una disminución en las interacciones de repulsión en la macromolécula, induciendo a la compactación de las cadenas. Este resultado fue obtenido también en la investigación realizada por Liu y Gao, en la cual se observa el mismo comportamiento (dentro del rango de pH desde 3,5 a 5,5) respecto a la disminución tanto en el tamaño de partícula como del potencial zeta conforme aumenta el pH de la disolución, al realizar una caracterización de tamaño y potencial zeta.⁹⁰

El contenido de aminas libres del quitosano se determinó mediante el método de ninhidrina resultando en 43,9 mol N/mol quitosano. La reacción solamente se da con las unidades de 2-amino-2-deoxi- β -d-glucopiranososa (grupos amino primarios del quitosano) produciendo un complejo coloreado. El espectro de absorción se realizó entre 325 y 750 nm, obteniéndose un máximo a 570 nm, el cual es característico de la formación de dicetohidrindilideno-dicetohidrindamina, también llamado púrpura de Ruhemann. Cabe mencionar que cierta desviación puede resultar en la determinación debido a que la reacción entre el quitosano y ninhidrina no se da en un 100%. Esto se puede deber a factores como la polidispersidad del polímero, aminas no protonadas, impedimento estérico y la nucleofilicidad del grupo amino; tal y como fue reportado por Sabina Prochazkova y colaboradores.⁹¹ No obstante, se ha demostrado en investigaciones similares que el método resulta adecuado para la determinación de la cantidad de aminas primarias experimentales disponibles en polímeros, tomando en cuenta además las ventajas que lo hacen de gran atractivo, tales como su rapidez, sensibilidad, precisión, reproducibilidad y bajo costo.⁹² Finalmente, cabe mencionar que como en cualquier técnica convencional, los resultados se pueden ver afectados por consideraciones tales como la fuerza iónica de los solventes, temperatura y el valor de pH de las disoluciones a evaluar.⁹³

5.3 Preparación y caracterización de los complejos quitosano: ADN

El quitosano es un polisacárido policatiónico que puede interaccionar electrostáticamente por medio de las cargas positivas de sus grupos amino con la macromolécula de ADN que tiene un carácter polianiónico.⁹⁴

En este estudio se evaluaron diferentes relaciones nitrógeno: fósforo (N:P) del complejo quitosano: ADN plasmídico para posteriores evaluaciones biológicas. El comportamiento del tamaño y potencial zeta se evaluó a tres valores de pH (4,0; 5,0 y 5,5) mediante la técnica de DLS. En la figura 8 se muestran los resultados de potencial zeta y tamaño para las formulaciones de complejos quitosano: ADN a pH 4,0. Inicialmente, la formulación con la relación N:P 2:1 presentó un tamaño de aproximadamente 200 nm, este tiende a disminuir al aumentar la relación N:P hasta 6:1. Conforme se sigue aumentando la relación nitrógeno: fósforo se observa un ligero y continuo aumento en el tamaño de las nanopartículas. Este comportamiento fue observado también por Sreekumar y colaboradores, donde al realizar un estudio de los parámetros que influyen el tamaño de las nanopartículas de quitosano obtuvieron que el aumento en la concentración del polímero es directamente proporcional al aumento en el radio hidrodinámico promedio de las nanopartículas formadas.⁹⁵ Interesante notar que la relación N:P 18:1 preparada a pH 4 presenta la mayor incertidumbre respecto a las demás formulaciones, debido posiblemente al exceso de quitosano en el medio y a la repulsión electrostática entre sus cadenas poliméricas.

Por otro lado, la formulación con la relación quitosano: ADN 2:1 registra un potencial zeta relativamente bajo (+10 mV), el cual se vuelve más positivo al aumentar la relación N:P. Dicha tendencia se puede explicar por una mayor cantidad de aminas protonadas presentes en el complejo polimérico. Este comportamiento ha sido observado por Ing y colaboradores al estudiar la dependencia del tamaño de partícula y el potencial zeta en función de la concentración de quitosano con diferentes pesos moleculares.⁹⁶

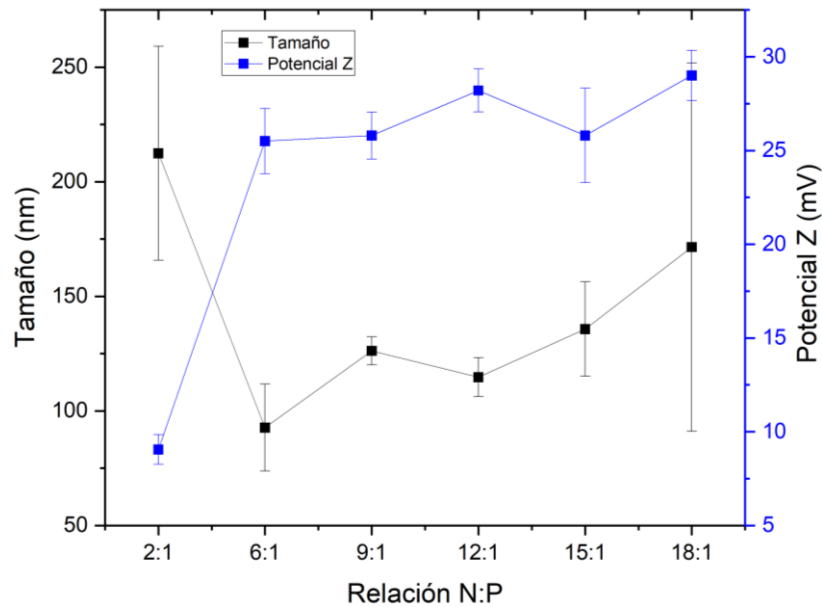


Figura 8. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN ampliado a más relaciones N:P, utilizando el quitosano disuelto en ácido acético a un valor de pH de 4,0.

Por su parte, las figuras 9 y 10 se muestran los resultados de las mismas relaciones estudiadas a un pH de formulación de 5,0 y 5,5 respectivamente. Se puede observar que el comportamiento es similar a las formulaciones realizadas a pH 4,0. Esto implica que el pH de la disolución de quitosano utilizado tiene un impacto significativo en la carga superficial final del complejo, mas no tanto en su tamaño.

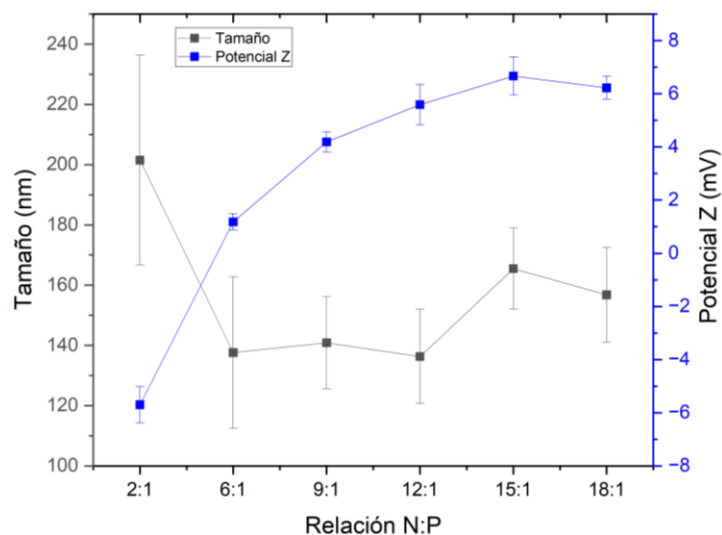


Figura 9. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN a las diferentes relaciones N:P, utilizando el quitosano disuelto en ácido acético a un valor de pH de 5,0.

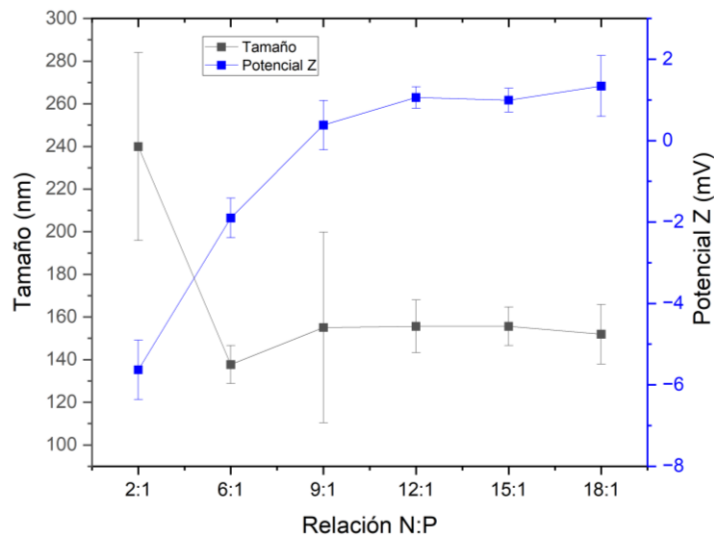


Figura 10. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN ampliado a más relaciones N:P, utilizando el quitosano disuelto en ácido acético a un valor de pH de 5,5.

Asimismo, de acuerdo con los resultados se evidencia que a un pH menor de formulación se alcanzan valores de potencial zeta más positivos, debido a una mayor disponibilidad de aminas protonadas en disolución.

Después de observar la tendencia respecto a las características de tamaño y potencial zeta del amplio rango de relaciones N:P formuladas, se siguió el estudio solamente con las relaciones N:P 2:1, 9:1 Y 15:1 reduciendo ligeramente los valores de pH a 4,0; 4,5 y 5,0 con el fin de obtener valores más alto de potencial zeta. Además, se ha evidenciado que la presencia de sales en el medio en el cual se encuentran las nanopartículas de quitosano, no cambia la tendencia de las mismas respecto a su tamaño y potencial zeta, tal y como se puede observar en la investigación realizada por Picola y colaboradores, en la cual, se puede notar que a pesar de que los valores de tamaño y potencial zeta aumentan y disminuyen respectivamente con el incremento en la fuerza iónica del medio, la tendencia o comportamiento (de aumento/disminución) de ambos parámetros es el mismo al variar la relación N:P en comparación con las formulaciones que presentan una baja concentración de sales en el medio. Asimismo se sugiere que la presencia de sales en las formulaciones quitosano: ADN puede generar una conformación óptima de las nanopartículas, aumentando su eficiencia de transfección.⁹⁷ Por lo anterior, se prosiguió con el presente estudio disolviendo el polímero en una disolución amortiguadora de ácido acético y su sal de sodio (acetato de sodio), de esta forma, se evaluó también el tamaño y potencial zeta de las formulaciones con las relaciones N:P de 2:1, 9:1 y 15:1 a pH de 4,0; 4,5 y 5,0 formuladas en medio buffer.

En las figuras 11, 12 y 13 se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de tamaño y potencial zeta de las formulaciones, realizada por medio de la técnica de dispersión de luz dinámica.

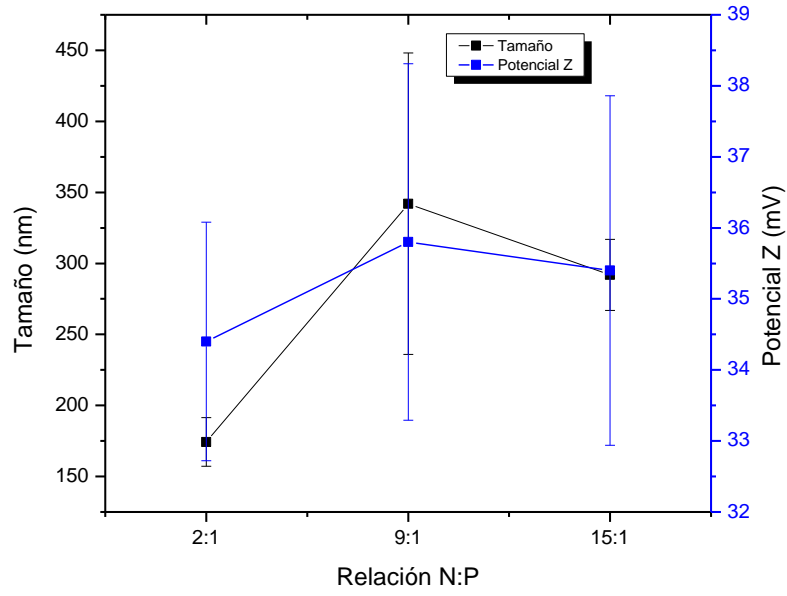


Figura 11. Promedio de tamaño de partícula y carga superficial de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN a diferentes relaciones N:P formulados con quitosano en buffer de ácido acético-acetato de sodio a pH 4,0.

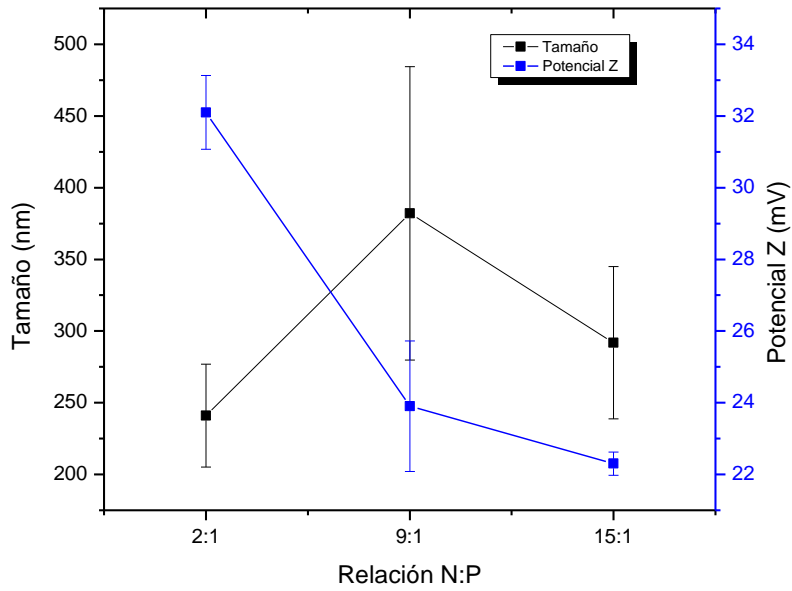


Figura 12. Promedio de tamaño de partícula y carga superficial de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN a diferentes relaciones N:P formulados con quitosano en buffer de ácido acético-acetato de sodio a pH 4,5.

