



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y  
TECNOLOGÍA AVANZADA**

**TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HUMANAS *IN VITRO*  
EMPLEANDO UN VECTOR SUPRAMOLECULAR Y  
SONOPORACIÓN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN TECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**DENISE GIOVANA CARRASCO GONZÁLEZ**

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN**

JURIQUILLA, QUERETARO

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
 CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA  
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, CUAUTILÁN  
 LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA



Votos Aprobatorios

**COMITÉ ACADÉMICO DE LA  
 LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA**

Presente

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis de título Transfección de células humanas *in vivo* empleando un vector supramolecular y sonoporación que realizó el (la) pasante

Denise Giovana Carrasco González

con número de cuenta: 412011256, bajo la opción de titulación por Tesis y Examen profesional en la Licenciatura en Tecnología.

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

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Achim Max Loske Mehling	
VOCAL	Dra. Luz María López Marín	
SECRETARIO	Dr. Manuel Miranda Anaya	
1er. SUPLENTE	Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez	
2º SUPLENTE	M.C. Alejandro Reyes de la Torre	

Atentamente  
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

UNAM, Campus Juriquilla, Oro. a 16 de marzo de 20 16.

## **DEDICATORIA**

A mi padre, Gerardo, por ser la roca y fortaleza de la familia, por su constante apoyo y por ser un gran ejemplo a seguir en mi potencial académico.

A mi madre, Margarita, por ser otro de mis ejemplos a seguir, por su paciencia, confianza, comprensión y amor incondicional para impulsarme a ser mejor.

A mi fiel compañera y hermana, Ana Karen, por su maravillosa y única amistad, su cariño y su disposición en todo momento.

A mis abuelitos, tías y tíos por su constante interés y estímulos en mi vida académica, en particular a María de las Mercedes, que será por siempre una inspiración.

A Angel Tinoco por ser un gran incentivo en mi desarrollo académico y personal.

**El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Nanobio-óptica y de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, con financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, a través del proyecto PAPIIT IT200615, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del proyecto PDCP-2013/214076, y del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCYTEQ), a través del Programa “Nuevos Talentos en Ciencia y Tecnología”.**

**Agradezco el otorgamiento de becas por parte de la DGAPA-UNAM y del CONCYTEQ.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Licenciatura en Tecnología del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, campus UNAM Juriquilla.

Al Dr. Remy F. Ávila Foucat por su apoyo y disposición como Coordinador de la Licenciatura en Tecnología.

A mi tutora, la Dra. Luz María López Marín por su apoyo, su confianza y su constante impulso para mi crecimiento académico.

Al Dr. Achim M. Loske por su apoyo, su constante incentivación y su confianza en la realización de este proyecto.

Al Dr. Pedro Salas Castillo por su colaboración al otorgar generosamente las nanopartículas mesoporosas con las cuales se desarrolló este trabajo.

A la Dra. Carmen Aceves por ser mi primera tutora de estancia de investigación, sirviendo de guía para mi formación académica.

A mis sinodales:

- M.C. Alejandro Reyes de la Torre
- Dr. Manuel Miranda Anaya
- Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez

A la Dra. Blanca Millán Chiu por su amistad, disposición y apoyo en el Laboratorio de Nanobio-óptica, así como en el área de microscopía confocal y epifluorescencia.

Al personal académico del Laboratorio de Nanobio-óptica y del Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, en especial, a Edgar Jiménez e Isadora Mejía por su amistad y apoyo, a Paula Bernardino por su constante interés y apoyo en este proyecto y al M. en C. Francisco Fernández por su disposición.

A la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, en particular a la Dra. Anaid Antaramian y a la M. en C. Adriana González.

A las responsables de la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología, la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y a la M.C. Lourdes Palma Tirado.

A la Dra. Genoveva Hernández Padrón del Departamento de Nanotecnología del CFATA por su apoyo en el área de espectroscopia Raman.

A mis amigos de la cuarta, quinta y sexta generación de la Licenciatura, en particular Itzel Ávila, Cristian Flores, Pamela Velázquez, Rodolfo Nava y Angel Tinoco, por su apoyo, compañía y su interés en el desarrollo del proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE TABLAS .....	XI
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. Antecedentes .....	3
2. Planteamiento del problema.....	4
3. Hipótesis.....	5
4. Objetivos .....	5
4.1. Generales.....	5
4.2. Particulares.....	6
MARCO TEÓRICO .....	7
1. Transfección: Definición y métodos .....	7
1.1. Nanopartículas .....	11
1.1.1. Tipos.....	12
1.1.1.1. Nanopartículas híbridas o supramoleculares.....	14
1.1.2. Caracterización de materiales .....	16
1.1.2.1. Espectroscopia Raman .....	17
1.1.2.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	17
1.2. Sonoporación .....	18
1.2.1. Generación de ondas de choque.....	20
1.2.2. Aplicaciones.....	22
2. Fluorescencia y sistemas reporteros de transfección celular .....	23
2.1. Fluorocromos .....	23
2.1.1. Calceína.....	24
2.1.2. Rodamina .....	25
2.1.3. DAPI .....	25
2.2. Proteínas y genes reporteros .....	26
2.2.1. Plásmidos .....	28
2.3. Métodos de caracterización de nanopartículas y de sus cargos .....	30
2.3.1. Espectroscopia UV.....	32
2.3.2. Electroforesis.....	32
2.3.3. Microscopía de epifluorescencia.....	34
2.3.4. Microscopía confocal .....	34
2.3.5. Citometría de flujo .....	35

METODOLOGÍA .....	36
1. Diseño experimental .....	36
2. Material y métodos.....	37
2.1. Obtención de lote de calidad del plásmido <i>pCX::GFP-GPI2</i> .....	37
2.1.1. Transformación de <i>E. coli</i> con plásmido.....	37
2.1.2. Inoculación y cultivo bacteriano .....	37
2.1.3. Purificación de ADN plasmídico por cromatografía de intercambio aniónico.....	38
2.1.4. Análisis cuantitativo .....	39
2.1.5. Análisis cualitativo .....	40
2.2. Manejo de líneas celulares .....	41
2.2.1. Descongelamiento .....	42
2.2.2. Propagación.....	42
2.2.3. Almacenamiento .....	44
2.3. Preparación de nanopartículas híbridas para transfección .....	44
2.3.1. Producción de nanopartículas híbridas.....	44
2.3.1.1. Preparación de liposomas catiónicos unilaminares grandes (LUV).....	45
2.3.1.2. Encapsulamiento de ADN en nanopartículas de sílice mesoporosa .....	46
2.3.1.3. Eficiencia de encapsulamiento .....	48
2.3.2. Caracterización de las nanopartículas .....	48
2.3.2.1. Microscopía de epifluorescencia .....	49
2.3.2.2. Espectroscopia Raman .....	49
2.3.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	49
2.3.3. Interacción de nanopartículas con la línea celular HEK293 .....	50
2.3.3.1. Adhesión e internalización .....	50
2.3.3.2. Transfección .....	51
2.4. Aplicación de ondas de choque.....	51
2.4.1. Efectos de nanopartículas sobre supervivencia celular.....	52
2.5. Transfección de células HEK293 mediante nanopartículas híbridas y exposición a ondas de choque .....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	56
1. Obtención del plásmido <i>pCX::GFP-GPI2</i> .....	56
2. Ensamblaje del nanovector híbrido.....	60
2.1. Eficiencia de encapsulamiento.....	62
2.2. Caracterización del nanovector híbrido .....	65
2.2.1. Microscopía de epifluorescencia.....	65
2.2.2. Espectroscopia Raman .....	67
2.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	71
2.3. Interacción de nanopartículas con células HEK293 .....	73
2.3.1. Adhesión e internalización.....	73
2.3.2. Transfección con el plásmido <i>pCX::GFP-GPI2</i> .....	76
3. Permeabilización e internalización de nanovectores mediante ondas de choque .....	77
3.1. Supervivencia de células HEK293 ante tratamientos por ondas de choque .....	78
3.2. Efectos de nanopartículas cerámicas sobre la supervivencia celular ante ondas de choque.....	79
3.3. Transfección de células empleando nanovectores híbridos y ondas de choque.....	82
CONCLUSIONES .....	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
C	Carbono.
cm	Centímetro(s).
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
DAPI	4',6-Diamino-2-Fenilindol.
DEAE-Dextran	Dietilaminoetil-Dextran.
DHPE (Rodamina) o PE-rodamina	Lisamina™ Rodamina B 1,2-Dihexadecanoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina.
DIC	Contraste de interferencia diferencial.
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DOTAP	1,2-Dioleil-3-Trimetilamonio-Propano.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético.
EGFP	Proteína verde fluorescente aumentada.
FBS	Suero fetal bovino.
FSC	Detector frontal (citometría de flujo).
GFP	Proteína verde fluorescente.
HEK293	Células inmortales derivadas de riñón embrionario humano.
hrs.	Horas.
Hz	Hertz.
IMF	Intensidad media de fluorescencia.
kpb	Kilopares de bases.
kV	Kilovolt(s).
LB	Caldo de lisogenia.

---

LB-AMP	Caldo de lisogenia-ampicilina.
LUV	Vesículas unilaminares grandes.
m	Metro(s).
mg	Miligramo(s).
ml	Mililitro(s).
MLV	Vesículas multilaminares grandes.
MPa	Megapascal(es).
NaOH	Hidróxido de sodio.
nm	Nanómetro(s).
°C	Centígrados.
pb	Pares de bases.
PBS	Solución isotónica y amortiguadora de fosfatos.
PC	L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina.
RNAse	Ribonucleasa.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
TEM	Microscopía electrónica de transmisión.
Tris-Cl	Tris (hidroximetil) aminometano (Hidrocloruro).
UV	Ultravioleta.
V	Volts.
$\times g$	Fuerza centrífuga relativa.
$\mu\text{g}$	Microgramo(s).
$\mu\text{l}$	Microlitro(s).
$\mu\text{m}$	Micrómetro(s).
$\mu\text{mol}$	Micromol.
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
$\mu\text{M}$	Micromolar.

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Interacción de liposomas catiónicos con células.....	15
<b>Figura 2.</b> Fabricación de nanopartículas híbridas.....	16
<b>Figura 3.</b> Gráfica de onda de choque.....	19
<b>Figura 4.</b> Efecto de cavitación de una burbuja en suspensión de células por ondas de choque.....	19,20
<b>Figura 5.</b> Generador piezoeléctrico de ondas de choque.....	21
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la calceína.....	24
<b>Figura 7.</b> Estructura química de la rodamina DHPE.....	25
<b>Figura 8.</b> Estructura química del DAPI.....	25
<b>Figura 9.</b> Proceso para obtención de ADN plasmídico.....	29
<b>Figura 10.</b> Purificación de ADN plasmídico.....	30
<b>Figura 11.</b> Electroforesis de ADN con gel de agarosa.....	33
<b>Figura 12.</b> Configuración básica del microscopio confocal.....	35
<b>Figura 13.</b> Diagrama Experimental del proyecto.....	36
<b>Figura 14.</b> Conteo en cámara Neubauer.....	43
<b>Figura 15.</b> Componentes del plásmido pCX::GFP-GPI2.....	56
<b>Figura 16.</b> Expresión de genes reporteros.....	57
<b>Figura 17.</b> Crecimiento de colonias de la bacteria E. coli modificada con el plásmido pCX::GFP-GPI2 en medio LB que contiene ampicilina.....	58
<b>Figura 18.</b> Cuantificación de ADN por espectrometría U.V. del lote purificado del plásmido pCX::GFP-GPI2.....	59
<b>Figura 19.</b> Análisis del plásmido pCX::GFP-GPI2 en gel de agarosa. Izquierda: Imagen de fluorescencia, con tinción de SybrSafe®, obtenida por fotodocumentador. Derecha: Imagen obtenida por fotodocumentador con colores invertidos. Muestras analizadas: 1) Referencia de tallas moleculares, 2) Plásmido purificado.....	60
<b>Figura 20.</b> Modalidades de nanovectores: nanopartículas cerámicas, nanopartículas híbridas, y sus variantes con cargos reporteros.....	62
<b>Figura 21.</b> Microscopía de epifluorescencia para el análisis de suspensiones de nanopartículas con calceína. A) SiNP no hidrofílicas, B)NC-Cal, C)NH-Cal.....	66
<b>Figura 22.</b> Estructura química de óxido de Silicio(sílice) amorfo.....	68
<b>Figura 23.</b> Estructura química del lípido catiónico DOTAP con sus grupos funcionales.....	68
<b>Figura 24.</b> Estructura química del lípido PC, resaltando sus grupos funcionales.....	68
<b>Figura 25.</b> Espectroscopia Raman de SiNP, liposomas catiónicos (LUV) y nanopartículas híbridas con ADN plasmídico (NH-ADN).....	69
<b>Figura 26.</b> Comparación de morfología y tamaño de imágenes obtenidas por la técnica de caracterización TEM a escala de 100 nm. A)Liposomas catiónicos, B)Nanopartículas mesoporosas de sílice, C)Nanopartículas mesoporosas de sílice con ADN y D)Nanopartículas híbridas con ADN.....	72
<b>Figura 27.</b> Comparación de morfología y tamaño de imágenes obtenidas por la técnica de caracterización TEM a escala de 200 nm. A)Liposomas catiónicos, B)Nanopartículas mesoporosas de sílice, C)Nanopartículas mesoporosas de sílice con ADN y D)Nanopartículas híbridas con ADN.....	73

<b>Figura 28.</b> Ensayo de adhesión de nanopartículas con células HEK293. Los ensayos fueron incubados por 24 hrs, y las muestras fijadas fueron analizadas por microscopía confocal. A) Nanopartículas de sílice con calceína (NC-Cal), B) Nanopartículas híbridas con calceína (NH-Cal). .....	74
<b>Figura 29.</b> Ensayo de internalización de nanopartículas en células HEK293 por 24 hrs. analizado por microscopía confocal. A) Fluorescencia roja de liposomas catiónicos marcados con PE-rodamina, B) Campo claro de células, C) Fluorescencia en azul de ADN plasmídico con DAPI en el núcleo celular, D)Imagen en conjunto de A), B) y C). .....	76
<b>Figura 30.</b> Expresión de la proteína verde fluorescente con el uso de nanopartículas híbridas con ADN(NH-ADN) en células HEK293 vista por microscopía confocal. A) Campo oscuro, B) Campo claro con contraste de interferencia diferencial. ....	77
<b>Figura 31.</b> Supervivencia de células HEK293 ante distintas cantidades de ondas de choque a 33 MPa. ....	78
<b>Figura 32.</b> Cantidad de células( $1 \times 10^4$ /ml) de la línea HEK293 posterior al tratamiento con 120 ondas de choque con intensidad 15, mostrando cada tratamiento respecto a un control sin ondas de choque para analizar los efectos del método en conjunto. Diferencia estadística entre grupo control y nanopartículas desnudas (** $p < 0.05$ ) .....	81
<b>Figura 33.</b> Viabilidad celular en la línea HEK293 posterior al tratamiento con 120 ondas de choque con intensidad 15, mostrando la tasa de supervivencia con respecto a un control de tratamiento sin ondas de choque para analizar los efectos del método en conjunto. ....	82
<b>Figura 34.</b> Microscopía de fluorescencia de células tratadas para transfección con el plásmido pCX::GFP-GPI2 Células con plásmido desnudo tratadas con 0 (A) y 120 ondas de choque (B); células con nanopartículas híbridas que contienen plásmido encapsulado y PE-rodamina, tratadas con 0 (C) y 120 ondas de choque (D).....	84
<b>Figura 35.</b> Población delimitada para análisis de citometría de flujo de la línea HEK293. A) Control con 0 ondas de choque, B) Control con 120 ondas de choque.....	86
<b>Figura 36.</b> Gráficas de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) contra tamaño (FSC) obtenidas por citometría de flujo. A) y D) Control, B) y E)Plásmido, C) y F) Nanopartículas híbridas con PE-rodamina y ADN (NHR-ADN). A),B) y C) con 0 ondas de choque y D),E) y F) con 120 ondas de choque.....	87
<b>Figura 37.</b> Intensidad de fluorescencia media (IMF) de la subpoblación verde fluorescente de cada experimento de transfección. Diferencia estadística entre el grupo con nanopartículas híbridas con ADN y las demás modalidades (* $p < 0.1$ ). .....	87

## ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Métodos de transfección celular .....	8
<b>Tabla 2.</b> Tipos de nanopartículas .....	12
<b>Tabla 3.</b> Longitudes de onda de materiales fluorescentes utilizados en este trabajo.....	32
<b>Tabla 4.</b> Modalidades de nanopartículas elaboradas.....	45
<b>Tabla 5.</b> Cantidades para preparación de liposomas catiónicos multilaminares.....	45
<b>Tabla 6.</b> Tipos de nanopartículas caracterizadas por determinadas técnicas .....	48
<b>Tabla 7.</b> Grupos utilizados para el método combinado de ondas de choque con nanopartículas híbridas .....	53
<b>Tabla 8.</b> Valores obtenidos de la cuantificación de ADN plasmídico, LUV con PE-rodamina, nanopartículas híbridas con rodamina(NHR-ADN) y los sobrenadantes (1 y 2) obtenidos de la producción de nanopartículas híbridas.....	64
<b>Tabla 9.</b> Bandas características de cada material analizado por espectroscopia Raman. ....	69

## RESUMEN

La transfección celular es un proceso que consiste en la introducción de material genético en células eucariontes con el propósito de regular la expresión de una proteína, proporcionando la posibilidad de un tratamiento para enfermedades adquiridas y genéticas.

Existen diversos métodos de transfección, tanto de naturaleza física como química. La sonoporación con ondas de choque es un método físico que permeabiliza membranas celulares temporalmente por medio de “microjets” que se generan al paso de estas ondas por un fluido. Por su parte, el manejo de un vector supramolecular es un método químico que consiste en producir materiales nanoestructurados que funcionen como medios de acarreamiento de determinado cargo hacia el interior de las células.

En este proyecto se planteó explorar la combinación de ambos métodos de transfección en células inmortalizadas de la línea HEK 293 (siglas en inglés, *Human Embryo Kidney*, proveniente de células de riñón de embrión humano) mediante el uso de un gen reportero (*GFP*) para determinar la entrega de ADN a través de un vector conformado por nanopartículas mesoporosas de sílice recubiertas por liposomas y la permeabilización de membranas celulares causada por ondas de choque.

Se produjeron distintos tipos de nanoestructuras con ADN plasmídico como cargo, para analizar la eficiencia de encapsulamiento y las características morfológicas de las construcciones por medio de microscopía de epifluorescencia, espectroscopia Raman y microscopía electrónica de transmisión (TEM). A partir de esto, se llevaron a cabo un conjunto de pruebas con ambos métodos, determinando la interacción con células HEK 293 y confirmando la transfección de las mismas por microscopía de fluorescencia y confocal.

**ABSTRACT**

Cellular transfection is the process of introducing genetic material into eukaryotic cells with the purpose of regulating the expression of a protein, providing the possibility to treat acquired and genetic diseases.

There are physical and chemical transfection methods. Sonoporation with shock waves is a physical method that permeates cellular membranes temporarily by “microjets” that are generated as these waves travel through a fluid. Moreover, the use of supramolecular vectors is a chemical method, which consists in producing nanostructured materials that can carry certain cargo to the interior of cells.

The aim of this project was to explore the combination of both transfection methods on immortalized HEK 293 (*Human Embryo Kidney*) cells by using a reporter gene (*GFP*) to determine DNA delivery of a vector formed by mesoporous silica nanoparticles covered by liposomes, and the permeabilization of cell membranes caused by shock waves.

Different types of nanostructures were produced with plasmidic DNA as cargo, to analyze the encapsulation efficiency and morfological characteristics of the constructions by techniques, such as epifluorescence microscopy, Raman spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM). Several scenarios were studied using both methods, determining the interaction with HEK 293 cells and confirming transfection thereof through epifluorescence and confocal microscopy.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Antecedentes

La transfección es la introducción de ácidos nucleicos a partir de ADN o ARN, en una célula eucarionte con el propósito de regular la expresión de una proteína aportando grandes beneficios para el tratamiento de enfermedades adquiridas y genéticas (Zhou et al., 2010). Los métodos de transfección se clasifican según los mecanismos de interacción con la membrana celular, siendo éstos químicos, como por ejemplo: manejo de virus, nanopartículas, fosfato de calcio, entre otros, o físicos tales como: sonoporación, microinyección o electroporación.

La sonoporación es un método de transfección físico que consiste en permeabilizar temporalmente la membrana celular para introducir material exógeno a partir de ondas acústicas de alta energía (Michel et al., 2004).

Análogamente, en la literatura se describe el manejo de materiales a escala nanométrica, conocidos como nanopartículas, para ser utilizados como estructuras acarreadoras de material exógeno hacia el interior de la célula. Estas nanopartículas se han producido con una amplia gama de compuestos químicos con el propósito de optimizar su interacción con la membrana celular y facilitar la entrada de determinado cargo, por lo que se han realizado distintos tipos de combinaciones de materiales para aportar propiedades concretas, buscando mejorar la eficiencia de entrega. En particular, las nanopartículas mesoporosas de sílice han mostrado alta biocompatibilidad, gran capacidad de adsorción en su superficie, y representan un tipo de nanovector eficiente para entrega de material genético a una célula. Asimismo, los liposomas catiónicos (nanomaterial conformado por lípidos) han sido

empleados ampliamente en nanomedicina debido a su interacción con la membrana celular, la cual también se encuentra conformada por lípidos. La carga catiónica de estos liposomas promueve la interacción con la superficie celular, en donde la carga neta es negativa (Nelson & Cox, 2005).

Aunque ambas estrategias, es decir, el uso de nanopartículas de sílice y las ondas de choque, han sido descritas como métodos prometedores para transfección celular, no existen trabajos en donde se reporte la combinación de ambos, permitiendo con esto que sean tomados en cuenta como una técnica innovadora en la transfección celular.

## **2. Planteamiento del problema**

La transfección es un método que permite modificar el comportamiento celular en eucariontes a partir de la introducción de material genético, esperando optimizar su funcionamiento al modificar genes dañados o mutados, o bien induciendo el silenciamiento de genes cuyos productos representen un factor de patogenicidad (Resnier et al., 2013). Sin embargo, obtener transfección exitosa y eficiente puede ser complejo debido a que se requiere de una determinada interacción con la membrana celular por su alta especificidad para introducir sustancias (Audesirk et al., 2013). Los métodos utilizados pueden ser químicos, los cuales consisten en el manejo de nanovectores, y físicos, por manipulación mecánica de la membrana celular.

Hasta ahora, el manejo de un método físico en conjunto con nanovectores ha incluido únicamente la combinación de sonoporación con vesículas basadas en bicapas lipídicas, específicamente liposomas (Millán-Chiu et al., 2014) y de microburbujas (Bekeredjian et al., 2007). Sin embargo, la encapsulación de moléculas hidrofílicas en vesículas de lípidos

es poco eficiente (Nii & Ishii, 2005), e implica el uso de procedimientos e infraestructura especializados (Perrie et al., 2001). El presente trabajo pretende aportar un método cooperativo, usando nanopartículas híbridas y sonoporación, para el mejoramiento en la eficiencia de transfección en un modelo *in vitro*. Al aplicar dos técnicas de distinta naturaleza en conjunto, se espera dilucidar una manera viable para introducir ácidos nucleicos en células eucariotes *in vitro* que sirva como antecedente para la búsqueda de un potencial tratamiento para diversas enfermedades, incluyendo enfermedades monogénicas, pero también enfermedades complejas, como el cáncer, para las cuales la regulación de genes podría aportar una solución.

Asimismo, dada la importancia del análisis de eficiencia de transfección, se plantea el uso de un gen reportero como prueba preliminar para analizar una posible alternativa de introducción de material genético eficaz, empleando ambos métodos en la línea de células inmortalizadas HEK 293, derivada de riñón embrionario humano.

### **3. Hipótesis**

La combinación de nanopartículas híbridas para acarreo de ADN y de ondas de choque para permeabilizar membranas plasmáticas, resultará en un método eficiente de transfección de un gen reportero en células humanas inmortalizadas de la línea HEK 293.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Generales**

Producir y analizar un nanovector híbrido de encapsulamiento génico con capacidad de transfección en células inmortalizadas HEK 293, derivadas de riñón embrionario humano.

## **4.2. Particulares**

Preparar y caracterizar un nanovector híbrido de liposomas catiónicos con nanopartículas de sílice mesoporosas para la entrega de ADN plasmídico.

Evaluar la interacción entre células inmortalizadas de la línea HEK 293 y nanopartículas híbridas de sílice con bicapa lipídica, específicamente para la entrega de material genético.

Explorar la eficiencia de transfección utilizando el nanovector híbrido para encapsulamiento de ADN con el uso de un gen reportero.

Evaluar la eficiencia de transfección con ADN plasmídico al combinar el nanovector híbrido como método químico y la sonoporación mediada por ondas de choque como método físico de permeabilización celular.

## MARCO TEÓRICO

### 1. Transfección: Definición y métodos

Las células se encuentran delimitadas por una membrana conformada por una bicapa de fosfolípidos y un conjunto de proteínas (Horton et al., 2008). Las membranas celulares son estructuras con carga negativa, complejas y heterogéneas, de lo cual depende su funcionamiento. Sus funciones principales son el aislamiento del contenido de la célula, la regulación de la entrada y salida de sustancias, la comunicación entre células, entre otras (Audesirk et al., 2013). Esto implica que la membrana es una barrera altamente específica, lo que representa un gran reto para la introducción de distintos tipos de sustancias, tanto fármacos como biomoléculas, con el propósito de generar tratamientos dirigidos a células con alteraciones en su genoma (Bains, 1998), las cuales pueden provocar enfermedades como lo es el cáncer o la diabetes.

La introducción de ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN, en una célula eucarionte con el propósito de regular la expresión de una proteína es llamada transfección (Agarwal et al., 2012). La transfección representa un potencial tratamiento para enfermedades genéticas que consiste en sustituir genes dañados o mutados con su variante natural o introducir una nueva función para superar alguna alteración, lo cual es conocido como terapia génica (Renneberg, 2008). Un gran reto de la terapia génica es la entrega eficiente de genes de interés hacia células, en particular, hacia órganos sólidos (Schaaf et al., 2003).

