



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
POSGRADO EN NANOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ESTUDIO CITOTÓXICO
DE LIPOPLEJOS CATIONICOS CON VISIÓN DE APLICACIÓN EN
LA TERAPIA GÉNICA

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN NANOTECNOLOGÍA
Presenta

L.F. Carlos Isidro Ochoa Sánchez

Director de tesis
Dr. César Rodríguez Beas

Hermosillo, Sonora, México

Agosto 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

VOTOS APROBATORIOS

DR. MARIO ENRIQUE ÁLVAREZ RAMOS
Coordinador de Posgrado en Nanotecnología

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis de Maestría: “**Caracterización fisicoquímica y estudio citotóxico de lipoplejos catiónicos con visión de aplicación en la terapia génica**”, presentada por:

L.F. CARLOS ISIDRO OCHOA SÁNCHEZ

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos para la obtención del Título de Maestría en Nanotecnología:

Dr. César Rodríguez Beas

Dra. Ericka Rodríguez León

Dr. Eduardo Antonio Larios Rodríguez

Dr. Ramón Alfonso Íñiguez Palomares

Dr. Reynaldo Esquivel González
(EXTERNO)

SINODALES

Dr. César Rodríguez Beas (presidente)
Departamento de Física,
Universidad de Sonora.

Dra. Erika Rodríguez León (secretaria)
Departamento de Física,
Universidad de Sonora.

Dr. Eduardo Antonio Larios Rodríguez (vocal)
Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia,
Universidad de Sonora.

Dr. Ramón Alfonso Íñiguez Palomares (vocal - propuesto)
Departamento de Física,
Universidad de Sonora.

Dr. Reynaldo Esquivel González (vocal externo - propuesto)
Cátedras Conacyt
Departamento de Física,
Universidad de Sonora.

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo de tesis a mis padres Carlos A. Ochoa y Ladislao Sánchez, mi hermana Rosa Ochoa y a mi futura esposa Marcela Lemas. Gran parte del resultado de este trabajo se lo debo a ustedes, su gran apoyo y amor incondicional, en los momentos más alegres y en los momentos donde creía que no podía continuar. Les agradezco desde el fondo de mi corazón.

Aprovecho para agradecer a mi director de tesis el Dr. César Rodríguez Beas por su dedicación, dirección y paciencia a lo largo de este trabajo de tesis.

Agradezco también al Dr. Aaron Martínez Higuera por su gran apoyo y enseñanza en el apartado biológico y experimental de este trabajo.

Se agradece al departamento de medicina por permitir el uso de las instalaciones del laboratorio de biología molecular, al laboratorio de Biofísica por permitir el uso del DLS, al Dr. Heriberto Acuña por su tiempo y enseñanzas y al laboratorio de biofísica molecular del dpto. de física por permitir el uso de sus instalaciones.

Finalmente quiero agradecer a mis compañeros y amigos quienes convivimos diariamente durante este trabajo haciendo más divertidos los momentos más críticos: Abraham Arizmendi, Mauro Villalobos, Aaron Martínez, Francisco Cirerol, Rebeca Contreras, Alejandra Córdova, Tadeo Peña, Heichi Yanajara, Sergio Toruga y José Luis Vega.

Carlos Isidro Ochoa Sánchez
Agosto del 2018

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Terapia génica	2
1.2 Vectores virales	3
1.3 Vectores no virales	4
2. Antecedentes	5
2.1 Fosfolípidos y liposomas	5
2.1.1 Fosfolípidos	5
2.1.2 Liposomas	6
2.1.3 Ácido desoxirribonucleico	8
2.1.4 Lipoplejos	9
2.2 Cáncer y liposomas como vectores no virales	10
2.2.1 Cáncer	10
2.2.2 Uso de liposomas en Cáncer	11
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivos	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos específicos	15
6. Metodología	16
6.1 Materiales	16
6.1.1 Fosfolípidos utilizados	16
6.1.2 Búfer	18
6.1.3 ADN utilizado y métodos de purificación	18
6.1.3.1 Preparación de la solución de ADN	18
6.1.3.2 Preparación de ADN marcado por fluorescencia	19
6.1.3.3 Métodos de purificación del ADN	19
6.1.3.3.1 Purificación de ADN utilizando columna de purificación	19
6.1.3.3.2 Método de purificación por precipitación de etanol	20
6.1.3.4 Electrólisis en gel de agarosa	20
6.1.4 Líneas celulares	22
6.1.4.1 Protocolo de crecimiento y MTT	22
6.2 Método de extrusión para fabricar liposomas	23
6.2.1 Método de separación por centrifugación	27
6.3 Método de agitación magnética para formar lipoplejos	28

6.4 Técnicas de caracterización	29
6.4.1 Dispersión dinámica de luz	29
6.4.1.1 Determinación de propiedades elásticas de membranas utilizando DLS	32
6.4.1.2 Características técnicas del equipo experimental	33
6.4.2 Electrocinética	33
6.4.2.1 Velocimetría de láser Doppler	34
6.4.2.2 Técnica M3	36
6.4.2.3 Técnica de análisis de fase de luz dispersada	38
6.4.3 Microscopía confocal de fluorescencia	38
6.4.4 Microscopía electrónica de barrido	42
6.4.5 Espectroscopia Ultravioleta-Visible	46
7 Resultados y discusiones	50
7.1 Liposomas catiónicos	50
7.1.1 Determinación de tamaños mediante DLS	50
7.1.2 Propiedades electrocinéticas	55
7.1.3 Micrografías de CLSM	58
7.1.4 Micrografías de SEM	60
7.1.5 Espectroscopia UV-Vis	61
7.1.6 Propiedades elásticas utilizando DLS	63
7.1.7 Pruebas de viabilidad celular	70
7.2 ADN	72
7.2.1 Gel de electroforesis	72
7.2.2 Espectroscopia UV-Vis	75
7.3 Lipoplejos catiónicos	77
7.3.1 Determinación de tamaños mediante DLS	78
7.3.2 Propiedades electrocinéticas	79
7.3.3 Micrografías de CLSM	81
7.3.4 Micrografías de SEM	82
7.3.5 Espectroscopia UV-Vis	83
7.3.6 Pruebas de viabilidad celular	86
8 Conclusiones	89
9 Perspectivas	90
10 Bibliografía	91

1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de la vida, los seres humanos, como otros seres vivos, han padecido de numerosas enfermedades, ya sea debido a microorganismos patógenos (como virus o bacterias), o bien, debido a mutaciones adquiridas o heredadas en su genoma. Debido a estos problemas surgen métodos para tratar enfermedades que posteriormente darían pie a la medicina: la ciencia dedicada al estudio de la vida, salud, enfermedades y la muerte del ser humano [1]. En la antigüedad, el ser humano utilizaba hierbas especiales y minerales para tratar enfermedades que lo aquejaban. Incluso en algunas culturas, cómo la mesopotámica, se datan hasta doscientas cincuenta plantas medicinales, ciento veinte sustancias minerales y ciento ochenta de origen animal [1].

Con el avance de la ciencia y la tecnología, los métodos para tratar enfermedades avanzaron, desarrollando ramas de la medicina como la anatomía y la farmacología. Esto permitió la fabricación de antibióticos, analgésicos y vacunas para la mayoría de las enfermedades que padeció y padece el ser humano. Sin embargo, en la actualidad existen un gran número de enfermedades que no son curables por métodos tan prácticos como píldoras o vacunas, entre estas figuran enfermedades tales como: el cáncer, el mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, por mencionar algunas. Para el tratamiento de estas, se utilizan terapias como la quimioterapia o el método quirúrgico en el caso del cáncer, no obstante, han resultado ser muy invasivas. Además, se han utilizado fármacos inhibidores y retardadores para el Alzheimer, pero no existen curas definitivas que cesen los síntomas para éste. Debido a esto, en las últimas décadas surgieron investigaciones acerca de posibles alternativas que puedan servir como tratamiento para este tipo de enfermedades, entre ellas se encuentra la terapia génica [2].

La *terapia génica* promete ser un tratamiento muy efectivo contra enfermedades de mutación genética, actuando estratégicamente a nivel celular reparando y/o reemplazando material genético dañado por uno sano. Utilizando diferentes técnicas, para llevar a cabo esto, entre ellas destaca el método por transfección asistida en el cual se utilizan *vectores genéticos* (también conocidos como vehículos portadores de genes o acarreadores de genes) los cuales servirían de transporte para este material genético [3]. Actualmente, se han estado utilizando virus modificados como transporte efectivo de este material [3], los cuales se describen más adelante.

1.1 Terapia génica

La terapia génica usualmente se define como *el conjunto de procedimientos que permiten la liberación o inserción de material genético sano o normal directamente en las células de un paciente con tratamiento de una enfermedad*. Los genes, son unidades de información de ADN y a su vez estos se encuentran en el núcleo de la célula a un nivel de resolución molecular [4]. Estos controlan tanto el medio interno de la célula como las interacciones con otras y con el medio ambiente en general por medio de proteínas que son transcritas en respuesta a estímulos. Así, si ocurren mínimas alteraciones en su estructura, a veces tan pequeñas como una mutación o cambio en un solo nucleótido que lo constituyen, pueden producir graves daños metabólicos o estructurales. Es por esto por lo que la terapia génica tiene como objetivo identificar cuál es el gen afectado causante de la enfermedad y posteriormente corregir el defecto mediante la inserción de un gen sano, no en solo una, sino en millones de células que constituyen el órgano o el tejido de la enfermedad, o bien en el órgano o sistema en el que se expresa este gen. Es por eso, por lo que un tipo de terapia a este nivel lucía imposible hasta hace poco [4]. Una ventaja que presenta la terapia génica sobre otras técnicas es la selectividad, con la ayuda de receptores y ligandos un vector génico puede adherirse de forma selectiva a una célula o grupo de células específicas, además de la selectividad, el vector funciona también como protección para el material genético que se desea transportar. Sin embargo, lograr una transferencia exitosa depende altamente de la formulación del vector utilizado, y a pesar de las numerosas investigaciones que se han realizado, son pocas las que han logrado determinar concretamente a qué características se atribuye la eficacia del proceso de transfección [5].

Se puede clasificar a la terapia génica en dos tipos: la terapia génica con células somáticas¹ y la terapia génica con células germinales². Actualmente, las investigaciones se realizan sobre células somáticas debido a los riesgos que presupone a la descendencia de un individuo el manipular el código genético hereditario al usar células germinales [3].

¹Las células somáticas son aquellas que conforman el crecimiento de los tejidos y órganos de un ser vivo pluricelular, las cuales proceden de células madre originadas durante el desarrollo embrionario y que tienen la capacidad de reproducirse y de apoptosis. ²Las células germinales son las precursoras de los gametos: óvulos y espermatozoides, en los organismos que se reproducen sexualmente. Estas son las células que contienen el material genético a heredarse a la siguiente generación.