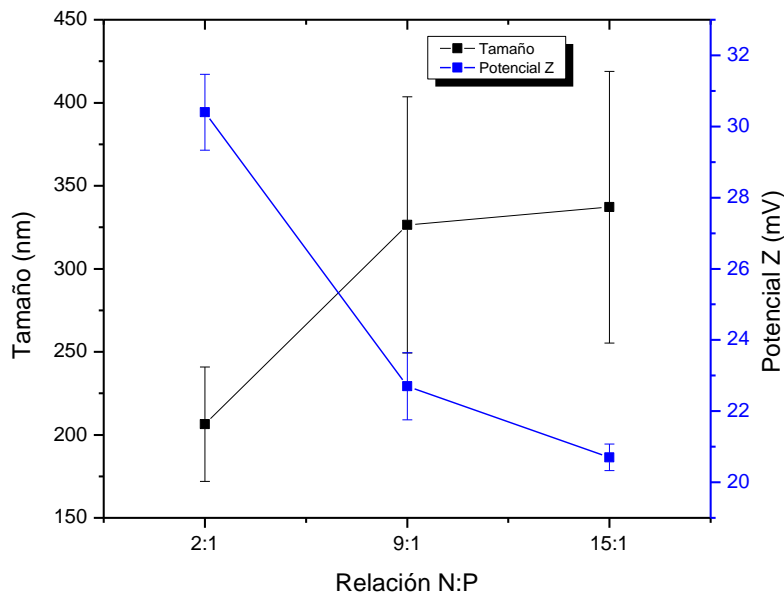


Figura 13. Promedio de tamaño de partícula y carga superficial de tres muestras preparadas independientemente de los complejos quitosano: ADN a diferentes relaciones N:P formulados con quitosano en buffer de ácido acético-acetato de sodio a pH 5,0.

Al comparar los resultados obtenidos en las formulaciones realizadas en buffer (figuras 11,12 y 13) con las preparadas en ácido acético diluido (figuras 8, 9 y 10); se observa un aumento en el tamaño de partícula y una mayor polidispersidad de los nanoencapsulados. Las sales presentes en el medio interactúan con los grupos amino y grupos fosfato presentes en las macromoléculas induciendo una reducción en la interacción entre ambos polielectrolitos resultando en la desestabilización estructural de los complejos y una menor compactación del complejo quitosano: ADN. Por otro lado, nótese que se obtienen valores de potencial zeta más positivos, lo cual se podría explicar en términos del efecto amortiguador proporcionado por el medio buffer, evitando que el pH de la formulación pueda aumentar de manera importante al mezclar la disolución de quitosano con los otros componentes de la formulación (disueltos en agua). Este comportamiento es comparable con los resultados obtenidos por Nimesh y colaboradores, donde al estudiar el efecto que presenta tanto el pH como la concentración de sales en la disolución sobre las características finales del complejo, se observó un aumento en el tamaño y la carga superficial, posiblemente por la descompactación de la formulación proporcionada por la presencia de un medio buffer salino.⁹⁸

En la figura 14 se muestra la micrografía de AFM para los complejos quitosano: ADN con la relación N:P 9:1. En la micrografía se puede observar la presencia de las partículas, las cuales luego de ser medidas con el software del AFM “Park SmartAnalysis”, presentaron un tamaño promedio alrededor de los 130 nm, ligeramente menor al obtenido por la técnica de DLS. Este resultado se puede explicar por la deshidratación que sufre la muestra durante el proceso de secado en la preparación el espécimen antes de ser medida en el microscopio. Este efecto también ha sido observado en otras investigaciones, tal como la realizada por Gennaro y colaboradores, en la cual, al realizar un estudio del efecto del estado de las vesículas a la hora de la medición, se obtiene que para aquellas húmedas el espesor es mayor en comparación con las muestras secadas previamente a la medición.⁹⁹

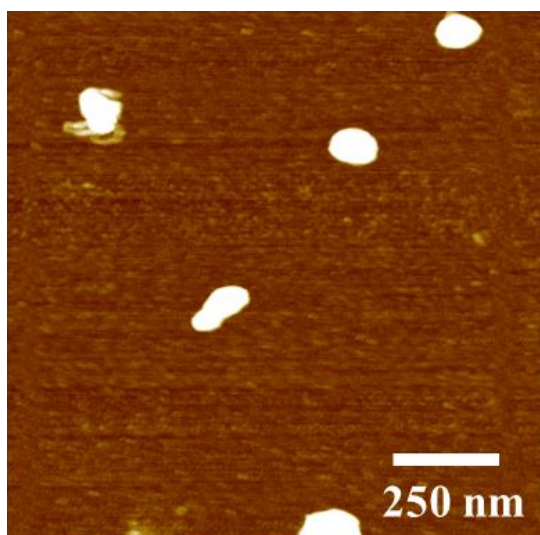


Figura 14. Micrografía de AFM de los complejos quitosano: ADN a una relación N:P 9:1, utilizando el quitosano en buffer de ácido acético-acetato de sodio a pH 4,0 sobre mica.

5.4 Determinación de la capacidad de encapsulamiento del ADN

La electroforesis ha sido una técnica utilizada para obtener información respecto al grado de encapsulamiento del ácido nucleico en partículas de quitosano: ADN.¹⁰⁰ En este estudio se utilizó esta técnica para evaluar el encapsulamiento y la estabilidad de diferentes formulaciones de nanoencapsulados en función del tiempo, pH y concentración salina. Las mismas se llevaron a cabo en medio acuoso y luego fueron diluidas con medio Opti-MEM.

Para este estudio se empleó GelRed, el cual es un tinte fluorescente, ultrasensible, estable y ambientalmente seguro comparado con el bromuro de etidio.¹⁰¹

El resultado obtenido de los complejos formulados en medio acuoso y utilizando el quitosano disuelto en ácido acético se muestra en la figura 15. Como se puede observar, el pozo control (solamente ADN) logró desplazarse considerablemente en comparación a las muestras preparadas a pH 4,0 (B, C, D y E), en las cuales se observa poco o nulo desplazamiento del ácido nucleico. Esto podría ser explicado en términos de una interacción electrostática efectiva entre las macromoléculas, induciendo el encapsulamiento del ADN por parte del quitosano. En contraste, el comportamiento de las muestras formuladas empleando quitosano en medio acuoso a pH 5,5 (muestras F, G, H e I) se observa una ligera migración del ADN aproximadamente a un 60% del gel, lo cual sugiere una menor retención de moléculas de ADN en la matriz del quitosano.

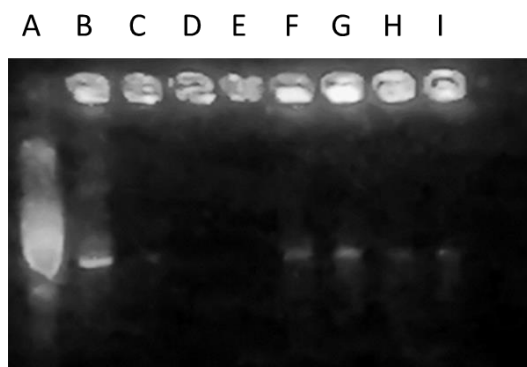


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa realizada a las muestras de complejos quitosano: ADN luego de 1h de haber sido formulados (A: control ADN plasmídico; B: Relación N:P 2:1 pH 4,0; C: Relación N:P 6:1 pH 4,0; D: Relación N:P 9:1 pH 4,0; E: Relación N:P 12:1 pH 4,0; F: Relación N:P 2:1 pH 5,5; G: Relación N:P 6:1 pH 5,5; H: Relación N:P 9:1 pH 5,5; I: Relación N:P 12:1 pH 5,5), utilizando el quitosano disuelto en ácido acético.

De manera comparativa, en la figura 16 se muestran los resultados de la electroforesis realizada a los complejos quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético) tras una hora de haber sido diluidos en Opti-MEM (complejos quitosano: ADN a las relaciones 2:1, 6:1, 9:1, 12:1, 15:1, 18:1 y un control positivo de ADN). Se puede observar que, bajo estas condiciones, en ninguno de los complejos el ADN logra migrar. Esto sugiere

una fuerte interacción entre el quitosano y el ADN en presencia de este medio y como consecuencia una adecuada estabilidad de las partículas.³¹

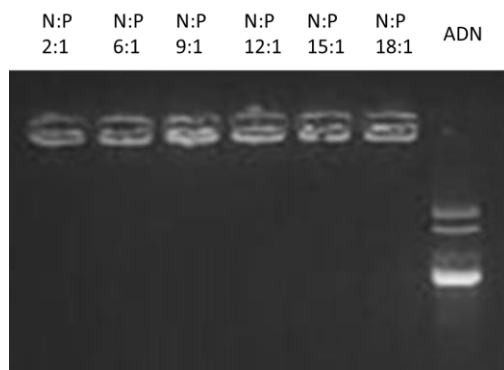


Figura 16. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa a diferentes formulaciones de quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético), después de una hora de haber sido diluidas en Opti-MEM y haber alcanzado un pH final de 6,0.

Interesante notar, que las mismas muestras tras un período de 24 y 48 h no presentan cambios significativos, lo cual sugiere una adecuada estabilidad de los nanoencapsulados inducida por las fuerzas de atracción electrostática entre el quitosano y el ADN (anexos, figuras 32 y 33 respectivamente).

El efecto del pH y salinidad sobre la estabilidad del complejo se evaluó sobre la relación con menor contenido de quitosano (relación 2:1 quitosano/ADN) mediante la técnica de electroforesis. La muestra se diluyó con Opti-MEM y posteriormente haciendo uso de una disolución de NaOH 0,1 M se ajustó el pH a un valor de 8. Paralelamente, la concentración de sal fue ajustada a 10 mM para la misma relación N:P. En la figura 17a se puede observar, que el aumento del pH no induce ningún cambio en la estabilidad del complejo indicando que la interacción electrostática en la estructura del nanoencapsulado prevalece. Esto sugiere además que esta formulación puede ser usada en un rango de pH por encima de la pKa del quitosano (6.5), lo cual podría facilitar su transfección en células, ya que la misma es altamente dependiente del pH del medio de transfección.¹⁰²

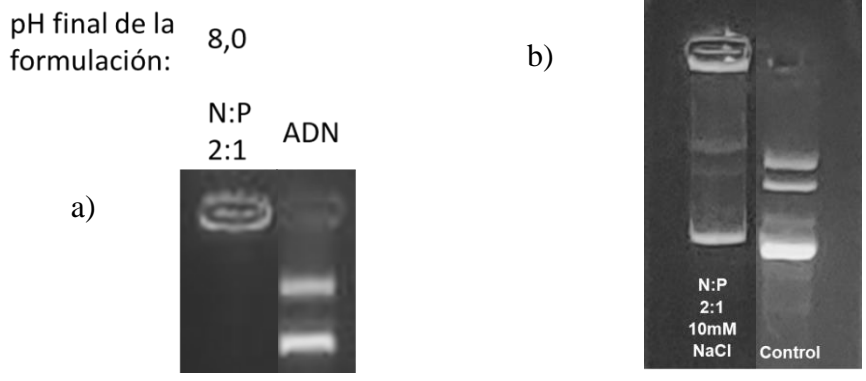


Figura 17. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa para la formulación 2:1 quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético). a) En medio Opti-MEM a un pH de 8 y b) a 10 mM NaCl.

La evaluación del efecto de la fuerza iónica del medio sobre la estabilidad de las formulaciones se muestra en la figura 17b. Se puede observar un ligero desplazamiento en la formulación a una concentración de NaCl de 10mM, sugiriendo un fenómeno de desestabilización estructural que permite la liberación del ADN. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Pfeifer y colaboradores en los que al evaluar el efecto de la fuerza iónica del medio, se nota una ligera liberación del ADN posiblemente debido a una desestabilización de la interacción electrostática de los complejos por la adición de iones cloruro y sodio.⁹⁷ Los estudios realizados han comprobado que la adición de sales de bajo peso molecular inducen la disociación complejos polielectrolíticos y consecuentemente podrían resultar en una mayor transfección de los nanoencapsulados sobre las células.¹⁰³

Basados en estos resultados, el estudio se complementó preparando disoluciones de quitosano a diferentes valores de pH, utilizando una disolución tampón de ácido acético-acetato de sodio como disolvente. Se prepararon tres diferentes disoluciones de quitosano en buffer, a pH 4,0; pH 4,5 y pH 5,0.

Como se puede observar en la figura 18, en las pruebas de electroforesis las formulaciones con una relación N:P 2:1, independientemente del pH del buffer utilizado, presentan una banda característica del ADN teñido, lo cual puede estar asociado a la desestabilización del complejo en un medio salino. Sin embargo, al diluir cada una de las formulaciones en el medio Opti-MEM (figura 19) las bandas desaparecen, lo cual podría

asociarse a una posible interacción entre las moléculas de ADN y las sustancias presentes en el Opti-MEM.

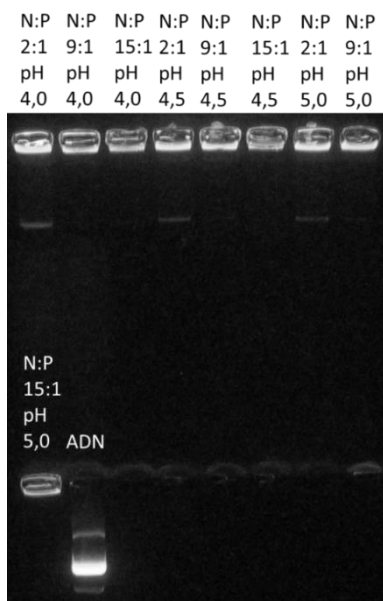


Figura 18. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa a las formulaciones de quitosano: ADN (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio), a diferentes relaciones N:P.

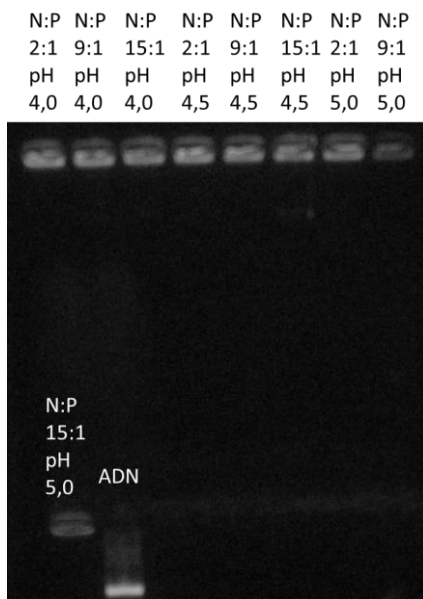


Figura 19. Electroforesis realizada a los complejos quitosano: ADN (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio) diluidos en medio Opti-MEM a diferentes relaciones N:P.

En las figuras 20A, 20B y 20C se observan los resultados de electroforesis correspondientes a las formulaciones quitosano: ADN con las diferentes relaciones N:P

(utilizando quitosano en buffer), evaluadas a diferentes intervalos de tiempo (0, 24 y 48 h) con el fin de evaluar la estabilidad.