La transfección como terapia génica es un proceso de ADN recombinante, es decir, ADN creado artificialmente que permite la síntesis biológica de productos genéticos humanos

(Desnick, 1983), aportando beneficios para el tratamiento de enfermedades adquiridas y genéticas (Zhou, et al., 2010).

Los métodos de transfección se clasifican en químicos o físicos, según los mecanismos de interacción con la membrana celular (Labastida & Ruiz, 2010).

Los métodos químicos consisten en el manejo de materiales acarreadores de un cargo, como un fármaco o material genético, que permitan transportar sustancias al interior de la célula, los cuales se conocen como vectores (Ewert et al., 2008). El manejo de nanovectores (materiales con escala nanométrica) produce un ambiente químico que provoca una interacción con la célula para facilitar la entrada de un cargo determinado (Ovidio Castro & Portelles, 1997).

Los métodos físicos se basan en la aplicación de un mecanismo físico sobre la membrana, lo cual genera una permeabilización transitoria para introducir material exógeno a las células.

En la **Tabla 1** se presenta una comparación de los distintos tipos de métodos de transfección.

**Tabla 1.** Métodos de transfección celular

<b>Métodos químicos</b> (Old & Primrose, 1994; Ovidio Castro & Portelles, 1997; Bio-Rad, 2015)			
<b>Método</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Fosfato de calcio</b> (Roy et al., 2003)	Mezcla de ADN con cloruro de calcio en un amortiguador de fosfatos para crear un precipitado disperso en las células.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método sencillo y no costoso.</li> <li>• Aplicación a gran cantidad de células.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La eficiencia de transfección varía dependiendo de la línea celular.</li> <li>• Ligeros cambios en el pH afectan la</li> </ul>

			<p>eficiencia.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El tamaño y la calidad del precipitado son cruciales para transfección exitosa.</li> </ul>
<b>DEAE-Dextran</b>	<p>Polímero catiónico mediador entre interacción de ADN y componentes de la superficie celular para producir endocitosis.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método rápido, sencillo y barato.</li> <li>• Aplicación a gran cantidad de células.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las altas concentraciones del compuesto pueden generar toxicidad.</li> <li>• La eficiencia de transfección varía dependiendo de la línea celular.</li> </ul>
<b>Nanopartículas</b> (García Martínez et al., 2006-2007; Ewert et al., 2008)	<p>Materiales producidos a escala nanométrica, con propiedades químicas y físicas controladas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación sencilla y no costosa.</li> <li>• Aplicación para distintos tipos de células.</li> <li>• Alta eficiencia (~80-90% dependiendo del tipo).</li> <li>• Control de parámetros para optimizar transfección.</li> <li>• Carga genética no tan limitada (6-10,000,000 pb).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buscar optimizar cantidades por posible toxicidad y/o genotoxicidad.</li> <li>• Eficiencia media y variable dependiendo de la línea celular.</li> </ul>
<b>Virus</b> (Ewert et al., 2008)	<p>Infección mediante un virus recombinante con un gen de interés que integra su genoma en la célula huésped.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta eficiencia en transferencia de genes (95-100%).</li> <li>• Método sencillo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carga genética limitada (40,000 pb).</li> <li>• Riesgos de mutación.</li> <li>• Activación del sistema inmune.</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificultad de manejo a gran escala.</li> <li>• Eficiencia variable dependiendo de la línea celular.</li> </ul>
<b>Métodos físicos</b> (Ovidio Castro & Portelles, 1997; Rodamporn, 2010; Bio-Rad, 2015)			
<b>Método</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Sonoporación</b> (Lauer et al., 1997; Loske & Prieto, 1999; Loske, 2007; Ohta et al., 2009)	Permeabilización celular momentánea generada por ondas acústicas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método sencillo.</li> <li>• Breve permeabilidad de membrana sin afectar su vitalidad.</li> <li>• Familiaridad con su uso al tener aplicaciones clínicas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Daño celular generando necrosis.</li> <li>• Las ondas de choque son no homogéneas para todas las células.</li> </ul>
<b>Microinyección</b> (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012)	Inyección directa de ADN por medio de microagujas de vidrio en una célula.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precisión y predicción de célula a transfectar.</li> <li>• Control visual.</li> <li>• Material acarreado dirigido al núcleo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy costoso.</li> <li>• Complejidad en la técnica.</li> <li>• No aplicable a gran cantidad de células (una a una).</li> </ul>
<b>Electroporación</b> (Escoffre et al, 2009)	Aplicación de pulsos eléctricos que desestabilizan la membrana creando poros para la introducción de material exógeno.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aplicación para distintos tipos de células.</li> <li>• Aplicación a gran cantidad de células.</li> <li>• Método sencillo.</li> <li>• Cargo integrado por difusión (moléculas pequeñas) o por proceso electroforético (macromoléculas).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costoso.</li> <li>• Daño celular generando necrosis.</li> </ul>

Las pruebas de transfección se pueden realizar de dos maneras: *in vitro* (con líneas celulares) o *in vivo* (con sujetos experimentales). Para las pruebas *in vitro*, es importante precisar que los cultivos celulares deben mantenerse en determinadas condiciones, como son: estar libres de contaminantes, tener una confluencia del 40% al 80%, disponer de medio con factores necesarios para el crecimiento celular y mantener la incubación de células a 37°C con CO<sub>2</sub> (5-10%) y 100% de humedad relativa (Bio-Rad, 2015).

Cabe destacar que el empleo de cada método de transfección depende del objetivo de transfección, de la línea celular que se maneja, del gen a introducir, de la disponibilidad del equipo, entre otras variables (Ovidio Castro & Portelles, 1997). Estableciendo estos parámetros y con la información descrita en la **Tabla 1**, se fundamenta el enfoque de dos métodos de distinta naturaleza con posibles ventajas respecto a los demás: el manejo de nanopartículas y la sonoporación.

### **1.1. Nanopartículas**

La nanotecnología es la producción de estructuras a escala nanométrica ( $1 \times 10^{-9}$  m) que consisten en materiales de transporte para fármacos o material genético, conocidos como nanoacarreadores o nanopartículas (Bains, 1998).

Existen dos estrategias para fabricar nanopartículas: descendente(arriba a abajo) o “top down” y ascendente(abajo a arriba) o “bottom up”. El método “top-down” consiste en disminuir el tamaño de un material másico hasta la escala nanométrica y el método “bottom up” se basa en el ensamblaje de unidades nanométricas de construcción, capa por capa, que otorgan al material mayor estabilidad y orden en su estructura (Yamamoto, 2005; García Martínez et al., 2006-2007).

En el área biológica se plantea el manejo de los nanoacarreadores para transportar y entregar eficientemente un determinado cargo, desde moléculas tóxicas hasta material genético, buscando evitar la degradación por nucleasas (Resnier et al., 2013) con el propósito de generar tratamientos para células dañadas (Wright, 2014).

Al fabricar nanomateriales, hay tres aspectos importantes a considerar: el tamaño, la carga superficial y el direccionamiento. En particular, el tamaño comprendido de 50 a 250 nm representa un rango ideal para limitar la degradación o eliminación y aumenta su duración en el torrente sanguíneo. La manipulación de estas tres características confiere a los materiales distintas propiedades, permitiendo su uso para distintas aplicaciones (Resnier et al., 2013).

### 1.1.1. Tipos

Existen distintos tipos de nanomateriales, los cuales se clasifican a partir de su composición. Los más relevantes y mayormente utilizados en el área biotecnológica se encuentran descritos en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Tipos de nanopartículas

Nanopartículas	Descripción	Características principales	Obtención
<b>Orgánicas</b>			
<b>Liposomas</b> (Bains, 1998; Son et al., 2000; Hans & Lowman, 2006; Zhou, et al., 2010;	Cápsula conformada por una capa (unilaminar) o múltiples capas (multilaminar) de fosfolípidos,	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vector de transfección frecuentemente utilizado.</li> <li>• Control de talla.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formados por autoensamblaje al entrar en contacto con solución acuosa.</li> <li>• Control de talla por</li> </ul>

Hughes et al., 2010)	similar a la estructura de una membrana celular.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta biocompatibilidad.</li> <li>• Transporte de material hidrofílico, lipofílico y anfipático.</li> <li>• Interacción con ADN mediante cargas opuestas (liposomas catiónicos con ADN cargado negativamente).</li> <li>• Interacción de liposomas catiónicos con membrana celular negativa.</li> </ul>	<p>distintas técnicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Sonicación: Ruptura mecánica por ultrasonido.</li> <li>-Extrusión: Paso de liposomas por membranas con poro de tamaño definido, generando una distribución uniforme.</li> </ul>
<b>Microburbujas</b> (Shashank & Borden, 2010)	Gas inerte recubierto por lípidos, proteínas o polímeros para dar estabilidad.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vector comúnmente utilizado en conjunto con ultrasonido.</li> <li>• Utilizadas para imagenología y entrega de fármacos y ADN.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación de microburbujas de aire por sonicación.</li> <li>• Autoensamblaje al estar conformadas por lípidos.</li> </ul>
<b>Dendrimeros</b> (Nazir et al., 2014; Xiong et al., 2014)	Polímeros esféricos con subunidades en forma de ramas que permiten la retención de una carga.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estructura molecular organizada.</li> <li>• Control de talla y morfología.</li> <li>• Encapsulamiento o adhesión de material de carga.</li> <li>• Alta biocompatibilidad.</li> <li>• Estabilidad ante condiciones externas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Divergente: Inicio de síntesis por un núcleo adhiriendo capas en forma de ramas.</li> <li>• Convergente: Diseño de parte exterior y, posteriormente, síntesis de ramificaciones de distintos tamaños.</li> </ul>
<b>Inorgánicas</b> (Moreno-Vega et al., 2012; Llinàs & Sánchez García, 2014)			
<b>Cerámicas</b>	Materiales inorgánicos inertes de	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estabilidad ante condiciones externas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis de materiales por medio de películas delgadas o</li> </ul>

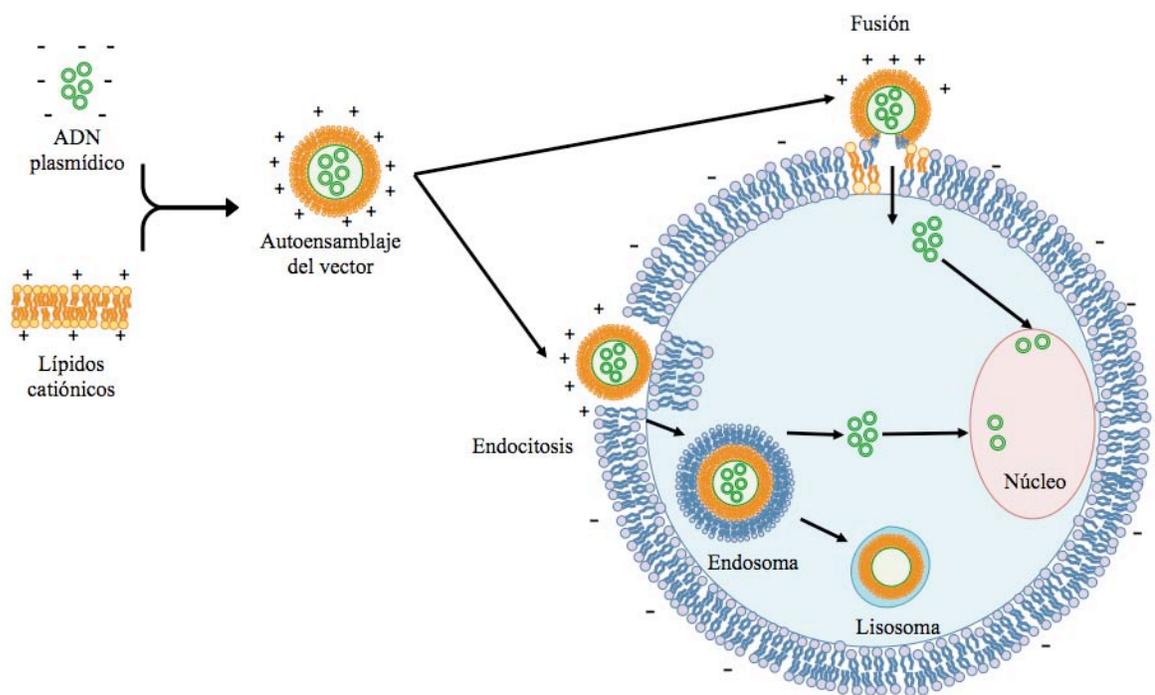
	hidroxiapatita u óxidos como sílice, zirconia, titania, entre otros.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Control de talla y morfología.</li> <li>• Alta biocompatibilidad.</li> <li>• Liberación controlada de fármacos.</li> </ul>	por reacciones químicas con precursores, ácidos o bases y surfactantes.
<b>Metálicas</b>	Nanomateriales inorgánicos constituidos por elementos metálicos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta biocompatibilidad.</li> <li>• Potencial para monitoreo como sondas para imagen.</li> <li>• Control de talla.</li> <li>• Propiedades ópticas y electrónicas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Químico: Reducción de sal metálica para formar centros de nucleación que son rodeados por moléculas estabilizantes.</li> <li>• Físico: Someter precursores metálicos a cambios de temperatura, ultrasonido de alta frecuencia o pulsos lumínicos.</li> </ul>

#### 1.1.1.1. Nanopartículas híbridas o supramoleculares

Una posibilidad para generar materiales nanoestructurados con determinadas características es la combinación de distintos tipos de nanopartículas con el propósito de mejorar sus propiedades de confinamiento y, por ende, su eficiencia como nanoacarreadores, dando lugar a la producción de materiales híbridos para el transporte de diferentes cargas.

Dengler y colaboradores (2013) menciona distintos tipos de materiales híbridos, entre ellos, las “protocélulas”, las cuales son nanopartículas híbridas conformadas por nanopartículas mesoporosas de sílice y liposomas catiónicos unilaminares grandes (100 a 200 nm en adelante). La sílice u óxido de silicio en su estructura no cristalina (amorfa) ha

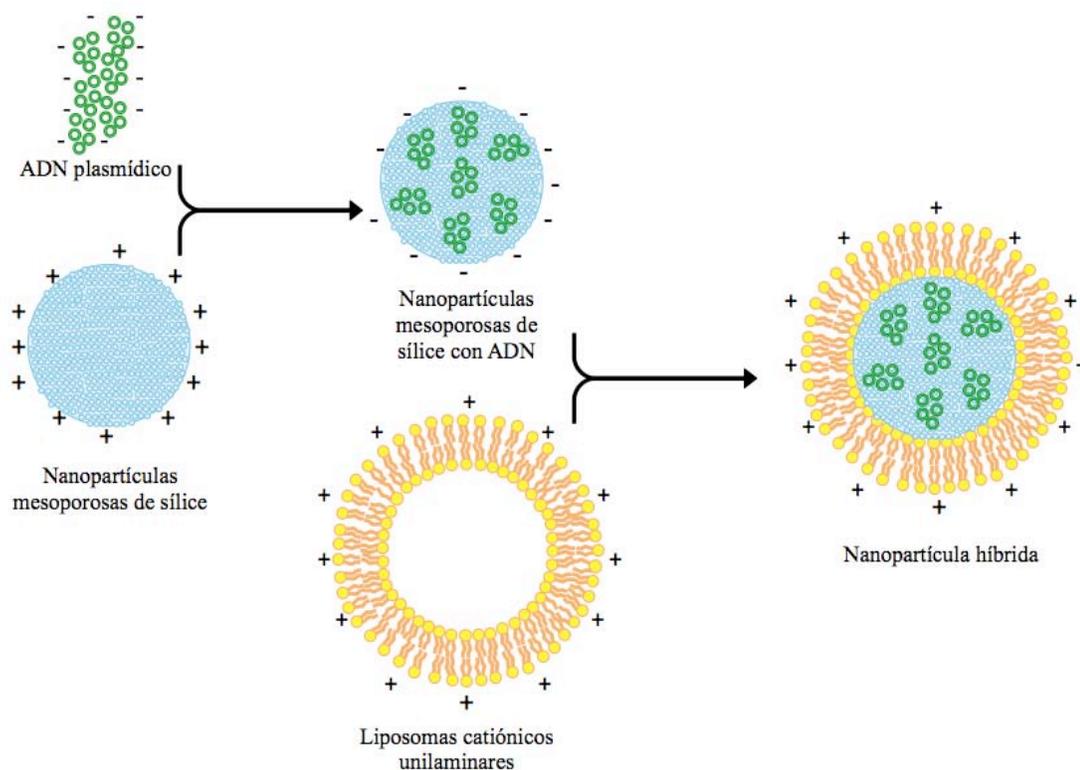
sido explorada para distintas aplicaciones, como la entrega de ADN para terapia génica, debido a que su superficie porosa confiere la propiedad de adsorción de moléculas. Asimismo, la carga catiónica de los liposomas es esencial para favorecer la interacción con la membrana celular e integrar la nanoestructura al interior de la célula (Resnier et al., 2013), como se muestra en la **Figura 1**. Este tipo de materiales es considerado un vector supramolecular debido a que surge a partir de interacciones no covalentes entre varias moléculas.



**Figura 1.** Interacción de liposomas catiónicos con células.

Este tipo de nanopartículas híbridas han sido utilizadas en pruebas *in vitro*, donde se ha comprobado su capacidad para la retención y protección del ADN (Dengler et al., 2013), lo cual vislumbra una posible alta eficiencia de transfección.

El método de fabricación por interacciones no covalentes de este nanovector híbrido se muestra en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Fabricación de nanopartículas híbridas.

### 1.1.2. Caracterización de materiales

Para determinar la morfología, el tamaño y la composición elemental de un material fabricado, se utilizan diversas técnicas de caracterización dependiendo de la información buscada. Al aplicar dichas técnicas, es posible conocer las propiedades principales de un material y, con esto, establecer las aplicaciones biológicas por medio de tres características primordiales: el tamaño, la superficie y la eficiencia de encapsulamiento de las nanopartículas (Hans & Lowman, 2006; Lee et al., 2012).

A continuación, se mencionan los principios de dos técnicas de caracterización relevantes para el desarrollo de este trabajo.

#### **1.1.2.1. Espectroscopia Raman**

La espectroscopia estudia la interacción de radiación electromagnética con la materia, la cual puede dispersar, emitir o absorber determinada longitud de onda dependiendo de su composición y estructura (Glencross et al., 2011).

La dispersión es la interacción de la materia con la luz que implica que la luz incidente no es absorbida por las moléculas que conforman la muestra. La onda de luz incidente tiene oscilaciones de la misma frecuencia en los electrones de la molécula y éstos actúan como fuentes de dispersión de luz, lo cual depende del tamaño, estructura y polarización de la molécula, es decir, la tendencia de separación de cargas en una molécula (Pingoud et al., 2002).

La espectroscopia Raman es una técnica de caracterización que consiste en analizar la dispersión generada por la interacción de las moléculas de un material con determinada radiación electromagnética, en particular en la región del infrarrojo, experimentando cambios de frecuencia entre el haz de luz monocromática incidente y el haz dispersado (Glencross et al., 2011). El espectro obtenido surge a partir de las transiciones vibracionales que tienen las moléculas expuestas a la radiación y tiene como finalidad determinar la información molecular de un material e identificar sus componentes (Osuna, 2011).

#### **1.1.2.2. Microscopía electrónica de transmisión**

La microscopía electrónica de transmisión (TEM del inglés Transmission Electron Microscopy) consiste en la incidencia de electrones en un alto vacío con un voltaje de

aceleración de entre 20 kV y 100 kV sobre una muestra con escala cercana a la atómica (cubriendo el rango de nanomateriales con escala  $1 \times 10^{-9}$  m) con el propósito de visualizar su morfología y tamaño (Glencross et al., 2011).

Las muestras a procesar se colocan en rejillas de cobre y, en algunos casos, se tiñen negativamente para dar una tonalidad oscura y contrastar el material por medio de un reactivo llamado acetato de uranilo (Glencross et al., 2011).

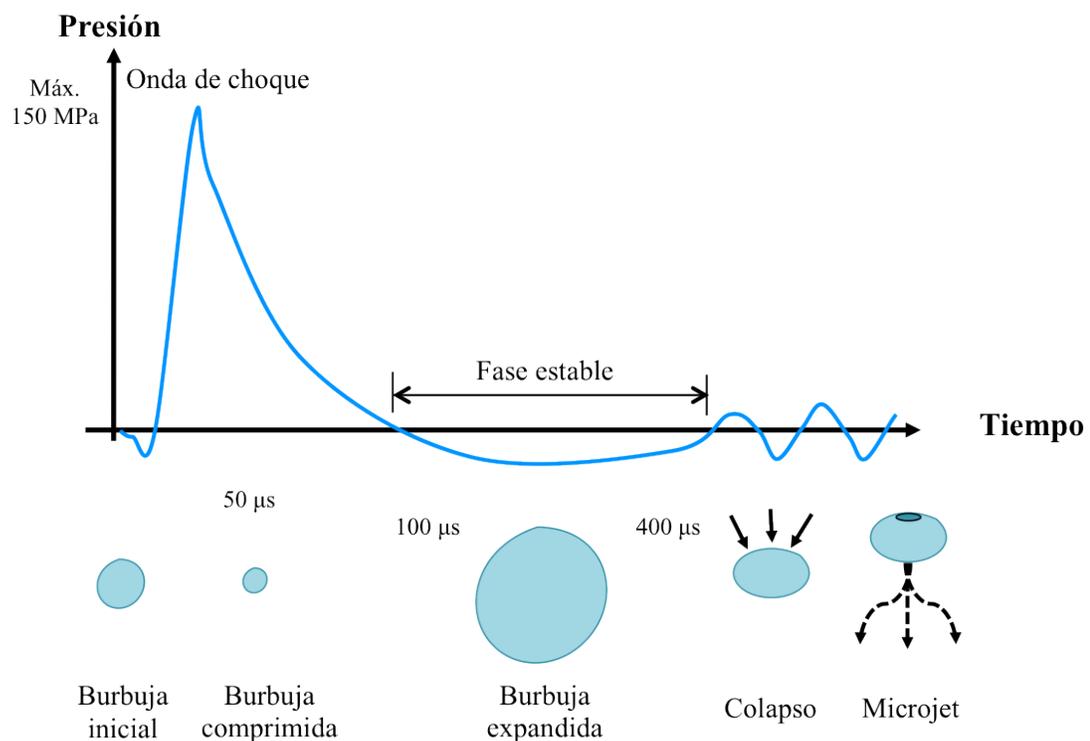
## **1.2. Sonoporación**

La sonoporación es un método de transfección que consiste en permeabilizar temporalmente la membrana celular para introducir material exógeno a partir de ondas acústicas de alta energía (Michel et al., 2004). Las ondas acústicas con frecuencias superiores a 20 kHz, o ultrasónicas, son ondas mecánicas que surgen cuando la materia es excitada a estas frecuencias por una fuente mecánica externa (Loske, 2007).

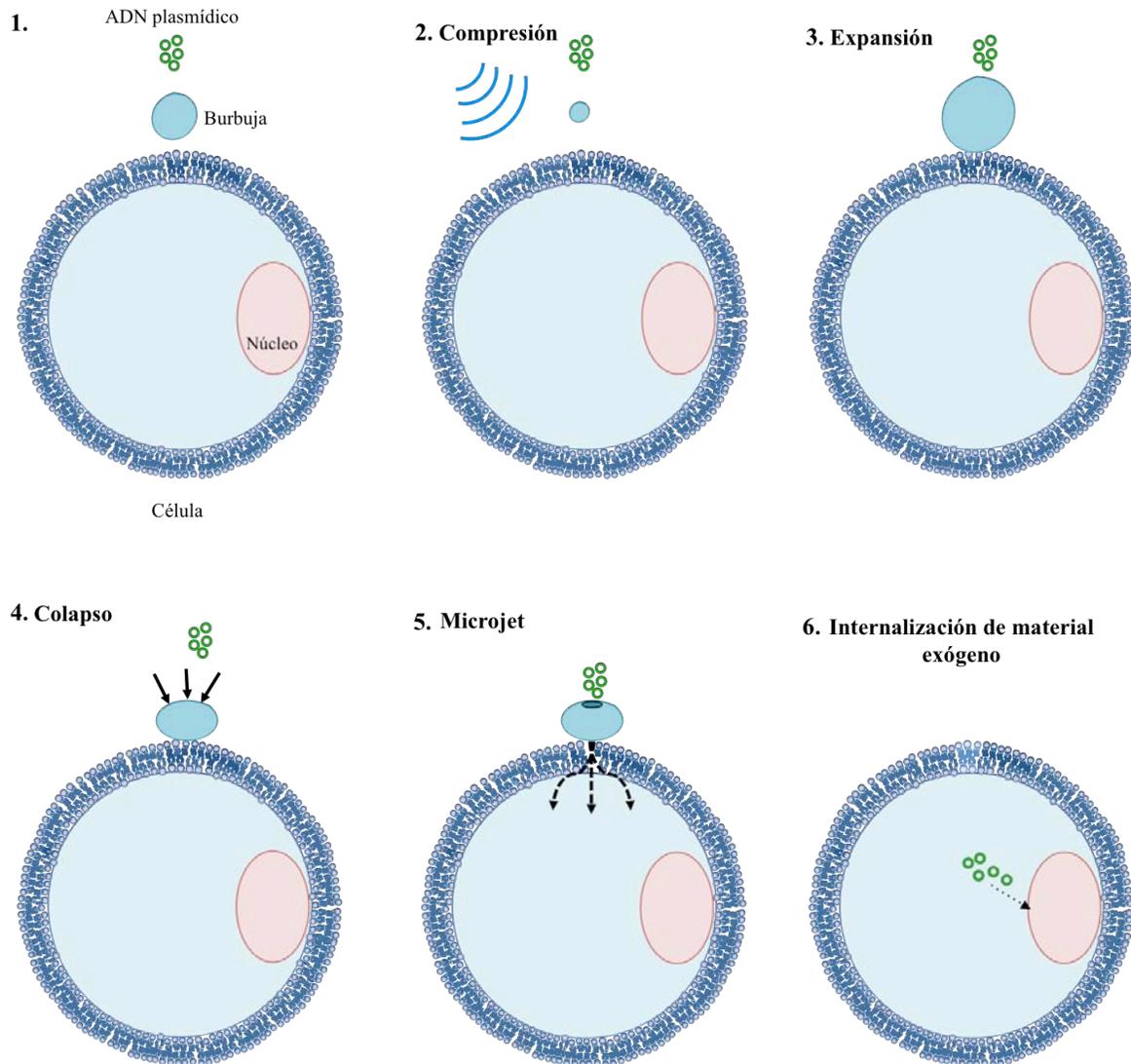
El principio de inserción de material extracelular se da por cavitación acústica, es decir, por la propagación de ondas ultrasónicas a partir de un líquido en reposo (Lauer et al., 1997), lo cual genera microburbujas en la vecindad de las células que crecen y colapsan debido a cambios positivos de presión. Durante su colapso, las burbujas producen ondas mecánicas de alta amplitud conocidas como ondas de choque y chorros de líquido a altas velocidades, llamados “microjets”, afectando la superficie de objetos sólidos cercanos (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012), como lo es, en su caso, la membrana celular. Los cambios que sufren las microburbujas respecto al tiempo se muestran en la *Figura 3* y el proceso de permeabilización celular se puede apreciar, paso a paso, en la *Figura 4*.