En la terapia génica que utilizan células somáticas, se busca introducir los genes a las células y así eliminar las consecuencias clínicas de una enfermedad genética adquirida. Con este tipo de terapia las generaciones futuras no son afectadas porque el gen adquirido o modificado no pasa a ellas [3].

La técnica de terapia génica se puede clasificar en tres formas generales para introducir el material genético en las células diana, las cuales son la mecánica, como la microinyección [6], la eléctrica como la electroporación [7] y mediante un sistema de transferencia asistida.

Por un lado, las técnicas mecánica y eléctrica, a pesar de la eficacia de transfección, han sido extremadamente difíciles de estandarizar y además resultan poco prácticas e invasivas para el paciente y agresivas para la célula.

Por otro lado, el método de transferencia asistida consiste en llevar a la célula de interés por medio de los llamados “*vectores*”, denominados así por su similitud con los agentes biológicos que transmiten enfermedades. El término vector se utilizaba anteriormente sólo para llamar a los plásmidos y virus modificados que eran utilizados para transportar el gen deseado a la célula de interés debido a los mecanismos que cuentan estos para invadir con efectividad a las células. Sin embargo, con el descubrimiento de otros vehículos efectivos para transportar genes se ha generalizado el término, llamando así a todo vehículo ya sea biológico, químico o físico [3].

En concreto hay dos tipos principales de vehículos, los vectores virales y no virales.

1.2 Vectores virales

El éxito de la terapia génica depende enormemente del desarrollo de vectores que puedan, de forma selectiva y efectiva, liberar un gen a las células de interés con una mínima toxicidad. La liberación del gen es más difícil *in vivo*, ya que la seguridad y la localización del vector, son retos adicionales que presenta la técnica, así como la rápida eliminación debido al sistema circulatorio [8].

Los virus son agentes infecciosos microscópicos acelular que solo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos. Estos representan la primera opción para la transfección génica (Figura 1.1), ya que ofrecen una alta eficiencia de transfección debido a su larga historia evolutiva. Los primeros intentos de la terapia génica en mostrar resultados benéficos reales fueron realizados utilizando un vector viral, de los cuales, probablemente, el más importante es el tratamiento empleado a nueve niños

con inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X [9]. Sin embargo, la transfección utilizando vectores virales no es la opción ideal debido a sus múltiples desventajas incluyendo citotoxicidad³, respuestas inmunológicas, posibilidad de mutagénesis⁴ de inserción y limitaciones de producción a gran escala, etc. [8]. Estas desventajas de los vectores virales han enfatizado en la necesidad de métodos alternativos con mejoras, como la seguridad, por lo que recientemente se ha optado por los vectores no virales [8].

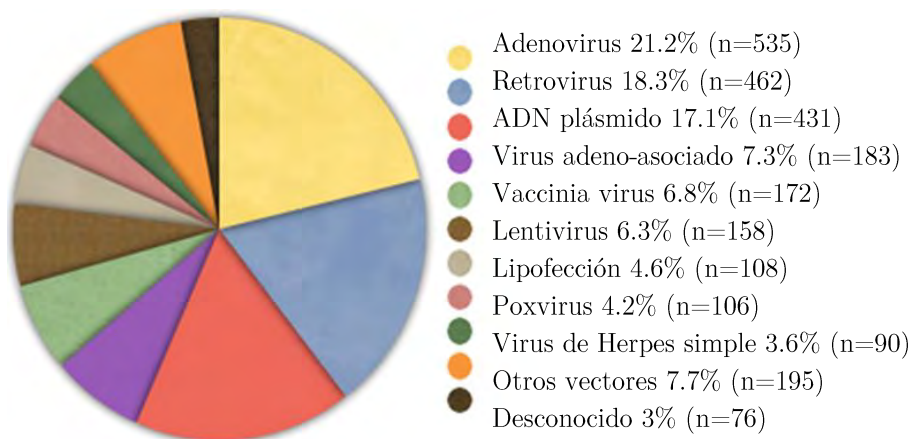


Fig. 1.1 Vectores utilizados en ensayos clínicos de Terapia Génica al año 2018. Grafica tomada y editada de [10].

1.3 Vectores no virales

Entre los *vectores no virales* destacan por su bajo nivel de toxicidad y alta eficacia, los *liposomas*. Los liposomas han sido utilizados como transportes biocompatibles de fármacos, péptidos, proteínas, ADN plasmídico⁵, oligonucleótidos⁶ o ribosomas, para propósitos farmacéuticos, cosméticos y bioquímicos [8].

³Citotoxicidad: Se trata de la cualidad de ser tóxico a las células. ⁴Mutagénesis: Se llama así a la producción de mutaciones sobre el ADN. ⁵El ADN plasmídico son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. ⁶Los Oligonucleótidos son secuencias cortas de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos.

La enorme versatilidad en cuanto a tamaños y parámetros físicos de los liposomas ofrece un atractivo potencial para la fabricación de vehículo hechos para una amplia gama de aplicaciones [8]. La siguiente sección describe a los liposomas con más detalle.

2 ANTECEDENTES

Debido a su importancia en la terapia génica, es necesario el estudio de estas estructuras lipídicas cerradas llamadas liposomas. En esta sección se describen los componentes que conforman a los liposomas, su complejación con el ADN y sus aplicaciones en terapia génica, específicamente en su uso contra el cáncer de distinta procedencia.

2.1 Fosfolípidos, liposomas, ADN y lipoplejos

2.1.1 Fosfolípidos

Los fosfolípidos, el tipo de lípidos dominante en las biomembranas, son moléculas anfifílicas, i.e., tienen una región hidrofílica o polar y una región hidrofóbica o no polar. Por un lado, la región polar está conformada de grupos ligados comúnmente constituidos por grupos glicerol, fosfatos y colina, serina, etanolamina, entre otros. Estos grupos polares pueden estar cargados positiva o negativamente, o bien, tener una carga neta neutra, y esto, dependiendo de su naturaleza química. Por otro lado, la parte no polar está constituida por una o dos cadenas hidrocarbonadas flexibles como se muestra en la imagen 2.1 [11].

El comportamiento hidrofóbico de estas moléculas conlleva a un ensamblado espontáneo de los lípidos al estar en contacto con un medio acuoso, formando distintas estructuras dependientes, principalmente de la concentración y de la naturaleza química de los fosfolípidos.

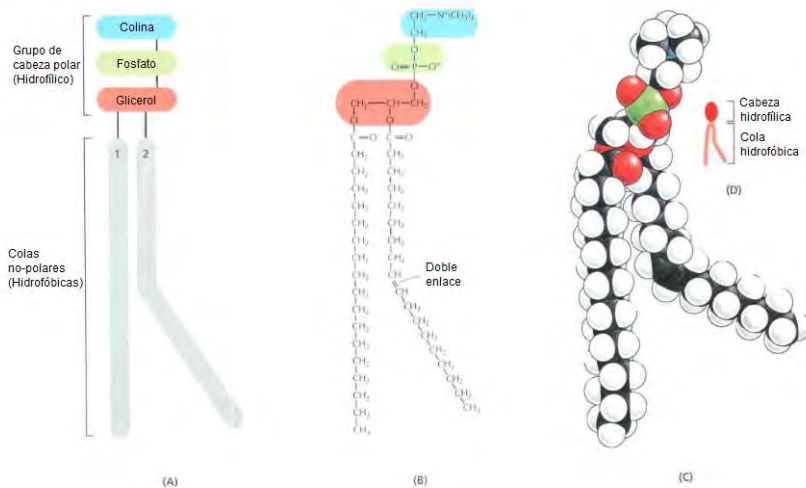


Fig. 2.1: Estructura química de un fosfolípido [12].

2.1.2 Liposomas

Los fosfolípidos pueden organizarse en distintas estructuras según sus propiedades químicas, estructurales y condiciones termodinámicas en las que se someten al disolverse en un medio acuoso. En base a estos parámetros se pueden obtener cantidades que ayudan a predecir las estructuras que formarán, entre estos parámetros, figura el parámetro de empaquetamiento. Bajo ciertas condiciones de concentración, solubilidad y temperatura los fosfolípidos forman estructuras de bicapas y a su vez, para evitar contacto con el agua en las zonas no polares de estas estructuras, tienden a curvarse dando lugar a estructuras de bicapas cerradas cuasi-esféricas llamadas liposomas (vesículas sintéticas) (figura 2.2.), lo cual es energéticamente más favorable que las bicapas finitas de fosfolípidos [16].

Tomando en consideración únicamente el parámetro de empaquetamiento, se puede determinar el radio mínimo que puede tener un liposoma de un tipo específico de fosfolípidos. Para formar estructuras de tipo bicapa, como detalla J. Israelachvili [16], es necesario que $v/a_0l_c = 1$ donde a_0 es el área del grupo polar, l_c es la longitud de la cadena hidrocarbonada y v el volumen de la cadena. Para que una bicapa se curve, los fosfolípidos que se encuentran en una de las monocapas deben de poder empaquetarse, en promedio, en conos truncados.



Fig. 2.2 Esquema característico de un liposoma unilamelar con corte transversal.

Esto requiere que $v/a_0l_c < 1$. Mediante consideraciones únicamente geométricas se puede demostrar que para $\frac{1}{2} < v/a_0l_c < 1$, el radio de la vesícula más pequeña que se puede formar es:

$$R_c \approx l_c \left[\frac{3 + \sqrt{3 \left(\frac{4v}{a_0l_c} - 1 \right)}}{6 \left(1 - \frac{v}{a_0l_c} \right)} \right] \approx \frac{l_c}{(1 - v/a_0l_c)}$$

En la ecuación a_0 es el área de grupo polar promedio de los lípidos de la monocapa interior. R_c es el radio crítico, en el cual una bicapa no se puede curvar más, esto, sin aplicar una fuerza externa que perturbe las interacciones entre los fosfolípidos y l_c es la longitud crítica de la cadena hidrocarbonada [16].

Debido a la complejidad de las biomembranas naturales, se utilizan modelos simplificados para caracterizar propiedades de fosfolípidos en agregados supra-moleculares. Los liposomas han sido el sistema modelo más popular para la investigación en fosfolípidos desde que Bangham et. al. los describieron por primera vez [17]. Regularmente al dispersar fosfolípidos o películas de fosfolípidos en agua se obtienen liposomas multilamelares (MLV's, por sus siglas en inglés) muy polidispersos en tamaños y forma. Esto es algo indeseado para muchas de las aplicaciones y generalmente las poblaciones de liposomas más homogéneas se logran exponiendo a estos agregados a métodos de sonicación, extrusión o centrifugación [18, 19] hasta obtener vesículas unilamelares pequeñas (SUV's, por sus siglas en inglés) con diámetros de aproximadamente 30 nm, o bien, con el método de extrusión obtener vesículas unilamelares grandes (LUV's, por sus siglas en inglés) con diámetros comprendidos

entre 50 – 200 nm, esto se detalla en el apartado de metodologías. Los liposomas catiónicos se pueden fabricar utilizando fosfolípidos catiónicos o bien, con una mezcla de fosfolípidos catiónicos y neutros a distintas proporciones, esta última formulación es la que se utilizó para este trabajo de tesis.