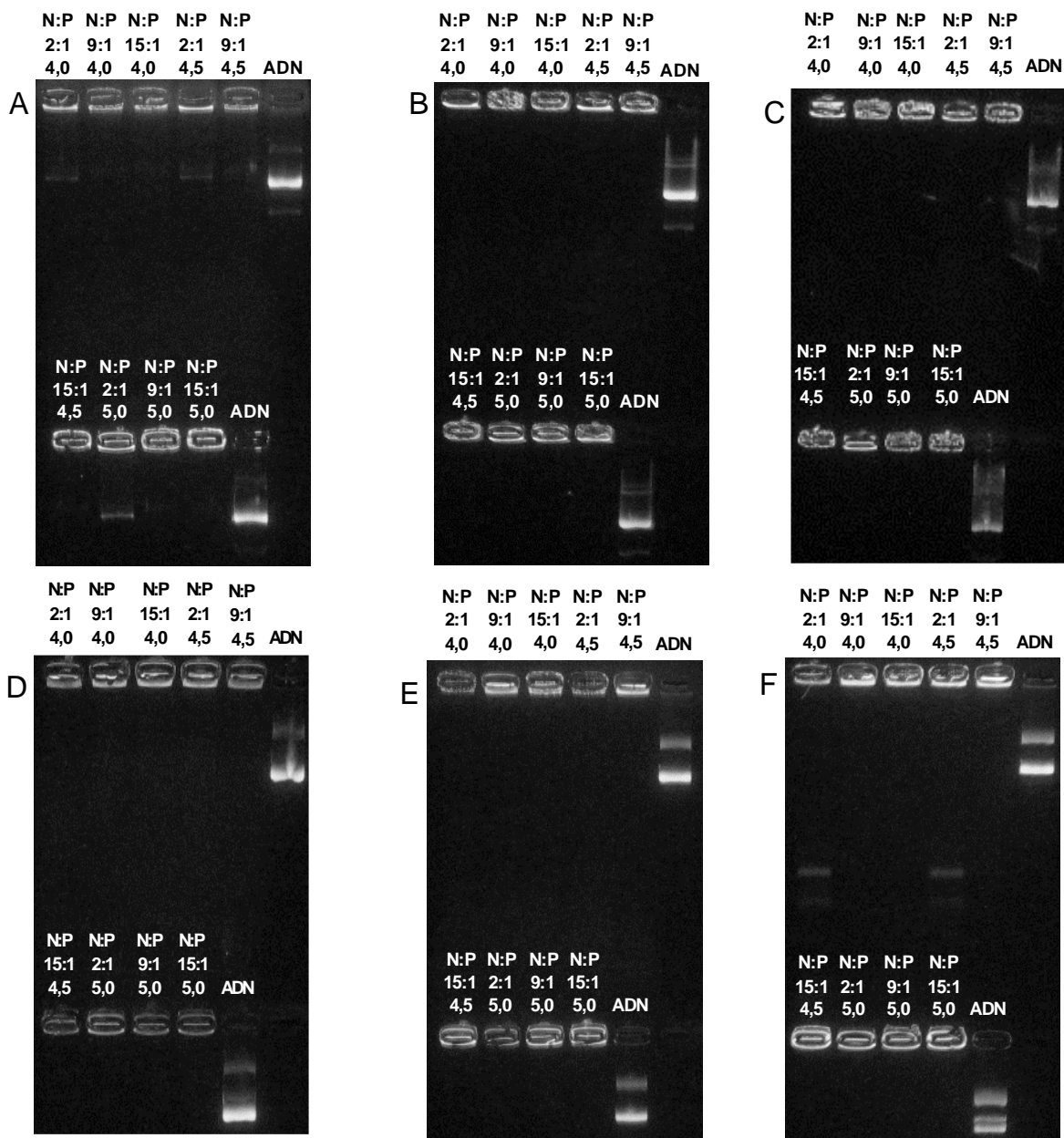


Figura 20. Pruebas de electroforesis realizadas en gel de agarosa a las formulaciones quitosano: ADN (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio) a diferentes relaciones N:P, tanto en su medio de formulación (A: 0 h; B: 24 h y C: 48 h) como también diluidas en medio Opti-MEM (D: 0 h; E: 24 h y F: 48 h) con el fin de medir su estabilidad en el tiempo.

Se puede notar en la figura 20A algunas bandas correspondientes al desacoplamiento del ADN en el complejo con quitosano. Este efecto parece ser evidente en la relación N:P 2:1, mientras que en las demás formulaciones no se presenta este fenómeno de manera significativamente. Por otro lado, en las figuras 20B (24 h) y 20C (48 h) no se registra ninguna de las bandas observadas anteriormente, asociadas al desensamblaje del complejo. Este fenómeno ha sido observado en otras investigaciones, tal como la realizada por Kim y colaboradores, en la cual se evidencia que el ADN que no queda atrapado dentro del complejo se degrada con el tiempo al quedar desprotegido y expuesto al ambiente. Por lo anterior, en este estudio se sugiere que el fenómeno observado se debe a que conforme pasa el tiempo después de que las formulaciones fueron preparadas se da una degradación del ADN que queda libre en solución.¹⁰⁴

De manera similar, los complejos diluidos con medio Opti-MEM (figuras 20D, 20E y 20F) no registran ninguna banda característica del desacoplamiento del nanoencapsulado. Además, cabe destacar que al diluir la formulación en el medio Opti-MEM, se obtiene un valor de pH cercano a 7,0 en las formulaciones con una relación N:P 2:1 (anexos, cuadro 6), cercano al pH fisiológico (7,4),¹⁰⁵ lo que la convierte en una potencial formulación para ser evaluada en las pruebas de viabilidad celular y eficiencia de transfección.

5.5 Preparación y caracterización de complejos quitosano/ADN modificados con fosfolípidos (lipoquitoplejos)

La palabra “lipoquitoplejos” se define a partir de las nanopartículas formuladas, donde el ácido nucleico se encuentra encapsulado por una primera capa compuesta del polímero quitosano y otra más externa compuesta por los fosfolípidos PE:PEG-2000.¹⁰⁶

En la figura 21 se muestran los resultados de tamaño y potencial zeta de las nanopartículas (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio) resultantes de las formulaciones del diseño ortogonal (cuadro 2).

Cuadro 2. Diseño ortogonal planteado, elaborado y tomado como guía para cada una de las formulaciones (usando la relación N:P 9:1).

Formulación del ortogonal	DPPC:PE-PEG2000 (molar)	pH (quitosano)	PE-PEG2000: ADN (molar)
1	6:1	4,0	5000:1
2	1:1	5,0	2500:1
3	6:1	5,0	1000:1
4	1:1	4,5	5000:1
5	3:1	5,0	5000:1
6	6:1	4,5	2500:1
7	3:1	4,0	2500:1
8	3:1	4,5	1000:1
9	1:1	4,0	1000:1

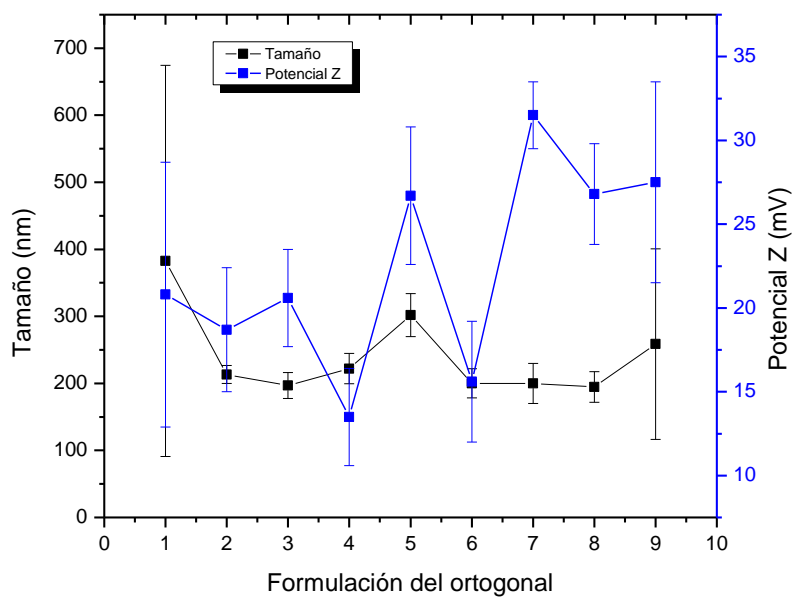


Figura 21. Promedio de tamaño de partícula y carga superficial de tres muestras preparadas independientemente de las diferentes formulaciones del diseño ortogonal (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio).

Respecto a los resultados obtenidos, en general la adición de los liposomas no afecta significativamente el tamaño de los complejos quitosano: ADN formulados, resultando en partículas con tamaños entre los 200 y los 400 nm. Interesante notar, que la adición de fosfolípidos no generó en el tiempo una agregación del sistema, lo cual indica una adecuada estabilidad del complejo formado. Asociado a esto, se determinó que los valores de potencial zeta se mantuvieron en el rango entre +15 y +30 mV. En este contexto, Zhang y colaboradores, sugieren que el tamaño de las nanopartículas está asociada la efectividad de las interacciones electrostáticas entre los componentes iónicos, donde aquellas partículas más pequeñas y compactas son producto de una mayor atracción entre cargas opuestas o de una mayor magnitud provenientes de cada uno de sus componentes.^{107,108} Esto indica que los complejos quitosano-ADN pudieron haber sido modificados de forma parcial en su superficie, resultando aún valores de tamaño y cargas superficiales similares a las discutidas anteriormente en las figuras 11-13, prevaleciendo una partícula compacta y una superficie catiónica debido a la presencia de los grupos amino del quitosano. Una posible representación de la estructura de los lipoquitoplejos se muestra en la figura 22.

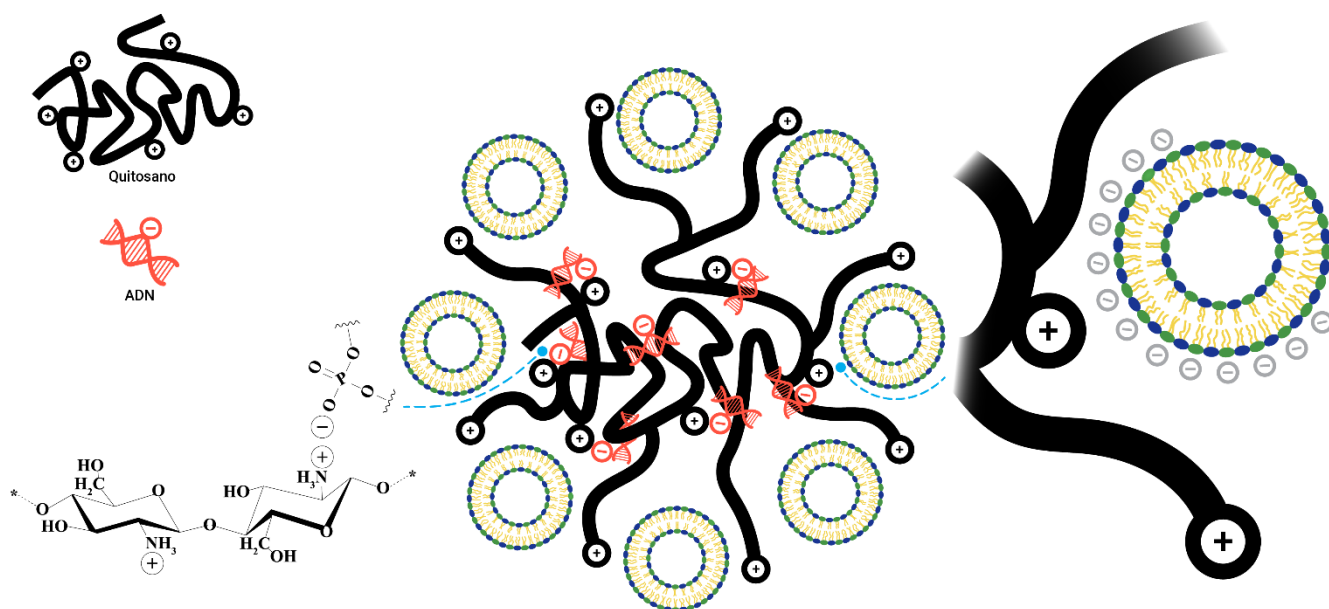


Figura 22. Representación gráfica de la posible estructura final de un lipoquitoplejo.

Sin embargo, los sistemas reportados en la literatura muestran que las formulaciones con características catiónicas son utilizadas como sistemas de liberación génica sobre diferentes líneas de células cancerosas como las de tipo HeLa, HEK, entre otras.¹⁰⁹ Por lo tanto, considerando los valores de tamaños y de potencial zeta obtenidos, los sistemas estudiados podrían ser de potencial interés para esta aplicación.

Para evaluar la importancia de cada una de las variables establecidas en el diseño ortogonal sobre los resultados tanto de tamaño de partícula como de carga superficial/potencial zeta de cada una de las formulaciones, se realizó el tratamiento estadístico de los datos usando el programa denominado “SPSS Statistics” de la empresa IBM como ha sido realizado también en otras investigaciones similares.¹¹⁰ Para evaluar las diferentes variables se utilizaron específicamente dos parámetros, el coeficiente estandarizado beta que brinda información acerca del impacto de la variable independiente sobre la variable dependiente en una muestra dada. La significancia indica el porcentaje con el cual los cambios observados sobre la variable dependiente se deben a factores aleatorios y no debido a un cambio realizado en la variable independiente evaluada. De tal manera que se consideran como significativas aquellas con un valor menor o igual a 0,05 o 5%.^{111,112} Los resultados se resumen en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Análisis estadístico del diseño ortogonal sobre la variable tamaño de partícula.

Resultado analizado: Tamaño		
Variable en el ortogonal	Coefficiente estandarizado Beta	Significancia
DPPC:PE-PEG2000 (molar)	0,107	0,584
pH	-0,163	0,409
PE-PEG2000:ADN (molar)	0,322	0,109

Cuadro 4. Análisis estadístico del diseño ortogonal sobre la variable carga superficial (potencial Z).

Resultado analizado: Potencial Z		
Variable en el ortogonal	Coefficiente estandarizado Beta	Significancia
DPPC:PE-PEG2000 (molar)	-0,054	0,779
pH	-0,280	0,156
PE-PEG2000:ADN (molar)	-0,283	0,152

Se puede observar en los resultados que considerando el coeficiente estandarizado beta la variable que tiene una mayor importancia es la relación PE-PEG2000:ADN (molar) tanto para tamaño como para potencial zeta, sin embargo al tomar en cuenta las significancias se puede notar que no existe ninguna variable que sea significativa estadísticamente ($\leq 0,05$).