Una onda de choque es una onda mecánica que se propaga por un medio. Aunque comúnmente se denomina “onda”, debería llamarse “frente de choque”, ya que es un aumento y una reducción de presión, es decir, un pulso de presión con una duración sumamente corta.

Dado lo anterior, se puede deducir que las ondas de choque permiten facilitar la transferencia de moléculas de gran tamaño en células (Bao et al., 1998).



**Figura 3.** Gráfica de presión contra tiempo correspondiente a una onda de choque (arriba) y dinámica de una burbuja de aire en un líquido (abajo) expuesta a las variaciones de presión mostradas en la gráfica.



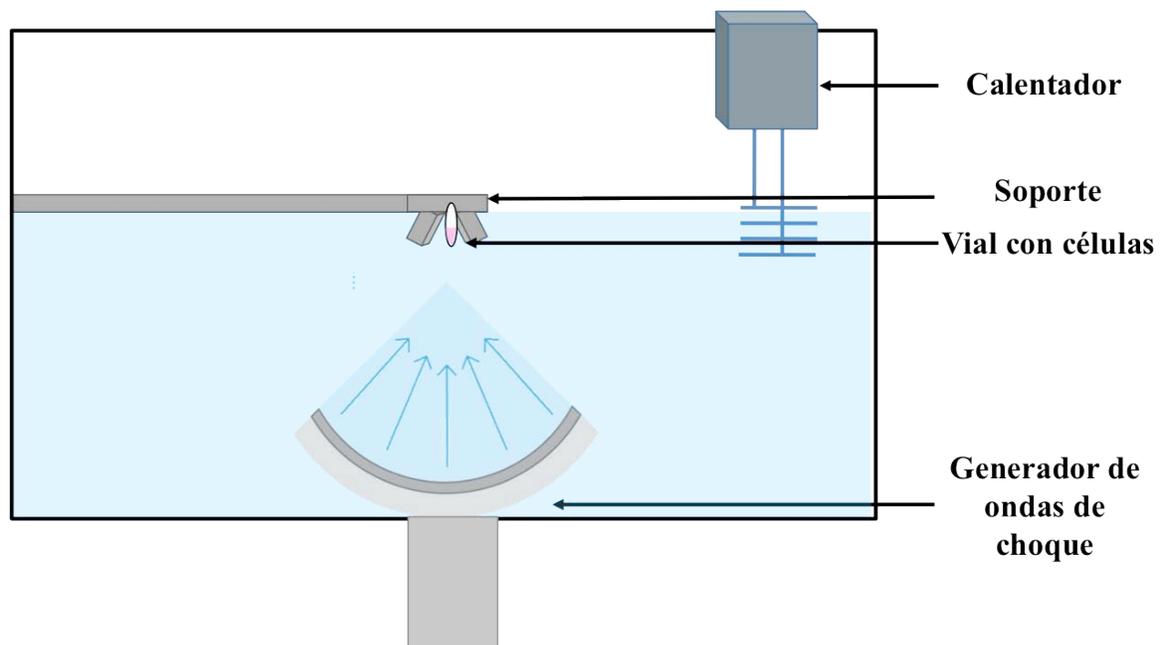
**Figura 4.** Efecto de cavitación de una burbuja en suspensión de células por ondas de choque.

### 1.2.1. Generación de ondas de choque

Las ondas de choque son generadas por tres distintos métodos: electrohidráulico, electromagnético y piezoeléctrico (Gallego-Juárez, 2007). Para la realización de esta tesis únicamente se usó el método piezoeléctrico.

Los generadores piezoeléctricos producen ondas de choque por la expansión de cientos de cristales piezoeléctricos, montados sobre un cascarón esférico y excitados simultáneamente por un pulso de alto voltaje, de entre 5 y 10 kV. Las ondas de compresión que producen los cristales se superponen, degenerando en una onda de choque en la vecindad del centro de curvatura (foco) de la superficie esférica (**Figura 5**). Una ventaja de este tipo de generador es que su zona focal es pequeña en comparación con la de los sistemas electrohidráulicos (Kolzer & García, 2001).

Para aplicaciones biomédicas se usan ondas de choque en agua, con pulsos de presión positivos de hasta 150 MPa, seguidos de pulsos de rarefacción o “negativos” de hasta -20 MPa. La duración del pulso positivo es de entre 0.5 y 3 microsegundos ( $\mu\text{s}$ ), y la del pulso negativo de entre 2 y 20  $\mu\text{s}$  (Loske, 2007).



**Figura 5.** Generador piezoeléctrico de ondas de choque.

En este proyecto, se utilizó un generador piezoeléctrico Piezoson 100 Plus (Richard Wolf, Knittlingen, Alemania), el cual es una unidad para tratamiento extracorpóreo por medio de ondas de choque adaptado en el Laboratorio de Ondas de Choque (CFATA, UNAM) para realizar experimentos *in vitro* con el que se manejó una presión positiva de 33 MPa.

### **1.2.2. Aplicaciones**

Las ondas de choque han sido utilizadas para aplicaciones médicas en urología debido a que pueden penetrar profundamente en el cuerpo humano, haciendo posible la aplicación en la vejiga, el uréter y el riñón con la finalidad de pulverizar cálculos renales, lo cual es una técnica conocida como litotricia extracorpórea (Michel et al., 2004).

Además de esto, las ondas de choque se utilizan para otras patologías urológicas como la enfermedad de Peyronie al corregir la fibromatosis (desarrollo de tumores benignos que afectan al tejido conjuntivo), la disfunción eréctil al inducir la formación de vasos sanguíneos (neovascularización) y mejorar la circulación y también para la ortopedia, estimulando el proceso de curación del tejido muscular.

Por otro lado, existen antecedentes de la aplicación de ondas de choque como método de transfección *in vitro* en distintas líneas celulares, en particular, relacionadas con el aparato urinario (Michel et al., 2004). Debido a esto, ha surgido la propuesta de aplicar ondas de choque como terapia génica para células cancerígenas (Schaaf et al., 2003). Sin embargo, es importante contemplar la posibilidad de desarrollo de metástasis y que la reducción del crecimiento tumoral *in vivo* no es permanente (Loske & Prieto, 1999).

## **2. Fluorescencia y sistemas reporteros de transfección celular**

Cuando un fotón es absorbido por la materia, su energía es transferida a un átomo o molécula, lo cual afecta sus estados electrónicos generando una excitación (Pingoud et al., 2002). Para perder esta energía de excitación, algunas moléculas la convierten en calor o emiten fotones de menor energía en un proceso llamado fotoluminiscencia. Si el fotón es emitido simultáneamente a la excitación, este fenómeno es conocido como fluorescencia (Glencross et al., 2011).

La fluorescencia es una propiedad de diversos materiales que se puede visualizar con facilidad debido a que consiste en hacer incidir radiación electromagnética con una longitud de onda determinada para detectar otra de mayor valor.

En este trabajo se incluye el uso de fluorocromos y proteínas fluorescentes obtenidas a partir de transgenes.

### **2.1. Fluorocromos**

Un fluorocromo es un material que se encuentra en estado de excitación debido a la absorción de determinada longitud de onda (Glencross et al., 2011). Debido a que se encuentran conformados por grupos funcionales aromáticos, los cuales tienen orbitales moleculares deslocalizados (Chang, 2010), tienen una mayor absorción en el espectro ultravioleta-visible (200 a 800 nm aproximadamente).

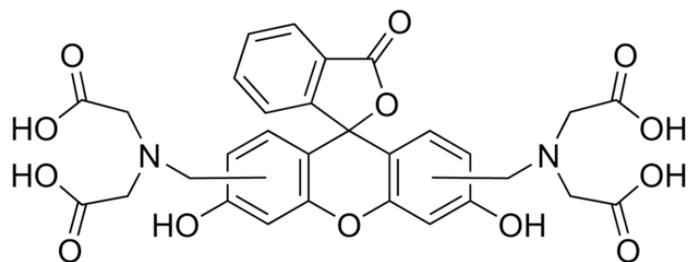
Del mismo modo, existen materiales fluorescentes que permiten la detección de ADN por distintos mecanismos, entre los cuales se encuentra la intercalación. La intercalación es la inserción de pequeñas moléculas entre los pares de bases de la doble hélice del ADN

debido a interacciones hidrofóbicas y de van der Waals, formando enlaces no covalentes en donde la molécula se une perpendicularmente al eje de la hélice (Demchenko, 2009), provocando su visualización por medio de fluorescencia.

Las aplicaciones biológicas de los fluorocromos consisten en el marcaje de células y tejidos para su caracterización e identificación. Dado lo anterior, se describirán los fluorocromos relevantes para este proyecto en los siguientes rubros.

### 2.1.1. Calceína

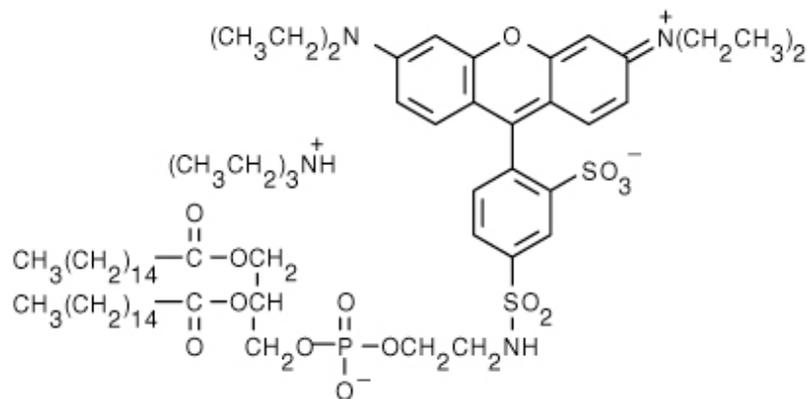
La calceína es un marcador verde fluorescente comúnmente utilizado como un indicador para analizar posibles fugas de vesículas lipídicas (Sigma-Aldrich), lo cual permite que pueda ser utilizado para especular sobre el encapsulamiento en caso de su manejo con otros nanomateriales. Su estructura química se muestra en la **Figura 6**, la cual se encuentra conformada por varios grupos funcionales aromáticos, distintivo de los fluorocromos, y por 4 grupos ácidos.



**Figura 6.** Estructura química de la calceína.

### 2.1.2. Rodamina

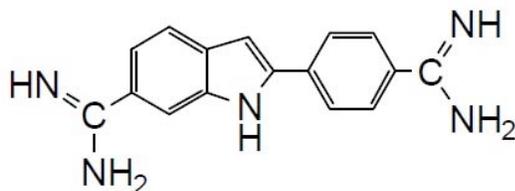
El fosfolípido rodamina DHPE es un marcador rojo fluorescente utilizado para visualizar la interacción de lípidos con la membrana celular (Technologies, 2012). Su estructura química se observa en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Estructura química de la rodamina DHPE.

### 2.1.3. DAPI

El compuesto DAPI (**Figura 8**) es un marcador azul fluorescente que se intercala en el ADN por unión a zonas ricas de las bases Adenina y Timina (Kapuscinski, 1995), lo cual implica que la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de ADN.



**Figura 8.** Estructura química del DAPI.

## 2.2. Proteínas y genes reporteros

La manipulación genética en células de mamíferos tiene gran complejidad debido al empaquetamiento del ADN, por lo cual, además de la introducción de material genético en el núcleo celular, se busca la expresión del mismo (Renneberg, 2008). Existen dos tipos de expresión: la estable y la transitoria. En la expresión estable, los ácidos nucleicos introducidos se vuelven parte del genoma en el núcleo celular y en la transitoria, permanecen temporalmente en la célula y no hay integración en el genoma (Recillas-Targa, 2006), por lo tanto, el material genético no pasa de generación en generación durante la división celular. Cabe destacar que para ésta última, las células deben estar saludables y activamente en división debido a que son más eficientes para aceptar plásmidos recombinantes (Recillas-Targa, 2006), por lo que no sería conveniente para células maduras.

La optimización de transferencia genética en células animales requiere de métodos eficientes para definir la entrega y expresión genética, por lo cual el manejo de material genético que tenga la propiedad de fluorescencia resulta válido para cumplir con este propósito (Stripecke et al., 1999).

Un gen reportero es un segmento de ADN que produce una proteína que permite evaluar la introducción exitosa de material genético exógeno por medio de su fácil visualización a partir de métodos no complejos y no costosos, es decir, por la observación directa de fluorescencia en un espécimen con la incidencia de determinada longitud de onda (Patterson, 2007). Estas construcciones se han utilizado ampliamente como herramientas para el análisis de expresión de transfección transitoria en células (en un periodo de uno a

tres días) por medio de un monitoreo no invasivo de expresión genética observable en tejidos y células (Old & Primrose, 1994).

Los genes y proteínas naturales obtenidos por organismos bioluminiscentes han resultado útiles como materiales reporteros para técnicas de imagen en células, entre los cuales se encuentran las proteínas fluorescentes obtenidas de animales invertebrados marinos como la proteína verde fluorescente producida por la medusa *Aequorea victoria* (McLennan et al., 2013), a partir de la cual se han generado variantes por medio de mutaciones que aumentan la expresión de la proteína para facilitar la identificación de fluorescencia (Eliopoulos & Galipeau, 2002). La proteína verde fluorescente se utiliza comúnmente debido a que se puede producir dentro de células eucariontes, permitiendo utilizarla como marcaje para analizar la actividad de genes (Bains, 1998).

El uso de un gen reportero es la vía más sencilla de optimizar los parámetros de transfección, permitiendo obtener una cuantificación indirecta de la eficiencia de determinado método de transfección (Ovidio Castro & Portelles, 1997). Esto ha permitido dilucidar eventos asociados con transcripción genética, lo cual implica una aportación para el desarrollo de terapia génica (Naylor, 1999).

Una recomendación para el manejo de genes reporteros es el uso de ADN de alta calidad, es decir, libre de proteínas, ARN y químicos para transfección. Un lote de ADN de alta pureza permite mejorar la eficiencia de transfección (Rincón-Arano & Recillas-Targa, 2004). Asimismo, la cantidad de ADN a utilizar varía dependiendo del tipo de material genético, método de transfección, línea celular, fisiología y cantidad de células a manejar (Recillas-Targa, 2004).

### 2.2.1. Plásmidos

Los plásmidos son estructuras de ADN circular de doble cadena extracromosomal provenientes de bacterias, los cuales se duplican de forma independiente debido a que se encuentran separados del cromosoma bacteriano (Old & Primrose, 1994) y son un medio de transporte de ADN exógeno (Renneberg, 2008).

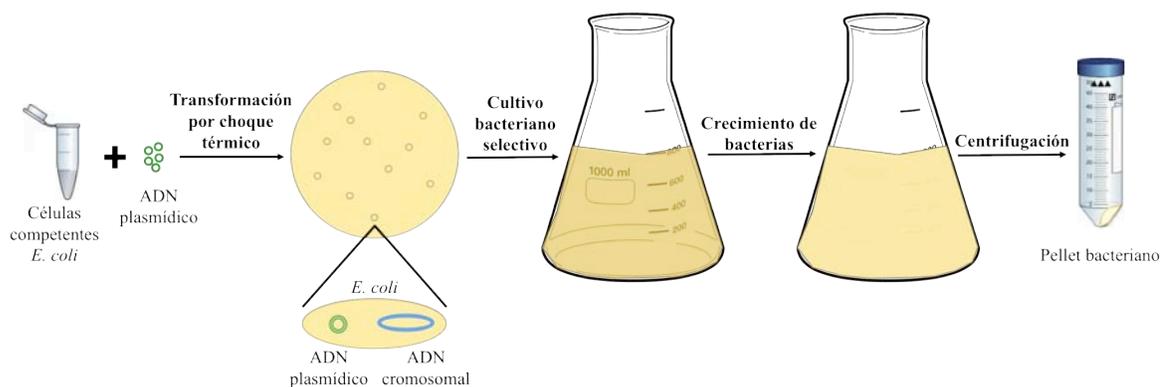
Los plásmidos usados en ingeniería genética tienen tres componentes principales: un origen de replicación recomendable con un promotor fuerte proveniente de un virus, una zona con resistencia a antibióticos, como ampicilina o tetraciclina, para generar ventaja adaptativa en bacterias y una región con el gen de interés.

El proceso de obtención de un lote de calidad de un plásmido inicia con la introducción de este material genético en bacterias, lo cual es conocido como transformación. Un organismo comúnmente utilizado para transformar y producir plásmidos es la bacteria *Escherichia coli*, para la cual se dispone de una gran variedad de plásmidos. La transformación bacteriana por el método químico consiste en dar un tratamiento previo a células bacterianas con calcio, haciéndolas susceptibles a la captación de ADN y volviéndolas competentes para el proceso de transformación (Old & Primrose, 1994). A partir de esto, se prepara una suspensión de estas células competentes con el plásmido de interés, que posteriormente es sometida a un choque térmico por un par de minutos con el propósito de permeabilizar la membrana bacteriana e introducir material genético exógeno. Posteriormente, la suspensión se transfiere a un medio rico en nutrientes, buscando la reproducción de las bacterias con la expresión del plásmido exógeno. A continuación, se realiza un proceso de selección de las células transformadas con el plásmido gracias a la región de resistencia a antibiótico que posee, sembrando el cultivo en un agar con un medio

que contiene el antibiótico, lo cual permite únicamente la supervivencia y crecimiento de las células transformadas (McLennan et al., 2013).

El siguiente paso para la obtención del plásmido puro es reproducir las células transformadas para tener una gran cantidad de material genético. Para esto se realiza un cultivo bacteriano en un medio selectivo con el antibiótico previamente utilizado, a partir del crecimiento de una colonia de células transformantes (Glencross et al., 2011).

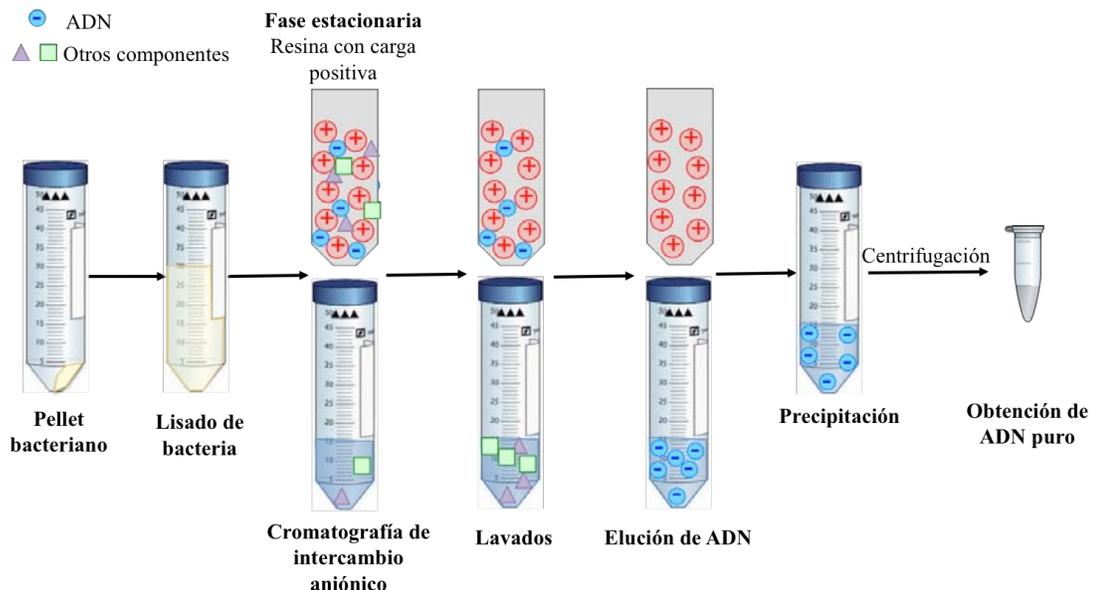
El proceso desde la transformación hasta el cultivo bacteriano se observa en la **Figura 9**.



**Figura 9.** Proceso para obtención de ADN plasmídico.

La purificación del ADN es el último paso para adquirir un lote de calidad de material genético plasmídico. Este proceso consiste en generar la lisis de la pared celular bacteriana, permitiendo la extracción y purificación del ADN plasmídico. Las bacterias son comúnmente tratadas con RNAsas, a fin de eliminar material ribonucleico, y tratadas con el detergente dodecil sulfato de sodio a pH básico, lo cual provoca la ruptura de la pared celular, así como la desnaturalización irreversible del ADN genómico, el cual es eliminado por filtración o centrifugación. El material plasmídico es renaturalizado mediante el uso de una solución amortiguadora, y existen distintos métodos para llevar a cabo su purificación

(Old & Primrose, 1994). Uno de los métodos más eficientes consiste en el uso de columnas de separación por intercambio iónico, las cuales se basan en la interacción de la carga negativa que tiene el ADN por sus grupos fosfatos y la resina que conforma las columnas de separación con carga positiva. En la columna se coloca la solución que contiene el plásmido y otras biomoléculas y, después de un lavado para eliminar estas últimas, el ADN es recuperado mediante elución con un solvente rico en aniones. Finalmente, el ADN plasmídico se precipita con isopropanol y con etanol al 70%, a fin de eliminar impurezas solubles en estos alcoholes. La purificación es mostrada paso a paso en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Purificación de ADN plasmídico.

### 2.3. Métodos de caracterización de nanopartículas y de sus cargos

Al pretender generar nanovectores adecuados para transportar material genético al interior de una célula, se busca conocer las características físicas y morfológicas de las nanopartículas producidas, así como las características del material que acarrean y la

eficiencia de encapsulamiento, ya sea un fluorocromo para modelar la carga aniónica del ADN, como la calceína, el manejo de ADN puro y el uso de lípidos e intercaladores de ADN que generen fluorescencia, con el propósito de observar la interacción entre las nanoestructuras y las células.

La caracterización de materiales con propiedades fluorescentes permite confirmar esta característica a partir de la incidencia y emisión de determinada longitud de onda.

Por otro lado, la información básica necesaria para el manejo de material genético implica conocer la concentración, tamaño y estructura del mismo; por lo tanto, los ácidos nucleicos también requieren de un análisis cuantitativo y cualitativo para determinar la calidad de un lote purificado (Pingoud et al., 2002).

Dentro de una célula, el ADN puede sufrir cambios en su conformación, como doblamiento o flexión, lo cual genera inestabilidad. Para recuperar la estabilidad en su estructura, el ADN puede encontrarse superenrollado o relajado. Estas formas representan las dos estructuras topoisoméricas más comunes en las que se encuentra el ADN purificado. Cabe destacar que el ADN superenrollado es el producto buscado en la purificación debido a que representa la forma activa para aplicaciones plasmídicas, mientras que el ADN relajado normalmente se encuentra pobre o nulamente activo (Carbone, et al. 2012).

En la **Tabla 3** se muestran las longitudes de onda de excitación y emisión que se tomaron como referencia para la caracterización de los materiales con fluorocromos.

**Tabla 3.** Longitudes de onda de materiales fluorescentes utilizados en este trabajo.

	Longitud de onda de excitación [nm]	Longitud de onda de emisión [nm]
Calceína y proteína verde fluorescente aumentada (EGFP) (Patterson, 2007)	488	509
Fosfolípido lisamina rodamina DHPE (Technologies, 2012)	560	580
DAPI (Kapuscinski, 1995; Pingoud et al., 2002)	360	450

### 2.3.1. Espectroscopia UV

Los ácidos nucleicos se encuentran conformados por grupos funcionales aromáticos, por lo que pueden ser cuantificados mediante la absorción de luz ultravioleta para determinar la concentración y pureza de una muestra (Scientific, 2008).

Los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorbancia en 260 nm, mientras que posibles contaminantes proteicos absorben a 280 nm. Si se obtiene una razón 260/280 puede definirse la pureza del ADN y ARN, siendo un razón de aproximadamente 1.8 lo aceptable para considerar un lote de calidad de ADN (Pingoud et al., 2002).