2.1.3 Ácido Desoxirribonucleico

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula que consiste en dos cadenas largas polinucleótidas las cuales están compuestas por cuatro tipos de nucleótidos. Cada una de estas cadenas se le conoce como *cadena de ADN* o *hebra de ADN*. Los puentes de hidrógeno entre las bases mantienen a estas cadenas unidas. Los nucleótidos están compuestos por azúcares de cinco carbonos a los cuales están unidos uno o más grupos fosfatos y una base nitrogenada. En el caso de los nucleótidos en el ADN, la azúcar ligada a los grupos fosfato es la desoxirribosa, de aquí su nombre ácido desoxirribonucleico, y las bases pueden ser: adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T) [13], como se muestra en la figura 2.3.

Debido a su constitución, el ADN es categorizado por muchos como un polímero natural, mientras que algunos otros lo consideran un polielectrolito. El ADN tiene una estructura tridimensional, la *doble hélice*, debido a las características químicas y estructurales de sus dos cadenas polinucleótidas.

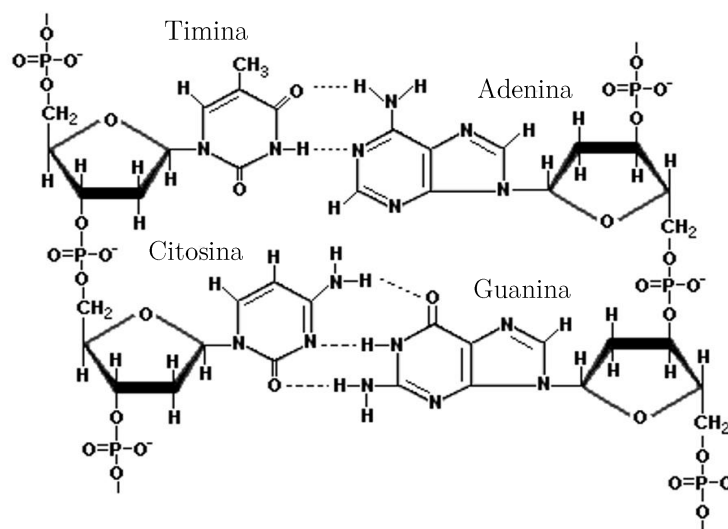


Fig. 2.3 Estructura química del ADN.

En todas las uniones que se efectúan entre las bases nitrogenadas, una base de dos anillos llamada Purina se une con una base de un solo anillo llamada Pirimidina. A siempre se une con T y G con C (figura 2.3).

Estos cuatro nucleótidos son los únicos que existen en el ADN y éste codifica información mediante diferentes combinaciones y secuencias. Al conjunto de información del ADN de un sistema se le conoce como genoma, y este lleva la información de todas las proteínas y las moléculas de ARN que el organismo sintetizará. El genoma está constituido por cromosomas los cuales son largas secuencias de ADN muy bien compactadas.

En la terapia génica se han realizado diversos estudios de caracterización y transfección utilizando diversos tipos de ADN en liposomas, entre ellos figuran los plásmidos [14], el ADN lineal, e.g., de timo de ternera [15], etc.

2.1.4 Lipoplejos

El interés de los liposomas, además de servir como un modelo simple de biomembranas, es el hecho de poder ser utilizados como un medio de transporte potencialmente viable para distintos fármacos, secuencias o plásmidos de ADN, siendo los últimos de gran interés en la terapia génica. Los lipoplejos son sistemas constituidos por liposomas y otra molécula que lo funcionaliza o *acompleja* (figura 2.4), ya sean proteínas, fármacos o ADN, en este trabajo se hablará precisamente de complejos Liposoma-ADN [20].

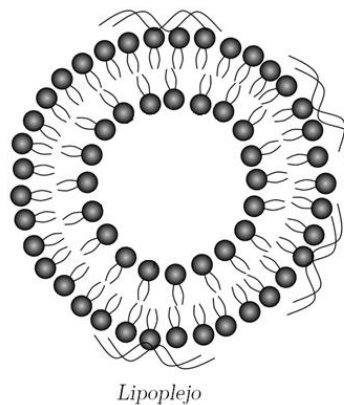


Fig. 2.4 Sección transversal de un lipoplejo.

La formación de estos complejos se debe a interacciones electroestáticas entre el ADN, que tiene una carga neta negativa, y liposomas catiónicos (CL's) de carga positiva. La cantidad de material acomplejado a la superficie del liposoma puede modificar en pequeña o gran cantidad las propiedades físicas del sistema, como son tamaño y carga superficial, elasticidad, etc. Los lipoplejos pueden conformarse en distintas estructuras o fases como son: Fase lamelar (L_{α}^C), Fase hexagonal (H_I^C) y en estructura cerrada o vesicular, siendo esta última la de importancia en este trabajo. [21]

2.2 Cáncer y liposomas como vectores no virales

A pesar de que los virus presentan alto índice de transfección génica, estos no son la mejor opción para utilizarse debido a los riesgos que implica utilizarlos y su limitación de fabricación en grandes volúmenes, debido a esto, surge el interés por alternativas a los virus, los llamados vectores no virales.

En los últimos años han surgido un gran número alternativas que pueden ser utilizadas para terapia génica, entre estas destacan los poliplejos (polímeros + ADN) y los lipoplejos. Específicamente los Lipoplejos (Liposomas + ADN) son de gran interés debido a su alta compatibilidad con las células.

2.2.1 Cáncer

Se conoce como cáncer al conjunto de enfermedades en donde las células afectadas se dividen sin control y se diseminan a los tejidos vecinos. Dado que esta enfermedad puede comenzar casi en cualquier lugar del cuerpo humano, existen diversos tipos de cáncer, algunos más comunes que otros, como lo son los carcinomas⁷.

Las células normalmente tienen un ciclo de vida, crecen, envejecen y se dividen a medida que el organismo lo necesita y cuando éstas envejecen o se dañan, mueren, permitiendo ser remplazadas por células nuevas. Cuando el cáncer ocurre, este ciclo se descontrola y a medida que las células se dividen se crean más células anormales y estas al envejecer o dañarse, no mueren como debería suceder. Se forman nuevas células cuando no es necesario y al repetirse numerosamente este proceso se pueden formar masas de tejido llamadas tumores [22].

⁷Tipo de cáncer que se desarrolla a partir de células epiteliales.

La mayoría de los cánceres forman tumores sólidos. Los tumores cancerosos son malignos, lo que significa que se pueden extender a los tejidos cercanos y los pueden invadir, a este proceso se le conoce como metástasis.

Actualmente existen muchos métodos para el tratamiento de cáncer, el tratamiento a realizarse a un paciente depende del tipo de cáncer que este presenta y a qué tan avanzado está. Se puede realizar un solo tratamiento, aunque la mayoría de los casos requiere una combinación de tratamientos. Entre los tratamientos más comunes se encuentran: la cirugía, quimioterapia o radioterapia [22]. Sin embargo, debido a que estos métodos son muy invasivos con el paciente y no siempre se obtienen los mejores resultados, han emergido nuevos tratamientos alternativos a los tradicionales, algunos de estos tratamientos son: La inmunoterapia, terapia dirigida y terapia génica [22-24].

El potencial uso que tienen los liposomas como vehículos portadores de genes los convierte en un interesante objeto de estudio para ser probado como posible tratamiento efectivo contra el cáncer [24].

2.2.2 Uso de liposomas en Cáncer

Desde su introducción como transportes génicos en 1987, los liposomas se han convertido en uno de los vectores no virales más estudiados. Debido a que poseen carga positiva a un pH fisiológico, estos interactúan con la carga negativa del ADN mediante interacciones electrostáticas [25]. Además la naturaleza catiónica de los liposomas permite que estos interactúen con la célula (la cual tiene una carga negativa en su membrana) y se internalicen en ella [26].

Existen dos mecanismos principales de entrada del lipoplejo hacia la célula: el primero es por endocitosis, con una posterior destrucción del endosoma dentro de la célula (figura 2.5) y el segundo directamente mediante fusión con la membrana celular. Se ha mostrado que la mayor parte de los complejos son internalizados mediante endocitosis mientras que únicamente el 2% de las células son transfectadas directamente por fusión lipoplejo-membrana [27].

Además, para que el transporte génico sea exitoso mediante el uso de liposomas catiónicos se requieren las siguientes condiciones: (1) Acomplejamiento del ADN en el liposoma y su protección de la degradación por nucleasas⁸ intracelulares; (2) Adhesión del lipoplejo en la superficie de la membrana celular; (3) internalización del lipoplejo a

la célula; (4) fusión del lipoplejo catiónico con la membrana del endosoma; (5) liberación del ADN del endosoma; (6) entrada del ADN al núcleo celular seguido de su respectiva expresión génica. A estas condiciones también se les denomina también *barreras biológicas* y como mencionan Marcel B. Bally y col. [28], únicamente las primeras cuatro barreras biológicas dependen de la naturaleza de vector génico utilizado [29].

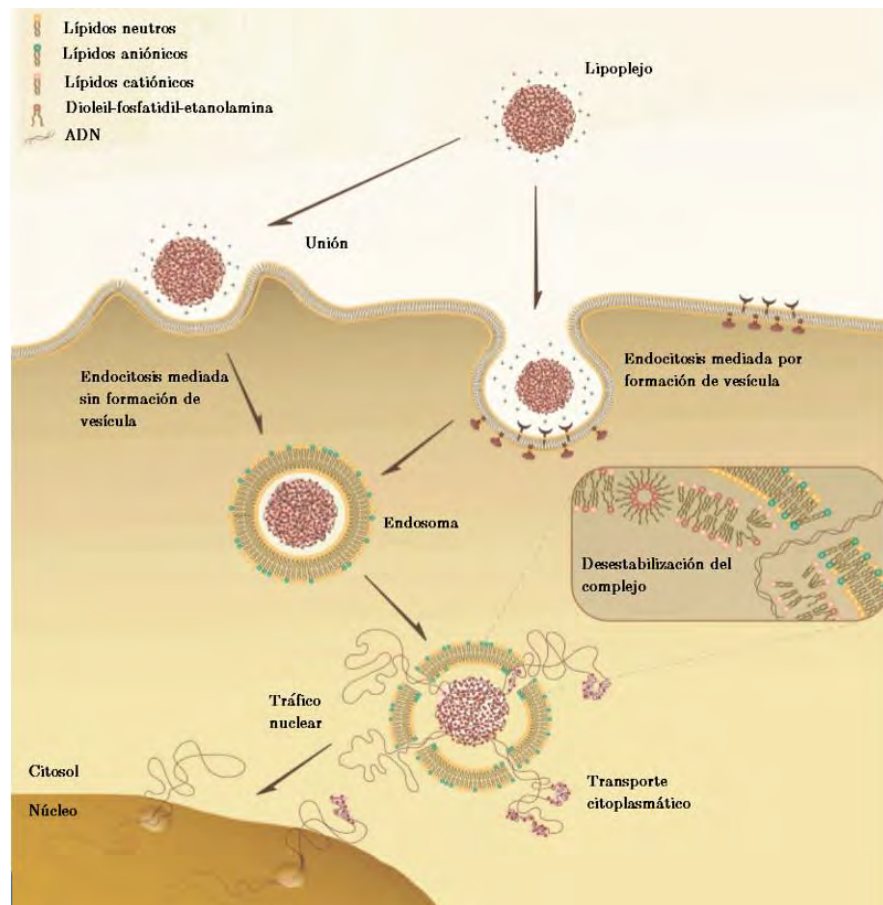


Figura 2.5. Panorama general de los pasos involucrados en la interacción lipoplejo-célula y la liberación del material genético al núcleo celular [20].