5.6 Determinación de la eficiencia de transfección de los complejos formulados

La evaluación de la eficiencia de transfección se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Esta es una técnica que permite la detección rápida y sencilla de células o partículas, cuya medición se realiza al hacer fluir estas a través de un punto donde se cruzan con un láser. Esto permite que la detección y medida de los parámetros de interés sea realizada de manera individual para cada una de las partículas implicadas, pudiendo realizar un posterior análisis estadístico de los datos. Además, al analizarse una gran cantidad de partículas de forma simultánea le confiere a esta técnica una adecuada confianza.¹¹³

Para evaluar la eficiencia de transfección, se formularon diferentes complejos quitosano: ADN y quitosano: ADN: fosfolípidos (utilizando una disolución de quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio). Como control negativo se tomaron las células HeLa sin ser tratadas con las formulaciones preparadas, mientras que como control positivo se utilizó un reactivo de transfección comercial (Lipofectamina).¹¹⁴ La doxorubicina se empleó como control positivo de toxicidad, facilitando la diferenciación entre las células HeLa vivas y las células muertas durante las mediciones en el citómetro de flujo. A partir del valor tomado como control negativo, se analizaron las células ya tratadas con los diferentes tipos de complejos formulados. La población de células tratadas y exitosamente transfectadas, son detectadas mediante la emisión de fluorescencia, como expresión de la GFP cuyo gen se encuentra en el ADN acomplejado con el quitosano. De manera similar al estudio realizado por Zheng y colaboradores, donde el GFP es detectado por citometría de flujo al evaluar la eficiencia de transfección de nanopartículas de quitosano insertadas vía mucosa gastrointestinal.¹¹⁵

En las figuras 23 y 24 se muestran los resultados de eficiencia de transfección obtenidos para las formulaciones quitosano: ADN a diferentes relaciones N:P (N:P 2:1 utilizando a la hora de la formulación, la disolución de quitosano a pH 4; N:P 9:1 y 15:1

utilizando quitosano a pH 5), después de un tiempo de 24 y 48 h respectivamente. Cabe mencionar que las formulaciones evaluadas presentaron un pH final cercano a la neutralidad (7,0) tal y como se indica en el cuadro 6 de la sección de anexos, donde se muestra el pH final de cada formulación luego de haber sido diluida en medio Opti-MEM.

Como se puede observar, las formulaciones quitosano: ADN a diferentes relaciones N:P registraron eficiencias de transfección muy similares entre 7 y 11 % en promedio. Este resultado inesperado por parte de las relaciones N:P más grandes podría ser explicado en términos de un fuerte acomplejamiento entre los polielectrolitos, induciendo a que menor cantidad de ADN esté disponible y pueda interactuar con las células. Además, los resultados son reforzados con los obtenidos en los experimentos de electroforesis, en los cuales no se observó una banda visible de ADN en la mayoría de los casos, indicando una retención excesiva del ácido nucleico dentro del complejo por parte del quitosano, debido a la fuerte atracción electrostática entre las macromoléculas y consecuentemente dificultando la liberación del ADN plasmídico. El quitosano como portador de ácidos nucleicos ha sido ampliamente estudiado y se ha evidenciado que a una mayor relación N:P se puede obtener mayor eficiencia de transfección, no obstante, a relaciones muy altas puede existir una unión demasiado fuerte entre ambas macromoléculas reduciendo la capacidad de liberación del ácido nucleico resultando en una menor eficiencia de transfección.¹¹⁶ En contraste, estudios similares realizados por Ishii y colaboradores registran eficiencia de transfección de complejos quitosano: ADN a relaciones intermedias (N:P 3:1 y 5:1), quizás debido a una óptima interacción y ensamblaje entre sus componentes.¹¹⁷

Considerando lo anterior se tomó la relación N:P 9:1 para realizar los experimentos de modificación con fosfolípidos. Las diferentes relaciones entre los componentes se ven resumidas en el cuadro 2 previamente mostrado en el presente trabajo de investigación. Cada una de las formulaciones del diseño ortogonal se siguió con su respectiva evaluación biológica y se compararon con las formulaciones sin la adición de fosfolípidos. En las figuras 23, 24, 25 y 26 se muestran los resultados de estos experimentos.

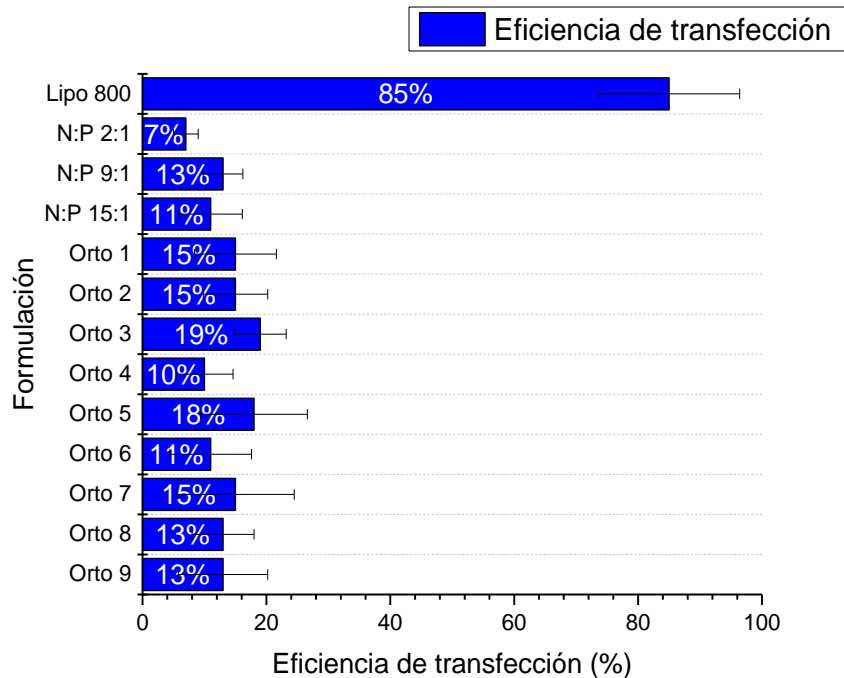


Figura 23. Promedio de eficiencia de transfección (%) de tres muestras preparadas independientemente de cada una de las formulaciones analizadas en el citómetro de flujo a las 24h de crecimiento.

Las formulaciones identificadas como ortogonal 1-9 corresponden a la incorporación de fosfolípidos en la formulación quitosano: ADN plasmídico. Según las figuras 23 y 24, la adición de fosfolípidos a las formulaciones quitosano ADN, resulta en un ligero desplazamiento en el porcentaje de transfección, sin embargo, estadísticamente la eficiencias de transfección de las formulaciones con fosfolípidos adicionados resultan similares a las obtenidas en las formulaciones sin fosfolípidos. El efecto de los fosfolípidos como un componente adicional a los complejos macromoleculares ha sido evidenciado en estudios similares, tal como el realizado por Du y colaboradores, en el cual se argumenta que la adición de fosfolípidos le permite al complejo tener mayor afinidad con los fosfolípidos externos de las células facilitando no solamente el proceso de endocitosis en la célula, sino también su fusión con la membrana endosomal y promoviendo así la liberación del ácido nucleico en el citoplasma dentro de la célula.¹¹⁸

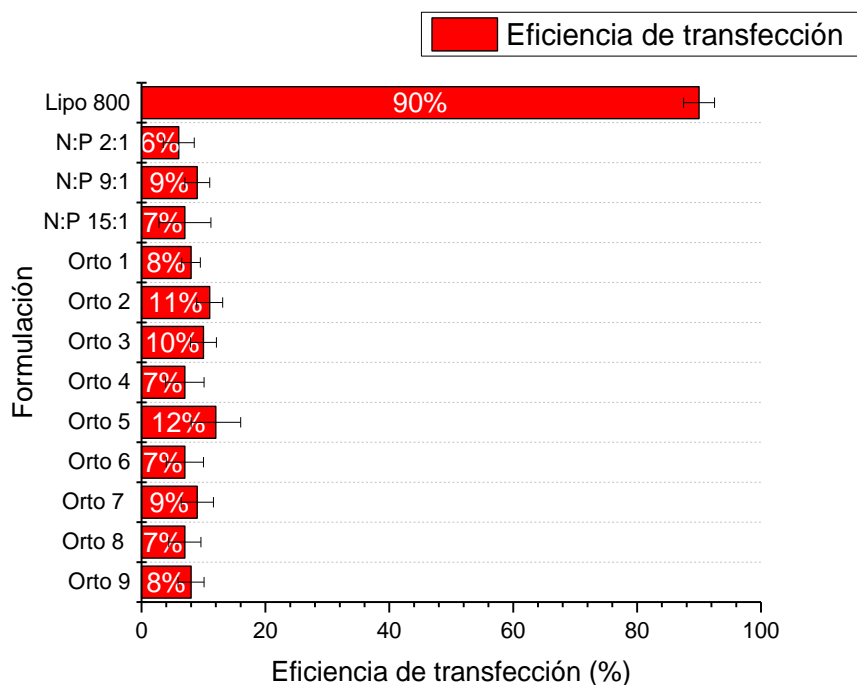


Figura 24. Promedio de eficiencia de transfección (%) de tres muestras preparadas independientemente de cada una de las formulaciones analizadas en el citómetro de flujo a las 48h de crecimiento.

Al comparar la eficiencia de transfección promedio obtenida a las 24 h de crecimiento con la obtenida a las 48 h (figuras 23 y 24, respectivamente) parece que la misma decrece en el tiempo de exposición para cada una de las formulaciones evaluadas. Lo contrario fue observado con el control positivo de Lipofectamina, sin embargo, se ha observado que no todos los reactivos de transfección siguen la misma tendencia en el tiempo, este efecto fue reportado por Sandbichler y colaboradores, donde al realizar ensayos con cuatro diferentes reactivos de transfección comerciales obtuvieron diferencias en sus comportamientos, algunos obteniendo su mayor eficiencia de transfección a las 24h, mientras que otros a las 48h, asimismo se señala que existe una importante diferencia entre las eficiencias de transfección de los reactivos, al evaluar su capacidad de transfección en diferentes tipos de línea celular.¹¹⁹

5.7 Determinación de la viabilidad celular de los complejos

La citotoxicidad inducida por los nanomateriales o nanoestructuras se da como resultado de la interacción que se origina entre la superficie de la nanoestructura con los

componentes de la célula.¹²⁰ Las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas inciden en cómo estas interactúan con dichos componentes y por esto, en su citotoxicidad. Se ha observado en otras investigaciones, tal como la realizada por Huang y colaboradores, que tanto el tamaño de partícula como la carga superficial son factores que afectan en gran medida la interacción nanopartícula-célula, donde entre menor sea el tamaño de la nanopartícula, mayor será su área superficial y tendrá una mayor interacción con los diferentes componentes de la célula haciéndose más citotóxica. Por otro lado, se ha observado que la carga superficial también es determinante, entre más positiva sea la superficie, mayor interacción tendrá la nanopartícula con la membrana plasmática cargada negativamente, resultando en una mayor captación celular pero también en una mayor citotoxicidad.¹²¹

Además de la evaluación en la eficiencia de transfección de las diferentes formulaciones, estas se evaluaron en términos de su viabilidad celular sobre células HeLa a las 24 y 48 h de exposición, haciendo uso de AlamarBlue como reactivo de ensayo de viabilidad celular. En las figuras 25 y 26 se muestran los resultados obtenidos.

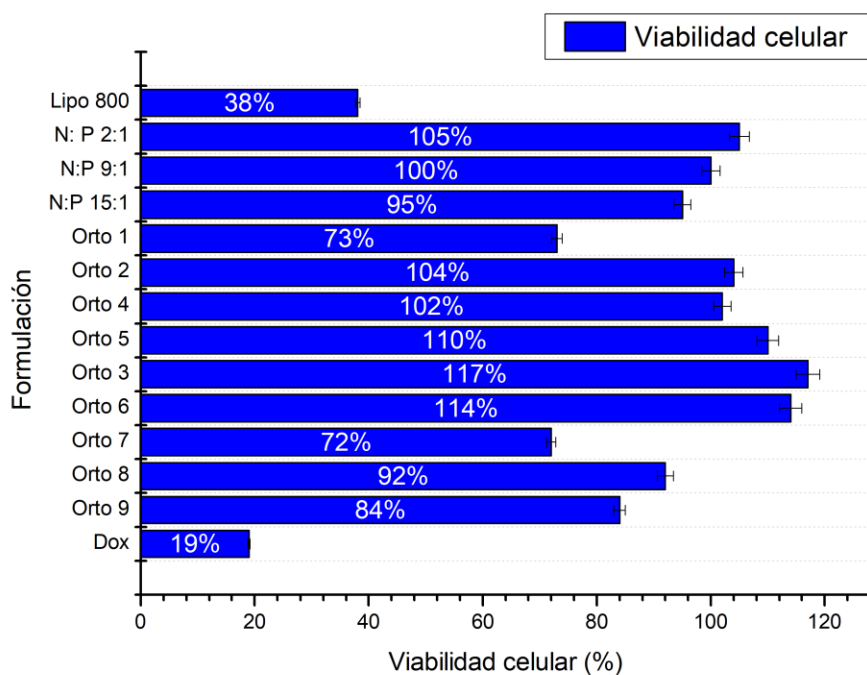


Figura 25. Promedio de viabilidad celular (%) de tres muestras preparadas independientemente de cada una de las formulaciones analizadas en el citómetro de flujo a las 24h de crecimiento.

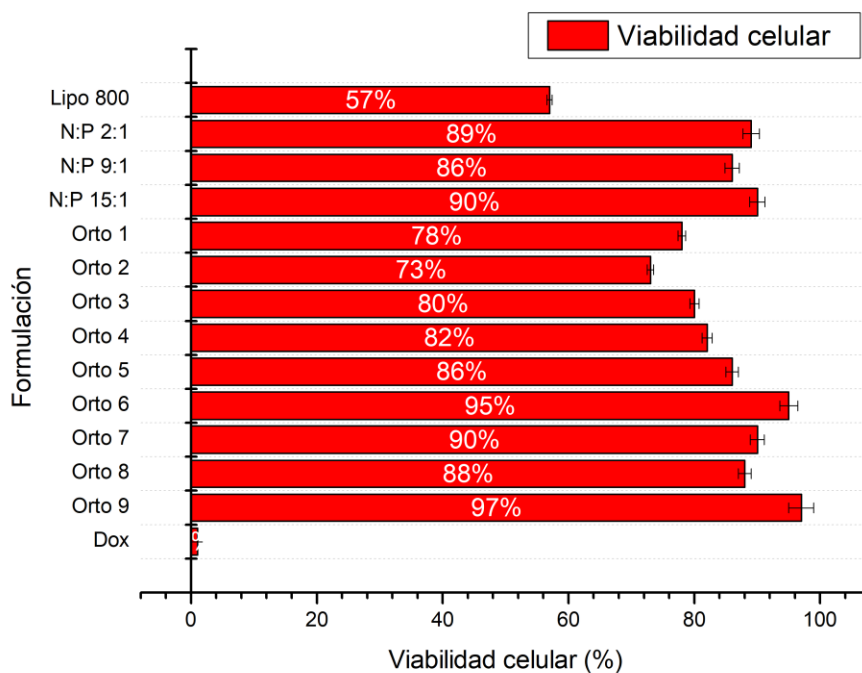


Figura 26. Promedio de viabilidad celular (%) de tres muestras preparadas independientemente de cada una de las formulaciones analizadas en el citómetro de flujo a las 48h de crecimiento.