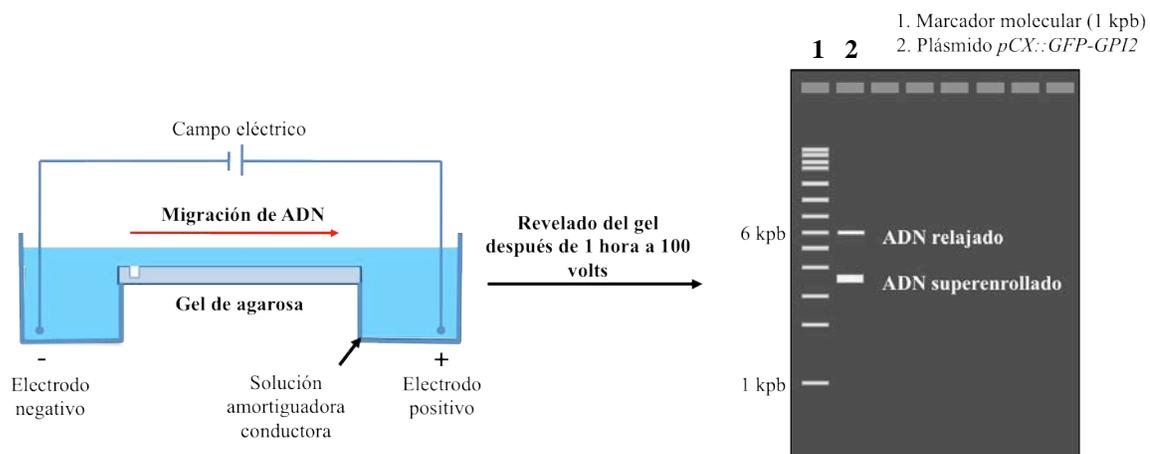
Un análisis de espectroscopia UV requiere de la purificación eficiente de ADN para tener un lote con un valor de alta razón, implicando una baja cantidad de contaminantes.

### 2.3.2. Electroforesis

La electroforesis es una técnica de separación que consiste en la migración de partículas con determinada carga sometidas a un campo eléctrico, lo cual provoca que se dirijan hacia un electrodo con carga opuesta, es decir, las partículas positivas se dirigen al cátodo (-) y

las negativas al ánodo (+). La velocidad de migración varía según el tamaño y la forma de las moléculas (Old & Primrose, 1994; Daintith & Tootill, 2001).

El proceso de electroforesis consiste en colocar muestras de ADN sometidas a un campo eléctrico en un gel de agarosa, es decir, un gel sólido de una mezcla de polisacáridos derivado de algas disuelto en una solución acuosa. Debido a que todos los nucleótidos de ADN están conformados por un grupo fosfato, tienen carga negativa al pH de análisis (= 8.3), por lo cual migran hacia el electrodo positivo (ánodo) (Glencross et al., 2011). Este proceso se muestra en la **Figura 11**.



**Figura 11.** Electroforesis de ADN con gel de agarosa.

Esta herramienta analítica también permite determinar el tamaño aparente de nucleótidos (Pingoud et al., 2002). Las concentraciones más utilizadas para determinar el tamaño de fragmentos de ADN entre 0.5 a 10 kpb son de aproximadamente 0.8% a 1% de agarosa.

La importancia de esta técnica es que permite analizar la estructura del material genético obtenido, como un plásmido, para utilizarlo como un vector (Glencross et al., 2011).

### **2.3.3. Microscopía de epifluorescencia**

Un microscopio de epifluorescencia consiste en dos monocromadores: el primero selecciona el haz de excitación con determinada longitud de onda para incidirlo sobre la muestra y provocar que la misma emita radiación fluorescente en todas direcciones, lo cual, a su vez, permite que el segundo monocromador haga que la longitud de onda sea detectada y medida (Glencross et al., 2011).

Entre las ventajas principales que aporta esta técnica se encuentran la mayor sensibilidad frente a otros métodos y la especificidad debido al manejo de dos longitudes de onda para producir una señal (Demchenko, 2009; Glencross et al., 2011).

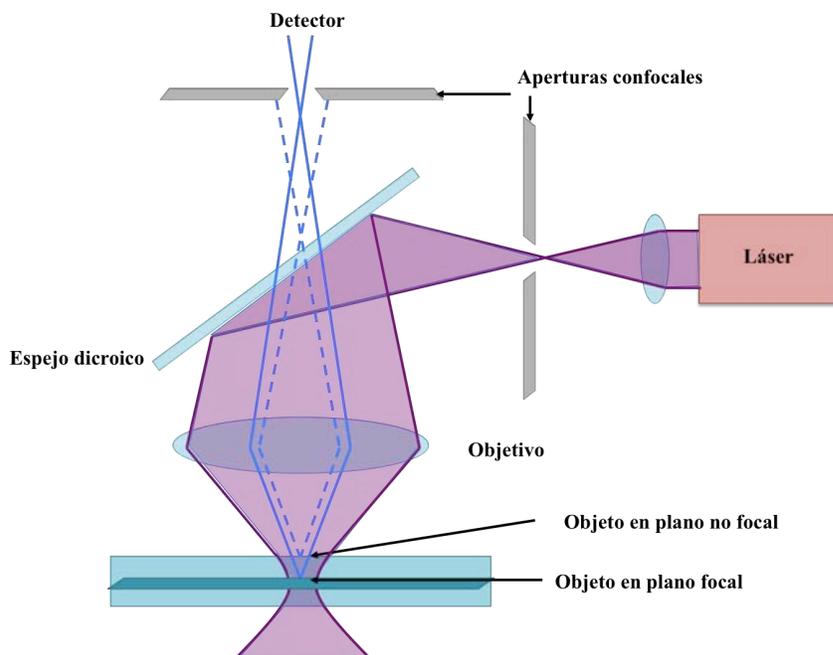
Gracias al marcaje por anticuerpos, fluorocromos y proteínas se han podido localizar proteínas y organelos celulares por microscopía de fluorescencia (Patterson, 2007).

### **2.3.4. Microscopía confocal**

La microscopía confocal es una técnica de caracterización que permite acceder a distintos planos de una muestra a partir del uso de un láser que pasa por una apertura confocal, conocida como “pinhole”, delimitando un plano focal de la muestra al eliminar los planos fuera de foco debido a que la zona de iluminación y la zona de detección se encuentran confinadas, lo cual produce una señal detectable por un sistema electrónico (Glencross et al., 2011) que permite reconstruir una imagen tridimensional del espécimen sometido a observación.

El propósito de esta técnica es analizar cualitativamente la fluorescencia de manera definida para identificar marcaje con fluorocromos, presencia de proteínas e interacción de materiales con células, entre otras aplicaciones.

La configuración del microscopio manejado para esta técnica se puede observar en la *Figura 12*.



**Figura 12.** Configuración básica del microscopio confocal.

### 2.3.5. Citometría de flujo

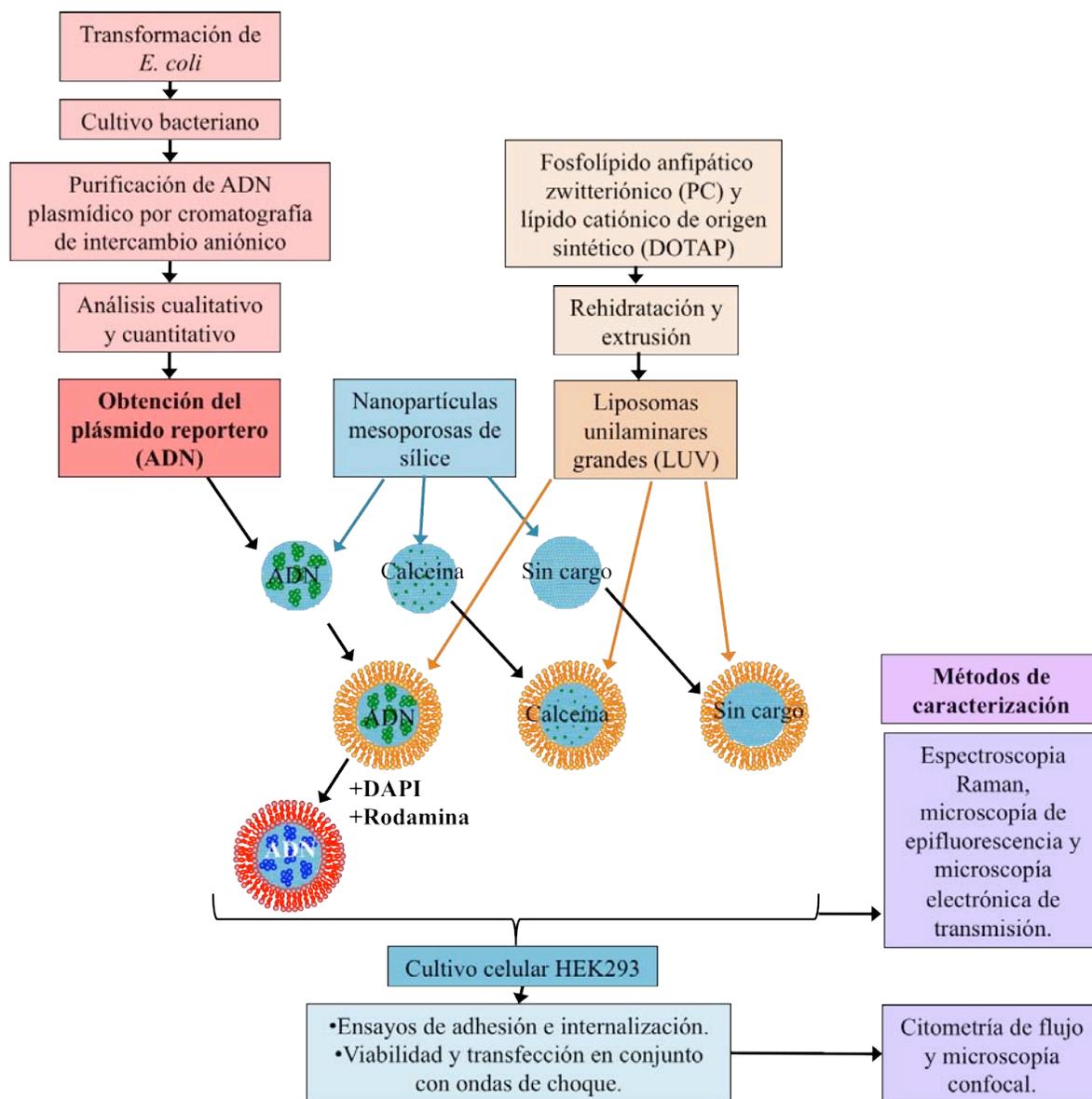
La citometría de flujo consiste en el análisis cuantitativo de células a partir de la medición de múltiples parámetros, sometiendo cada célula a un haz de láser focalizado, lo cual genera una señal detectable para determinar la granularidad, tamaño y/o algún componente celular relacionado con fluorescencia (Barrera Ramírez et al., 2004).

La citometría de flujo permite establecer la proporción de fluorescencia de proteínas fluorescentes de células en suspensión, proporcionando utilidad para comprobar la eficiencia de transfección (Eliopoulos & Galipeau, 2002).

## METODOLOGÍA

### 1. Diseño experimental

El desarrollo de este proyecto consistió en combinar dos métodos de transfección de acuerdo con lo plasmado en el diagrama de flujo mostrado en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Diagrama Experimental del proyecto.

## **2. Material y métodos**

### **2.1. Obtención de lote de calidad del plásmido *pCX::GFP-GPI2***

Este rubro requirió del uso de guantes para cada paso.

#### **2.1.1. Transformación de *E. coli* con plásmido**

Se descongelaron dos viales con células ultracompetentes de *E. coli XL-Blue*, sumergiéndolos en hielo por no más de 20 minutos: uno como control y otro para ser transformado. Posteriormente, en condiciones estériles, se agregaron 2 µl de plásmido *pCX::GFP-GPI2* (con una cantidad ≈100 ng de ADN) en el vial a transformar, y ambos viales se incubaron a 4°C en hielo por 15 minutos.

Se aplicó un choque térmico al colocar ambos viales en baño maría a 42°C por 3 minutos. Después, cada muestra fue transferida a un tubo Falcon estéril con 1 ml de medio LB cada uno, e incubadas bajo agitación a 37°C por 30 minutos.

Se colocaron 50 µl de cada suspensión en una respectiva caja Petri con agar de medio LB-AMP (preparado previamente con 500 µl de Ampicilina a 100 µg/ml en 500 ml de medio LB), dispersándolos con el uso de perlas de vidrio estériles por agitación manual.

Las cajas Petri se sellaron con Parafilm®M (Bemis Company, Inc., Estados Unidos de América) y se incubaron por una noche a 37°C.

#### **2.1.2. Inoculación y cultivo bacteriano**

A partir del cultivo con bacterias transformadas en cajas Petri, una colonia fue resuspendida en un tubo Falcon con 5 ml de medio LB-AMP, para obtener un inóculo con

bacterias portadoras del plásmido. El inóculo fue incubado a 37°C por 5 horas bajo agitación constante a 200 rpm. Posteriormente, se diluyó 500-1000 µl del mismo en 500 ml de medio LB-AMP y el cultivo se dejó crecer a 37°C por 12 horas con agitación constante a 200 rpm.

Finalmente, el cultivo se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 4000 rpm y los pellets obtenidos fueron inmediatamente utilizados, o bien congelados a -20°C hasta su uso.

### **2.1.3. Purificación de ADN plasmídico por cromatografía de intercambio aniónico**

La purificación se llevó a cabo con el material y reactivos establecidos en el protocolo Maxi Kit para plásmidos de QIA-GEN® (QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda).

Los pellets bacterianos provenientes de 250 ml de cultivo (obtenidos de acuerdo al proceso descrito en el rubro **Metodología:** 2.1.2. Inoculación y cultivo bacteriano) fueron resuspendidos con 10 ml de buffer P1 (QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda), el cual contiene RNAsa I. Posteriormente, se agregaron 10 ml de buffer P2 (QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda), el cual contiene detergente para realizar lisis de bacterias, y se mezclaron por inversión, con el tubo cerrado, hasta homogeneización, y se dejó reposar hasta completar 5 minutos de incubación en este medio. El reactivo contiene un indicador de pH que facilita observar la homogeneidad de la suspensión mediante una coloración azul.

A continuación, fueron agregados 10 ml del buffer P3 (QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda), el cual permite la renaturalización del ADN plasmídico, homogeneizando por inversión, hasta desaparición del color azul.

Enseguida, el ADN plasmídico fue separado del ADN genómico desnaturalizado. Para ello, la mezcla se incubó en un filtro *Cartridge* con tapón QIAGEN (QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda) a temperatura ambiente por 10 minutos, en donde el ADN genómico formó una capa flotante. Mientras tanto, se equilibró una columna QIAGEN-TIP 500 por flujo de gravedad con 10 ml de buffer QBT (QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda). Al terminar la incubación, el tapón del filtro *Cartridge* fue removido y, con el uso de un pistón, el contenido se colocó cuidadosamente en la columna QIAGEN-TIP500 (QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda).

Posteriormente, la columna fue lavada con 60 ml de buffer QC (QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda) para remover biomoléculas no aniónicas. Seguido de esto, se agregaron 15 ml de buffer QF (QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda) a 65°C para eluir el ADN en un tubo Falcon limpio.

El ADN se precipitó al agregar 10.5 ml de isopropanol (J.T. Baker) a temperatura ambiente y fue centrifugado por 1 hora a 5000  $\times g$  a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se disolvió el pellet con 5 ml de etanol al 70% y fue centrifugado por 1 hora a 5000  $\times g$  a 4°C.

El pellet se dejó secar al aire libre hasta dejar de percibir el olor característico del etanol y se disolvió el ADN en 500  $\mu$ l de agua inyectable (PiSa Farmacéutica) en un tubo Eppendorf, homogeneizando con golpes suaves en el mismo.

#### **2.1.4. Análisis cuantitativo**

Se realizó un análisis de espectroscopia UV en el Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) para determinar la concentración y pureza del ADN obtenido según el protocolo descrito en

la sección **Metodología:** 2.1.3. Purificación de ADN plasmídico por cromatografía de intercambio aniónico. Se emplearon 1-2  $\mu$ l de la muestra, cargándola con una micropipeta de 2  $\mu$ l.

### **2.1.5. Análisis cualitativo**

Se llevó a cabo el análisis cualitativo del ADN obtenido en el proceso descrito en la sección **Metodología:** 2.1.3. Purificación de ADN plasmídico por cromatografía de intercambio aniónico por medio de un gel de agarosa en una cámara Biorad de electroforesis horizontal con el propósito de analizar la calidad del ADN, específicamente para visualizar las formas topoisoméricas del ADN (superenrollado y relajado).

El plásmido fue diluido a una concentración tal que el depósito fuera de 100 ng de ADN por carril, disueltos en 17  $\mu$ l de agua inyectable (PiSa Farmacéutica) , y mezclados con 3  $\mu$ l de cóctel de carga, el cual contiene el indicador azul de bromofenol y glicerol (BlueJuice™ 10X Invitrogen). Como referencia se utilizó una escalera de pesos moleculares de 1 a 15 kbp (5  $\mu$ l de Ladder EZ Load™ Molecular Ruler 1kb, Biorad), la cual fue mezclada con 1  $\mu$ l de azul de bromofenol antes de su depósito. Las mezclas de ADN y cóctel de carga fueron preparadas sobre papel Parafilm®M.

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% con 40 ml de 1XTAE caliente (usando 50XTAE Buffer Biorad y agua destilada) mezclado con 0.32 g de agarosa (UltraPure™ Invitrogen). El contenido se colocó en una base con su respectivo molde (también conocido como “peine”) para formar los pocillos del gel y se dejó gelificar durante 1 hora a temperatura ambiente.

En la base de la cámara electroforética, se agregaron aproximadamente 250 ml de buffer de corrida TAE 1X y se colocó el gel de agarosa con los pocillos cerca de la zona del cátodo (-).

En cada pocillo se colocó una muestra y se inició el proceso de electroforesis de cátodo (-) a ánodo (+), es decir, de carga negativa a positiva, a 100 V por 1 hora. Al finalizar, el gel de agarosa fue sumergido en una solución de 3 µl SYBR®Safe DNA 10,000X (Invitrogen) con 30 ml de 1XTAE (dilución de SYBR®Safe 1:10,000) y se mantuvo en agitación suave por 10 minutos, utilizando un agitador orbital. El revelado fue observado en el fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (Biorad).

## **2.2. Manejo de líneas celulares**

En este trabajo, se utilizó la línea celular inmortalizada *Human Embryo Kidney* (HEK)-293, proveniente de células de riñón de embrión humano, transformadas con genes del Adenovirus Tipo 5.

Para el manejo de cualquier línea celular es necesario utilizar material estéril y trabajar en condiciones estériles. Adicionalmente, esta línea celular es manejada dentro de una campana de bioseguridad clase II, a fin de contener posibles recombinaciones de los oncogenes de Adenovirus tipo 5 con organismos del medio ambiente. Los materiales biológicos no utilizados fueron descartados previa descontaminación con hipoclorito de sodio.

Las células se deben mantener en una atmósfera de 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 97% de humedad relativa, en cajas Petri estériles para cultivo celular (Cell Culture Dish, CORNING® 100 mm × 20 mm). La línea celular HEK 293 es cultivada con medio DMEM completo

conformado por medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM 1X, Gibco), suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS, Gibco) al 10% y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml).

### **2.2.1. Descongelamiento**

Previamente a su uso, las células se conservan congeladas en nitrógeno líquido, o bien a -70°C por un breve periodo, en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) y suero fetal bovino como crioprotectores. Al descongelarlas, el DMSO debe ser eliminado del cultivo celular, ya que es altamente tóxico. El protocolo utilizado para este trabajo consistió en colocar, en una caja Petri estéril para cultivo celular, 9 ml de DMEM completo y 1 ml de suspensión celular descongelada en el momento (con aproximadamente  $10^6$  células). Aproximadamente 10 horas después, se aspiró el medio con pipeta Pasteur estéril y se sustituyó con 10 ml de medio DMEM completo.

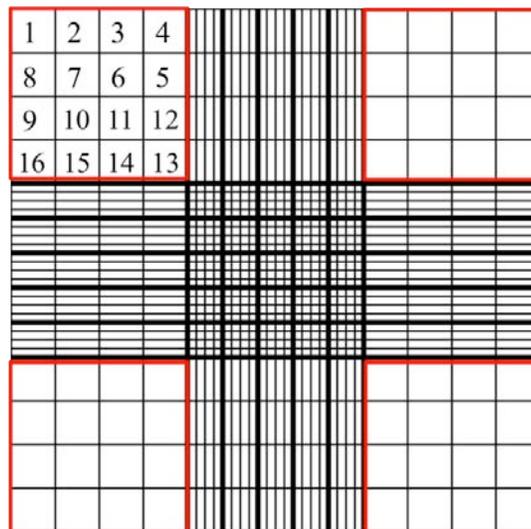
### **2.2.2. Propagación**

Para propagar las células, se requiere del proceso de cosecha, el cual consiste en despegar las células de la caja Petri mediante ataque con Tripsina y EDTA, para obtenerlas en suspensión, contarlas y resembrarlas en otra caja. Este proceso se realiza al haber aproximadamente un 80% de confluencia.

Se aspiró el medio de la caja Petri con pipeta Pasteur y se realizó un lavado con 7 ml de PBS 1X por 30 segundos. Posteriormente, se agregaron 2 ml de Tripsina-EDTA (0.25%, 1X, Gibco) y las células se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 97% de humedad relativa por 5 minutos. Se revisó que las células se despegaran y no formaran aglomerados y se homogeneizaron al resuspenderlas con 8 ml de DMEM completo, el cual neutraliza la

acción de la tripsina. La suspensión se centrifugó en tubo Falcon estéril por 6 minutos a 2500 rpm y se aspiró el medio con pipeta Pasteur, evitando tocar el pellet celular. Para realizar el conteo celular, el pellet se resuspendió en medio DMEM completo y se colocaron 12  $\mu\text{l}$  de la suspensión en la cámara Neubauer (Hausser Scientific).

El conteo se llevó a cabo en cada uno de los cuatro cuadrantes marcados en recuadros rojos y con el orden indicado en la **Figura 14**. A partir de los cuatro valores obtenidos, se realizó un promedio de las células por mililitro [células/ml] (multiplicando el valor por  $1 \times 10^4$ ).



**Figura 14.** Conteo en cámara Neubauer.

De acuerdo con los conteos celulares, se sembró la respectiva cantidad de células junto con la cantidad necesaria de DMEM completo para llenar la caja Petri con 10 ml de volumen total.

### 2.2.3. Almacenamiento

Inicialmente, se realizó el proceso de cosecha descrito en **Metodología: 2.2.2. Propagación**, y se colocaron  $2 \times 10^6$  células/ml en 500  $\mu$ l de DMEM completo, a los cuales se les agregaron 500  $\mu$ l de medio de congelación (preparado con 0.3 ml DMEM completo, 0.1 ml FBS y 0.1 ml DMSO), antes de colocarlas de inmediato a  $-70^{\circ}\text{C}$  o en nitrógeno líquido.

## 2.3. Preparación de nanopartículas híbridas para transfección

Las nanopartículas híbridas se produjeron a partir de nanopartículas mesoporosas de sílice y liposomas unilaminares catiónicos.

### 2.3.1. Producción de nanopartículas híbridas

Las nanopartículas mesoporosas de sílice fueron donadas por el Dr. Pedro Salas Castillo, del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM. Estas nanopartículas fueron sintetizadas por el método de Stöber modificado, para incluir la presencia de CTAB y de un alcohol durante el proceso de síntesis, generando así la formación de mesoporos (Kwon et al., 2013). A partir de estas nanopartículas, se prepararon distintas modalidades de nanopartículas funcionalizadas, como se muestra en la **Tabla 4**. Estos tipos de nanopartículas fueron preparadas para dos propósitos de análisis: interacción y transfección celular. Las nanopartículas destinadas al análisis de la interacción nanopartícula-célula fueron marcadas con distintos reactivos, como son: el fluorocromo calceína (Sigma) a una concentración de 250  $\mu\text{M}$ , el fosfolípido rodamina DHPE (Lisamina<sup>TM</sup> Rodamina B, Life Technologies) y el intercalador DAPI (Sigma-Aldrich). Por su parte, las nanopartículas

utilizadas para pruebas de transfección contenían el plásmido *pCX::GFP-GPI2* purificado y caracterizado.

**Tabla 4.** Modalidades de nanopartículas elaboradas.

Propósito	Nombre	Modalidades
Interacción	NC	Nanopartículas mesoporosas de sílice (SiNP).
	NH	Nanopartículas híbridas (SiNP y liposomas unilaminares) sin carga.
	NC-Cal	SiNP con calceína.
	NH-Cal	Nanopartículas híbridas con calceína.
	NHR-DAPI	Nanopartículas híbridas (usando liposomas con rodamina DHPE) con ADN plasmídico y DAPI.
Transfección	NC-ADN	SiNP con ADN plasmídico.
	NH-ADN	Nanopartículas híbridas con ADN plasmídico.
	NHR-ADN	Nanopartículas híbridas (usando liposomas con rodamina DHPE) con ADN plasmídico.

### 2.3.1.1. Preparación de liposomas catiónicos unilaminares grandes (LUV)

Inicialmente, se realizaron los cálculos necesarios para producir liposomas catiónicos multilaminares grandes (MLV, del inglés Multilamellar Vesicle) con una concentración de 2.5 mg lípidos/ml según lo especificado en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Cantidades para preparación de liposomas catiónicos multilaminares

Lípido	Porcentaje molar	Peso molecular [g/mol]	Peso [mg]
PC	70%	768	10.75
DOTAP	30%	698.55	4.19
<b>TOTAL</b>			<b>14.94</b>

En un contenedor de vidrio, fueron colocadas las cantidades establecidas de PC (Sigma) y DOTAP (Avanti Polar Lipids) y se dejaron secar en parrilla (50°C) bajo corriente de nitrógeno por 5 minutos.

Para preparar las nanopartículas NHR-DAPI y NHR-ADN (*Tabla 4*), se agregaron 200 µl del fosfolípido rodamina DHPE (Lisamina<sup>TM</sup> Rodamina B, Life Technologies) a una concentración 0.2 µM y 50 µl de una mezcla cloroformo:metanol (9:1). Posteriormente, los lípidos se colocaron al vacío en desecador por 10 minutos.