⁸Nucleasas: Son enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces fosfodiéster, típicos en los ácidos nucleicos.

3 JUSTIFICACIÓN

A pesar de las ventajas que poseen los lipoplejos catiónicos, éstos tienen limitaciones; estudios recientes han mostrado que éstos causan citotoxicidad y una baja eficacia de transfección tanto *in vitro* como *in vivo* [29-31]. En estudios *in vitro*, esta baja eficacia en el proceso de transfección, es atribuida a su heterogeneidad [32]. En estudios *in vivo*, la baja eficacia de transfección se debe a que los lipoplejos catiónicos son susceptibles de ser alterados por las proteínas del suero fisiológico, i.e., a una rápida liberación del ADN del complejo y en consecuencia una degradación debido a las nucleasas del suero.

Aunque, en general la utilidad de los lipoplejos ha sido limitada hasta el momento en gran medida por su baja eficacia de transfección y su relativa baja expresión transgénica, la baja toxicidad junto con los resultados favorables en ensayos clínicos recientes, hacen de estos vectores no víricos una gran promesa para la evolución de la terapia génica a corto o mediano plazo. Un buen conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los lipoplejos contribuye de manera significativa al aumento de sus índices de transfección, por esta razón, se propone de nueva manera estudiar las propiedades fisicoquímicas de los liposomas catiónicos en función a los tamaños, concentraciones y temperatura. El proceso de transfección, la estabilidad, la toxicidad, etc. de los lipoplejos, siguen siendo temas que preocupan a la comunidad científica debido a que pocas propiedades fisicoquímicas se han relacionado directamente con los efectos de los vectores genéticos en el proceso de transfección.

4 HIPÓTESIS

1.- Es posible mejorar los procesos de transfección de los lipoplejos catiónicos conociendo mejor sus propiedades fisicoquímicas. La caracterización fisicoquímica incrementa el conocimiento de la formación, morfología, propiedades eléctricas y mecánicas de los lipoplejos, características importantes que ayudan mejorar la estabilización de los complejos, la cual es muy importante e indispensable para el proceso de transfección.

2.- Es posible disminuir la toxicidad de los lipoplejos catiónicos variando los porcentajes de fosfolípidos neutros utilizados. Generalmente la fabricación de liposomas es planeada de acuerdo al uso que se les va a dar a los liposomas, i.e., eligiendo el material con el que se van a fabricar los liposomas. En la fabricación de liposomas catiónicos es de suma importancia el porcentaje y el tipo de fosfolípidos neutros que se utilizan, pues estos mejoran la estabilidad de los liposomas, misma estabilidad que se requiere para la formación de los lipoplejos, los cuales a su vez, requieren de esta estabilidad para asegurar la eficacia de transfección. La carga superficial de los liposomas varía de acuerdo al porcentaje de fosfolípidos neutros, y esta carga se requiere para asegurar una buena complejación con el ADN, pero de manera que no afecte a la membrana plasmática de la célula al momento de la transfección, y por ende, que no sea tóxica. Se ha encontrado que formulaciones de 50:50 tienen los mejores resultados en pruebas de transfección en células animales sanas [33, 34] por esto, se utilizará esa formulación para los liposomas DODAB-DOPC utilizados en este trabajo de tesis.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo principal contribuir a la caracterización fisicoquímica de lipoplejos catiónicos (liposomas catiónicos/ADN), para mejorar el proceso de transfección en células y disminuir su toxicidad.

5.2 Objetivos específicos

1.- Fabricar liposomas catiónicos, utilizando fosfolípidos catiónicos y neutros, para mejorar su estabilidad.

2.- Homogenizar los tamaños del ADN, i.e., hacerlo monodisperso, que será utilizado para la formación de los lipoplejos.

3.- Formar los lipoplejos catiónicos.

4.- Determinar y caracterizar la morfología, carga, tamaño, propiedades eléctricas y mecánicas de los liposomas y lipoplejos.

5.- Evaluar la toxicidad de los lipoplejos en células humanas, utilizando aquellos que mejores propiedades presentaron en la caracterización fisicoquímica.

6 METODOLOGÍA

Para la fabricación y caracterización de liposomas y lipoplejos catiónicos se utilizaron los materiales y métodos de caracterización que se describen en esta sección.

A pesar de que existen diversas técnicas experimentales para fabricar liposomas, a partir de fosfolípidos, como el método de electroformación descrito por M. Angelova y col. [35], el método congelamiento-descongelamiento (Freeze-thawed) y el método de extrusión con celda de presión francesa [36], por mencionar algunos, en este trabajo se utilizó el método de extrusión por membrana. De estas técnicas se pueden obtener liposomas de características similares a los aquí descritos.

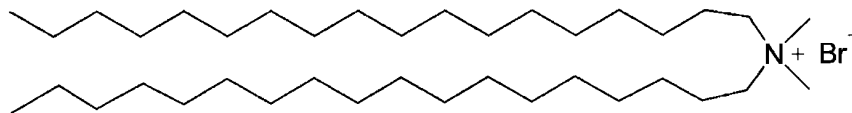
6.1 Materiales

En esta sección se mencionan y describen brevemente los materiales utilizados para la fabricación de los liposomas y lipoplejos catiónicos.

6.1.1 Fosfolípidos utilizados

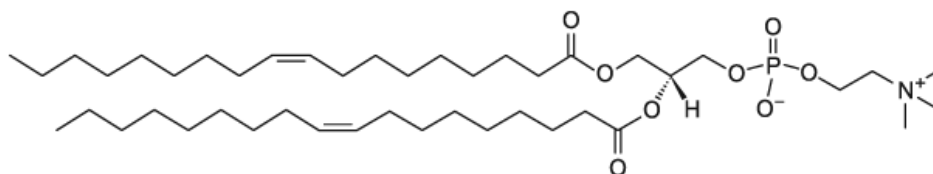
Para la preparación de los liposomas, se utilizaron fosfolípidos en presentación de polvos (Sigma-Aldrich), con los que se prepararon las soluciones necesarias, a una concentración determinada. Se utilizó como solvente una mezcla de cloroformo y metanol. En todos los casos se preparó una solución de lípidos a $10^{-3} M$ y a partir de esta se hicieron diluciones. Los fosfolípidos utilizados fueron los siguientes:

- Bromuro de Dioctadecildimetilamonio (DODAB). Se trata de un surfactante catiónico de dos cadenas hidrocarbonadas con 18 carbonos cada una. Posee con un grupo polar de amonio cuaternario, con carga positiva.

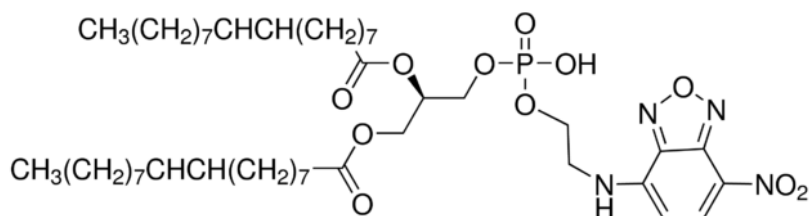


- 1,2-Dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC) lípido zwitteriónico utilizado como lípido auxiliar, este cuenta con dos cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos y con una insaturación en cada una de ellas. Como es característico del fosfolípido, cuenta

con un grupo fosfato en su cabeza polar y un grupo de amino, los cuales le otorgan una carga neutra.



- N-(7-nitrobenzol-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanol-amina (NBD-PE): Fosfolípido (PE) marcado con una molécula fluorescentese (NBD) para obtener micrografías de microscopia confocal.



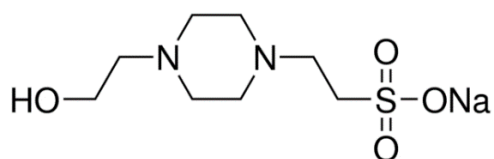
Todos los fosfolípidos fueron disueltos en 10 mL de solvente orgánico cloroformo/metanol (70:30 v:v). La tabla 6.1 muestra los pesos moleculares (Pm) de los fosfolípidos utilizados en la fabricación de los liposomas/lipoplejos.

Tabla 6.1. Pesos moleculares de los lípidos utilizados.

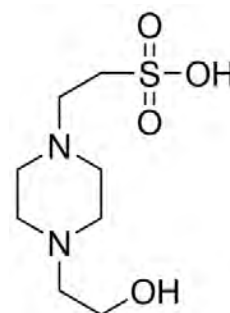
Lípido	Pm (g/mol)
DODAB	630.97
DOPC	786.13
NBD-PE	924.155

6.1.2 Búfer

Para evitar la disociación del ADN, se utilizó como búfer N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etano-sulfónico (HEPES, base y ácido) a un pH = 7 y se filtró para eliminar partículas de polvo utilizando filtros de policarbonato de 0.2 μm de diámetro de poro. Los Pm del HEPES base y HEPES ácido son 238.30 g/mol y 260.29 g/mol respectivamente.



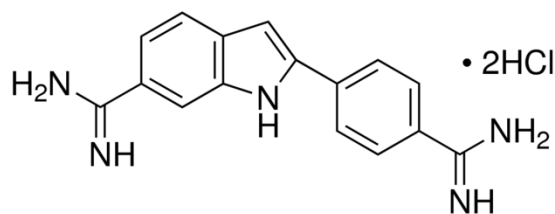
HEPES (SAL)



HEPES (ÁCIDO)

6.1.3 ADN utilizado y métodos de purificación

Para obtener micrografías del ADN con microscopia confocal, fue necesario marcarlo, para ello se utilizó la molécula fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), la cual se une fuertemente a las regiones donde existen Timina y Adenina, las cuales son particularmente abundantes en el ADN [26]. El peso molecular (Pm) del DAPI es 457.48 g/mol.