Se puede notar, que tanto a las 24 como a las 48 h de crecimiento la viabilidad celular promedio de las formulaciones presenta valores mayores al 70%. Los resultados obtenidos por parte del reactivo citotóxico doxorubicina presentaron un comportamiento esperado, donde la muerte celular aumenta con el tiempo de exposición. Por otro lado, las viabilidades celulares promedio del control positivo de lipofectamina tanto a las 24 (38%) como a las 48 h (57%) registraron porcentajes relativamente bajos, a pesar de que el mismo presentó altas eficiencias de transfección (mayores al 80%). Este comportamiento ha sido reportado por Clements y colaboradores, donde la eficiencia de transfección de la lipofectamina es bastante alta, sin embargo, con altas dosis de ácido nucleico se torna muy citotóxica.¹²² De manera similar, Moradian y colaboradores argumentan que la viabilidad celular disminuye al aumentar la dosis de ácido nucleico empleada, induciendo un estrés sobre la célula que como efecto indirecto genera citotoxicidad.¹²³ Finalmente, cabe mencionar que a nivel general, las viabilidades celulares de las formulaciones disminuyeron ligeramente desde las 24 a las 48 h de crecimiento, esto podría deberse a la adhesión persistente a las células por parte de los complejos que no lograron transfectar. Este fenómeno ha sido notado en otras investigaciones

independientemente de la línea celular usada, tal como la llevada a cabo por Qi y colaboradores, donde al evaluar el efecto de las nanopartículas en la proliferación de células obtienen una disminución en la viabilidad celular desde las 24 a las 48 h sobre la línea celular de carcinoma gástrico humano MGC803.¹²⁴

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

La técnica de AFM demostró ser una técnica útil para la caracterización morfológica de las nanopartículas formuladas.

El encapsulamiento y retención del plásmido por parte del quitosano depende de la relación N:P a la cual se formule el complejo, sin embargo, la mayoría de las formulaciones evaluadas tienen la capacidad de retener el ADN plasmídico.

La técnica de electroforesis en gel de agarosa demostró ser una herramienta fácil y rápida para evaluar el encapsulamiento del ADN plasmídico en la matriz de quitosano.

La presencia de sales en el medio de formulación induce una ligera desestabilización estructural de los complejos, la cual podría provocar un efecto sobre la eficiencia de transfección de estos.

La adición de fosfolípidos a la formulación genera una ligera disminución en el tamaño del nanoencapsulado, posiblemente por una mejor compactación del complejo por medio de interacciones electrostáticas. Además, provoca una ligera disminución en el potencial zeta de los complejos.

La adición de fosfolípidos en la formulación de los complejos quitosano: ADN plasmídico, generó un ligero aumento en la eficiencia de transfección.

Las formulaciones estudiadas muestran una viabilidad celular superior al reactivo de transfección comercial, potenciando su posible uso como sistema de vehiculación *in vivo*.

Al evaluar estadísticamente el diseño ortogonal, se obtuvo que el valor de cada una de las variables individuales evaluadas en el diseño no consiguió un impacto significativo sobre las características físico-químicas finales del complejo, por lo que no se pudo utilizar

la información resultante de este análisis como herramienta para poder posteriormente optimizar las diferentes formulaciones.

6.2 Recomendaciones

El recubrimiento del complejo quitosano: ADN con fosfolípidos en las relaciones estudiadas, generó un ligero efecto sobre los resultados obtenidos, sin embargo, se debe considerar la adición de una mayor proporción de fosfolípidos en la formulación final con el fin de obtener diferencias significativas.

A pesar de que al agregar los fosfolípidos DPPC:PE-PEG2000 en diferentes cantidades tuvo un impacto positivo en la mayoría de las formulaciones, se podría considerar adicionar otro lípido tal como lo es el colesterol, cuya función como estabilizador de complejos dentro del cuerpo ha tenido un papel importante en aplicaciones de transfección.¹²⁵

Al realizar el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en las formulaciones del diseño ortogonal, se obtuvo que ninguna de las variables del mismo es significativa sobre los valores finales de tamaño y potencial zeta, no obstante se podría evaluar la significancia que podría tener la relación entre las tres variables tomadas en cuenta en el diseño ortogonal y de esta manera obtener más información acerca de cómo poder optimizar aún más las diferentes formulaciones variando los datos en cada una de las variables.

La técnica de AFM ha sido una herramienta importante en el proceso de investigación, ya que ha permitido la obtención de imágenes de las distintas formulaciones de nanoencapsulados realizadas hasta el momento. Esta técnica, además, ofrece la posibilidad de medir las propiedades nanomecánicas de las muestras por medio de la técnica denominada PinPoint Nanomechanical™, presente en los microscopios de fuerza atómica de Park Systems, la cual recolecta datos al formar curvas de fuerza/distancia en cada pixel, para que así sea posible calcular propiedades nanomecánicas cuantificables, tales como módulo, adhesión, deformación y disipación y de esta manera poder diferenciar e identificar cada complejo por aparte.¹²⁶

Se propone la evaluación de la eficiencia de transfección de las nanopartículas estudiadas con y sin la adición de fosfolípidos sobre una línea celular diferente tal como HEK293, ya que se ha visto que las eficiencias de transfección de vectores no virales como el quitosano varían de manera importante de una línea celular a otra.¹²⁷

Como recomendación final se podría realizar un diseño ortogonal en el cual se evalúe la relación N:P como variable y se fije un único valor de pH a la hora de formular los lipoquitoplejos, con el fin de tener más clara la ruta a seguir para mejorar la eficiencia de transfección. Esto, al estudiar el comportamiento de diferentes relaciones N:P con las diferentes relaciones a las que se agregan los fosfolípidos en cada formulación.

CAPÍTULO VII: REFERENCIAS

- (1) Langer, R. New Methods of Drug Delivery. *Science (1979)* **1989**, 249 (4976), 1527–1533. <https://doi.org/10.1126/science.2218494>.
- (2) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science (1979)* **2004**, 303 (5665), 1818–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>.
- (3) Stephenson, M. L.; Zamecnik, P. C. Inhibition of Rous Sarcoma Viral RNA Translation by a Specific Oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**, 75 (1), 285–288. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.285>.
- (4) Zamecnik, P. C.; Stephenson, M. L. Inhibition of Rous Sarcoma Virus Replication and Cell Transformation by a Specific Oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**, 75 (1), 280–284. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.280>.
- (5) Nimesh, S.; Gupta, N.; Chandra, R. Cationic Polymer Based Nanocarriers for Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. *J Biomed Nanotechnol* **2011**, 7 (4), 504–520. <https://doi.org/10.1166/jbn.2011.1313>.
- (6) Pack, D. W.; Hoffman, A. S.; Pun, S.; Stayton, P. S. DESIGN AND DEVELOPMENT OF POLYMERS FOR GENE DELIVERY. *NATURE REVIEWS* **2005**, 4 (July), 581–593. <https://doi.org/10.1038/nrd1775>.
- (7) Kamimura, K.; Suda, T.; Zhang, G.; Liu, D. Advances in Gene Delivery Systems. *Pharm Med* **2011**, 25 (5), 293–306. <https://doi.org/10.1007/BF03256872>.
- (8) Ramamoorth, M.; Narvekar, A. Non Viral Vectors in Gene Therapy - An Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **2015**, 9 (1), GE01–GE06. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>.
- (9) Herzog, R.; Zolotukhin, S. *A Guide to Human Gene Therapy*; Herzog, R., Zolotukhin, S., Eds.; World Scientific Publishing: Florida, USA, 2010.

- (10) Chellappan, D.; Sivam, N.; Xiang, T.; Pan, L.; Fui, T.; Kien, C.; Nico, K.; Yi, F.; Chellian, J.; Cheng, L.; Dahiya, R.; Gupta, G.; Singhvi, G.; Nammi, S.; Hansbro, P.; Dua, K. Gene Therapy and Type 1 Diabetes Mellitus. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2018**, *108*, 1188–1200. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.138>.
- (11) Hitti, F. L.; Gonzalez-Alegre, P.; Lucas, T. H. Gene Therapy for Neurologic Disease: A Neurosurgical Review. *World Neurosurg* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.09.097>.
- (12) Farmer, Z. L.; Kim, E. S.; Carrizosa, D. R. Gene Therapy in Head and Neck Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* **2019**, *31* (1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.08.006>.
- (13) Wei, Z.; Wang, C.; Zou, S.; Liu, H.; Tong, Z. Chitosan Nanoparticles as Particular Emulsifier for Preparation of Novel PH-Responsive Pickering Emulsions and PLGA Microcapsules. *Polymer (Guildf)* **2012**. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2012.02.015>.
- (14) Patil, S. D.; Rhodes, D. G.; Burgess, D. J. DNA-Based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review. *AAPS Journal* **2005**, *7* (1). <https://doi.org/10.1208/aapsj070109>.
- (15) García, S.; González, M. Terapia Génica: Perspectivas y Consideraciones Éticas En Relación Con Su Aplicación. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* **2008**, *2* (1), 1–15.
- (16) Henao, J.; Tachack, G.; Hernández, L. Terapia Génica En El Manejo de Las Distrofias Retinianas. *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular* **2001**, *16* (2), 57–67. <https://doi.org/doi.org/10.19052/sv.5078>.
- (17) Mcallister, D. V.; Allen, M. G.; R, M. M Icrofabricated M Icroneedles for G Ene. *Molecules* **2000**, 289–313.
- (18) Brown, M. D.; Schätzlein, A. G.; Uchegbu, I. F. Gene Delivery with Synthetic (Non Viral) Carriers. *Int J Pharm* **2001**, *229* (1–2), 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00861-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00861-4).
- (19) Regnier, V.; Tahiri, A.; André, N.; Lemaître, M.; Le Doan, T.; Préat, V. Electroporation-Mediated Delivery of 3'-Protected Phosphodiester

- Oligodeoxynucleotides to the Skin. *Journal of Controlled Release* **2000**, *67* (2–3), 337–346. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00223-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00223-6).
- (20) Chamundeeswari, M.; Jeslin, J.; Verma, M. L. Nanocarriers for Drug Delivery Applications. *Environ Chem Lett* **2019**, *17* (2), 849–865. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00841-1>.
- (21) Qian, W. Y.; Sun, D. M.; Zhu, R. R.; Du, X. L.; Liu, H.; Wang, S. L. PH-Sensitive Strontium Carbonate Nanoparticles as New Anticancer Vehicles for Controlled Etoposide Release. *Int J Nanomedicine* **2012**, *7*, 5781–5792. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34773>.
- (22) Garton, K. J.; Ferri, N.; Raines, E. W. Efficient Expression of Exogenous Genes in Primary Vascular Cells Using IRES-Based Retroviral Vectors. *Biotechniques* **2002**, *32* (4), 830–843. <https://doi.org/10.2144/02324rr01>.
- (23) Kay, M. A.; Glorioso, J. C.; Naldini, L. Viral Vectors for Gene Therapy: The Art of Turning Infectious Agents into Vehicles of Therapeutics. *Nat Med* **2001**, *7* (1), 33–40. <https://doi.org/10.1038/83324>.
- (24) Favre, D.; Provost, N.; Blouin, V.; Blancho, G.; Chérel, Y.; Salvetti, A.; Moullier, P. Immediate and Long-Term Safety on Recombinant Adeno-Associated Virus Injection into the Nonhuman Primate Muscle. *Molecular Therapy* **2001**, *4* (6), 559–566. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0494>.
- (25) Lundstrom, K.; Boulikas, T. Viral and Non-Viral Vectors in Gene Therapy: Technology Development and Clinical Trials. *Technol Cancer Res Treat* **2003**, *2* (5), 471–485. <https://doi.org/10.1177/153303460300200513>.
- (26) Lukashev, A. N.; Zamyatnin, A. A. Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry (Moscow)* **2016**, *81* (7), 700–708. <https://doi.org/10.1134/S0006297916070063>.
- (27) Nayerossadat, N.; Ali, P.; Maedeh, T. Viral and Nonviral Delivery Systems for Gene Delivery. *Adv Biomed Res* **2012**, *1* (1), 27. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.98152>.
- (28) Thomas, C. E.; Ehrhardt, A.; Kay, M. A. Progress and Problems with the Use of Viral Vectors for Gene Therapy. *Nat Rev Genet* **2003**, *4* (5), 346–358. <https://doi.org/10.1038/nrg1066>.

- (29) Marshall, E. Gene Therapy Death Prompts Review of Adenovirus Vector. *Science (1979)* **1999**, 286 (December), 2244–2245.
- (30) Response, N. I. H.; Possibly, P. D.; To, A.; Use, T. H. E.; An, O. F.; Vector, A. D. Assessment of Adenoviral Vector Safety and Toxicity: Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. *Hum Gene Ther* **2002**, 13 (1), 3–13. <https://doi.org/10.1089/10430340152712629>.
- (31) Baghdan, E.; Pinnapireddy, S. R.; Strehlow, B.; Engelhardt, K. H.; Schäfer, J.; Bakowsky, U. Lipid Coated Chitosan-DNA Nanoparticles for Enhanced Gene Delivery. *Int J Pharm* **2018**, 535 (1–2), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.045>.
- (32) Ahmed, S. E.; Martins, A. M.; Hussein, G. A. The Use of Ultrasound to Release Chemotherapeutic Drugs from Micelles and Liposomes. *J Drug Target* **2014**, 1–27. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2014.954119>.
- (33) Moussa, H.; Martins, A.; Hussein, G. Review on Triggered Liposomal Drug Delivery with a Focus on Ultrasound. *Curr Cancer Drug Targets* **2015**, 15 (4), 282–313.
- (34) Souto, E.; Figueiro, J.; Müller, R. *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*; Uchegbu, I., Schätzlein, A., Cheng, W., Lalatsa, A., Eds.; Springer: New York, 2013.
- (35) Liechty, W. B.; Kryscio, D. R.; Slaughter, B. V.; Peppas, N. A. Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **2010**, 1, 149–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847>.
- (36) Zamora-Mora, V.; Velasco, D.; Hernández, R.; Mijangos, C. Chitosan Microgels Obtained by On-Chip Crosslinking Reaction Employing a Microfluidic Device. *Optofluidics, Microfluidics and Nanofluidics* **2014**, 1 (1), 56–61. <https://doi.org/10.2478/optof-2014-0004>.
- (37) Tian, T. C.; Xie, C. X.; Li, L.; Wei, Q. L.; Yu, S. T.; Zhang, T. L. Research on the Structure of Amino Acid ILs and Its Solubility for Chitosan with Chemical Software. *Polym Degrad Stab* **2016**, 126, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.01.010>.
- (38) Koukaras, E. N.; Papadimitriou, S. A.; Bikiaris, D. N.; Froudakis, G. E. Insight on the Formation of Chitosan Nanoparticles through Ionotropic Gelation with