Enseguida, se agregó la cantidad necesaria de PBS 1X (según el peso de lípidos en cada modalidad) para formar liposomas catiónicos multilaminares a una concentración de 2.5 mg/ml. A fin de promover la formación de vesículas lipídicas, el PBS fue previamente calentado a 50°C y, después de agitación en vortex, la suspensión fue pasada a través de una jeringa calibre 21 hasta obtener homogeneidad.

Finalmente, para obtener liposomas catiónicos unilaminares (LUV, del inglés Large Unilamellar Vesicle), cada preparación se filtró 5 veces con filtro de 0.45 µm (Syringe Filters with Luer Tip, Agilent Technologies) y 5 veces con un filtro de 0.20 µm (Fluoropore Membrane Filters, Millipore). Las muestras fueron conservadas a 4°C.

### **2.3.1.2. Encapsulamiento de ADN en nanopartículas de sílice mesoporosa**

Para hidrofilar la superficie de las nanopartículas mesoporosas de sílice y mejorar su interacción con el ADN (y, en su caso, con la calceína), así como con los liposomas catiónicos, se realizó el procedimiento descrito por Liu y colaboradores (2009).

Se pesaron 25 mg de nanopartículas mesoporosas de sílice en tubo de vidrio y se incubaron a 80°C por 10 minutos con 10 ml de una solución de 4% de hidróxido de amonio

(J.T. Baker) con 4% de peróxido de hidrógeno (J.T. Baker). Posteriormente, la suspensión se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. Para realizar un lavado, se colocó 1 ml de agua inyectable (PiSa Farmacéutica) y la muestra fue centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm, nuevamente eliminando el sobrenadante.

Lo anterior se incubó a 80°C por 10 minutos con 10 ml de una solución de 0.4 M de ácido clorhídrico (J.T. Baker) y 4 % de peróxido de hidrógeno. A continuación, la solución se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. Seguido de esto, se realizó un lavado con 1 ml de agua inyectable (PiSa Farmacéutica) con las mismas condiciones de centrifugación, descartando el sobrenadante.

Posteriormente, las nanopartículas de sílice fueron mezcladas con 1 ml de su respectivo cargo dependiendo de la modalidad a preparar --- sin cargo no se agregó ninguna sustancia, con calceína (250  $\mu$ M), con ADN *pCX::GFP-GPI2* (1000 ng/ $\mu$ l aprox.) y con ADN *pCX::GFP-GPI2* (1000 ng/ $\mu$ l aprox.) y DAPI (500 ng/ $\mu$ l) --- y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos con agitación ocasional. A continuación, exclusivamente para la preparación de nanopartículas con recubrimiento lipídico (híbridas), se agregó a la mezcla 1 ml de liposomas catiónicos (LUV) a 2.5 mg/ml y fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos con agitación ocasional.

Después, cada modalidad se centrifugó por 1 minuto a 4000 rpm y se guardó el sobrenadante para su posterior análisis a 4°C (Sobrenadante No. 1). Al sedimento se le agregaron 200  $\mu$ l de PBS 0.25X y la solución fue centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm, guardando el sobrenadante a 4°C para analizarlo (Sobrenadante No. 2). Finalmente, se diluyó el sedimento con 200  $\mu$ l de PBS 0.25X y se refrigeró a 4°C.

### 2.3.1.3. Eficiencia de encapsulamiento

Para determinar la eficiencia de encapsulamiento del nanovector producido, se realizó un análisis de espectrofotometría UV en el Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) empleando 2  $\mu$ l de suspensión de nanopartículas con ADN, con excepción de las nanopartículas NHR-DAPI. Cabe mencionar que las nanopartículas de sílice mesoporosa no absorben la luz UV.

### 2.3.2. Caracterización de las nanopartículas

En este apartado se describirá la preparación de muestras de cada método de caracterización para determinar la morfología, tamaño y composición de los materiales fabricados. En la **Tabla 6** se indican las muestras que fueron procesadas por cada técnica.

**Tabla 6.** Tipos de nanopartículas caracterizadas por determinadas técnicas

Nombre	Raman	TEM	Epifluorescencia
NC	-	-	-
NH	-	-	-
NC-Cal	-	-	Sí
NH-Cal	-	-	Sí
NHR-DAPI	-	-	-
NC-ADN	-	Sí	-
NH-ADN	Sí	Sí	-
NHR-ADN	-	-	-
Liposomas catiónicos unilaminares	Sí	Sí	-
Nanopartículas mesoporosas de sílice	Sí	Sí	-

### **2.3.2.1. Microscopía de epifluorescencia**

Las muestras fueron analizadas en el Microscopio de Epifluorescencia ApoTome.2 (Zeiss) con filtro para FITC-GFP, láser de 488 nm y objetivo 100X. Se colocaron 15  $\mu$ l de cada muestra en un portaobjetos y se dejaron secar.

### **2.3.2.2. Espectroscopia Raman**

La preparación de muestras para la técnica de espectroscopia Raman consistió en envolver un portaobjetos con aluminio liso, en el cual se colocó una gota de 5  $\mu$ l de la respectiva muestra y se dejó secar. Posteriormente, se colocó otra gota encima de la anterior con la misma cantidad de muestra y se colocó en el desecador por 5 minutos.

Las muestras fueron analizadas en un espectroscopio Raman dispersivo Senterra (Bruker Optik GMBH) con una fuente láser de 785 nm, con resolución espacial realizando barridos en el intervalo de 80 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , y los datos obtenidos fueron procesados por el software Origin ® 9.

### **2.3.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Se realizó una dilución 1:1000 de cada muestra en agua desionizada y se colocaron 5  $\mu$ l sobre rejillas de cobre malla 200, con película de carbono.

Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo al 2%, incubándolas a 80°C por 10 minutos dentro de placas de Mazzini, y se lavaron con agua desionizada. La observación fue realizada en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEM-1010 (Jeol Co., Peabody).

### 2.3.3. Interacción de nanopartículas con la línea celular HEK 293

#### 2.3.3.1. Adhesión e internalización

Los análisis de células con nanopartículas fueron realizados mediante microscopía confocal en cajas de cultivo con fondo de vidrio de 17 mm de espesor (Fluorodish™ Cell Culture Dish 35 mm, World Precision Instruments, Inc.); para ello, se colocó 1 ml de polilisina (Sigma-Aldrich) al 0.01% en cada caja Fluorodish. Después de 5 minutos, se lavó con 1.5 ml de agua inyectable (PiSa Farmacéutica) y el contenido fue eliminado para dejar secar por 2 horas.

Se realizó el protocolo de tripsinización descrito en el rubro **Metodología:** 2.2.2. Propagación y, en cada caja Fluorodish con polilisina se incubaron 30,000 células en 2 ml de DMEM completo por una noche a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 97% de humedad relativa. Se aspiró el contenido con micropipeta y fue incubado 1 ml de DMEM sin FBS en cada caja Fluorodish por 4 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 97% de humedad relativa con 10 µl de cada uno de los grupos enlistados a continuación:

- PBS 1X como control.
- NHR-DAPI (250 µg): Nanopartículas de sílice recubierta por lípidos (híbrida) con rodamina y con ADN con DAPI como cargo.
- NH-Cal (250 µg): Nanopartículas híbridas con calceína como cargo.
- NC-Cal (250 µg): Nanopartículas cerámicas con calceína como cargo.

Posteriormente, se agregó 1 ml de DMEM con 20% de FBS a cada caja y fueron incubadas por una noche a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 97% de humedad relativa.

Finalmente, se realizó el proceso de fijación, en el cual el medio fue removido con micropipeta y se lavaron 3 veces las cajas Fluorodish con 1 ml de PBS 1X sin dejar secar. Fueron agregados 500 µl de paraformaldehído (Sigma) al 4% y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos al abrigo de la luz. Posterior a esto, se lavó 2 veces cada caja Fluorodish con 1 ml de PBS 1X, incubando cada lavado por 5 minutos y fueron agregados 1.5 ml de PBS 1X para analizar las células en el microscopio confocal Axiovert 200 LSM 510 Meta (Zeiss), conservando las muestras a 4°C.

### **2.3.3.2. Transfección**

Para las pruebas de transfección, se llevó a cabo el proceso descrito en el apartado **Metodología:** 2.3.3.1. Adhesión e internalización, sustituyendo los grupos utilizados anteriormente por los presentados a continuación:

- PBS 1X como control.
- NC-ADN (250 µg): Nanopartículas cerámicas con ADN plasmídico como cargo.
- NH-ADN (250 µg): Nanopartículas cerámicas con bicapa lipídica con ADN plasmídico como cargo.

## **2.4. Aplicación de ondas de choque**

El generador de ondas de choque utilizado fue un generador piezoeléctrico Piezoson 100 Plus fabricado por la empresa Richard Wolf GmbH en Knittlingen, Alemania.

El experimento se realizó exponiendo una suspensión celular con  $1 \times 10^6$  células/ml a ondas de choque con una presión positiva de 18.4 MPa (nivel de intensidad 15) a una frecuencia de 1 Hz. Las muestras se analizaron por duplicado a una temperatura de 37°C.

Inicialmente, se llevó a cabo el proceso de cosecha de células HEK 293 (descrito en **Metodología:** 2.2.2. Propagación) para obtener  $1 \times 10^6$  células/ml en DMEM completo. Cada muestra fue colocada en tubos Eppendorf y el contenido fue colocado en pipetas de transferencia de plástico estériles (Sedi-PET TM Sterile), las cuales se sellaron con fuego para mantener su esterilidad. Las muestras fueron sometidas a distintas cantidades de ondas de choque: 0, 120, 180, 240 y 300. A fin de determinar la cantidad adecuada de ondas de choque respecto a la viabilidad celular, se realizó un conteo celular de cada muestra, utilizando una cámara de Neubauer, y se determinó la supervivencia celular, utilizando como control células sometidas a los mismos procedimientos, pero sin tratamiento con ondas de choque.

#### **2.4.1. Efectos de nanopartículas sobre supervivencia celular**

A partir de las condiciones permeabilizantes establecidas, el experimento se realizó tratando una suspensión celular con  $1 \times 10^6$  células/ml con 120 ondas de choque (presión positiva de 18.4 MPa) a una frecuencia de 1 Hz. Las muestras se analizaron por duplicado a una temperatura de 37°C.

Inicialmente se llevó a cabo el proceso de cosecha de células HEK 293 (descrito en **Metodología:** 2.2.2. Propagación) para obtener  $1 \times 10^6$  células/ml en DMEM sin FBS, utilizando un grupo control (sin nanopartículas), un grupo con 625  $\mu\text{g}$  de nanopartículas cerámicas (NC) y otro grupo con 625  $\mu\text{g}$  de nanopartículas cerámicas con recubrimiento lipídico (NH). Cabe mencionar que estas nanopartículas se obtuvieron a partir del proceso descrito en el rubro **Metodología:** 2.3.1.2. Encapsulamiento de ADN en nanopartículas de sílice mesoporosa. Cada muestra fue colocada en tubos Eppendorf y el contenido fue colocado en pipetas de transferencia de plástico estériles (Sedi-PET TM Sterile), las cuales

se sellaron con fuego para mantener su esterilidad. Las muestras fueron sometidas a 0 ondas de choque (como control para cada grupo) y a 120 ondas de choque.

Finalmente, se realizó un conteo celular de cada muestra con cámara Neubauer para generar una gráfica con la supervivencia celular de cada modalidad respecto a su control, utilizando el software Excel ® y se realizó una prueba estadística ANOVA de una vía con *Post hoc* Tukey y Duncan usando el software SPSS Statistics versión 21.

## 2.5. Transfección de células HEK 293 mediante nanopartículas híbridas y exposición a ondas de choque

El experimento se realizó por duplicado con  $1 \times 10^6$  células/ml expuestas a 120 ondas de choque (presión positiva de 18.4 MPa) a una frecuencia de 1 Hz y temperatura de 37°C.

Inicialmente se realizó el proceso de cosecha de células HEK 293 (descrito en **Metodología:** 2.2.2. Propagación) para obtener  $1 \times 10^6$  células/ml en DMEM sin FBS en tubos Eppendorf, como lo enlistado en la **Tabla 7**. Cabe mencionar que la concentración de ADN utilizada para el grupo de plásmido se ajustó a partir de la lectura obtenida por la cuantificación de las nanopartículas híbridas (NHR-ADN) en el Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), tomando este valor como una aproximación del material genético acarreado.

**Tabla 7.** Grupos utilizados para el método combinado de ondas de choque con nanopartículas híbridas

Grupo	Cantidad de muestra
Control	---
Plásmido <i>pCX::GFP-GPI2</i>	~21 µg.
NHR-ADN	625 µg de nanopartículas con ~21 µg de ADN.

Posteriormente, se colocó el contenido de cada tubo Eppendorf dentro de pipetas de transferencia estériles (Sedi-PET TM Sterile), las cuales se sellaron con fuego para mantener su esterilidad durante el tratamiento de ondas de choque. Las muestras fueron sometidas a 0 ondas de choque (para controles) y 120 ondas de choque. A continuación, se hizo un conteo celular en cámara Neubauer y se sembraron 500,000 células de cada muestra en cajas Petri para cultivo celular (Cell Culture Dish, CORNING® 60 mmx15 mm) con 9 ml de DMEM completo por 24 horas.

Después de la incubación, se aspiró el medio con pipeta Pasteur estéril y cada caja Petri fue incubada con 2 ml de Tripsina-EDTA en condiciones de 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 97% de humedad relativa por 5 minutos. Se revisó que las células se despegaran y no formaran aglomerados y se homogeneizaron por resuspensión con 4 ml de DMEM completo. Lo anterior se centrifugó en tubo Falcon estéril por 6 minutos a 2500 rpm y el medio fue aspirado por pipeta Pasteur, evitando tocar el pellet celular. El pellet se resuspendió en 500 µl de PBS 1X y se agregaron 500 µl de paraformaldehído (Sigma) al 4%, incubando a temperatura ambiente por 15 minutos al abrigo de la luz. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 7000 rpm y, posteriormente, se realizaron 3 lavados con 1 ml de PBS 1X con centrifugaciones de 5 minutos a 7000 rpm.

Finalmente, se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS 1X filtrado para analizar cada muestra por citometría de flujo (10,000 eventos registrados) en el equipo BD Accuri C6™.

Alternativamente, las muestras de células transfectadas fueron sembradas en cajas Fluorodish, para su observación mediante microscopía confocal. Para ello, se sembraron 30,000 células con 2 ml de DMEM completo durante 24 horas después de la transfección,

utilizando el protocolo de siembra descrito en **Metodología:** 2.3.1. Adhesión e internalización.

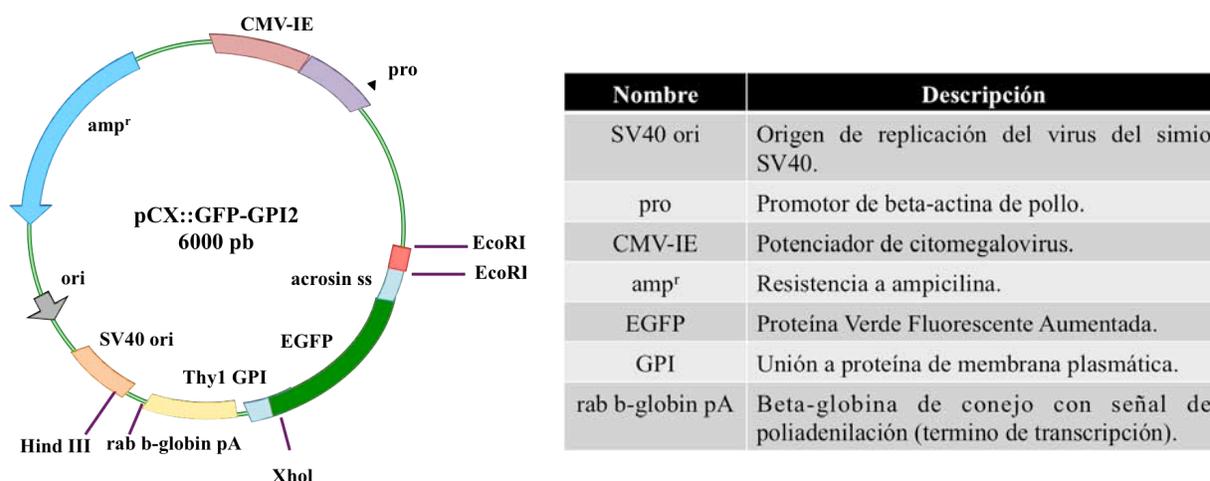
Cabe mencionar que se realizó un conteo celular de cada muestra con cámara Neubauer para generar una gráfica con la supervivencia celular de cada modalidad respecto a su control, utilizando el software Excel ® y se llevó a cabo una prueba estadística ANOVA de una vía con *Post hoc* Tukey y Duncan usando el software SPSS Statistics versión 21.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

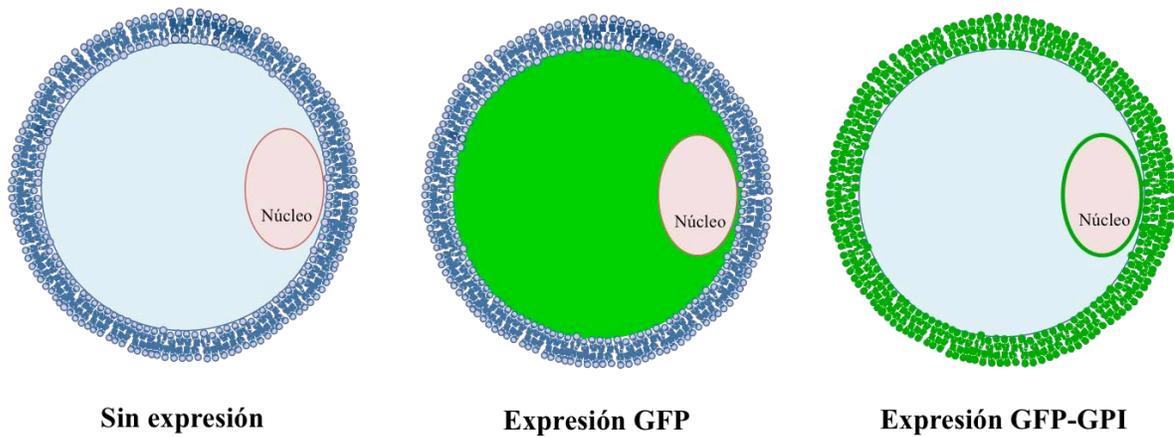
### 1. Obtención del plásmido *pCX::GFP-GPI2*

Un plásmido es una estructura de ADN circular de doble cadena extracromosomal proveniente de bacterias que se duplica de manera independiente (Old & Primrose, 1994).

En este trabajo se utilizó el gen reportero de la proteína verde fluorescente aumentada (EGFP) con excitación/emisión 488/509 nm, el cual se encuentra en la construcción mostrada en la **Figura 15**. Cabe mencionar que en este plásmido se encuentra el gen EGFP fusionado con GPI que codifica para el anclaje de proteínas en membrana plasmática del tipo glicosilfosfatidilinositol (Camacho Banda, 2012), del cual se muestra la expresión esperada en la **Figura 16**.



**Figura 15.** Componentes del plásmido *pCX::GFP-GPI2*.



**Figura 16.** Expresión de genes reporteros.

Cabe destacar que un lote de ADN plasmídico con una construcción reportera de alta pureza permite mejorar la eficiencia de transfección (Rincón-Arano & Recillas-Targa, 2004). Como lo mencionado en la sección **Marco Teórico:** 2.2.1. Plásmidos, el proceso de obtención de plásmido consiste en la introducción de material genético en bacterias por medio de transformación, a partir de lo cual se realiza una selección de células transformadas gracias a la región de resistencia a antibiótico. A continuación se clonan estas células provocando el crecimiento de una colonia de células del mismo tipo. Posteriormente, la purificación permite adquirir material genético plasmídico por medio de una extracción de ADN por intercambio iónico, basándose en la interacción de la carga negativa que tiene el ADN por sus grupos fosfatos y la resina que conforma las columnas de separación con carga positiva. Finalmente, el ADN plasmídico puro se remueve por precipitación (Glencross, Ahmed & Wang, 2011).

El plásmido fue propagado en la bacteria *E. coli*, la cual fue transformada mediante choque térmico. Como era de esperarse, la transformación exitosa de esta bacteria generó la aparición de colonias resistentes a ampicilina (mostradas en la

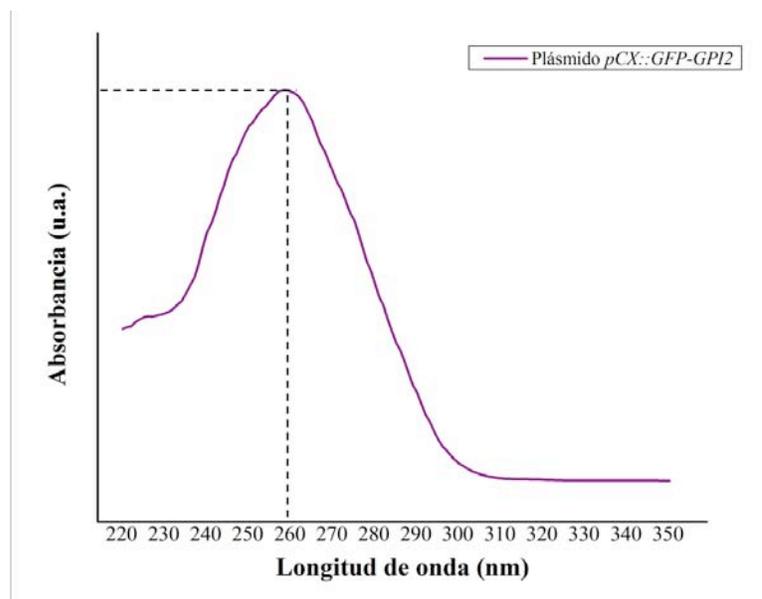
**Figura 17)**, a partir de las cuales se propagó el cultivo bacteriano.



**Figura 17.** Crecimiento de colonias de la bacteria *E. coli* modificada con el plásmido *pCX::GFP<sub>GPI2</sub>* en medio LB que contiene ampicilina.

El ADN plasmídico fue purificado utilizando el kit QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda. La calidad y cantidad de ADN obtenido fue estimada mediante espectroscopia UV, determinando las razones de absorbancia 260/280 y 260/230 para conocer la pureza del ADN obtenido.

En la **Figura 18** se muestra el espectro típico de ADN con un pico de absorbancia en el valor de 260 nm, característico de absorbancia de ácidos nucleicos.

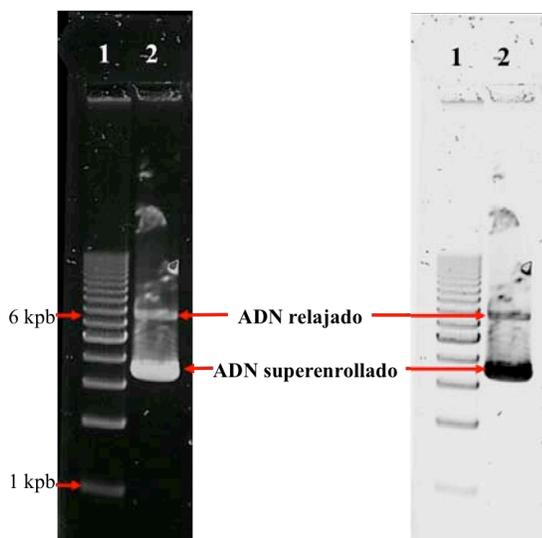


**Figura 18.** Cuantificación de ADN por espectrometría UV del lote purificado del plásmido *pCX::GFP-GPI2*.

La razón 260/280 tuvo un valor de 1.98, el cual entra al rango de buena calidad de ADN puro, y la razón 260/230, como medida secundaria, tuvo un valor de 2.32 (Scientific, 2008), lo cual se encuentra en el rango adecuado para considerar que el ADN obtenido es puro, como lo especificado en la sección **Marco Teórico: 2.3.1. Espectroscopia UV**.

A fin de confirmar la identidad del plásmido, así como su composición en formas topoisoméricas, se realizó un análisis en electroforesis horizontal en gel de agarosa, el cual se muestra en la **Figura 19**. En el gel se observan dos fragmentos de la muestra del ADN plasmídico purificado: el ADN relajado y el ADN superenrollado. Estas formas representan las dos estructuras topoisoméricas más comunes en las que se encuentra el ADN purificado,

y nos permite afirmar que hay una mayor cantidad de ADN superenrollado, lo cual es lo deseado ya que se trata de la forma más estable.



**Figura 19.** Análisis del plásmido *pCX::GFP-GPI2* en gel de agarosa. Izquierda: Imagen de fluorescencia, con tinción de SybrSafe®, obtenida por fotodocumentador. Derecha: Imagen obtenida por fotodocumentador con colores invertidos. Muestras analizadas: 1) Referencia de tallas moleculares, 2) Plásmido purificado.

## 2. Ensamblaje del nanovector híbrido

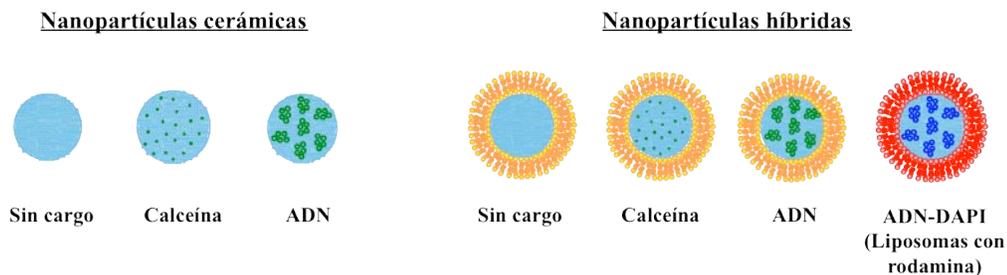
Las nanoestructuras híbridas se encuentran conformadas por nanopartículas mesoporosas de sílice y liposomas catiónicos que se obtuvieron por autoensamblaje, creando un vector supramolecular a partir de interacciones no covalentes.