6.1.3.1 Preparación de la solución de ADN

Para preparar la solución de ADN se utilizó un ADN proveniente de timo de ternera y se siguió el protocolo establecido por el fabricante Sigma-Aldrich, realizando

soluciones de 2 mg/mL. Se pesó la cantidad adecuada de ADN y se depositó en un tubo de ensayo, enseguida se depositó el solvente. Para incorporar la mezcla, basta solo con dar tres o cuatro giros de aproximadamente 180 grados manuales al tubo (no se recomienda agitarla con el vortex), la solución se almacena en refrigeración durante 24 h a una temperatura cercana a los 4°C. En la formación de los lipoplejos se utilizó una solución de ADN a una concentración de 5×10^{-8} M tomando en cuenta que el peso molecular especificado para este ADN tiene un promedio de 1.25×10^7 g/mol.

6.1.3.2 Preparación de ADN marcado por fluorescencia

Para marcar el ADN se utilizó el marcador fluorescente DAPI, dado que, como se mencionó anteriormente, se une fuertemente a regiones enriquecidas de adenina y timina. Se usó una concentración de DAPI de 1×10^{-6} M, concentración suficiente para observar los lipoplejos por microscopía confocal. Es importante mencionar que se utilizó esta concentración de DAPI en las soluciones de ADN dado que para una concentración mayor se formaban agregados a simple vista. Es de suma importancia tener cuidado con la iluminación, se recomienda preparar esta solución utilizando luz roja (la iluminación LED es lo más recomendable), de tal manera que no degrade la fluorescencia del DAPI. Una vez preparada la solución, cubrir el recipiente de la luz utilizando papel aluminio o frascos color ámbar.

6.1.3.3 Métodos de purificación del ADN

Para asegurar la purificación de las muestras de ADN, i.e., eliminación de todas las posibles moléculas no deseadas, como proteínas y ARN, se utilizaron dos métodos de purificación.

6.1.3.3.1 Purificación del ADN utilizando columna de purificación

La purificación se realizó utilizando un kit comercial de purificación de la marca Qiagen y se continuó con el siguiente protocolo establecido por el fabricante [37].

- Se toman 200 mL de ADN de la muestra.
- Se agregan 200 mL de etanol 70:30 (v:v).
- Se pasa la muestra por la columna de purificación y esta se centrifuga durante un min a 8,000 revoluciones por minuto (RPM).
- Se recupera la muestra y se hidrata utilizando 200 mL de un búfer de lavado.

- Se centrifuga la muestra utilizando las condiciones anteriores.
- Se decanta el sobrenadante y se hidrata utilizando un búfer de lavado de menor concentración.
- Se centrifuga durante un min a 14,000 RPM, se decanta el sobrenadante y se recupera la muestra de ADN purificada.

6.1.3.3.2 Método de purificación por precipitación de etanol

Se utilizó también el método descrito a continuación para eliminar los contaminantes del ADN.

1. Se mide el volumen de la muestra de ADN.
2. Se ajusta la concentración de sal añadiendo 1/10 de volumen de acetato de sodio, pH 5.2 (0.3 M).
3. Se agrega un volumen de 2 a 2.5 veces de etanol 100% a 4°C (volumen calculado después de agregar la sal) y se mezcla bien.
4. Se centrifuga la solución a 14,000 RPM a una temperatura de 4°C durante 10-15 min.
5. Se decanta el sobrenadante cuidadosamente.
6. Se agrega 1 mL de etanol 70% y se centrifuga a 14,000 RPM a 4°C durante 5 min.
7. Cuidadosamente se vuelve a decantar el sobrenadante.
8. Se seca el pellet al aire o brevemente al vacío (20 min al aire o 5 min al vacío).
9. Se resuspende el pellet en el volumen apropiado de agua o HEPES (se utilizó el volumen inicial de ADN).

6.1.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó la técnica de electroforesis por gel para determinar los tamaños de las muestras de ADN mediante la separación por peso molecular y tamaño.

La técnica de electroforesis en gel es una de las técnicas más utilizadas para la caracterización y separación de ácidos nucleicos de distintas procedencias o tamaños. Los gels de agarosa se comportan como un filtro y permiten separar las moléculas cargadas en función de su tamaño y forma mediante la aplicación de una corriente eléctrica [38]. De esta forma, las moléculas de ADN de diferentes tamaños migran de forma distinta cuando se encuentran en un gel de agarosa y se encuentran bajo la

influencia de un campo eléctrico. Para reconocer el tamaño aproximado del ADN en cuestión se utilizan marcadores de peso molecular, i.e., fragmentos de ADN de tamaño bien conocido, y en base a estos marcadores se puede realizar una comparación y así calcular el tamaño del ADN.

Para los experimentos de electroforesis en gel realizados en este trabajo se utilizó el siguiente protocolo:

- Se utilizó una concentración de agarosa al 1.4%.
- 20 mL de búfer TBE 5x a pH 8.
- 80 mL de agua desionizada.
- Se hierve la mezcla y se deja enfriar un poco.
- Se adicionan 10 μL de una dilución 1:10 del reactivo Gelstar.
- La muestra se mezcla con un búfer de Carga 5x Green Gotaq Flexi Buffer.
- Se depositan 5 μL de muestra en los pozos del gel (figura 6.1).
- Se aplica un voltaje de 80 V durante un tiempo de 2 h aproximadamente.
- Una vez realizado esto, se retira el gel de la cubeta de electroforesis y se seca.
- En este paso el gel ya está listo para analizarse en una cámara Ultravioleta.
-

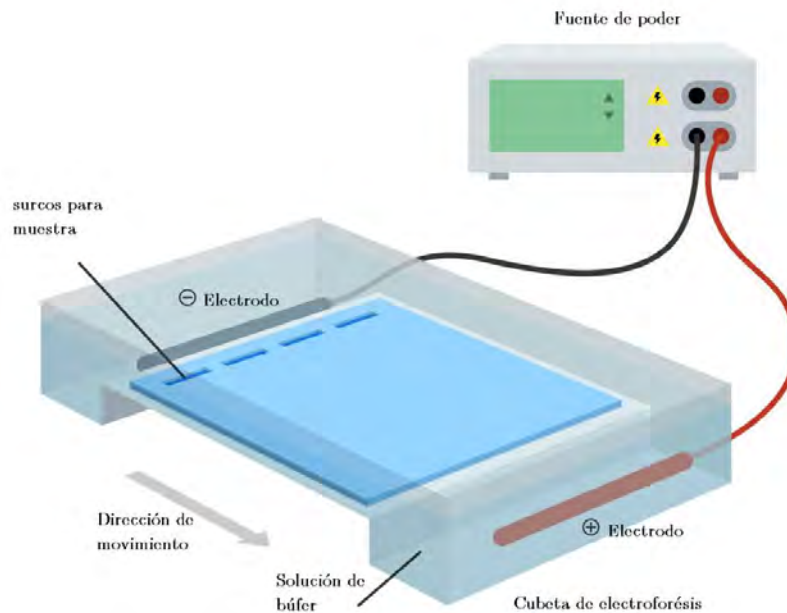


Fig.6.1 Arreglo de un experimento de electroforesis en gel de agarosa [39].

6.1.4 Líneas celulares

Para los ensayos citotóxicos de los liposomas se utilizaron dos líneas celulares distintas, la línea de células HeLa y las células MDA-MB-231 ambas crecidas de acuerdo con el protocolo del distribuidor.

- Células HeLa: Esta línea celular presenta diámetros promedios de 20 μm , tiene característica de ser adherente y es proveniente de células de cáncer cervical tomadas en febrero de 1951 de la paciente Henrietta Lacks. Actualmente, esta línea celular es un modelo aceptado para estudios de cáncer cérvico-uterino [40].
- Células MDA-MB-231: Esta línea celular es proviene de células de cáncer de mama de una paciente de 51 años, de igual forma son células adherentes y tienen un diámetro promedio similar a las células HeLa, esta línea celular junto a la línea MCF-7 son dos modelos de células de cáncer de mama en humanos.

6.1.4.1 Protocolo de crecimiento y MTT

Para llevar a cabo los ensayos de viabilidad se utilizaron las células: HeLa, crecidas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (10% Suero Fetal Bovino (SFB)) de la casa comercial Gibco; MDA-MB-231, crecidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) (10% SFB) de la casa comercial Sigma Aldrich. Ambos cultivos celulares fueron crecidos en placas de 96 pozos en condiciones de 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar las poblaciones requeridas. Una vez alcanzada, se procedió a administrar los liposomas y lipoplejos para estudiar el efecto tóxico, se tomaron como controles los liposomas, ADN y las células sin tratar como el control de crecimiento normal. Los tratamientos se incubaron por 24 h a 37°C al 5% de CO₂.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se utilizó el kit para ensayos Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma Aldrich). Inicialmente se agregaron 10 μL de MTT a una concentración de 0.5 mg/mL a cada pozo y se incubó en condiciones de 37°C al 5% de CO₂ durante 4 h. Después se agregaron 100 μL del buffer de solubilización y se dejó incubar por 12 h más. Finalmente, la placa se leyó en lector de ELISA de la marca BIO-RAD Modelo 680 a una longitud de onda de 570 nm (longitud de onda de absorción del MTT).

Una vez obtenidos los resultados del lector de ELISA, se procede a calcular el porcentaje de viabilidad, i.e., el número de células que realizan el proceso de reducción metabólica del MTT de manera correcta, lo cual es un indicador de que las células están vivas. Esto se obtiene mediante la expresión:

$$\%Viabilidad = \frac{A_{células\ con\ tratamiento}}{A_{células\ control}} \times 100$$

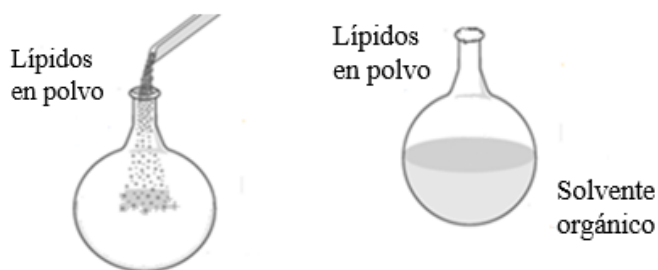
Donde A se refiere a la absorbancia medida.

Para cada ensayo es indispensable realizarlo mínimo por triplicado y controles (células sin tratamiento alguno o con un tratamiento que se conoce su efecto sobre las células).

6.2 Método de extrusión para fabricar liposomas.

Los liposomas utilizados en este trabajo de tesis se fabricaron mediante el método de extrusión, originalmente reportado por Bangham y col. [17], y es un método para obtener liposomas de un tamaño deseado. Este consiste en los siguientes pasos:

1.- Se pesan los fosfolípidos depositándolos en un matraz aforado y se disuelven en un solvente orgánico, comúnmente cloroformo y/o metanol, en este caso se utilizó una mezcla cloroformo/metanol.