- Tripolyphosphate. *Mol Pharm* **2012**, 9 (10), 2856–2862. <https://doi.org/10.1021/mp300162j>.
- (39) Mwangi, W. W.; Ho, K. W.; Tey, B. T.; Chan, E. S. Effects of Environmental Factors on the Physical Stability of Pickering-Emulsions Stabilized by Chitosan Particles. *Food Hydrocoll* **2016**, 60, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.023>.
- (40) Ramin, B.; Li, Y.; Jin, W.; An, Y.; He, L.; Li, Z. Preparation and Optimization of Pickering Emulsion Stabilized by Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles for Curcumin Encapsulation. *Food Hydrocoll* **2016**, 52, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.015>.
- (41) Sogias, I. A.; Williams, A. C.; Khutoryanskiy, V. V. Why Is Chitosan Mucoadhesive? *Biomacromolecules* **2008**, 9 (7), 1837–1842. <https://doi.org/10.1021/bm800276d>.
- (42) Ristić, T.; Zabret, A.; Zemljič, L. F.; Peršin, Z. Chitosan Nanoparticles as a Potential Drug Delivery System Attached to Viscose Cellulose Fibers. *Cellulose* **2017**, 24 (2), 739–753. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1125-5>.
- (43) Sayin, B.; Somavarapu, S.; Li, X. W.; Sesardic, D.; Şenel, S.; Alpar, O. H. TMC-MCC (N-Trimethyl Chitosan-Mono-N-Carboxymethyl Chitosan) Nanocomplexes for Mucosal Delivery of Vaccines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 38 (4), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.08.010>.
- (44) Lee, K. Y.; Kwon, I. C.; Kim, Y. H.; Jo, W. H.; Jeong, S. Y. Preparation of Chitosan Self-Aggregates as a Gene Delivery System. *Journal of Controlled Release* **1998**, 51 (2–3), 213–220. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00173-9).
- (45) Paleos, C. M.; Tsiourvas, D.; Sideratou, Z.; Tziveleka, L. A. Drug Delivery Using Multifunctional Dendrimers and Hyperbranched Polymers. *Expert Opin Drug Deliv* **2010**, 7 (12), 1387–1398. <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.534981>.
- (46) Sánchez Carpintero, M.; Sánchez Navarro, A.; De Jesús Valle, M. Caracterización y Separación de Liposomas Por Microencapsulación. *Farna Journal* **2016**, 1, 93–100.
- (47) Villa, M.; Martínez, E.; Pedroza, R. Liposomas Como Nanotransportadores de Antioxidantes y Estudio de Tasa de Liberación. In *Omnia Science*; Omnia Science: México, 2015; pp 215–254.
- (48) Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. *Bioquímica*, Sexta Edic.; Reverté: Barcelona, 2007.

- (49) Zuhorn, I. S.; Oberle, V.; Visser, W. H.; Engberts, J. B. F. N.; Bakowsky, U.; Polushkin, E.; Hoekstra, D. Phase Behavior of Cationic Amphiphiles and Their Mixtures with Helper Lipid Influences Lipoplex Shape, DNA Translocation, and Transfection Efficiency. *Biophys J* **2002**, *83* (4), 2096–2108. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73970-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73970-2).
- (50) Khiati, S.; Pierre, N.; Andriamanarivo, S.; Grinstaff, M. W.; Arazam, N.; Nallet, F.; Navailles, L.; Barthélémy, P. Anionic Nucleotide-Lipids for in Vitro DNA Transfection. *Bioconjug Chem* **2009**, *20* (9), 1765–1772. <https://doi.org/10.1021/bc900163s>.
- (51) Li, J.; Wang, X.; Zhang, T.; Wang, C.; Huang, Z.; Luo, X.; Deng, Y. A Review on Phospholipids and Their Main Applications in Drug Delivery Systems. *Asian J Pharm Sci* **2014**, *10* (2), 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>.
- (52) Lenzo, N.; Martins, I.; Redgrave, M.; Redgrave, T. Effects of Phospholipid Composition on the Metabolism of Triacylglycerol, Cholesteryl Ester and Phosphatidylcholine from Lipid Emulsions Injected Intravenously in Rats. *Biochim Biophys Acta* **1988**, *960*, 111–118.
- (53) Edwards, K.; Johnsson, M.; Karlsson, G.; Silvander, M. Effect of Polyethyleneglycol-Phospholipids on Aggregate Structure in Preparations of Small Unilamellar Liposomes. *Biophys J* **1997**, *73* (1), 258–266. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78066-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78066-4).
- (54) Medicine, U. S. N. L. of. *ChemIDplus: A Toxnet Database*. National Institutes of Health, Health & Human Services. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/247925-28-6> (accessed 2019-01-23).
- (55) Ciani, L.; Ristori, S.; Salvati, A.; Calamai, L.; Martini, G. DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE Lipoplexes for Gene Delivery: Zeta Potential Measurements and Electron Spin Resonance Spectra. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2004**, *1664* (1), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.003>.
- (56) Pierrat, P.; Casset, A.; Kereselidze, D.; Lux, M.; Pons, F.; Lebeau, L. DOPC-Detergent Conjugates: Fusogenic Carriers for Improved In Vitro and In Vivo Gene Delivery. *Macromol Biosci* **2016**, 984–989. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600012>.

- (57) Pasut, G.; Paolino, D.; Celia, C.; Mero, A.; Joseph, A. S.; Wolfram, J.; Cosco, D.; Schiavon, O.; Shen, H.; Fresta, M. Polyethylene Glycol (PEG)-Dendron Phospholipids as Innovative Constructs for the Preparation of Super Stealth Liposomes for Anticancer Therapy. *Journal of Controlled Release* **2015**, *199*, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.008>.
- (58) Kakimoto, Y.; Tachihara, Y.; Okamoto, Y.; Miyazawa, K.; Fukuma, T.; Tero, R. Morphology and Physical Properties of Hydrophilic-Polymer-Modified Lipids in Supported Lipid Bilayers. *Langmuir* **2018**, *34* (24), 7201–7209. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00870>.
- (59) Kulkarni, J. A.; Darjuan, M. M.; Mercer, J. E.; Chen, S.; Van Der Meel, R.; Thewalt, J. L.; Tam, Y. Y. C.; Cullis, P. R. On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA. *ACS Nano* **2018**, *12* (5), 4787–4795. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.8b01516>.
- (60) Sutton, D.; Nasongkla, N.; Blanco, E.; Gao, J. Functionalized Micellar Systems for Cancer Targeted Drug Delivery. *Pharm Res* **2007**, *24* (6), 1029–1046. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9223-y>.
- (61) Hussein, G. A.; Pitt, W. G. The Use of Ultrasound and Micelles in Cancer Treatment. *J Nanosci Nanotechnol* **2008**, *8* (5), 2205–2215. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.225>.
- (62) Hussein, G. A.; Pitt, W. G. Micelles and Nanoparticles for Ultrasonic Drug and Gene Delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, *60* (10), 1137–1152. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.008>.
- (63) UCHEGBU, I.; SIEW, A. Nanomedicines and Nanodiagnostics Come of Age. *J Pharm Sci* **2013**, *102* (2), 305–310. <https://doi.org/doi.org/10.1002/jps.23377>.
- (64) Shapiro, H. *Practical Flow Cytometry*, Fourth.; John Wiley & Sons, Inc: New Jersey, 2003.
- (65) Marti, G.; Stetler-Stevenson, M.; Bleasing, J.; Fleisher, T. Introduction to Flow Cytometry. *Semin Hematol* **2001**, *38* (2), 93–99. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2004.07.008>.
- (66) Keith, M. B. A.; Farrell, P. J.; Iatrou, K.; Behie, L. A. Use of Flow Cytometry to Rapidly Optimize the Transfection of Animal Cells. *Biotechniques* **2000**, *28* (1), 148–154. <https://doi.org/10.2144/00281rr03>.

- (67) Homann, S.; Hofmann, C.; Gorin, A. M.; Nguyen, H. C. X.; Huynh, D.; Hamid, P.; Maithel, N.; Yacoubian, V.; Mu, W.; Kossyvakis, A.; Roy, S. Sen; Yang, O. O.; Kelesidis, T. A Novel Rapid and Reproducible Flow Cytometric Method for Optimization of Transfection Efficiency in Cells. *PLoS One* **2017**, *12* (9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182941>.
- (68) Yuan, Y.; Chesnutt, B. M.; Utturkar, G.; Haggard, W. O.; Yang, Y.; Ong, J. L.; Bumgardner, J. D. The Effect of Cross-Linking of Chitosan Microspheres with Genipin on Protein Release. *Carbohydr Polym* **2007**, *68*, 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.10.023>.
- (69) Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G.; Cullis, P. R. Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure. Characterization of Size Distribution, Trapped Volume and Ability to Maintain a Membrane Potential. *BBA - Biomembranes* **1985**, *812* (1), 55–65. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90521-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90521-8).
- (70) Bravo-Anaya, L. M.; Soltero, J. F. A.; Rinaudo, M. DNA/Chitosan Electrostatic Complex. *Int J Biol Macromol* **2016**, *88*, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.035>.
- (71) Diemunsch, A. M.; Pabst, J. Y.; Constant, C.; Mathis, C.; Stamm, A. Tablet Formulation: Genichi Taguchi's Approach. *Drug Dev Ind Pharm* **1993**, *19* (12), 1461–1477. <https://doi.org/10.3109/03639049309047185>.
- (72) Kim, K. Do; Choi, D. W.; Choa, Y. H.; Kim, H. T. Optimization of Parameters for the Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles by Taguchi Robust Design Method. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2007**, *311* (1–3), 170–173. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.06.017>.
- (73) Tsai, H. H.; Wu, D. H.; Chiang, T. L.; Chen, H. H. Robust Design of SAW Gas Sensors by Taguchi Dynamic Method. *Sensors* **2009**, *9* (3), 1394–1408. <https://doi.org/10.3390/s90301394>.
- (74) Palmieri, G. F.; Wehrlé, P. Evaluation of Ethylcellulose-Coated Pellets Optimized Using the Approach of Taguchi. *Drug Dev Ind Pharm* **1997**, *23* (11), 1069–1077. <https://doi.org/10.3109/03639049709150495>.
- (75) Weng, W. C.; Yang, F.; Elsherbeni, A. Z. Linear Antenna Array Synthesis Using Taguchi's Method: A Novel Optimization Technique in Electromagnetics. *IEEE*

- Trans Antennas Propag* **2007**, *55* (3 I), 723–730.
<https://doi.org/10.1109/TAP.2007.891548>.
- (76) Zhou, Y.; Chen, X.; Ye, M.; Shuai, X.; Deng, Y. Application of Orthogonal Design in Optimization of the Transfection Efficiency of Polyethylenimine Mediated Gene Transfer to Hepatoma Carcinoma Cells. *PubMed* **2011**, *28* (1), 104–109.
- (77) Montgomery, D. C. Experimental Design for Product and Process Design and Development. **1999**.
- (78) Zamora-Mora, V.; Fernández-Gutiérrez, M.; Román, J. S.; Goya, G.; Hernández, R.; Mijangos, C. Magnetic Core-Shell Chitosan Nanoparticles: Rheological Characterization and Hyperthermia Application. *Carbohydr Polym* **2014**, *102* (1), 691–698. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.101>.
- (79) Huang, M.; Fong, C. W.; Khor, E.; Lim, L. Y. Transfection Efficiency of Chitosan Vectors: Effect of Polymer Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Journal of Controlled Release* **2005**, *106* (3), 391–406. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.05.004>.
- (80) Povsic, T. J.; Dervan, P. B. Triple Helix Formation by Oligonucleotides on DNA Extended to the Physiological PH Range. *J Am Chem Soc* **1989**, *111* (8), 3059–3061. <https://doi.org/10.1021/ja00190a047>.
- (81) Han, M. S.; Kim, D. H. Naked-Eye Detection of Phosphate Ions in Water at Physiological PH: A Remarkably Selective and Easy-to-Assemble Colorimetric Phosphate-Sensing Probe. *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, *41* (20), 3809–3811. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20021018\)41:20<3809::AID-ANIE3809>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20021018)41:20<3809::AID-ANIE3809>3.0.CO;2-N).
- (82) Li, J.; Wang, X.; Zhang, T.; Wang, C.; Huang, Z. ScienceDirect A Review on Phospholipids and Their Main Applications in Drug Delivery Systems. *Asian J Pharm Sci* **2014**, No. 103, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>.
- (83) Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena. *J Colloid Interface Sci* **2007**, *309* (2), 194–224. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.12.075>.
- (84) Retamal Marín, R. R.; Babick, F.; Hillemann, L. Zeta Potential Measurements for Non-Spherical Colloidal Particles – Practical Issues of Characterisation of Interfacial

- Properties of Nanoparticles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2017**, 532, 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.010>.
- (85) Abreu, A. S.; Castanheira, E. M. S.; Queiroz, M. R. P.; Ferreira, P. M. T.; Vale-silva, L. A. Nanoliposomes for Encapsulation and Delivery of the Potential Antitumoral Methyl 6-Methoxy-3- (4- Methoxyphenyl) -1 H -Indole-2-Carboxylate. **2011**, 1–6.
- (86) Ahmadi, T. S.; Wang, Z. L.; Green, T. C.; Henglein, A.; El-sayed, M. A. Shape-Con Trolled Synthesis of Colloidal Platinum Nanoparticles. *Science (1979)* **2000**, 272, 1924–1925.
- (87) Meyer, G.; Amer, N. M.; Meyer, G.; Mo, N. Novel Optical Approach to Atomic Force Microscopy Novel Optical Approach to Atomic Force Microscopy. **2013**, 1045 (1988), 10–13. <https://doi.org/10.1063/1.100061>.
- (88) Ruozi, B.; Belletti, D.; Tombesi, A.; Tosi, G.; Bondioli, L.; Forni, F.; Vandelli, M. A. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in Liposomal Characterization: A Comparative Study. *Int J Nanomedicine* **2011**, 6, 557–563. <https://doi.org/10.2147/ijn.s14615>.
- (89) Saïed, N.; Aider, M. Zeta Potential and Turbidimetry Analyzes for the Evaluation of Chitosan/Phytic Acid Complex Formation. *J Food Res* **2014**, 3 (2), 71. <https://doi.org/10.5539/jfr.v3n2p71>.
- (90) Liu, H.; Gao, C. Preparation and Properties of Ionically Cross-Linked Chitosan Nanoparticles. *Polym Adv Technol* **2009**, 20 (7), 613–619. <https://doi.org/10.1002/pat.1306>.
- (91) Prochazkova, S.; Va, K. M.; Ostgaard, K. Quantitative Determination of Chitosans by Ninhydrin. *Carbohydr Polym* **1999**, 38, 115–122.
- (92) Curotto, E.; Aros, F. Quantitative Determination of Chitosan and the Percentage of Free Amino Groups. *Anal Biochem* **1993**, 211, 240–241.
- (93) KASAAI, M. Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan : A Review. *J. Agric. Food Chem* **2009**, 57, 1667–1676.
- (94) Pavinatto, A.; Delezuk, J. A. M.; Souza, A. L.; Pavinatto, F. J.; Volpati, D.; Miranda, P. B.; Campana-Filho, S. P.; Oliveira, O. N. Experimental Evidence for the Mode of Action Based on Electrostatic and Hydrophobic Forces to Explain Interaction between Chitosans and Phospholipid Langmuir Monolayers. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2016**, 145, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.001>.