Las nanopartículas de sílice tienen varias ventajas, como es la alta adsorción de material genético debido al tipo y tamaño de poro (con un rango aproximado de 2 a 10 nm de diámetro) que permite el almacenamiento de una gran carga (Llinàs & Sánchez García, 2014), y también ha presentado alta biocompatibilidad en pruebas *in vitro* e *in vivo* (Dengler et al., 2013). Por su parte, la carga catiónica de los liposomas es esencial para favorecer la interacción con la membrana celular, permitiendo la internalización de material

exógeno en células eucariontes (Dengler et al., 2013). Para obtener una superficie con carga catiónica en los vectores producidos, se utilizó una mezcla de lípidos con un fosfolípido anfipático zwitteriónico (fosfatidil-colina o PC) y un lípido catiónico de origen sintético (DOTAP). Adicionalmente, en algunas muestras se utilizó un 0.01% del fosfolípido fosfatidil-etanolamina, acoplado con el fluorocromo rodamina (PE-rodamina), como marcador fluorescente de la bicapa lipídica. Los liposomas unilaminares fueron elaborados por medio de extrusión con filtros de talla de 200 nm de la mezcla de liposomas multilaminares.

Con el fin de explorar el comportamiento de nanopartículas cerámicas y nanopartículas híbridas, en cuanto a eficiencia de encapsulamiento e interacción con células humanas, se prepararon distintas modalidades de ellas, como se esquematiza en la *Figura 20*.

En resumen, por un lado se evaluó la capacidad para retener el fluorocromo calceína, el cual representa un polianión, y ha sido utilizado para modelar la retención de ADN. Asimismo, se evaluó la interacción de nanovectores: nanopartículas cerámicas, nanopartículas híbridas, y sus variantes con cargos reporteros. Se les denomina reporteros debido a que pueden ser visualizados por técnicas de fluorescencia, lo cual facilita el análisis respecto a la interacción con las células y, en el caso de un gen reportero, la expresión de una proteína como referencia para confirmar la viabilidad del vector de transfección. Básicamente, un gen reportero se identifica y se puede medir fácilmente.



**Figura 20.** Modalidades de nanovectores: nanopartículas cerámicas, nanopartículas híbridas, y sus variantes con cargos reporteros.

Se realizaron distintos análisis para determinar las características principales de los materiales producidos, como se describe en las siguientes secciones.

## 2.1. Eficiencia de encapsulamiento

Las nanopartículas mesoporosas de sílice fueron sometidas a cambios de pH, se incubaron en una solución acuosa conteniendo el lote de ADN plasmídico purificado y, posteriormente, fueron agregados los liposomas unilaminares (LUV), obteniendo con esto las nanopartículas híbridas. A partir de esto, se analizó la eficiencia de encapsulamiento de plásmido mediante espectrometría UV, la cual permitió estimar la cantidad de ADN adsorbida en las nanopartículas y el ADN no encapsulado en los sobrenadantes.

Las siguientes muestras fueron cuantificadas por la técnica mencionada: ADN plasmídico puro (previamente analizado), nanopartículas mesoporosas de sílice recubiertas por una bicapa lipídica con PE-rodamina (NHR-ADN) y el sobrenadante No. 1 y No. 2 obtenidos en el protocolo descrito en **Metodología: 2.3.1.2. Adsorción de ADN y encapsulamiento**. Cabe mencionar que este método de cuantificación de ADN puede ser utilizado en las preparaciones de nanopartículas, debido a que la sílice mesoporosa no presenta absorción en este rango de longitud de onda.

En la **Tabla 8** se muestran los valores numéricos adquiridos, a partir de los cuales se determinó el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento, mostrado en la **Ecuación 1**.

**Tabla 8.** Valores obtenidos de la cuantificación de ADN plasmídico, LUV con PE-rodamina, nanopartículas híbridas con rodamina(NHR-ADN) y los sobrenadantes (1 y 2) obtenidos de la producción de nanopartículas híbridas.

<b>Grupo</b>	<b>Concentración [ng/μl]</b>
<b>Plásmido <i>pCX::GFP-GPI2</i></b>	1389.63
<b>NHR-ADN</b>	418.80
<b>Sobrenadante No. 1</b>	498.39
<b>Sobrenadante No. 2</b>	238.57

**Ecuación 1**

**Tabla 8.** Valores obtenidos de la cuantificación de ADN plasmídico, LUV con PE-rodamina, nanopartículas híbridas con rodamina(NHR-ADN) y los sobrenadantes (1 y 2) obtenidos de la producción de nanopartículas híbridas.

Grupo	Concentración [ng/μl]
Plásmido <i>pCX::GFP-GPI2</i>	1389.63
NHR-ADN	418.80
Sobrenadante No. 1	498.39
Sobrenadante No. 2	238.57

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulamiento} = \frac{(\text{ADN total} - \text{ADN no encapsulado})}{(\text{ADN total})} (100)$$

**Siendo**

$$\text{ADN total} = 1389.63 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

$$\text{ADN no encapsulado (Sobrenadantes)} = 498.39 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} + 238.57 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} = 736.96 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

**Entonces**

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulamiento} = \mathbf{46.97\%}$$

**Ecuación 1.** Porcentaje de eficiencia de encapsulamiento a partir de los valores obtenidos por espectrometría UV (Dastan & Turan, 2004).

Dado lo anterior, se determinó que hay una adsorción de casi la mitad de ADN plasmídico puro. Esto implica que la adsorción no tiene un porcentaje tan eficiente, sin embargo, se especuló que la cantidad de ADN adsorbida en las nanopartículas pudo resultar conveniente para las pruebas de transfección, ya que en la literatura se ha reportado una eficiencia de encapsulamiento de aproximadamente 40% para agentes quimioterapéuticos como Gemcitabina (Meng et al., 2015).

## 2.2. Caracterización del nanovector híbrido

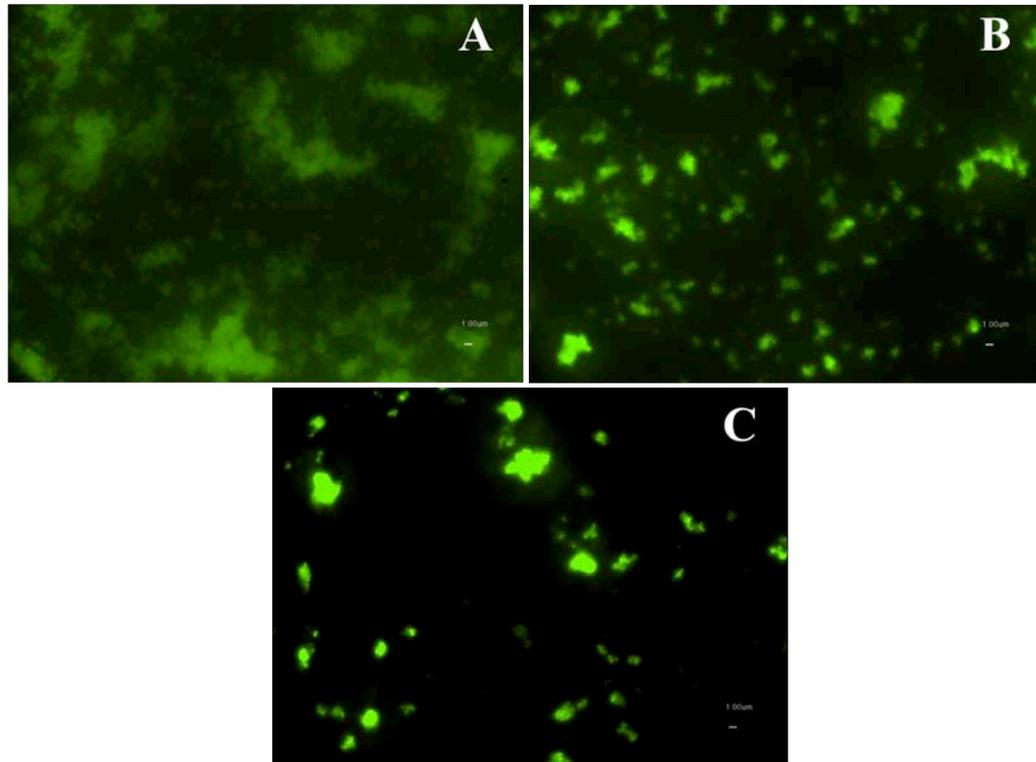
### 2.2.1. Microscopía de epifluorescencia

Inicialmente, se planteó analizar la estabilidad de encapsulamiento del fluorocromo calceína en las nanopartículas y la interacción de estas partículas con células, sirviéndose de la fluorescencia de esta molécula, con el fin de definir la modalidad de nanoconstrucción más conveniente para las posteriores pruebas de transfección al encapsular ADN plasmídico.

Se obtuvieron nanopartículas de sílice mesoporosa (SiNP) funcionalizadas de tres modos, las cuales se denominaron como sigue:

- a) SiNP no hidrofílicas: Nanopartículas incubadas con calceína.
- b) NC-Cal: Nanopartículas tratadas para obtener una superficie más hidrofílica (proceso descrito en **Metodología: 2.3.1.2.Adsorción de ADN y encapsulamiento**), e incubadas con calceína.
- c) NH-Cal: Nanopartículas tratadas para obtener una superficie más hidrofílica (proceso descrito en **Metodología: 2.3.1.2.Adsorción de ADN y encapsulamiento**), incubadas con calceína y recubiertas con una bicapa de lípidos.

Para explorar si el encapsulamiento de calceína presentaba estabilidad en estas tres modalidades, las nanopartículas fueron suspendidas en PBS 0.25X y la suspensión fue observada con un microscopio de epifluorescencia. En la **Figura 21** se muestran las imágenes obtenidas.



**Figura 21.** Microscopía de epifluorescencia para el análisis de suspensiones de nanopartículas con calceína. A) SiNP no hidrofílicas, B)NC-Cal, C)NH-Cal.

La resolución de un microscopio óptico no permite observar nanopartículas individuales; sin embargo, es posible observar si la marca verde fluorescente de la calceína es retenida en las partículas, que forman agregados, o bien si es liberada al medio, produciéndose un patrón difuso de la fluorescencia. En primera instancia, se observó que las nanopartículas no sometidas al protocolo de modificación de superficie (SiNP no hidrofílicas) no encapsulan la carga de calceína de manera estable, mostrando un aspecto no pulcro en la muestra y generando fluorescencia en prácticamente todo el medio (**Fig. 21A**). A su vez, la modalidad en donde las nanopartículas fueron tratadas para tener una superficie más hidrofílica (NC-Cal), mostraron mayor definición en la estructura de las nanopartículas, aunque también se observaron rastros de fluorescencia de calceína no encapsulada (**Fig.**

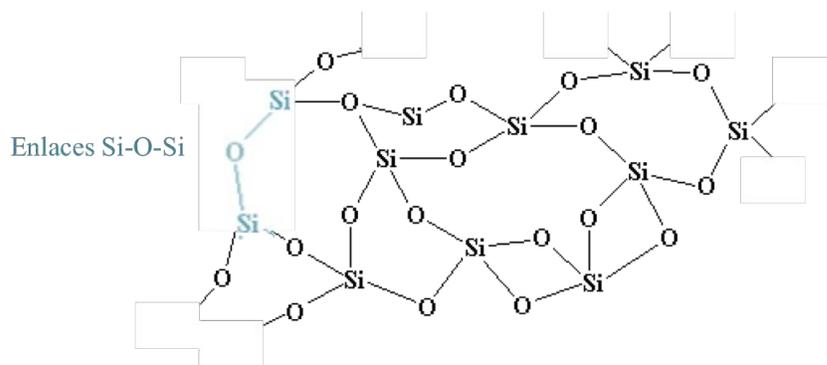
**21B**). Finalmente, se observa que la carga de calceína en el lote de nanopartículas híbridas (NH-Cal) se encuentra confinada en zonas bien definidas, indicando una buena estabilidad en la encapsulación (**Fig. 21C**). Éste fue el indicativo por el cual se decidió continuar con la producción de las nanopartículas híbridas con el proceso para mejorar la hidrofilia en la superficie, buscando con esto mantener el confinamiento de material genético.

### 2.2.2. Espectroscopia Raman

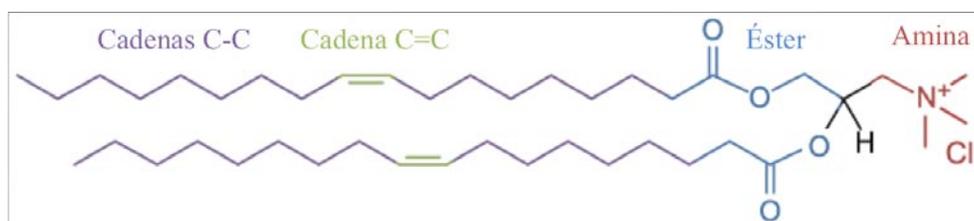
La espectroscopia Raman es una técnica que consiste en analizar la dispersión generada por la interacción de las moléculas de un material con determinada radiación electromagnética, permitiendo analizar la diversa composición de materiales de forma simultánea y generando con esto un control de calidad en productos farmacéuticos (Caballero González, 2013) al definir los componentes esenciales de una muestra.

Inicialmente, se consideraron las estructuras de cada uno de los componentes, mostradas en la *Figura 22*, *Figura 23* y *Figura 24*, esperando encontrar las bandas características en el espectro Raman de cada muestra.

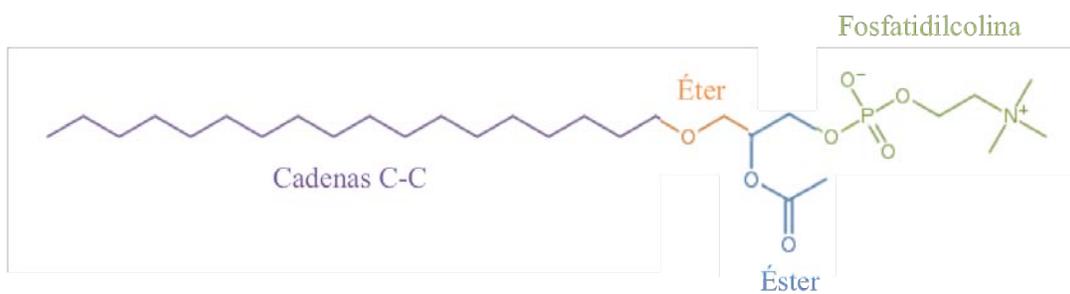
En la *Figura 25* se muestran los espectros Raman de las nanopartículas de sílice (SiNP), de los liposomas catiónicos unilaminares (LUV) y de la construcción supramolecular (NH-ADN), la cual contiene también plásmido encapsulado. Las bandas características (Kocisová et al., 2013; Socrates, 2001) de estas muestras se describen conforme a sus tipos de vibración en la *Tabla 9*.



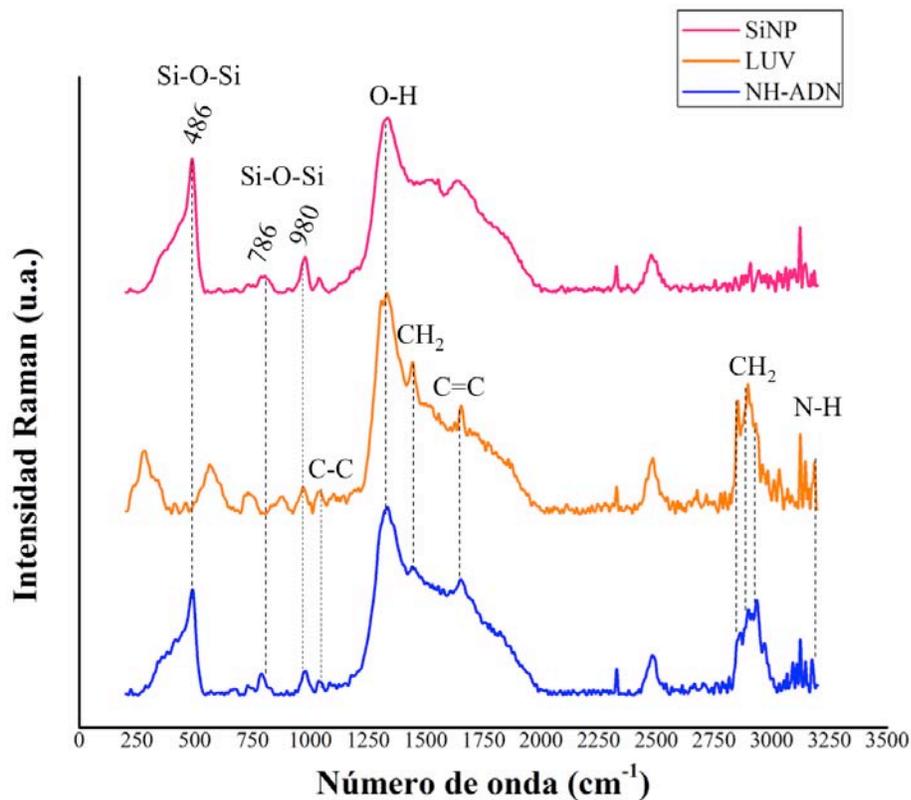
**Figura 22.** Estructura química de óxido de silicio (sílice) amorfo.



**Figura 23.** Estructura química del lípido catiónico DOTAP con sus grupos funcionales.



**Figura 24.** Estructura química del lípido PC, resaltando sus grupos funcionales.



**Figura 25.** Espectroscopia Raman de SiNP, liposomas catiónicos (LUV) y nanopartículas híbridas con ADN plasmídico (NH-ADN).

**Tabla 9.** Bandas características de cada material analizado por espectroscopia Raman.

Banda	Número de onda [cm <sup>-1</sup> ]	Tipo de vibración
1	~486	Si-O-Si
2	~786	
3	~980	
4	1330	Grupo Hidroxilo O-H
5	~1450	Estiramiento simétrico CH <sub>2</sub>
6	~1655	Estiramiento C=C
7	~2850	Estiramiento simétrico CH <sub>2</sub>
8	~2900	

<b>9</b>	~2935	
<b>10</b>	~3175	Estiramiento de enlace simétrico N-H

Dados los grupos funcionales de los compuestos analizados, se esperaba obtener determinadas bandas características de cada muestra. En el caso de las nanopartículas de sílice, u óxido de silicio, se encontraron las bandas de absorción características de enlaces de silicio y oxígeno (Si-O-Si), con bandas bien definidas en el espectro a 486, 786 y 980  $\text{cm}^{-1}$  (Cattaneo et al., 2016).

Por su parte, en el espectro de los liposomas unilaminares (que contienen DOTAP y PC), se observan señales de enlaces sencillos (C-C) y dobles (C=C), así como señales que pueden ser atribuidas a distintos grupos funcionales de estos componentes, como amina, éster, éter y fosfatidilcolina (Kocisová et al., 2013). En el análisis del espectro Raman, se encontraron enlaces C-C y C=C, enlaces  $\text{CH}_2$  y grupos amina (N-H), todos ellos correspondientes a grupos funcionales que forman parte de las estructuras químicas en los liposomas.

Como esperado, en el espectro de las nanopartículas híbridas (NH-ADN) se observaron bandas características tanto de liposomas catiónicos (enlace N-H), como de nanopartículas de sílice (estiramiento Si-O-Si).

Con este análisis podemos definir que las nanopartículas híbridas contienen los dos materiales utilizados: la sílice mesoporosa y los lípidos que componen los liposomas utilizados para el recubrimiento.

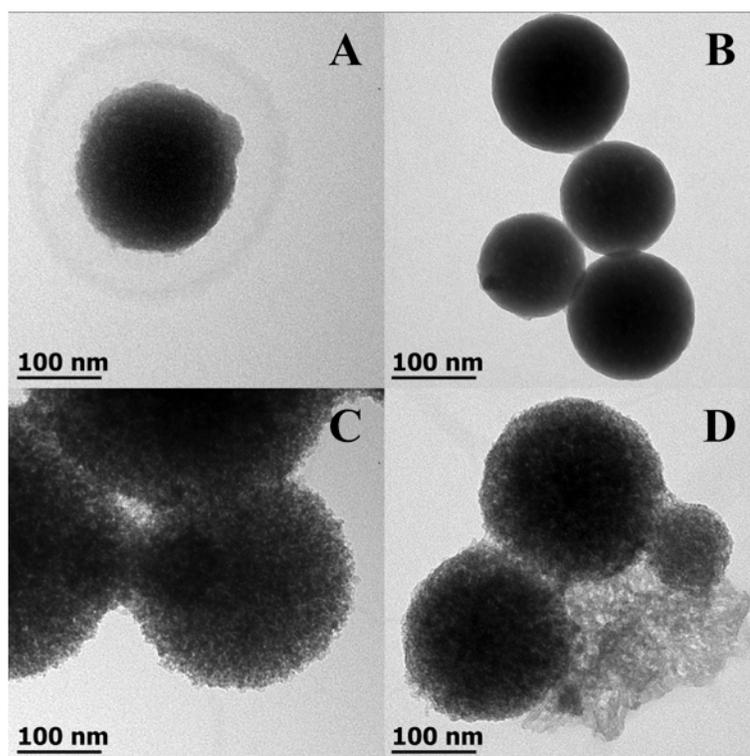
### 2.2.3. Microscopía electrónica de transmisión

Las imágenes capturadas por esta técnica son obtenidas por el paso de un haz de electrones sobre la muestra y son magnificadas con alta resolución, permitiendo observar estructuras a escalas nanométricas para obtener información respecto al tamaño y morfología de las muestras analizadas. En este trabajo se aplica esta técnica para analizar la estructura de las modalidades de nanopartículas producidas.

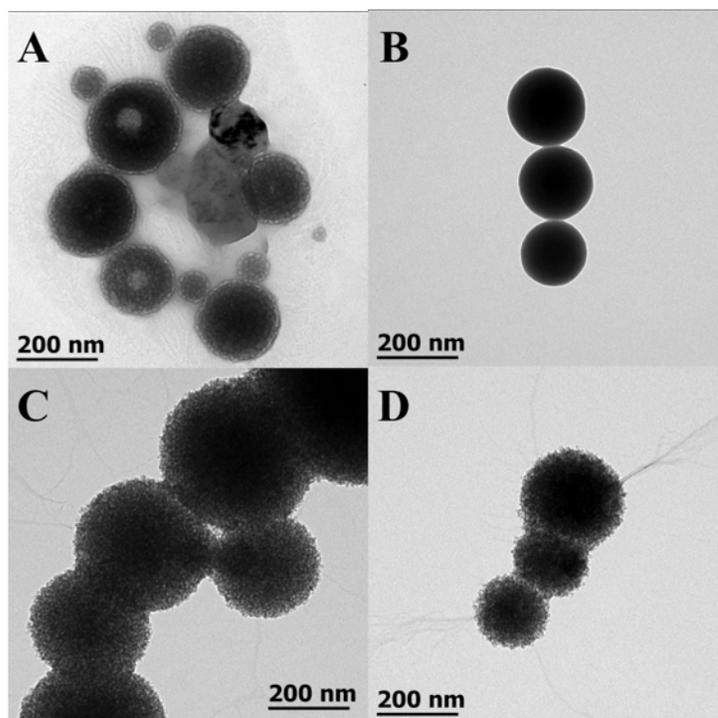
Se caracterizaron los liposomas unilaminares (LUV), las nanopartículas mesoporosas de sílice (SiNP), las nanopartículas de sílice con ADN adsorbido (NC-ADN) y las nanopartículas de sílice con ADN y recubrimiento de lípidos (NH-ADN). Las imágenes representativas de cada grupo se muestran a distintas escalas nanométricas en la *Figura 26* y la *Figura 27*. A partir de estos análisis se observa que las nanopartículas mesoporosas de sílice tienen una superficie muy definida y una estructura esférica, los liposomas son esféricos y un poco traslúcidos y las modalidades NC-ADN y NH-ADN tienen una superficie distinta a las SiNP, que indica cambios superficiales conferidos por las biomoléculas, ya sea el ADN plasmídico y/o los liposomas catiónicos sobre la estructura esférica. De acuerdo con estos análisis, el ADN plasmídico quedaría encapsulado en la superficie hidrofílica de los mesoporos, pero también adsorbido sobre la superficie de las partículas.

Al analizar la talla de las nanopartículas, se observó que las nanopartículas funcionalizadas con ADN y con liposomas presentan tallas máximas superiores a las cerámicas de origen. Notablemente, las nanopartículas híbridas (NH-ADN) parecen tener una mayor homogeneidad en la distribución de tamaño que las nanopartículas mesoporosas de sílice sin el recubrimiento lipídico (NC-ADN). Es probable que estas características se

relacionen con un mayor confinamiento del cargo (ADN) dentro del nanovector en las nanopartículas recubiertas por una bicapa lipídica, lo cual indicaría una clara ventaja para evitar la eliminación o degradación del ADN en el nanovector (Resnier et al., 2013). Estos resultados muestran, como era lo esperado, que las nanopartículas hidrofílicas e híbridas tienen mejores características como acarreadoras de material nucleico para fines de transfección.



**Figura 26.** Comparación de morfología y tamaño de imágenes obtenidas por la técnica de caracterización TEM a escala de 100 nm. A) Liposomas catiónicos, B) Nanopartículas mesoporosas de sílice, C) Nanopartículas mesoporosas de sílice con ADN y D) Nanopartículas híbridas con ADN.