2.- Una vez asegurada la disolución de los fosfolípidos en cloroformo/metanol lo siguiente es llevar a cabo el proceso de evaporación de éstos y obtener la película de fosfolípidos deseada utilizando un rotavapor (figura 6.2), para esto se vierte la solución de forma manual a un matraz de bola y se realizan los siguientes pasos:

a) Se fija el giro del matraz a una velocidad constante de 75 RPM.

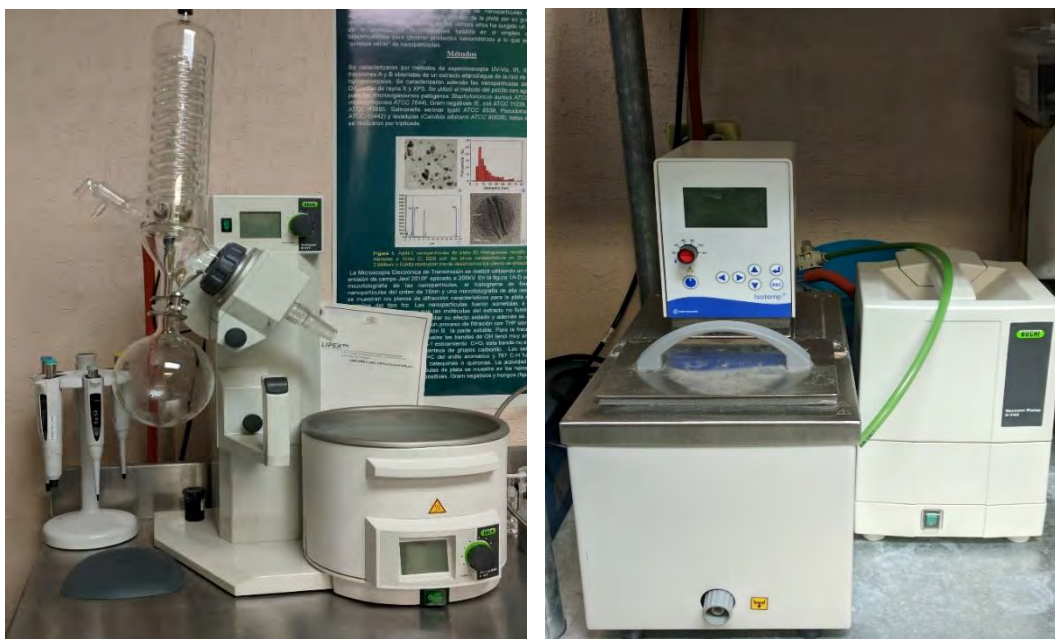


Fig. 6.2 Fotografías de los componentes del rotavapor utilizado.

b) Se sumerge el matraz en un baño térmico, el cual esta a una temperatura ligeramente superior a la temperatura de transición (T_m) del fosfolípido (tabla 6.2), i.e., temperatura en la que las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos pasan de una fase gel-sólido a una fase de cristal líquido desordenado. Previo a este paso, se enciende el baño térmico para que alcance la temperatura deseada.

Tabla 6.2 Tabla de temperatura de transición de los lípidos.

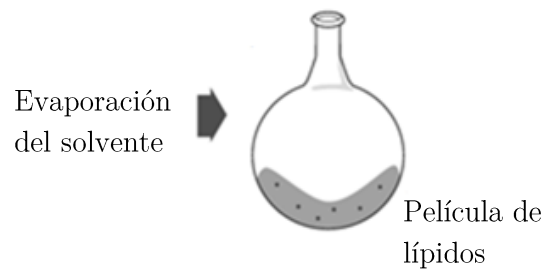
Lípido	T_m (°C)
DOPC	-20
DODAB	45
NBD-PE	12

c) Se utiliza un baño recirculador para el control de temperatura, utilizando una temperatura de alrededor de 19°C, necesaria para la condensación del solvente orgánico dentro del matraz de depósito del rotavapor.

d) Se utiliza una bomba para generar un vacío en la solución y acelerar el proceso de evaporación.

e) Se mantiene la solución dentro del baño térmico alrededor de 2 h.

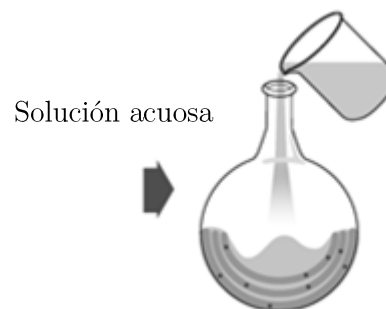
3.- Cuando el solvente se evapora por completo y la suspensión termina seca, se tiene como resultado una película de fosfolípidos sobre la pared interior del matraz, la cual se ve blanquizca a simple vista.



4.- Una vez finalizado el proceso de evaporación del cloroformo/metanol se obtiene la película de fosfolípidos, esta película es una superposición de varias bicapas lipídicas, de la cual se obtendrán los liposomas mediante un proceso de hidratación. Para hidratar la película se utilizó un búfer HEPES con pH neutro (7.4) a una concentración de 40 mM, filtrado con membranas con tamaños de poros de 200 nm para filtrarlo de agentes externos, como el polvo.

a) Se retira del rotavapor el matraz con la película lipídica.

b) Se hidrata con búfer HEPES utilizando una micropipeta, de forma normal a la superficie con la punta de la micropipeta alejada aproximadamente un par de centímetros de la base, liberando el HEPES de forma cuidadosa. Una vez hecho esto, se coloca de nuevo al rotavapor.



- c) Se fija nuevamente la velocidad giro utilizada en el paso 2.
- d) Se sumerge en el baño térmico a la misma T_m que en el proceso de evaporación del cloroformo/metanol.

5.- Se deja a la frecuencia giro que se utilizó en el proceso de evaporación y a la T_m del liposoma nuevamente permitiendo que la película de fosfolípidos se hidrate.

6.- Durante el proceso se forman agregados, por lo que se detiene el rotavapor y se deshacen los agregados con ondas de ultrasonido, utilizando un sonicador intercaladamente durante un tiempo máximo de 10 s o hasta que a simple vista la solución se vea lo más homogénea posible.

7.- Nuevamente se pone la solución a girar en el rotavapor durante una hora.

8.- Si los agregados no se han disuelto a simple vista, se repiten los pasos 6 y 7.

9.- Al final se obtienen liposomas MLV's y estos son dispersados un par de segundos con ondas de ultrasonido. Al realizar estos pasos obtenemos liposomas pequeños SUV's y liposomas LUV's (figura 6.3).

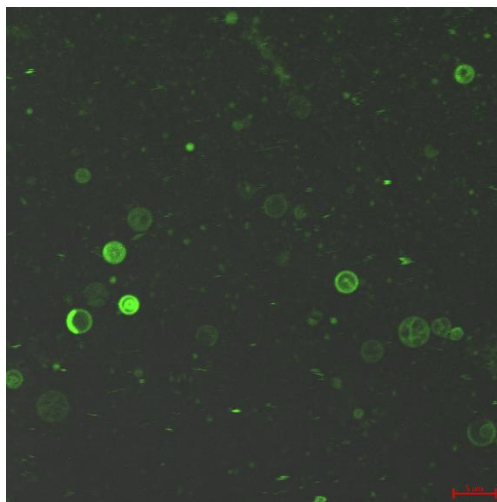


Fig. 6.3 Micrografía obtenida mediante la técnica de CLSM de liposomas obtenidos mediante el procedimiento descrito.

10.- Una vez finalizado el proceso de hidratación se tiene una diversidad de liposomas, tanto LUV's, SUV's y SMV's. Por lo cual, en este siguiente paso se tiene como objetivo tener una población de tamaños de liposomas cuasi-monodispersos, logrando esto mediante un filtrado de la solución inicial de liposomas.

Para homogeneizar los tamaños de los liposomas obtenidos se hace pasar la solución por un extrusor, como el que se muestra en la figura 6.3. Este, tiene la capacidad de filtrar un máximo de 10 mL, y se ejerce una presión controlada sobre la solución de liposomas mediante el flujo de gas de nitrógeno. Primero se hace pasar cinco veces por un filtro de policarbonato del tamaño mayor al requerido, y luego cinco veces por otro filtro de tamaño de poros menor, según el tamaño de liposoma requerido. Con este método se obtuvo un índice de polidispersidad menor, como lo mencionan L.D Mayer y col. [41].

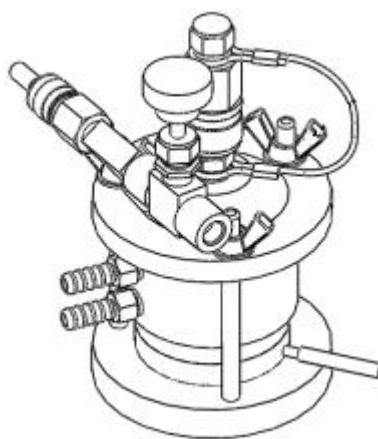


Figura 6.4 Extrusor Thermobarrel [42].

En el extrusor se colocan un filtro de policarbonato con un tamaño de poro determinado, según el tamaño de liposoma deseado (se utilizaron para las muestras los filtros de 1 μm y 200 nm de diametro) y un filtro de desagüe de poliéster. Una vez colocados, se deposita dentro del extrusor la solución de liposomas y se comienza el proceso de extrusión abriendo de forma muy lenta la válvula del tanque de nitrógeno procurando que el flujo del líquido sea lento, gota por gota.

6.2.1 Método de separación por centrifugación

Para separar aquellos liposomas de diámetro superior a 800 nm de los liposomas de menor tamaño en una solución se realizó el siguiente procedimiento.

La suspensión obtenida directamente del paso de hidratación (paso 9) se centrifuga a diferentes tiempos y velocidades a una temperatura de 4°C, dependiendo del diámetro de liposoma requerido, para esto es necesario hacer diferentes ensayos a distintos

tiempos, ya que, factores como el peso molecular del fosfolípido utilizado o su carga superficial, pueden ser grandes contribuyentes a que la agregación ocurra de manera más fácil. Para obtener tamaños superiores a los 850 nm con los liposomas que se utilizaron en este trabajo de tesis (DODAB-DOPC 50:50 en Pm) se utilizaron tiempos de centrifugación de 30 min a 13,000 RPM.

El principio de la centrifugación para el dimensionamiento por tamaños es la separación. Conforme la fuerza de centrifugación (velocidad) y duración aumentan, los liposomas cada vez más pequeños permanecen en el sobrenadante [43].

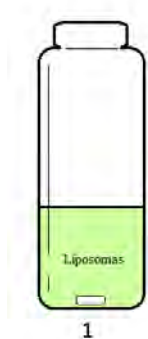
Una vez concluido el tiempo de centrifugación se retiró de manera cuidadosa la mayor cantidad de sobrenadante de la muestra y se agregó un volumen de HEPES (se utilizó en este caso el mismo volumen inicial), seguido se realizó de nuevo el proceso de centrifugación a las mismas condiciones durante 30 min más y se repitió el proceso anterior para asegurar una reducción en lo posible de liposomas de un tamaño inferior a lo deseado.