- (95) Sreekumar, S.; Goycoolea, F. M.; Moerschbacher, B. M.; Rivera-rodriguez, G. R. Parameters Influencing the Size of Chitosan-TPP Nano- and Microparticles. *Sci Rep* **2018**, No. February, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23064-4>.
- (96) Ing, L. Y.; Zin, N. M.; Sarwar, A.; Katas, H. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. *Int J Biomater* **2012**, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/632698>.
- (97) Pfeifer, I.; Picola, D.; Andressa, K.; Busson, N.; Tiera, D. O.; Taboga, S. R.; Ruggiero, J. Effect of Ionic Strength Solution on the Stability of Chitosan – DNA Nanoparticles. *J Exp Nanosci* **2013**, *8* (January 2014), 37–41. <https://doi.org/10.1080/17458080.2011.602120>.
- (98) Nimesh, S.; Thibault, M.; Lavertu, M.; Buschmann, M. D. Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan / DNA Complexes : Effect of PH and Serum. *Mol Biotechnol* **2010**, *46*, 182–196. <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9286-1>.
- (99) Gennaro, A.; Deschaume, O.; Pfeiffer, H.; Bartic, C.; Wagner, P.; Wübbenhorst, M. Understanding the Dehydration Stress in Lipid Vesicles by a Combined Quartz Crystal Microbalance and Dielectric Spectroscopy Study. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science* **2020**, *217* (13). <https://doi.org/10.1002/pssa.201900986>.
- (100) Sezer, A. D.; Akbuğa, J. Comparison on in Vitro Characterization of Fucospheres and Chitosan Microspheres Encapsulated Plasmid DNA (PGM-CSF): Formulation Design and Release Characteristics. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10* (4), 1193–1199. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9324-0>.
- (101) Huang, Q.; Baum, L.; Fu, W.-L. Simple and Practical Staining of DNA with GelRed in Agarose Gel Electrophoresis. *Clin. Lab* **2010**, *56*, 149–152.
- (102) Sato, T.; Ishii, T.; Okahata, Y. *In Vitro Gene Delivery Mediated by Chitosan. Effect of PH, Serum, and Molecular Mass of Chitosan on the Transfection Efficiency*; 2001; Vol. 22.
- (103) Liu, W. E. N. G.; Yao, K. D. E.; Liu, Q. G. Formation of a DNA / N-Dodecylated Chitosan Complex and Salt-Induced Gene Delivery. **2001**, 3391–3395. <https://doi.org/10.1002/app.2199>.

- (104) Hee, T.; Kyu, I.; Woon, J.; Jaie, Y.; Su, C. Galactosylated Chitosan / DNA Nanoparticles Prepared Using Water-Soluble Chitosan as a Gene Carrier. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3783–3792. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.063>.
- (105) Krosggaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. *Textbook of Drug Design and Discovery*, Third Edit.; Taylor & Francis: London, 2002.
- (106) Chen, W.; Li, H.; Liu, Z.; Yuan, W. Lipopolyplex for Therapeutic Gene Delivery and Its Application for the Treatment of Parkinson’s Disease. *Front Aging Neurosci* **2016**, *8* (APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00068>.
- (107) Giancoli, D. *Física: Principios Con Aplicaciones*, Sexta Edic.; Quintanar, E., Hernández, F., Eds.; Pearson Educación: México, 2006.
- (108) Zhang, W.; Kang, X.; Yuan, B.; Wang, H.; Zhang, T.; Shi, M.; Zheng, Z.; Zhang, Y.; Peng, C.; Fan, X.; Yang, H.; Shen, Y.; Huang, Y. Nano-Structural Effects on Gene Transfection: Large, Botryoid-Shaped Nanoparticles Enhance DNA Delivery via Macropinocytosis and Effective Dissociation. *Theranostics* **2019**, *9* (6), 1580–1598. <https://doi.org/10.7150/thno.30302>.
- (109) Lavertu, M.; Méthot, S.; Tran-Khanh, N.; Buschmann, M. D. High Efficiency Gene Transfer Using Chitosan/DNA Nanoparticles with Specific Combinations of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Biomaterials* **2006**, *27* (27), 4815–4824. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.029>.
- (110) Agirre, M.; Zarate, J.; Puras, G.; Ojeda, E.; Pedraz, J. L. Improving Transfection Efficiency of Ultrapure Oligochitosan/DNA Polyplexes by Medium Acidification. *Drug Deliv* **2015**, *22* (1), 100–110. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.871373>.
- (111) Simmons, J. P.; Nelson, L. D.; Simonsohn, U. False-Positive Psychology: Undisclosed Flexibility in Data Collection and Analysis Allows Presenting Anything as Significant. *Psychol Sci* **2011**, *22* (11), 1359–1366. <https://doi.org/10.1177/0956797611417632>.
- (112) Bring, J. How to Standardize Regression Coefficients. *American Statistician* **1994**, *48* (3), 209–213. <https://doi.org/10.1080/00031305.1994.10476059>.
- (113) Sánchez, C. Rafts Lipídicos E IL-12R: Nuevos Avances En El Control de La Actividad Proliferativa de IL-12, Santiago de Compostela, 2007.

- (114) Cardarelli, F.; Digiaco, L.; Marchini, C.; Amici, A.; Salomone, F.; Fiume, G.; Rossetta, A.; Gratton, E.; Pozzi, D.; Caracciolo, G. The Intracellular Trafficking Mechanism of Lipofectamine-Based Transfection Reagents and Its Implication for Gene Delivery. *Sci Rep* **2016**, *6* (April), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep25879>.
- (115) Zheng, F.; Shi, X. W.; Yang, G. F.; Gong, L. L.; Yuan, H. Y.; Cui, Y. J.; Wang, Y.; Du, Y. M.; Li, Y. Chitosan Nanoparticle as Gene Therapy Vector via Gastrointestinal Mucosa Administration: Results of an in Vitro and in Vivo Study. *Life Sci* **2007**, *80* (4), 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.09.040>.
- (116) Cao, Y.; Tan, Y. F.; Wong, Y. S.; Liew, M. W. J.; Venkatraman, S. Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery. *Mar Drugs* **2019**, *17* (6). <https://doi.org/10.3390/md17060381>.
- (117) Ishii, T.; Okahata, Y.; Sato, T. Mechanism of Cell Transfection with Plasmid/Chitosan Complexes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2001**, *1514* (1), 51–64. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00362-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00362-5).
- (118) Du, Z.; Munye, M. M.; Tagalakis, A. D.; Manunta, M. D. I.; Hart, S. L. The Role of the Helper Lipid on the DNA Transfection Efficiency of Lipopolyplex Formulations. *Sci Rep* **2014**, *4*, 4–9. <https://doi.org/10.1038/srep07107>.
- (119) Sandbichler, A. M.; Aschberger, T.; Pelster, B. A Method to Evaluate the Efficiency of Transfection Reagents in an Adherent Zebrafish Cell Line. *Biores Open Access* **2013**, *2* (1), 20–27. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0287>.
- (120) Shin, S.; Song, I.; Um, S. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials* **2015**, *5* (3), 1351–1365. <https://doi.org/10.3390/nano5031351>.
- (121) Huang, Y. W.; Cambre, M.; Lee, H. J. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *Int J Mol Sci* **2017**, *18* (12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122702>.
- (122) Clements, B. A.; Incani, V.; Kucharski, C.; Lavasanifar, A.; Ritchie, B.; Uludağ, H. A Comparative Evaluation of Poly-L-Lysine-Palmitic Acid and Lipofectamine™ 2000 for Plasmid Delivery to Bone Marrow Stromal Cells. *Biomaterials* **2007**, *28* (31), 4693–4704. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.023>.

- (123) Moradian, H.; Roch, T.; Lendlein, A.; Gossen, M. mRNA Transfection-Induced Activation of Primary Human Monocytes and Macrophages: Dependence on Carrier System and Nucleotide Modification. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60506-4>.
- (124) Qi, L. F.; Xu, Z. R.; Li, Y.; Jiang, X.; Han, X. Y. In Vitro Effects of Chitosan Nanoparticles on Proliferation of Human Gastric Carcinoma Cell Line MGC803 Cells. *World J Gastroenterol* **2005**, *11* (33), 5136–5141. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i33.5136>.
- (125) Betker, J. L.; Kullberg, M.; Gomez, J.; Anchordoquy, T. J. Cholesterol Domains Enhance Transfection. *Ther Deliv* **2013**, *4* (4), 453–462. <https://doi.org/10.4155/tde.13.16>.
- (126) Vermette, P. Young ' s Moduli of Surface-Bound Liposomes by Atomic Force Microscopy Force Measurements. **2014**, No. 20, 3320–3325.
- (127) Mansouri, S.; Lavigne, P.; Corsi, K.; Benderdour, M.; Beaumont, E.; Fernandes, J. C. Chitosan-DNA Nanoparticles as Non-Viral Vectors in Gene Therapy: Strategies to Improve Transfection Efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *57* (1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00155-3).

CAPÍTULO VIII: ANEXOS

8.1 Anexo 1. Cálculo de las relaciones N:P teóricas en los complejos quitosano: ADN

Muestra de cálculo realizada para la determinación de aminos libres por mol de quitosano utilizado:

- Partiendo desde el hecho de que el polímero (quitosano) con el que se trabajó posee una unidad repetitiva $[C_6H_{11}NO_4]_n$ se tiene $\frac{20000 \text{ g/mol}}{161 \text{ g/mol}} = 124 \text{ unidades} \times 1N = 124 \text{ moles de N por cada mol de quitosano} = 124 \times 0,90 = 111,6 \frac{\text{mol N}}{\text{mol Qui}}$.

Muestra de cálculo realizada para la determinación de micro moles de fosfatos libres por microlitro de ADN a la concentración de trabajo:

- Partiendo desde el hecho de que el ADN posee 7950 pares de bases y se encontraba a una concentración de $0,2377 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$ se tiene $\frac{4912356 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{15900 \text{ nucleótidos}} = 309 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ por nucleótido $\rightarrow \frac{0,2377 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}}{309 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}}} = 7,69 \times 10^{-4} \frac{\mu\text{mol [P-]}}{\mu\text{L ADN}}$.

Muestra de cálculo realizada para la formulación de los complejos quitosano: ADN a una relación N:P 2:1 tomando como base una masa de 2,5 μg de ADN en 100 μL de formulación:

- ADN: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \rightarrow 0,2377 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \times V_1 = 0,025 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \times 100 \mu\text{L} \rightarrow V_1 = \underline{10,5 \mu\text{L}}$
 $\rightarrow 10,5 \mu\text{L ADN} \times \frac{7,69 \times 10^{-4} \mu\text{mol [P-]}}{\mu\text{L ADN}} = 8,07 \times 10^{-3} \mu\text{mol [P-]}$.
- Quitosano: Ya que la relación N:P es de 2:1 entonces se necesitan $8,07 \times 10^{-3} \mu\text{mol [P-]} \times 2 = 1,61 \times 10^{-2} \mu\text{mol [N+]}$ $\rightarrow X \cdot 0,90 = 1,61 \times 10^{-2} \text{ [N+]} \rightarrow X = 0,01789 \text{ N}_T$
 $\rightarrow 0,01789 \mu\text{mol N} \times \frac{1 \mu\text{mol Qui}}{111,6 \mu\text{mol N}} = 1,60 \times 10^{-4} \mu\text{mol Qui}$
 $\rightarrow \frac{X \mu\text{g}}{20000 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} = 1,60 \times 10^{-4} \mu\text{mol Qui} \rightarrow X = 3,2 \mu\text{g} \times \frac{1 \mu\text{L}}{0,5 \mu\text{g}} = \underline{6,4 \mu\text{L}}$.

8.2 Anexo 2. Determinación de aminas libres en el quitosano mediante el método de ninhidrina

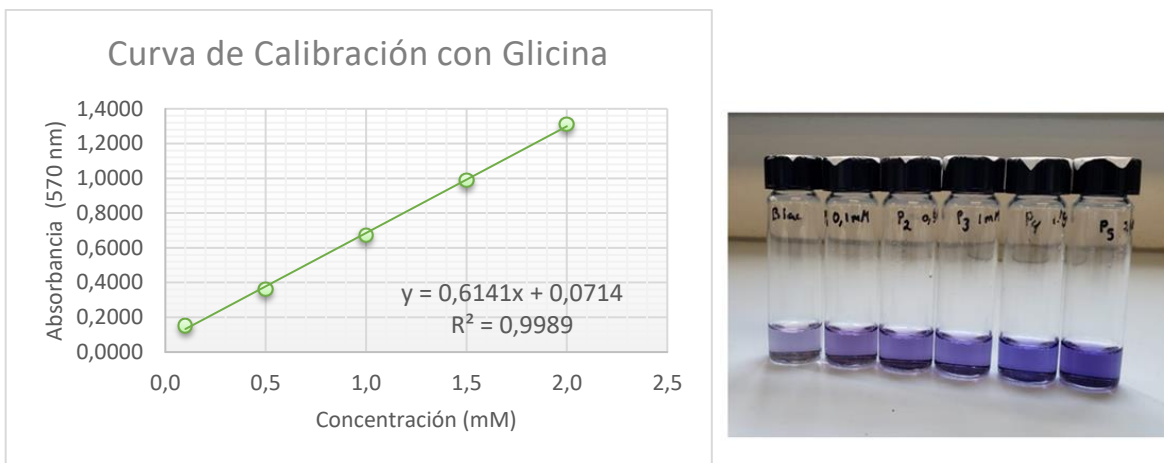


Figura 27. Curva de calibración realizada con glicina para la determinación de aminas libres en quitosano.

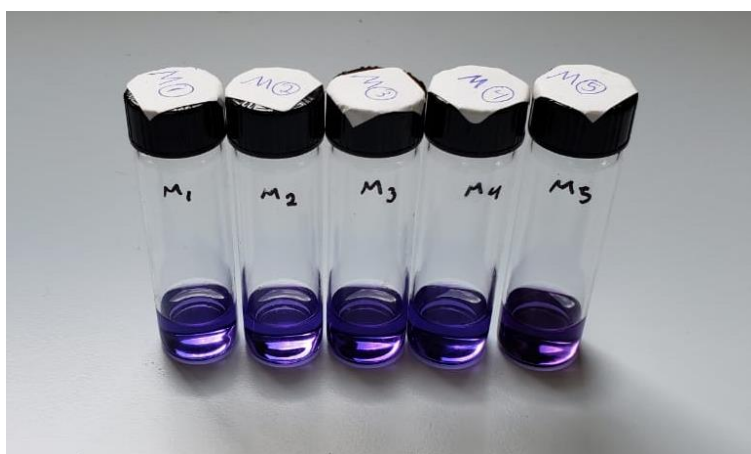


Figura 28. Muestras de quitosano de 2 mg/mL preparadas para el análisis espectrofotométrico con ninhidrina.