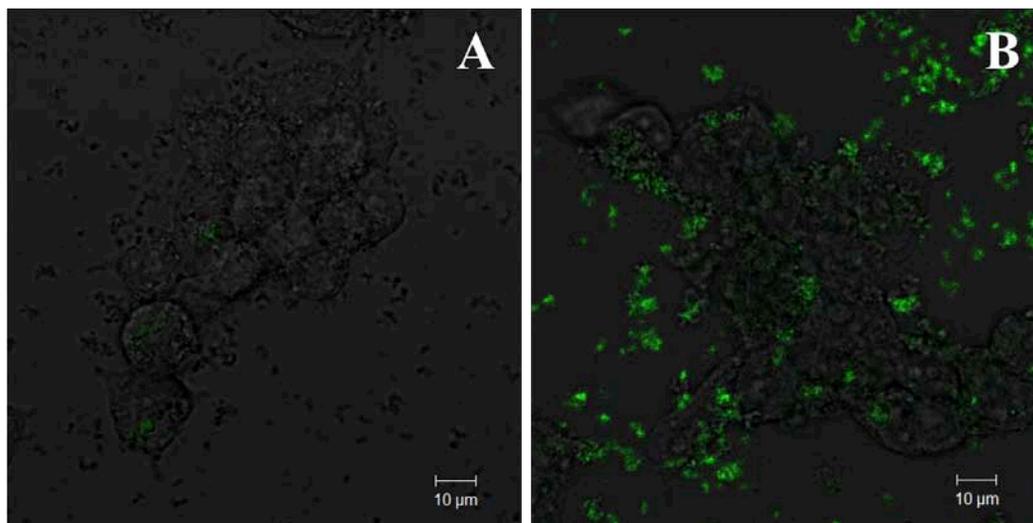
**Figura 27.** Comparación de morfología y tamaño de imágenes obtenidas por la técnica de caracterización TEM a escala de 200 nm. A) Liposomas catiónicos, B) Nanopartículas mesoporosas de sílice, C) Nanopartículas mesoporosas de sílice con ADN y D) Nanopartículas híbridas con ADN.

## 2.3. Interacción de nanopartículas con células HEK 293

### 2.3.1. Adhesión e internalización

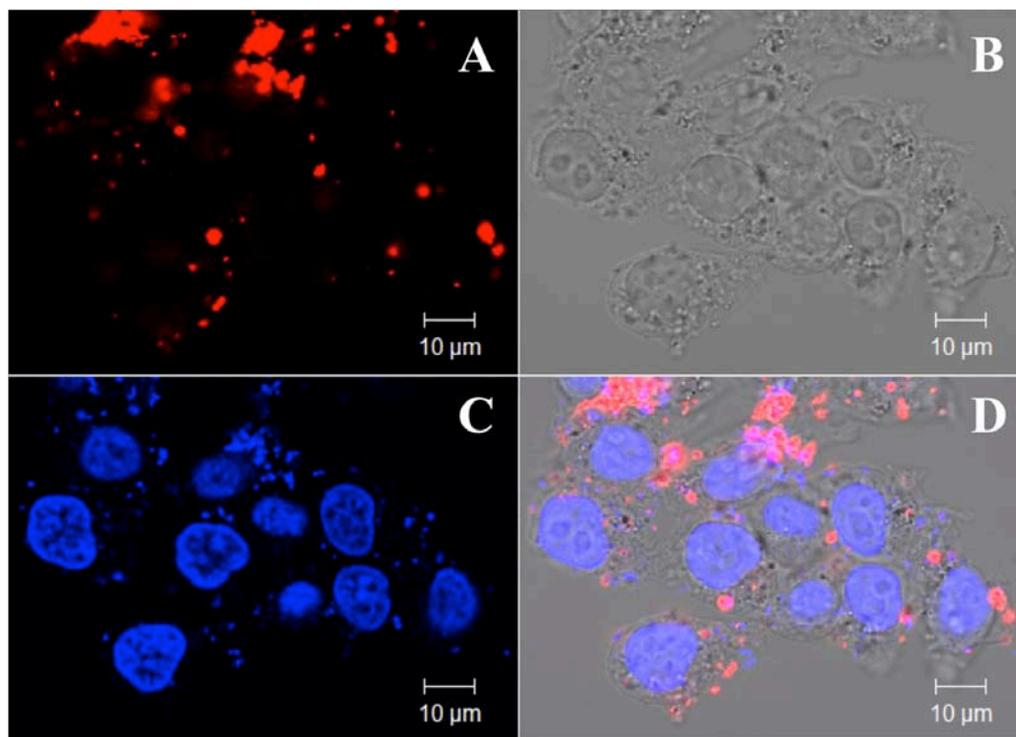
El primer paso para promover la internalización de un nanovector es definir la interacción de éste con la superficie de la célula. De acuerdo con varios reportes, una carga catiónica en la superficie de las nanopartículas permite promover la adhesión a la membrana con carga negativa de células eucariontes debido a la atracción de cargas (Audesirk et al., 2013). Para analizar la adhesión e internalización de estas construcciones en células eucariontes, se realizaron incubaciones de cada una de ellas con células HEK 293 cultivadas en monocapas. Estas células, pertenecientes a una línea celular derivada de

riñón de embrión humano, representan una línea típica de células adherentes y pueden tomarse como modelo para explorar la internalización de nanovectores en células no fagocíticas de un tejido. Con el uso de calceína y PE-rodamina, en conjunto con el marcaje de núcleos con DAPI, se analizó, por medio de la captura de imágenes confocales en distintos planos, si las partículas eran internalizadas en las células o simplemente se adherían a su superficie. En la **Figura 28** se observa que, si las células son incubadas con nanopartículas, y lavadas antes del análisis microscópico, la fluorescencia verde de la calceína encapsulada queda en contacto con las células únicamente cuando las nanopartículas se han funcionalizado con lípidos catiónicos (**Fig. 28B**). En contraste, el uso de nanopartículas con calceína (**Fig. 28A**) no genera contacto del fluorocromo con las células. Cabe destacar que la falta de visualización de calceína se puede deber a la pérdida del cargo de las nanopartículas en el medio.



**Figura 28.** Ensayo de adhesión de nanopartículas con células HEK 293. Los ensayos fueron incubados por 24 hrs. y las muestras fijadas fueron analizadas por microscopía confocal. A) Nanopartículas de sílice con calceína (NC-Cal), B) Nanopartículas híbridas con calceína (NH-Cal).

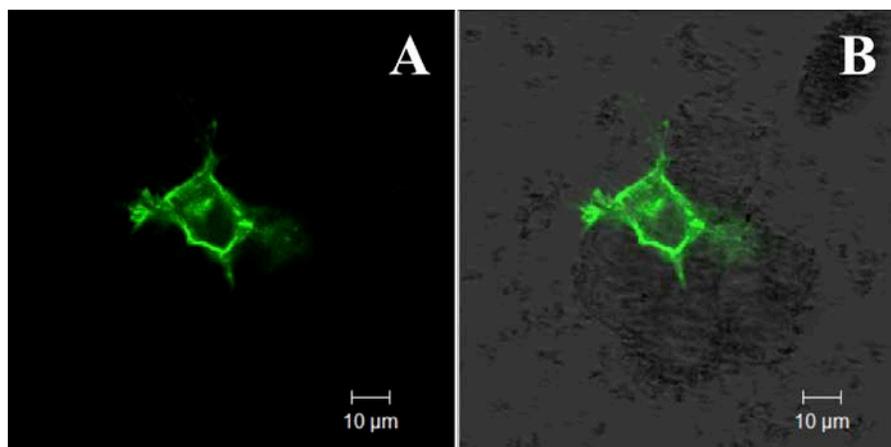
En el ensayo de internalización, el propósito era el de observar la posible localización de partículas internalizadas en el plano focal del núcleo celular, discriminando una localización intracelular de la superficie de la membrana plasmática. Debido a esto, se realizó una nanoconstrucción de nanopartículas de sílice cargadas con ADN plasmídico, previamente incubado con el reactivo DAPI, y PE-rodamina en el recubrimiento de liposomas unilaminares, generando que el cargo de las nanopartículas tuviera fluorescencia azul y su recubrimiento de lípidos fuera rojo fluorescente. En la **Figura 29** se observa el resultado de estos experimentos. Un exceso de DAPI permite que, además de marca fluorescente azul en el plásmido encapsulado, el marcador sea liberado (a partir de nanopartículas internalizadas) para localización del núcleo celular. Por otro lado, la marca de lípidos en la superficie de las nanopartículas (en rojo), permite observar si las bicapas lipídicas del nanovector son integradas en las membranas celulares, y si estas marcas colocalizan con material nucleico. Como puede observarse en la **Fig. 29D**, en algunas regiones se observó colocalización de ambos marcadores (ADN y lípidos fluorescentes) en estructuras internalizadas, pero ajenas al núcleo, lo que permite sugerir que las nanopartículas han sido internalizadas, y su ADN permanece protegido dentro de ellas. En todo caso, la presencia de fluorescencia azul fuera del núcleo, pero en el mismo plano focal y dentro del contorno celular, soporta la entrada de plásmido vía esta nanoconstrucción. Cabe destacar que, tanto en el ensayo de adhesión como en el de internalización, las nanopartículas híbridas parecen conferir una gran estabilidad del cargo, además de adherencia e interacción con las células.



**Figura 29.** Ensayo de internalización de nanopartículas en células HEK 293 por 24 hrs. analizado por microscopía confocal. A) Fluorescencia roja de liposomas catiónicos marcados con PE-rodamina, B) Campo claro de células, C) Fluorescencia en azul de ADN plasmídico con DAPI en el núcleo celular, D) Imagen en conjunto de A), B) y C).

### 2.3.2. Transfección con el plásmido *pCX::GFP<sub>GPI2</sub>*

La transfección consiste en introducir material genético en células eucariontes para su posterior expresión, por lo cual, al utilizar un plásmido que contiene un gen reportero, la transfección exitosa implica la producción de una proteína a partir del mismo, que en este caso es la proteína verde fluorescente. En la **Figura 30** se visualiza, por microscopía confocal, la transfección exitosa de células HEK 293 al utilizar el nanovector híbrido con ADN (NH-ADN).



**Figura 30.** Expresión de la proteína verde fluorescente con el uso de nanopartículas híbridas con ADN (NH-ADN) en células HEK 293 vista por microscopía confocal. A) Campo oscuro, B) Campo claro con contraste de interferencia diferencial.

Asimismo, se analizaron las otras modalidades manejadas (control, ADN plasmídico y nanopartículas con ADN sin recubrimiento lipídico) y no se observó fluorescencia verde, el indicativo de transfección (datos no mostrados), por lo cual las nanopartículas híbridas con ADN resultaron ser el único método con transfección exitosa en células no fagocíticas. Sin embargo, el número de células transfectadas observado fue reducido, por lo cual se planteó la mejora de eficiencia de transfección, procediendo a explorar el uso de este nanovector combinado con ondas de choque.

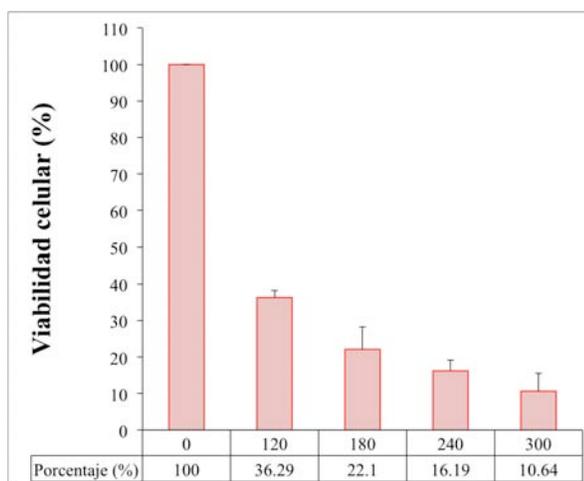
### **3. Permeabilización e internalización de nanovectores mediante ondas de choque**

Anteriormente, en el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), campus Juriquilla, Querétaro, en colaboración con el Laboratorio de Nanobio-óptica de la misma sede, se han realizado pruebas de sonoporación con células inmortalizadas de la línea HEK 293 y de la línea MCF-7, comprobando la permeabilización membranal transitoria y, por ende, proponiendo esta técnica como un método factible de transfección.

Estos resultados son el precedente que establece las condiciones de permeabilización aquí evaluadas (180 a 500 ondas de choque con una amplitud del pulso de presión positiva ( $p^+$ ) de 26 a 33 MPa).

### 3.1. Supervivencia de células HEK 293 post-tratamiento con ondas de choque

La inserción de material extracelular por cavitación acústica se basa en un fenómeno en donde las microburbujas en la vecindad de las células crecen y colapsan. Durante su colapso, las burbujas producen ondas mecánicas de alta amplitud conocidas como ondas de choque y también generan chorros de líquido a altas velocidades, llamados “microjets”, afectando la superficie de objetos sólidos cercanos. En una suspensión de células, los “microjets” producen perturbaciones, generando permeabilidad transitoria en las membranas celulares o muerte celular, dando como consecuencia la reducción en el número de células. Dado lo anterior, se realizó un análisis de supervivencia celular posterior al tratamiento con ondas de choque, y se obtuvo la información graficada en la **Figura 31**.



**Figura 31.** Supervivencia de células HEK 293 expuestas a diferente número de ondas de choque ( $p^+ = 33$  MPa).

Teniendo como principal objetivo mejorar la eficiencia de transfección mediante la combinación de ondas de choque y la entrega con las nanopartículas híbridas, se fijaron condiciones de 120 ondas de choque con una intensidad 15 ( $p^+ = 33$  MPa), cuyos efectos presentan menor reducción en la supervivencia celular (aproximadamente 36%), para observar si con estas condiciones era posible internalizar nanopartículas.

### **3.2. Efectos de nanopartículas cerámicas sobre la supervivencia celular post-aplicación de ondas de choque**

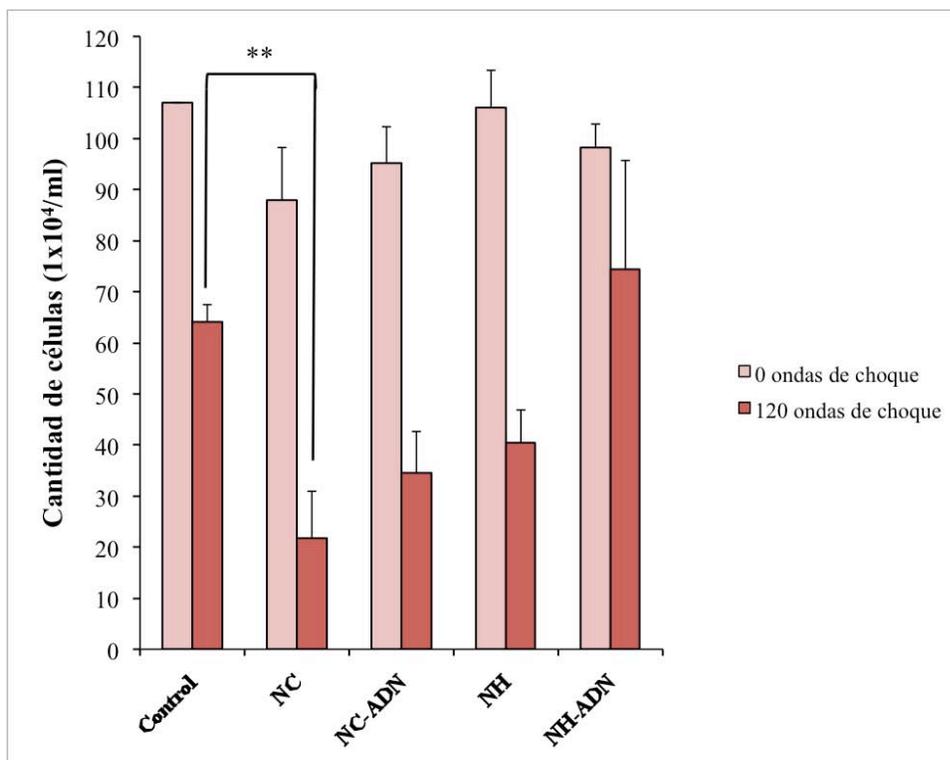
En primera instancia se exploró si la presencia de nanopartículas durante el tratamiento con ondas de choque tenía efectos sobre la supervivencia celular, por lo cual,  $1 \times 10^6$  células de la línea HEK 293 fueron sometidas al tratamiento de 0 y 120 ondas de choque con intensidad 15 ( $p^+ = 33$  MPa). Se exploraron nanopartículas con las distintas modalidades de funcionalización: nanopartículas de sílice sin cargo (NC), nanopartículas híbridas sin cargo (NH), nanopartículas funcionalizadas con ADN (NC-ADN) y nanopartículas de sílice con ADN y recubrimiento lipídico (NHR-ADN). Posterior al tratamiento con ondas de choque, se realizó un conteo de células con cámara de Neubauer (*Figura 32*), a partir del cual se determinó el porcentaje de viabilidad celular de cada grupo mostrado en la *Figura 33*. Este análisis determinó, como esperado, una reducción importante en el número de células viables después del tratamiento con las ondas de choque. El grupo tratado con 120 ondas de choque muestra una reducción hasta aproximadamente un 60% de células viables, comparado con el grupo control (no tratado por ondas de choque). Aunque esta reducción es considerable, las células que permanecen después del tratamiento pueden ser monitoreadas en cuanto a fenómenos de permeabilización y transfección. Sin embargo, las células tratadas con ondas de choque en

presencia de nanopartículas de sílice sin recubrimiento presentaron un incremento exacerbado en su mortalidad. La aplicación de 120 ondas de choque en suspensiones celulares en presencia de nanopartículas desnudas produjo un decremento de viabilidad celular hasta un 25%.

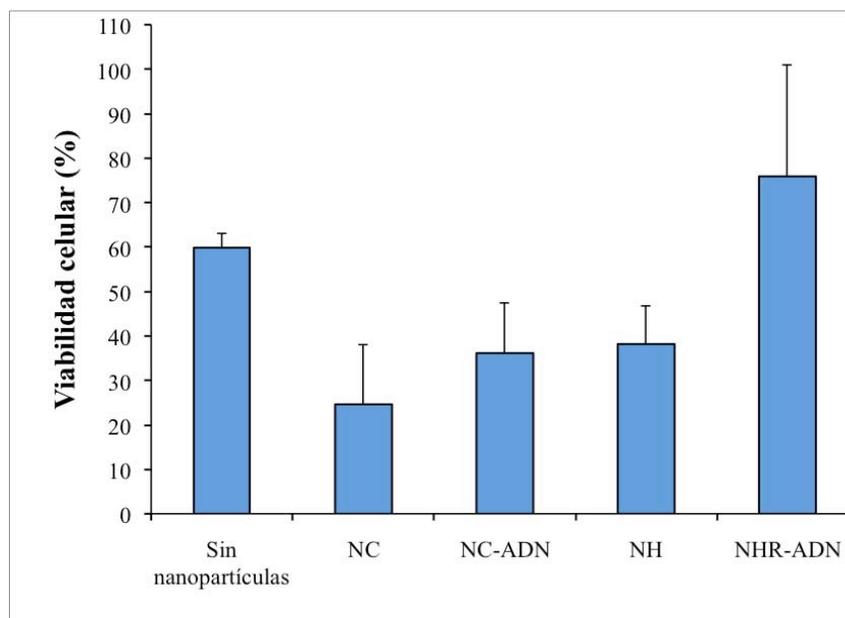
Hasta ahora, los métodos físicos de transfección que involucran cavitación acústica han sido combinados con nanovectores hechos con lípidos anfipáticos, tales como los liposomas, los lipoplex (Millán-Chiu et al, 2014) y las microburbujas (Bekeredjian et al., 2007). Los resultados presentados aquí muestran que la presencia de nanopartículas de materiales densos en combinación con fenómenos de cavitación acústica producen una mortalidad muy alta, por lo cual se descartó su uso. Además de esto, el análisis estadístico ANOVA de una vía (*Post hoc* Duncan) del software SPSS Statistics versión 21, determinó que, con 120 ondas de choque, la cantidad de células con nanopartículas sin recubrimiento y sin ADN (NC) son estadísticamente diferentes al control ( $p < 0.05$ ).

De manera sorprendente, la funcionalización de las nanopartículas de sílice con biomoléculas, en este caso ADN plasmídico y/o fosfolípidos arreglados en bicapa lipídica, redujo la mortalidad producida por las ondas de choque en presencia de nanopartículas. Como puede verse en las gráficas de la **Figura 32** y de la **Figura 33**, la funcionalización con estas estructuras en la superficie de las cerámicas permitió revertir la mortalidad y alcanzar los niveles de mortalidad atribuidos al tratamiento físico por sí solo. Estos resultados representan un punto determinante para el manejo del nanovector con recubrimiento lipídico en conjunto con ondas de choque debido a que resultó ser una vía no nociva en las células, es decir, la viabilidad fue similar para el grupo sin nanopartículas (control) y para el grupo incubado con nanopartículas híbridas con rodamina y ADN

(NHR-ADN), indicando que no hay una reducción significativa en la cantidad de células y que resulta ser un vector viable para no generar mortalidad más allá de la generada por ondas de choque.



**Figura 32.** Cantidad de células ( $1 \times 10^4$ /ml) de la línea HEK 293 post-tratamiento con 120 ondas de choque con intensidad 15, mostrando cada tratamiento respecto a un control sin ondas de choque para analizar los efectos del método en conjunto. La diferencia entre el grupo control y las nanopartículas desnudas es estadísticamente significativa (\*\* $p < 0.05$ )



**Figura 33.** Viabilidad celular en la línea HEK 293 post-tratamiento con 120 ondas de choque con intensidad 15 ( $p^+ = 33$  MPa), mostrando la tasa de supervivencia de células sometidas a distintas modalidades de nanopartículas respecto a su propio control de tratamiento sin ondas de choque.

### 3.3 Transfección de células empleando nanovectores híbridos y ondas de choque

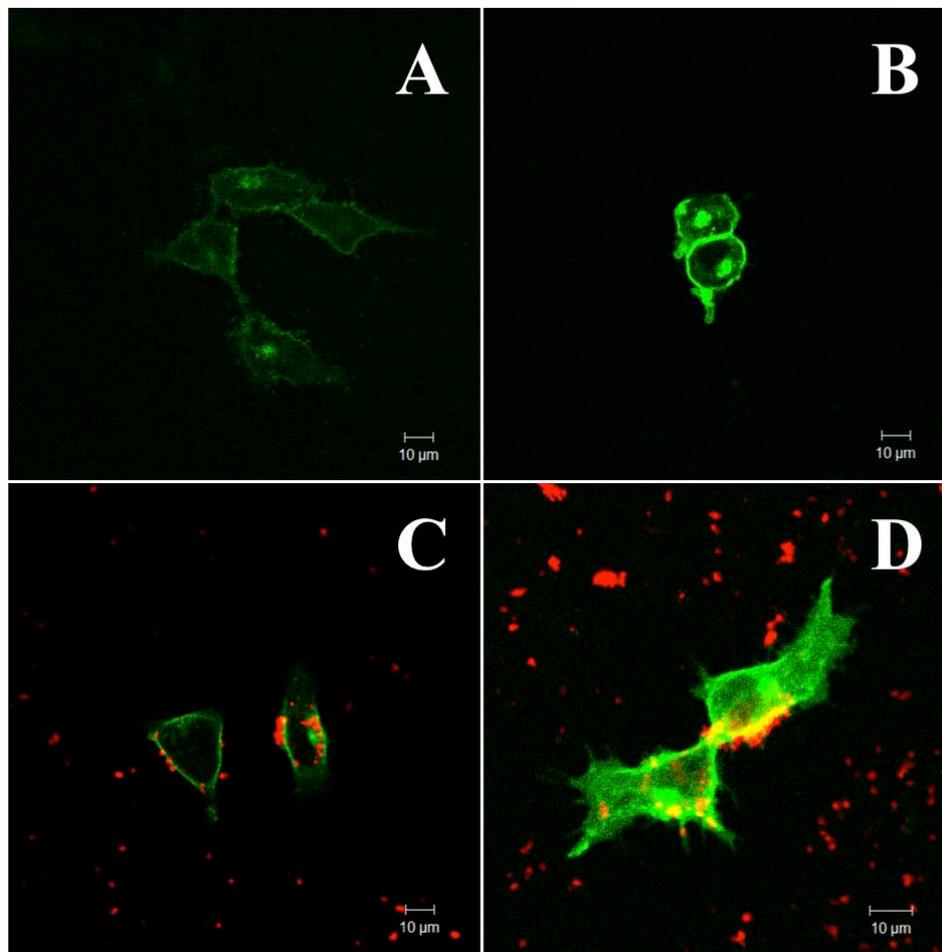
Después de haber seleccionado las nanopartículas compatibles para tratamientos por ondas de choque, se procedió a analizar su capacidad para acarrear material genético al interior de células tratadas por ondas de choque.

En esta etapa, se utilizó un control, plásmido *pCX::GFP-GPI2* y nanopartículas híbridas recubiertas por liposomas con rodamina y con ADN de cargo.

Inicialmente, se cultivaron  $5 \times 10^5$  células en cajas Petri de cada grupo, para analizar fluorescencia por medio de citometría de flujo y  $3 \times 10^4$  células en cajas Fluorodish, para observar por microscopía confocal, por un periodo de 24 hrs. En la **Figura 34** se muestra la transfección de células HEK 293, analizada por medio de la expresión de proteína verde

fluorescente. Las células fueron analizadas en microscopía confocal de campo oscuro y de contraste de fases mediante el método de Nomarsky (DIC, del inglés Differential Interference Contrast). Cabe destacar que la expresión del transgen resulta evidente en los grupos tratados con ondas de choque en presencia de plásmido desnudo, así como en células tratadas con nanopartículas híbridas con ADN (**Fig. 34B y 34D**), pero la expresión resultó significativamente superior cuando ambos métodos, el uso de nanopartículas híbridas y las ondas de choque, fueron combinados (**Fig. 34D**).

Las imágenes obtenidas de NHR-ADN tienen fluorescencia verde y roja, esta última debido a que se utilizó PE-rodamina con el recubrimiento de lípidos en las nanopartículas, provocando con esto la interacción de las bicapas lipídicas del nanovector con aquellas de la célula, como se observa por medio de la colocalización de fluorescencia roja y verde en algunos sitios (**Fig. 34C y 34D**). La fluorescencia verde encontrada en la membrana celular se debe a que la expresión del plásmido *pCX::GFP-GPI2* (que se encuentra en las nanopartículas híbridas) se presenta en esta zona, debido a que el gen que codifica para la GFP se expresa fusionado con un puente transmembranal del tipo glicosilfosfatidilinositol o GPI (Camacho Banda, 2012).