6.3 Método de agitación magnética para formar lipoplejos

El siguiente paso consiste en acomplejar los liposomas, que se fabricaron anteriormente, con una solución de ADN preparada, para formar los lipoplejos.

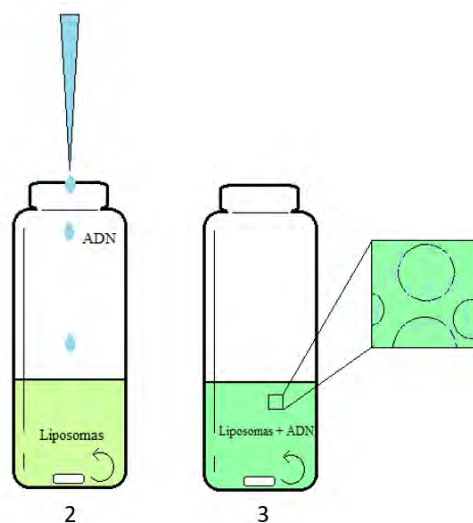
El método utilizado para esto fue el siguiente:

1. Primeramente, se agrega un agitador magnético a un vial y posteriormente se deposita el volumen deseado de una solución de liposomas.



2. Se ajusta el volumen con búfer HEPES, de tal manera que en el volumen final las concentraciones de liposomas y ADN sean las deseadas.

3. Se enciende la placa de agitación para hacer girar el agitador magnético a aproximadamente 50 RPM y de esta forma incorporar el volumen de la solución de ADN deseada gota por gota (al rededor de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$), de forma lenta para que el ADN se incorpore a toda la solución de liposomas, con ayuda del agitador magnético se logra una mejor homogenización del ADN en la solución de liposomas.



Utilizando las técnicas de dispersión de luz y electrocinética se determina la concentración óptima de ADN. Se utilizan varias concentraciones de ADN hasta encontrar una concentración en donde no se formen agregados de lipoplejos, i.e., donde el potencial Zeta sea lo más alejado a cero en lo posible.

6.4 Técnicas de caracterización.

En esta sección se describirán los fundamentos teóricos de las técnicas de caracterización que fueron utilizadas para este trabajo de tesis. Las técnicas experimentales utilizadas fueron aquellas con las que se pueden conocer propiedades morfológicas, físicas y químicas de los liposomas y lipoplejos estudiados. A continuación, se describen de manera breve cada una de ellas.

6.4.1 Dispersión dinámica de luz

El experimento de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), se conoce también como espectroscopia de correlación de fotones, y es una de las técnicas

experimentales más populares empleadas para la determinación de la distribución de tamaños de partículas o macromoléculas en suspensión [44].

En el experimento de DLS, la luz monocromática emitida por un láser incide sobre el medio de dispersión. La luz en este punto es dispersada por las partículas en suspensión, debido a la polarización inducida a los electrones de la muestra por la luz, provocando una dispersión de la luz incidente en todas las direcciones. La luz dispersada llega hasta el fotodetector, el cual está posicionado a un ángulo θ del rayo incidente, y es la que define el ángulo de dispersión. El volumen V de dispersión se define como la intersección del rayo incidente y el rayo interceptado por el detector [45].

En un experimento de DLS, se irradia una muestra de partículas en solución con un haz de luz láser de una longitud de onda λ_0 . El movimiento Browniano de las partículas en suspensión origina fluctuaciones temporales en la intensidad de luz dispersada $I_{\theta_r}(t)$, a un ángulo de medición θ_r como se muestra en la figura 6.5 [45].

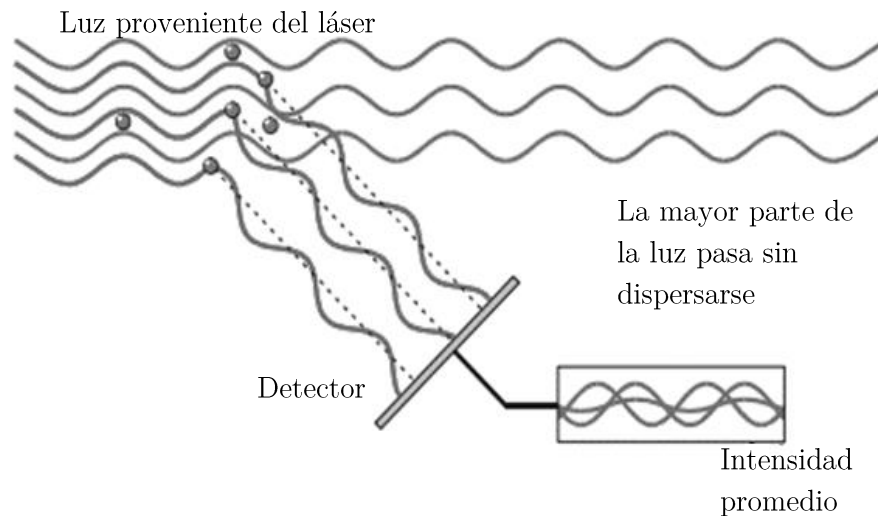


Fig. 6.5 Diagrama de cómo la luz dispersada incide en el detector y crea una intensidad de dispersión promedio mediante la superposición de las distintas intensidades [46].

Debido a que las partículas están en constante movimiento Browniano, el campo eléctrico dispersado cambia constantemente, causando que la intensidad de la luz fluctúe en el tiempo. El comportamiento de esta fluctuación puede modelarse a través de la denominada función de autocorrelación, y en un experimento de DLS se mide la

función de autocorrelación $g^{(2)}(q, t)$ de la luz dispersada por una muestra a un cierto ángulo:

$$g^{(2)}(q, t) = \frac{\langle I(q, 0)I(q, t) \rangle}{\langle I^2(q, 0) \rangle} \quad (1)$$

$I(q, 0)$ representa la intensidad de la luz medida en $t=0$ e $I(q, t)$ corresponde a un tiempo t , los corchetes representan el promedio temporal de los valores de la intensidad de la luz medida a diferentes valores del tiempo t . Por otro lado, $q \equiv \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$ es el número de onda, donde n es el índice de refracción del medio, λ es la longitud de onda del láser y θ el ángulo de dispersión utilizado.

Además, mediante la relación de Siegert [47] se puede obtener la función de correlación correspondiente al campo eléctrico dispersado $g^{(1)}(q, t)$: $g^{(2)}(q, t) = 1 + b|g^{(1)}(q, t)|^2$, donde b es una constante experimental. La función de correlación decae con el tiempo de acuerdo a la dinámica de la muestra, para sistemas coloidales diluidos y en las condiciones casi ideales el decaimiento de $g^{(1)}(q, t)$ se describe con una función exponencial simple.

$$g^{(1)}(q, t) \sim A \exp -\Gamma t \quad (2)$$

Para el caso de interés, vesículas unilamelares, se ha observado que el decaimiento de las funciones de correlación difiere de este modelo y se puede ajustar mejor una curva a los datos obtenidos utilizando una función de exponencial estrecha.

$$g^{(1)}(q, t) \sim A \exp -\Gamma t^\beta \quad (3)$$

En esta ecuación $\Gamma = 1/\tau$ es la frecuencia de relajación, τ es el tiempo de relajación y β el exponente de estrechamiento.

Para difusión Browniana, esta frecuencia de relajación se relaciona con el coeficiente de difusión D y al cuadrado del número de onda q por la ecuación

$$\Gamma = Dq^2 \quad (4)$$

Para una muestra de liposomas se puede obtener Γ mediante el ajuste de exponencial estrecha mencionado anteriormente y utilizando diferentes valores de q se construye una gráfica de Γ vs. q^2 , la cual permite calcular el valor del coeficiente de difusión D si la relación obtenida es lineal, y si esto se cumple se asegura que la difusión se debe únicamente a movimiento browniano. Suponiendo que se tiene una muestra diluida y de tamaños monodispersos, el valor de D se utiliza en la ecuación de Stokes-Einstein para determinar el radio hidrodinámico de la partícula.

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (5)$$

Donde K_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura y η la viscosidad del solvente.

6.4.1.1 Determinación de propiedades elásticas de membranas utilizando DLS

Las propiedades elásticas de una membrana se pueden estudiar mediante los módulos elásticos de curvatura (k_1) y el módulo Gaussiano (k_2) [47,48]. Estos módulos están asociados a la energía libre de Helfrich (E) por unidad de área, la cual se expresa de la manera siguiente.

$$E = \frac{1}{2} k_1 \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} - \frac{2}{R_0} \right)^2 + k_2 \frac{1}{R_1 R_2} \quad (6)$$

Donde R_1 y R_2 son los radios de curvatura principal en diferentes puntos de la membrana, R_0 es el radio de curvatura espontaneo, k_1 es una constante de curvatura elástica, y está asociada a las fluctuaciones térmicas de la membrana, por lo que da información acerca de la flexibilidad de ésta. Dependiendo de los valores que puede tomar esta constante, es la rigidez de la membrana, i.e., una membrana muy rígida y

poco deformable presenta valores de k_1 grandes y por el contrario, si se tiene una membrana muy flexible, k_1 tiende a valores pequeños del orden de $K_B T$. k_2 es la constante de curvatura Gaussiana, la cual está asociada a las formas de la membrana.

Para este estudio, se hace uso del modelo de exponencial estrecha (obtenida de DLS), en donde escalando Γ con la tercera potencia de q como, $\Gamma = m q^3$, podemos obtener información de k_1 . De igual forma, como se hizo para calcular el coeficiente de difusión, se requiere que exista un comportamiento lineal en esta relación y dado que m contiene información de las fluctuaciones de membrana del sistema estudiado, se puede calcular k_1 de acuerdo a

$$m = 0.025 \gamma_k \left(\frac{K_B T}{\kappa_1} \right) \frac{K_B T}{\eta} \quad (7)$$

Donde γ_k es una constante cercana a la unidad (≈ 1) y η la viscosidad del solvente.

6.4.1.2 Características técnicas del equipo experimental

Para realizar las mediciones de tamaños y propiedades elásticas, en este trabajo se utilizó un equipo de DLS de la marca Brookhaven Instruments con láser de estado sólido y polarización vertical, de potencia variable de 5 mW a 30 mW, con una longitud de onda de $\lambda = 637$ nm y un fotodetector de avalancha (APD).

También se utilizó el equipo Malvern Zetasizer Nano para realizar las mediciones de tamaños y polidispersidad, este equipo utiliza un ángulo θ fijo de 90° y un láser de $\lambda = 636$ nm.

El equipo de ZetaSizer cuenta con un arreglo óptico pre-alineado y con una posición fija para mediciones de tamaño dentro de un amplio rango de concentraciones.