Cuadro 5. Resultados obtenidos en el ensayo de ninhidrina para el quitosano de ultra bajo peso molecular.

Muestra	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación (R ²)	Concentración Obtenida de aminas primarias (mM)	Concentración Obtenida de aminas primarias (mol/μL)	Concentración de aminas primarias en moles por mol de quitosano
Quitosano ULMW 0,5 mg/mL	$y = 0,3447x - 0,0145$	0,9989	1,012	1,012E-09	40,49
	$y = 0,6859x - 0,0004$	0,9999	1,009	1,009E-09	40,38
	$y = 0,3433 - 0,0149$	0,9996	1,015	1,016E-09	40,62
	$y = 1,4333x - 0,0064$	0,9992	0,989	9,893E-10	39,57
	$y = 0,6408x + 0,0061$	0,9981	1,063	1,063E-09	42,53
	$y = 0,3619x - 0,1225$	0,9988	1,342	1,342E-09	53,66
	$y = 0,3304x + 0,0118$	0,9919	1,206	1,206E-09	48,23
	$y = 1,618x + 0,116$	0,9957	1,256	1,256E-09	50,23
	$y = 0,3177x - 0,0213$	0,9960	1,182	1,182E-09	47,27
	$y = 0,6842x - 0,041$	0,9972	1,164	1,164E-09	46,58
	$y = 0,3175x - 0,0216$	0,9959	1,182	1,182E-09	47,28
	$y = 1,4126x - 0,089$	0,9970	1,169	1,169E-09	46,75
	$y = 0,3177x - 0,0213$	0,9960	0,999	9,993E-10	39,97
	$y = 0,6842x - 0,041$	0,9972	0,979	9,790E-10	39,16
	$y = 0,3175x - 0,0216$	0,9959	0,998	9,982E-10	39,93
$y = 1,4126x - 0,089$	0,9970	0,983	9,828E-10	39,31	
Promedio	N/A	N/A	1,100	1,097E-09	43,87

Para cada muestra de quitosano utilizando la ecuación de la curva de calibración, se despejó la variable dependiente “x” sustituyendo la variable "y" por la absorbancia obtenida en cada una. Posteriormente la concentración obtenida en milimolaridad se expresó en término de mol N/mol Qui.

8.3 Anexo 3. Cálculo de las relaciones N:P en los complejos quitosano: ADN utilizando el resultado obtenido por el ensayo con ninhidrina

Muestra de cálculo realizada para la formulación de los complejos quitosano: ADN a una relación N:P 2:1 tomando como base una masa de 2,5 µg de ADN en 100 µL de formulación:

$$7,69 \times 10^{-4} \frac{\mu\text{mol } [P^-]}{\mu\text{L ADN}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1000000 \mu\text{mol}} = 7,69 \times 10^{-10} \frac{\text{mol } [P^-]}{\mu\text{L ADN}} \times 10,5 \mu\text{L} = 8,07 \times 10^{-9} \text{ mol} \times 2 = 1,61 \times 10^{-8} \text{ mol } [N^+] \times \frac{1 \mu\text{L Qui}}{1,097 \times 10^{-9} \text{ mol } [N^+]} = 14,7 \mu\text{L Qui.}$$

∴ La formulación total es: 14,7 µL Qui + 10,5 µL ADN + 74,8 µL H₂O.

De igual manera se realizó para cada una de las relaciones estudiadas en el proyecto.

8.4 Anexo 4. Evaluación de la estabilidad de las dispersiones liposomales en el tiempo por medio de la técnica de DLS

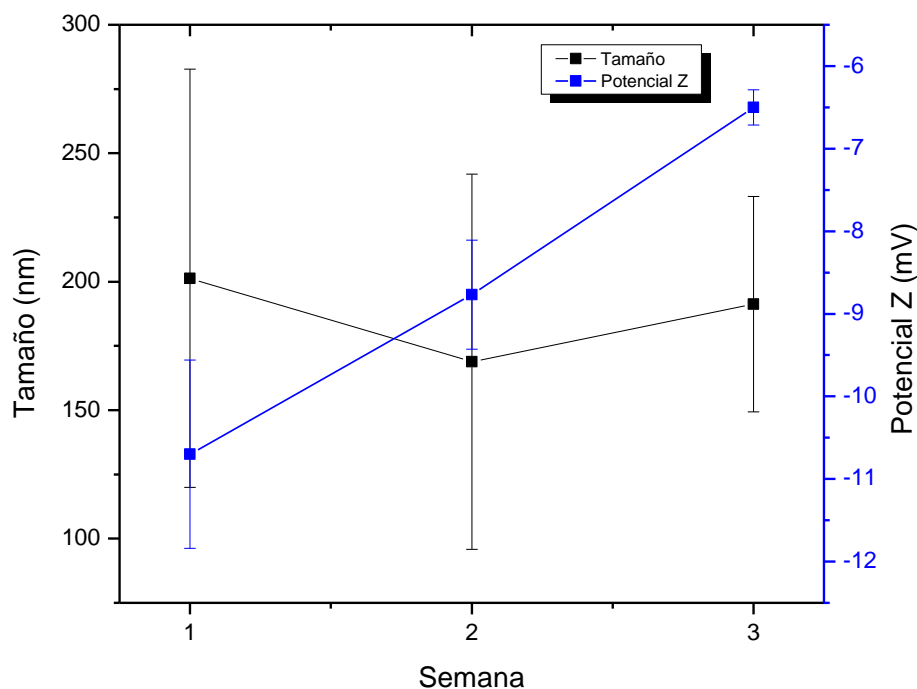


Figura 29. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los liposomas en una relación molar DPPC:PE-PEG2000 1:1 con el fin de evaluar estabilidad en el tiempo.

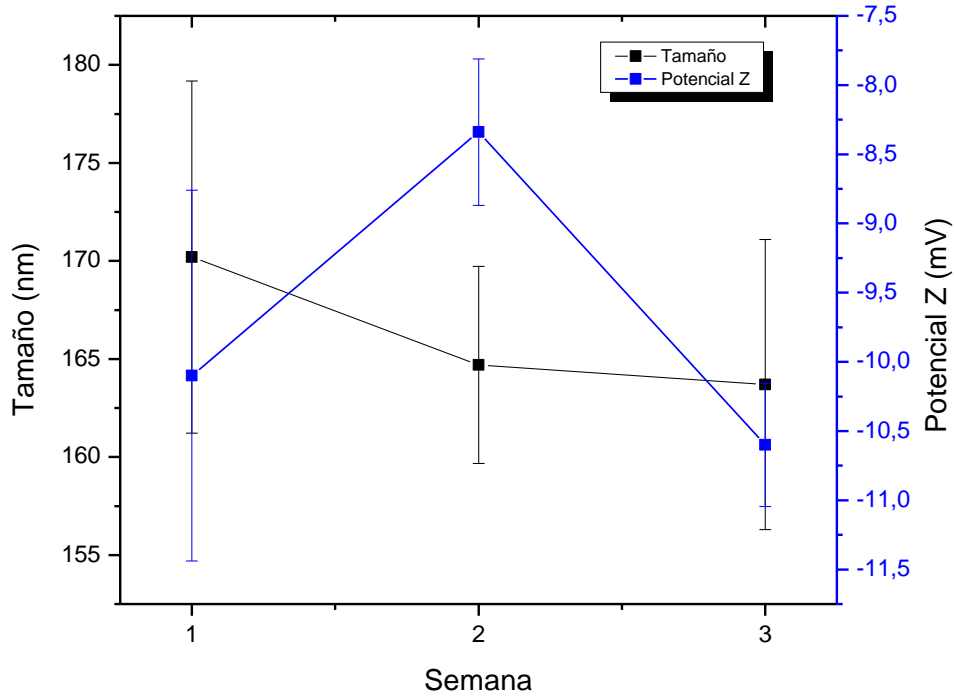


Figura 30. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los liposomas en una relación molar DPPC:PE-PEG2000 3:1 con el fin de evaluar estabilidad en el tiempo.

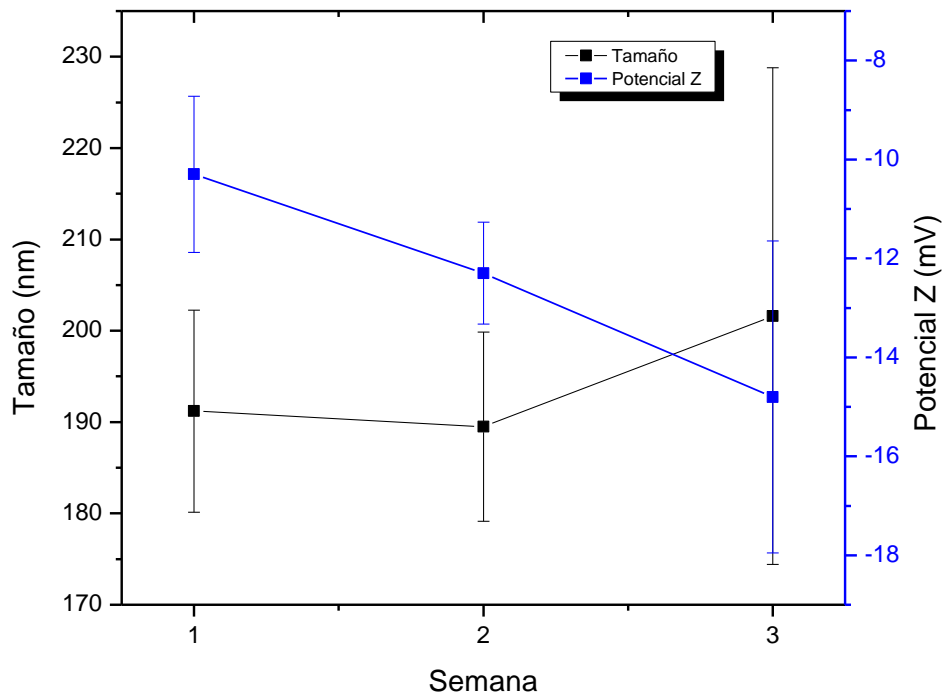


Figura 31. Promedio de tamaño de partícula y potencial Z de tres muestras preparadas independientemente de los liposomas en una relación molar DPPC:PE-PEG2000 6:1 con el fin de evaluar estabilidad en el tiempo.

8.5 Anexo 5. Evaluación de la estabilidad de los complejos quitosano:

ADN por medio de la técnica de electroforesis

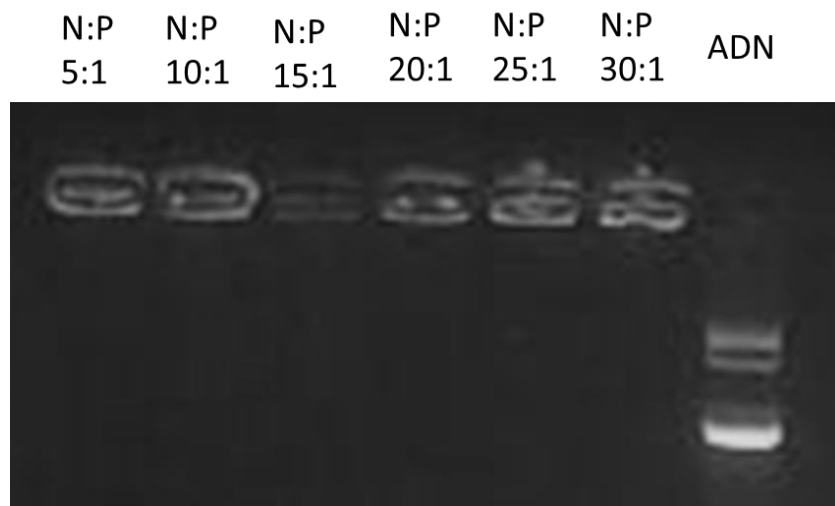


Figura 32. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa a diferentes formulaciones de quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético) después de 24 h de haber sido diluidas en Opti-MEM y haber alcanzado un pH final de 6,0.

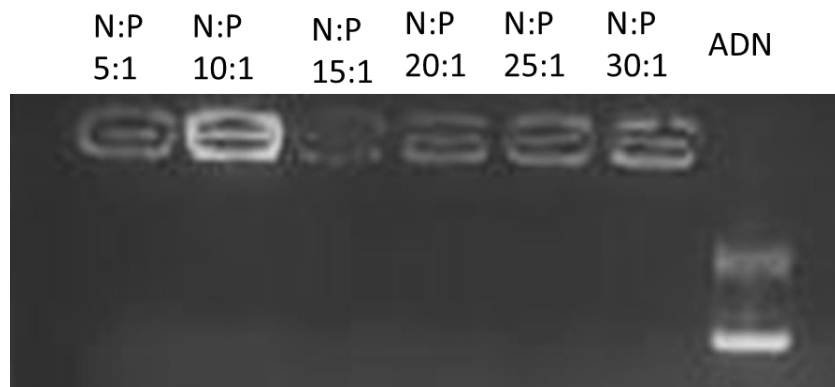


Figura 33. Prueba de electroforesis realizada en gel de agarosa a diferentes formulaciones de quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético) después de 48 h de haber sido diluidas en Opti-MEM y haber alcanzado un pH final de 6,0.

8.6 Anexo 6. Determinación de los valores de pH de los complejos quitosano: ADN en Opti-MEM

Cuadro 6. Medición de los valores de pH de los complejos quitosano: ADN (utilizando el quitosano en un buffer de ácido acético-acetato de sodio) formulados antes y después de haber sido diluidos con Opti-MEM.

Complejo quitosano: ADN	Valor de pH		
	Quitosano utilizado a	Antes de ser diluido el complejo	Después de ser diluido el complejo
N:P 2:1	4,0	4,2	7,2
N:P 9:1	4,0	4,1	4,9
N:P 15:1	4,0	4,0	4,5
N:P 2:1	4,5	4,7	7,5
N:P 9:1	4,5	4,6	5,3
N:P 15:1	4,5	4,6	4,9
N:P 2:1	5,0	5,2	7,6
N:P 9:1	5,0	5,1	6,9
N:P 15:1	5,0	5,1	5,5

Cuadro 7. Cambios en el pH realizados a formulaciones quitosano: ADN (utilizando quitosano disuelto en ácido acético) diluidos en Opti-MEM para analizar su estabilidad por electroforesis.

Formulación	pH inicial	pH final o ajustado
N:P 2:1	8,1	8,0
N:P 6:1	7,8	5,0
N:P 9:1	7,7	4,0
N:P 12:1	7,5	3,0
N:P 15:1	7,0	7,0
N:P 12:1	7,0	2,0
N:P 18:1	6,3	6,0