**Figura 34.** Microscopía de fluorescencia de células tratadas para transfección con el plásmido *pCX::GFP-GPI2*. Células con plásmido desnudo tratadas con 0 (A) y 120 ondas de choque (B); células con nanopartículas híbridas que contienen plásmido encapsulado y PE-rodamina, tratadas con 0 (C) y 120 ondas de choque (D).

A fin de contar con una medición estadística, se realizó el análisis de la expresión de GFP por citometría de flujo. En la **Figura 35** se muestran imágenes típicas de células analizadas por citometría de flujo, mediante gráficos de dispersión de luz hacia el frente (FSC), parámetro relacionado con el tamaño, y la dispersión de luz hacia los lados (SSC), la cual se relaciona con la complejidad de la célula. Para analizar poblaciones celulares, se hace uso de ventanas o subpoblaciones, en este caso para definir células libres de *debris*.

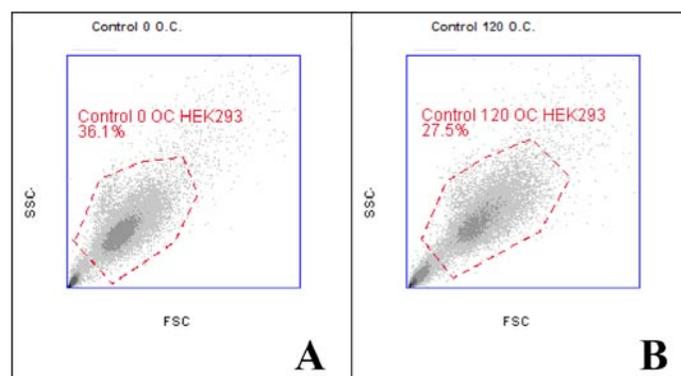
En estos análisis, el nivel de autofluorescencia verde en células control fue utilizado para delimitar un umbral en el eje de fluorescencia (a partir de una gráfica de fluorescencia vs. tamaño) y estimar el porcentaje de las subpoblaciones con expresión positiva de la GFP (**Figura 36**). En las gráficas se puede observar que los grupos expuestos a ondas de choque presentan mayor fluorescencia que el experimento control. El grupo con mayor cantidad de células fluorescentes fue el tratado mediante NHR-ADN en conjunto con 120 ondas de choque.

Para definir la expresión de proteína verde fluorescente de manera cuantitativa se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (MFI, siglas en inglés mean fluorescence intensity) en cada experimento. En la **Figura 37** se muestran los porcentajes de fluorescencia verde con la MFI, obtenidos por citometría de flujo. Al exceder la MFI del grupo control, las células de la modalidad de plásmido y de nanopartículas híbridas (NHR-ADN) indican presencia de la proteína verde fluorescente.

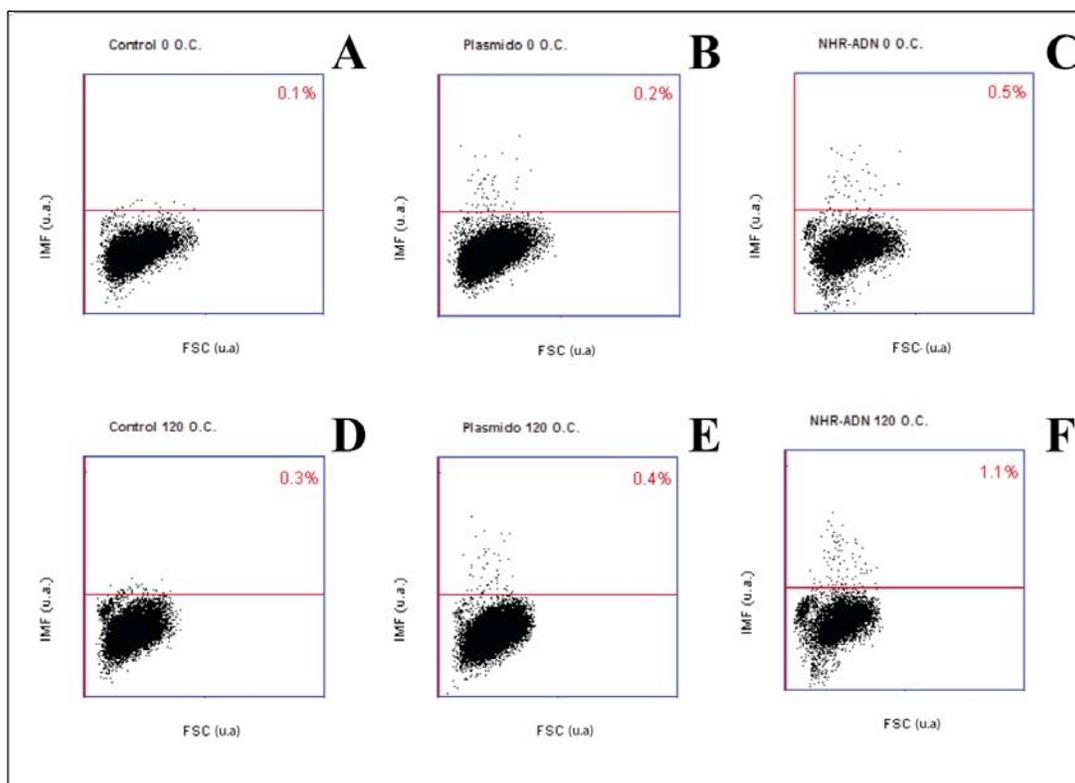
A partir de los conteos celulares determinados por el software de citometría (BD Accuri C6 Software), se obtuvieron valores que se analizaron por ANOVA de una vía (*Post Hoc* Duncan) en el software SPSS Statistics versión 21 y se determinó la diferencia estadística de las nanopartículas híbridas respecto de todos los demás grupos ( $p < 0.1$ ). Así, la citometría de flujo permitió definir el porcentaje de transfección y los niveles comparativos de expresión del transgen. En estos análisis puede observarse que el método de transfección combinando del uso de nanopartículas y de ondas de choque produjo un aumento de 5.5 veces (1.1/0.2) el porcentaje de células transfectadas, en comparación con la transfección utilizando plásmido desnudo, y un aumento de 2.75 veces (1.1/0.4) el porcentaje de transfección, comparando con la obtenida mediante ondas de choque.

En la gráfica de la **Figura 37**, se observa un comparativo de cada grupo respecto a su control y destaca el grupo NHR-ADN con 120 ondas de choque, el cual tuvo un mayor porcentaje de intensidad de fluorescencia en comparación con los demás grupos, confirmando el resultado observado en microscopía confocal.

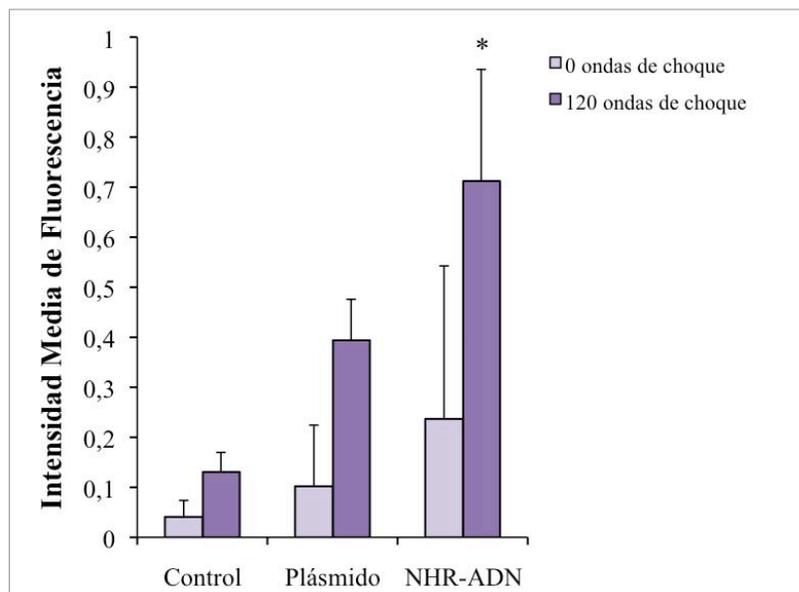
Todos los resultados de este apartado, permitieron confirmar que el grupo con mayor expresión de la *GFP-GPI* fue el del método combinado (NHR-ADN con 120 ondas de choque), dando las bases para afirmar que se cumple la hipótesis y los objetivos del presente trabajo.



**Figura 35.** Población delimitada para análisis de citometría de flujo de la línea HEK 293. A) Control con 0 ondas de choque, B) Control con 120 ondas de choque.



**Figura 36.** Gráficas de intensidad media de fluorescencia (IMF) contra tamaño (FSC) obtenidas por citometría de flujo. A) y D) Control, B) y E) Plásmido, C) y F) Nanopartículas híbridas con PE-rodamina y ADN (NHR-ADN). A), B) y C) con 0 ondas de choque y D), E) y F) con 120 ondas de choque.



**Figura 37.** Intensidad de fluorescencia media (IMF) de la subpoblación verde fluorescente de cada experimento de transfección. Diferencia estadística entre el grupo con nanopartículas híbridas con ADN y las demás modalidades (\* $p < 0.1$ ).

## CONCLUSIONES

Gracias a la preparación de distintas construcciones (nanopartículas de sílice con y sin recubrimiento lipídico) y a los distintos cargos manejados (calceína, ADN con DAPI y ADN), se lograron definir distintas características del vector supramolecular, como su capacidad de encapsulamiento, su interacción con membranas celulares y la eficiencia de transfección.

Los métodos de caracterización utilizados otorgaron información fundamental respecto al tamaño, morfología y encapsulamiento de las nanopartículas híbridas. A partir de la información adquirida, se definió que el tamaño cumple con el rango establecido para evitar la eliminación o degradación del nanovector híbrido (Resnier et al., 2013) con una talla aproximada de 220 nm, que tienen estabilidad debido al confinamiento adecuado del cargo y que su estructura permitió la interacción buscada con células eucariontes.

En particular, la técnica de espectroscopia Raman permitió definir los componentes del nanovector producido, tomándolo como un control de calidad de las preparaciones.

Los análisis de supervivencia de las células tratadas con ondas de choque en presencia de nanopartículas híbridas revelaron que el recubrimiento de biomoléculas reduce la toxicidad en partículas duras al ser usadas en conjunto con sonoporación.

Comparado con las demás modalidades estudiadas, las nanopartículas híbridas en conjunto con el uso de ondas de choque resultaron ser el método con mayor eficiencia de transfección, tanto en el número de células transfectadas como en expresión génica, y un sistema viable para la internalización de material genético, vislumbrándolo como un método adecuado para la posible aplicación en terapia génica.

Como perspectiva, se propone establecer los parámetros óptimos para la transfección de células HEK 293 con nanopartículas híbridas en conjunto con ondas de choque, buscando asimismo una dosis adecuada para incrementar la tasa de transfección y supervivencia celular. Además, considerando este método combinado como idóneo, se plantea explorar el uso de esta estrategia de transfección en otros sistemas celulares tanto *in vitro* como *in vivo*.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Agarwal et al., 2012                      Agarwal, S., Maji, S., & Greiner, A. (2012). PDMAEMA based gene delivery materials. *Materials Today* , 15 (9), 388-393.
- Audesirk et al., 2013                      Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2013). *Biología*. México: Pearson Educación.
- Bains, 1998                                  Bains, W. (1998). *Biotechnology From A to Z*. Nueva York: Oxford University Press.
- Bao et al., 1998                              Bao, S., Thrall, B., Gies, R., & Miller, D. (1998). *In vivo* Transfection of Melanoma Cells by Lithotripter Shock Waves. *Cancer Research* , 58, 219-221.
- Barrera Ramírez et al., 2004              Barrera Ramírez, L., Drago Serrano, M., Pérez Ramos, J., Zamora, A., Gómez Arroyo, F., Sainz Espuñes, T., y otros. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* , 17, 42-55.
- Bekeredjian et al., 2007                      Bekeredjian, R., Bohris, C., Hansen, A., Katus, H. A., Kuecherer, H. F., & Hardt, S. E. (2007). Impact Of Microbubbles On Shock Wave-Mediated DNA Uptake In Cells In Vitro. *Ultrasound In Med. & Biol.* , 33 (5), 743–750.
- Bio-Rad, 2015                                  Bio-Rad. (2015). *Transfection methods overview*. USA: Bio-Rad Laboratories.
- Caballero González, 2013                      Caballero González, R. (2013). *Nanovectores híbridos para insertar material genético en células humanas*. Querétaro: Tesis de Maestría en Ciencias e Ingeniería de Materiales, UNAM.
- Camacho Banda, 2012                          Camacho Banda, G. S. (2012). *Revisión de parámetros y efectos biológicos implicados en la transfección mediada por ondas de choque*. Querétaro: Tesis de Licenciatura en Biotecnología, Universidad Autónoma de Querétaro (Facultad de Química).
- Carbone et al., 2012                          Carbone, A., Fioretti, F., Fucci, L., Ausió, J., & Piscopo, M. (2012). High Efficiency Method To Obtain Supercoiled DNA With A Commercial Plasmid Purification Kit. *Acta Biochim Pol.* , 52 (2),



- Ewert et al., 2008  
Ewert, K. K., Ahmad, A., Bouxsein, N. F., Evans, H. M., & Safinya, C. R. (2008). Non-Viral Gene Delivery with cationic liposome-DNA complexes. En J. M. Le Doux, *Gene Therapy Protocols Vol. 1: Production and in vivo applications of gene transfer vectors* (Pág. 379). USA: Humana Press.
- Frairia et al., 2003  
Frairia, R., Catalano, M. G., Fortunati, N., Fazzari, A., Raineri, M., & Berta, L. (2003). High Energy Shock Waves (Hesw) Enhance Paclitaxel Cytotoxicity In Mcf-7 Cells. *Breast Cancer Research And Treatment* , 11-19.
- Gallego-Juárez, 2007  
Gallego-Juárez, J. (2007). La acústica en las ciencias de la vida. *Revista de Española de Física* , 2, 5-15.
- García Martínez et al., 2006-2007  
García Martínez, J., Abellán, G., Carrillo, A., & Linares, N. (2006-2007). *Nanomateriales para aplicaciones avanzadas*. Alicante: Laboratorio de Nanotecnología Molecular.
- Glencross et al., 2011  
Glencross, H., Ahmed, N., & Wang, Q. (2011). *Biomedical science practice*. New York: Oxford University Press.
- Hans & Lowman, 2006  
Hans, M., & Lowman, A. (2006). Nanoparticles for Drug Delivery. En Y. Gogotsi, *Nanomaterials Handbook* (págs. 637-659). Boca Raton: CRC Press.
- Horton et al., 2008  
Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., & Rawn, J. D. (2008). *Principios de Bioquímica*. México: Pearson Educación.
- Hughes et al., 2010  
Hughes, J., Yadava, P., & Mesaros, R. (2010). Liposomal siRNA Delivery. En V. Weissig, *Liposomes, Methods in Molecular Biology* (págs. 445-456). New Jersey: Humana Press.
- Kapuscinski, 1995  
Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic and Histochemistry* , 70, 220-233.
- Kocisová et al., 2013  
Kocisová, E., Antalík, A., & Procházka, M. (2013). Drop coating deposition Raman spectroscopy of liposomes: role of cholesterol. *Chemistry and Physics of Lipids* , 1-5.
- Kolzer & García, 2001  
Kolzer, J., & García, R. (2001). Estudio comparativo de generadores de ondas de choque de litotriptores

- comerciales. *Memorias II Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica* .
- Kwon et al., 2013 Kwon, S., Singh, R. K., Perez, R. A., Abou Neel, E. A., Kim, H.-W., & Chrzanowski, W. (2013). Silica-Based Mesoporous Nanoparticles For Controlled Drug Delivery. *Journal Of Tissue Engineering* .
- Labastida & Ruiz, 2010 Labastida, J., & Ruiz, R. (2010). Volumen 4: Química, Biología, Ciencias de la Salud. En Varios, *Enciclopedia de Conocimientos Fundamentales UNAM~Siglo XXI* (pág. Vol. 4). México: UNAM.
- Lauer et al., 1997 Lauer, U., Bürgelt, E., Squire, Z., Messmer, K., Hofschneider, P., Gregor, M., y otros. (1997). Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Therapy* , 4, 710-715.
- Lee et al., 2012 Lee, H., Lytton-Jean, A., Chen, Y., Love, K., Park, A., Karagiannis, E., y otros. (2012). Molecular Self-Assembled Nucleic Acid Nanoparticles for Targeted *In Vivo* siRNA Delivery. *NIH Public Access* , 7, 389-393.
- Liu et al., 2009 Liu, J., Stace-Naughton, A., Jiang, X., & Brinker, C. J. (2009). Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers (Protocells) as Delivery vehicles (Supporting Information). *J Am. Chem. Soc.* , 1354-1355.
- Llinàs & Sánchez García, 2014 Llinàs, M., & Sánchez García, D. (2014). Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad: Revista de química teórica y aplicada* , 71, 20-31.
- Loske & Prieto, 1999 Loske, A., & Prieto, F. (1999). *Fundamentos Técnicos de Litotripsia Extracorpórea*. México: J.G.H. Editores.
- Loske, 2007 Loske, A. (2007). *Shock Waves Physics for Urologists*. Querétaro: CFATA-UNAM.
- Lukes et al., 2015 Lukes, P., Zeman, J., Horak, V., Hoffer, P., Pouckova, P., Holubova, M., Y Otros. (2015). In Vivo Effects Of Focused Shock Waves On Tumor Tissue Visualized By Fluorescence Staining Techniques. *Bioelectrochemistry* , 103-110.
- Mardan, Loening, & Mardan, A. H., Loening, S. A., & Lubaroff, D. M.

- Lubaroff, 1988 (1988). Impact Of Extracorporeal Shock Wave Treatment On Dunning Prostate Tumors. En J. Lingeman, & D. M. Newman, *Shock Wave Lithotripsy: State Of The Art* (Págs. 333-340). Indianapolis: Springer Science+Business Media, Llc.
- Marty et al., 2009 Marty, R., N'soukpoé-Kossi, C. N., Charbonneau, D., Weinert, C. M., Kreplak, L., & Tajmir-Riahi, H.-A. (2009). Structural analysis of DNA complexation with cationic lipids. *Nucleic Acids Research* , 37 (3), 849-857.
- McLennan et al., 2013 McLennan, A., Bates, A., Turner, P., & White, M. (2013). *Molecular Biology*. New York: Garland Science, Taylor & Francis.
- Michel et al., 2004 Michel, M., Erben, P., Trojan, L., Schaaf, A., Kiknavelidze, K., Knoll, T., y otros. (2004). Acoustic Energy: A new Transfection Method for Cancer of the Prostate, Cancer of the Bladder and Benign Kidney Cells. *Anticancer Research* , 24, 2303-2308.
- Millán-Chiu et al., 2014 Millán-Chiu, B., Camacho, G., Varela-Echavarría, A., Tamariz, E., Fernández, F., López-Marín, L. M., Y Otros. (2014). Shock Waves And DNA-Cationic Lipid Assemblies: A Synergistic Approach To Express Exogenous Genes In Human Cells. *Ultrasound In Med. & Biol.* , 40 (7), 1599–1608.
- Moreno-Vega et al., 2012 Moreno-Vega, A.-I., Gómez-Quintero, T., Nuñez-Anita, R.-E., Acosta-Torres, L.-S., & Castaño, V. (2012). Polymeric and Ceramic Nanoparticles in Biomedical Applications. *Journal of Nanotechnology* , 10.
- Naylor, 1999 Naylor, L. (1999). Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical Pharmacology* , 58, 749-757.
- Nazir et al., 2014 Nazir, S., Hussain, T., Ayub, A., Rashid, U., & MacRobert, A. (2014). Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and development. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* , 10, 19-34.
- Nelson & Cox, 2005 Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principios De Bioquímica*. Omega.

- Nii & Ishii, 2005  
Nii, T., & Ishii, F. (2005). Encapsulation Efficiency Of Water-Soluble And Insoluble Drugs In Liposomes Prepared By The Microencapsulation Vesicle Method. *International Journal Of Pharmaceutics* , 298, 198–205.
- Ohta et al., 2009  
Ohta, S., Suzuki, K., Miyagawa, S., Villacorte, M., Wada, Y., & Yamada, G. (2009). Sonoporation in developmental biology. En H. Nakamura, *Electroporation and sonoporation in developmental biology* (págs. 317-326). Japón: Springer.
- Old & Primrose, 1994  
Old, R., & Primrose, S. (1994). *Principles of Gene Manipulation*. U.K.: Blackwell Science.
- Osuna, 2011  
Osuna, L. G. (2011). *Aplicación de la espectroscopía Raman al estudio analítico de fármacos*. Cataluña: UPC Ingeniería Superior de Telecomunicación (Tesis).
- Ovidio Castro & Portelles, 1997  
Ovidio Castro, F., & Portelles, Y. (1997). *Transfección de ADN a células de mamíferos* (Vol. 14). La Habana: Biotecnología Aplicada.
- Patterson, 2007  
Patterson, G. H. (2007). Fluorescent Proteins for Cell Biology. EN D. S. Anson, *Reporter* (Págs. 47-80). New Jersey: Humana Press.
- Perrie et al., 2001  
Perrie, Y., Frederik, P. M., & Gregoriadis, G. (2001). Liposome-Mediated DNA Vaccination: The Effect Of Vesicle Composition. *Vaccine* , 19, 3301–3310.
- Pingoud et al., 2002  
Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J., & Jeltsch, A. (2002). *Biochemical Methods*. Weinheim: Wiley-VCH.
- QIAGEN Plasmid MaxiKit, Cat. no. 12263, Venlo, Holanda  
QIAGEN. (2005). *QIAGEN Plasmid Purification Handbook*. Hilden: QIAGEN GmbH.
- Ramsden, 2009  
Ramsden, J. J. (2009). *Applied Nanotechnology*. Uk: William Andrew Applied Science Publishers.
- Recillas-Targa, 2004  
Recillas-Targa, F. (2004). Gene Transfer and Expression in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals. En P. Balbás, & A. Lorence, *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols* (págs. 417-433). New Jersey: Humana Press.

- Recillas-Targa, 2006  
Recillas-Targa, F. (2006). Multiple Strategies For Gene Transfer, Expression, Knockdown, And Chromatin Influence In Mammalian Cell Lines And Transgenic Animals. *Molecular Biotechnology* , 34 (3), 337-354.
- Renneberg, 2008  
Renneberg, R. (2008). *Biotechnología para principiantes*. Barcelona: Reverté.
- Resnier et al., 2013  
Resnier, P., Montier, T., Mathieu, V., & Benoit, J.-P. (2013). A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials* , 34, 6429-6443.
- Rincón-Arano & Recillas-Targa, 2004  
Rincón-Arano, H., & Recillas-Targa, F. (2004). Sustained Heterologous Transgene Expression in Mammalian and Avian Cell Lines. En P. Balbás, & A. Lorence, *Recombinant Gene Expression* (págs. 435-450). New Jersey: Humana Press.
- Rodamporn, 2010  
Rodamporn, S. (2010). *Microfluidic systems for cell transfection using sonoporation and electroporation*. Southampton: University of Southampton, Faculty of Engineering, Science and Mathematics, PhD Thesis.
- Roy et al., 2003  
Roy, I., Mitra, S., Maitra, A., & Mozumdar, S. (2003). Calcium phosphate nanoparticles as novel non-viral vectors for targeted gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics* , 250, 25-33.
- Schaaf et al., 2003  
Schaaf, A., Langbein, S., Knoll, T., Alken, P., & Michel, M. (2003). *In vitro* Transfection of Human Bladder Cancer Cells by Acoustic Energy. *Anticancer Research* , 23, 4871-4876.
- Scientific, 2008  
Scientific, T. F. (2008). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual*. Wilmington: ThermoScientific.
- Shashank & Borden, 2010  
Shashank, S., & Borden, M. (2010). Microbubble Compositions, Properties And Biomedical Applications. *Bubble Sci Eng Technol* , 3-17.
- Sigma-Aldrich  
Sigma-Aldrich. *Product Specification: Calcein*. U.S.: Sigma-Aldrich.
- Socrates, 2001  
Socrates, G. (2001). *Infrared And Raman Characteristic Group Frequencies*. Great Britain: John Wiley & Sons.

- Son et al., 2000                      Son, K., Patel, D., Tkach, D., & Park, A. (2000). Cationic liposome and plasmid DNA complexes formed in serum-free medium under optimum transfection condition are negatively charged. *Biochimica et Biophysica* , 1466, 11-15.
- Stripecke et al., 1999              Stripecke, R., Villacres, M., Skelton, D., Satake, N., Halene, S., & Kohn, D. (1999). Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Therapy* , 6, 1305-1312.
- Technologies, 2012                  Life Technologies (2012). *Molecular Probes. Certificate of Analysis*. U.S.: Life Technologies.
- Wagner, 2005                          Wagner, P. (2005). Nanobiotechnology. En R. S. Greco, F. B. Prinz, & R. L. Smith, *Nanosclae Technology In Biological Systems* (Págs. 39-54). Florida: Crc Press.
- Wright, 2014                          Wright, J. (2014). Nanotechnology: Deliver on a promise. *Nature* , 509, S58-S59.
- Xiong et al., 2014                      Xiong, M.-H., Bao, Y., Yang, X.-Z., Zhu, Y.-H., & Wang, J. (2014). Delivery of antibiotics with polymeric particles. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 78, 63-76.
- Yamamoto, 2005                      Yamamoto, K. (2005). Nanotechnology and trends in drug delivery systems with self-assambled carriers. En N. H. Malsch, *Biomedical Nanotechnology* (págs. 29-40). Boca Raton: CRC Press.
- Zabelinskii et al., 2005              Zabelinskii, S., Chebotareva, M., Shukolyukova, E., Furaev, V., & Krivchenko, A. (2005). Participation of pi-electrons of phospholipid molecules in absorption of ultraviolet light in the range of 260-280 nm. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* , 41 (3), 236-239.
- Zhou et al., 2010                      Zhou, C., Yu, B., Yang, X., Huo, T., Lee, L., Barth, R., y otros. (2010). Lipid-coated nano-calcium-phosphate (LNCP) for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics* , 392, 201-208.