6.4.2 Electrocinética

Para realizar la medición del potencial Zeta, se hizo uso del equipo de ZetaSizer Nano el cual determina la movilidad electroforética y después aplica la ecuación de Henry (detallada más adelante). Para obtener la movilidad electroforética se aplica un

campo eléctrico que pasa a través de la solución coloidal, estas partículas suspendidas al estar influenciadas por el campo eléctrico presentan un movimiento relativo, migrando hacia el electrodo de carga opuesta, a este proceso se le conoce como electroforesis. El coloide es acelerado hasta que la fuerza viscosa alcanza el equilibrio con la fuerza que ejerce el campo. Cuando se logra alcanzar este equilibrio la partícula se mueve con una velocidad constante. Esta velocidad depende, del campo eléctrico (E), la constante dieléctrica del medio (ϵ), la viscosidad del solvente (η) y del potencial zeta (ζ). La velocidad de un coloide en un campo eléctrico se conoce como movilidad electroforética (μ_e) y con ella se determina ζ mediante la ecuación de Henry.

$$\mu_e = 2\epsilon\zeta \frac{f(K_\alpha)}{3\eta} \quad (8)$$

$f(K_\alpha)$ es la función de Henry, y comúnmente se utilizan dos valores para aproximar esta función, 1 y 1.5.

Para medir la μ_e se utiliza una celda, como se muestra en la figura 6.6, en donde se vierte el líquido dentro del capilar de $850 \mu L$ de volumen y se mide la velocidad de las partículas utilizando velocimetría de láser doppler.

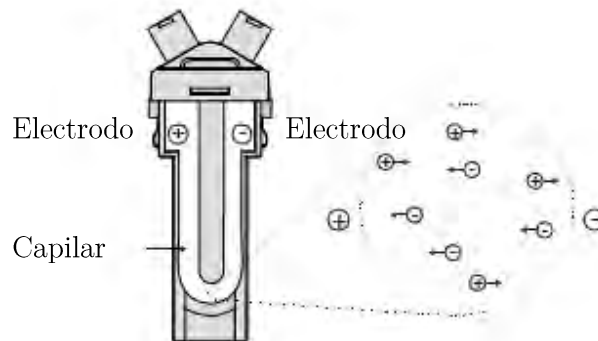


Fig. 6.6. Celda para mediciones de potencial zeta del Zetasizer Nano [46].

6.4.2.1 Velocimetría de láser Doppler

La velocimetría de láser doppler (LDV, por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente utilizada en ingeniería para el estudio de flujo de fluidos en una amplia

variedad de situaciones, desde flujos supersónicos [46] hasta flujos de arterias uterinas [49].

En el arreglo óptico, el receptor se encarga de observar las partículas dispersadas en la celda. La luz dispersada a un ángulo de 17° es combinada con el haz de referencia. Esto produce una fluctuación en la intensidad de la señal donde el ritmo de fluctuación es proporcional a la velocidad de las partículas (figura 6.7). Se utiliza un procesador digital de señales para extraer las frecuencias características de la luz dispersada.

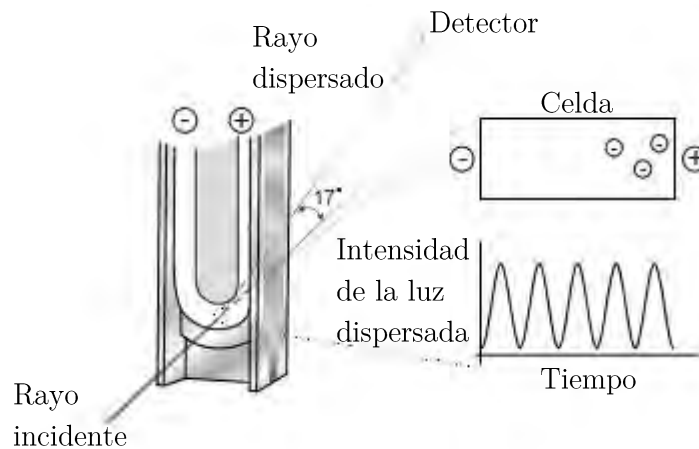


Fig. 6.7. Esquema de medición del potencial zeta [46].

Las paredes del capilar, dentro de la celda, tienen una carga superficial por lo que al aplicar un campo eléctrico necesario para observar electroforesis hace que el líquido adyacente a las paredes se someta a un flujo electroosmótico. Debido a esto las partículas coloidales estarán sujetas a este flujo afectando a su μ_e . Sin embargo, en sistemas cerrados el flujo a lo largo de las paredes debe ser compensado por un flujo inverso por el centro del capilar.

Debido a lo anterior, existe un punto en la celda en el que el flujo electroosmótico se cancela con la μ_e , y si se realiza una medición de la velocidad de la partícula en este punto se puede obtener la verdadera velocidad electroforética. A este punto libre de errores electroosmóticos se le conoce como capa estacionaria (figura 6.8).

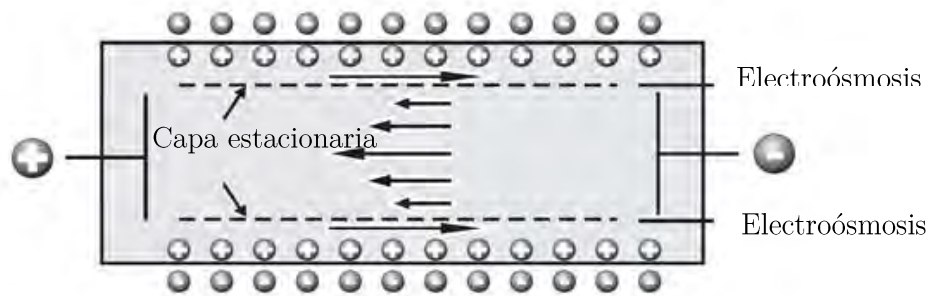


Fig.6.8 Representación del flujo electroosmótico y la capa estacionaria.

La técnica de capa estacionaria descrita arriba se utiliza desde hace mucho tiempo. Debido al efecto de electroosmosis la medición se puede realizar únicamente en un punto específico de la celda. Si fuese posible remover este efecto, la mediciones de electroforesis se podrían realizar en cualquier punto de la celda y así obtener la verdadera μ_e .

Esto es posible con una combinación de LDV y la técnica de Análisis de fase de luz dispersada (PALS, por sus siglas en inglés) dando lugar a la técnica M3-PALS patentada por Malvern Instruments [46].

6.4.2.2 Técnica M3

Con la técnica M3, se puede realizar una medición de μ_e en cualquier posición de la celda, no únicamente en la capa estacionaria, aunque en el equipo Zetasizer Nano esta medición ser realiza en el centro de la celda.

M3 consiste en mediciones de reversión lenta de campo (SFR) y reversión rápida de campo (FFR), de aquí el nombre “medición de modo mixto”.

Todos los sistemas que miden movilidad utilizando LDV invierten el campo aplicado periódicamente durante la medición. Esto es únicamente el método de SFR. Sin embargo, M3 consiste en realizar dos mediciones para cada medición del ζ , una invirtiendo lentamente el campo eléctrico aplicado y otra con una inversión rápida de campo (FFR).

El SFR se aplica para reducir la polarización de los electrodos lo cual sucede siempre en una solución conductora. Este campo usualmente se invierte cada segundo para permitir que el flujo del fluido se estabilice. Mientras que el FFR permite que el campo se invierta más rápidamente, si esto se realiza, es posible notar que las partículas

alcanzan su velocidad terminal, en donde el flujo del fluido debido a la electroósmosis es insignificante (figura 6.10) en comparación con el flujo obtenido por la técnica de LDV (figura 6.9). Esto significa que la movilidad medida durante este periodo es debido a la electroforesis de las partículas y no a la electroósmosis.

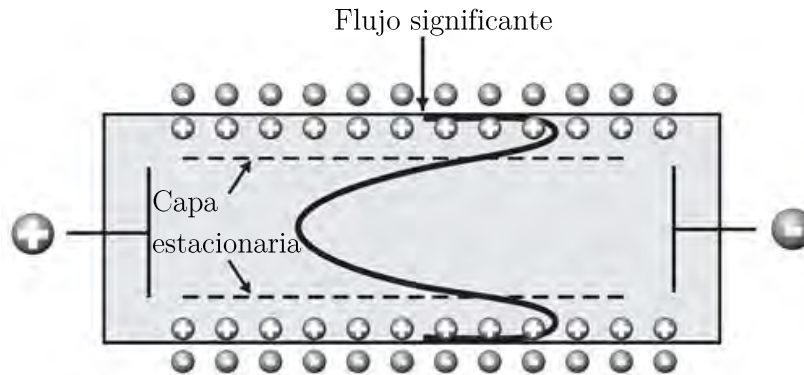


Fig.6.9 Representación del flujo electroosmótico y la capa estacionaria con un flujo electroosmótico significativo.

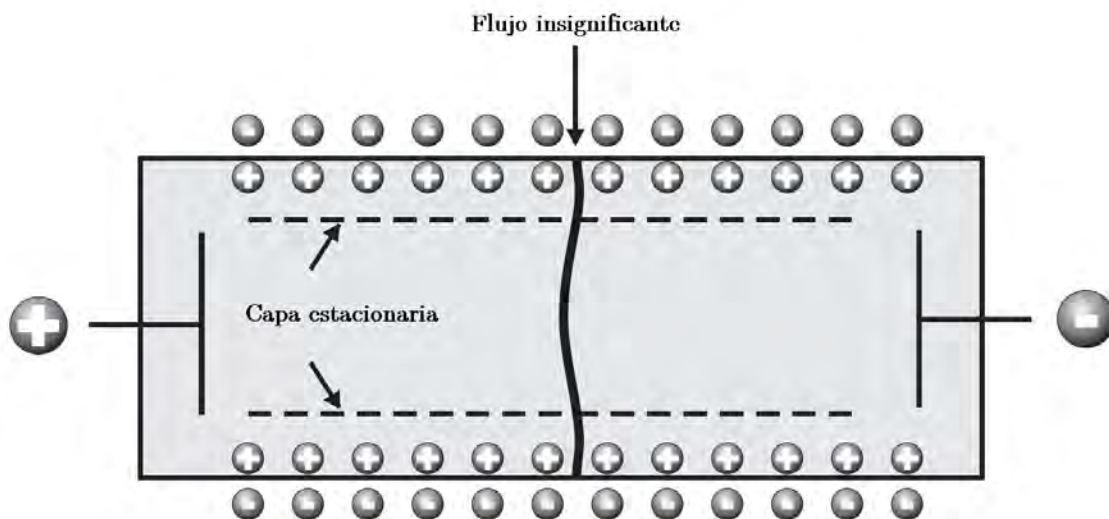


Fig.6.10 Representación del flujo electroosmótico y la capa estacionaria con un insignificante flujo electroosmótico.

El ζ promedio que se calcula utilizando esta técnica es muy preciso debido a lo anterior, y además el lugar de medición en la celda ya no es crítico. La técnica M3 se combina con PALS para lograr una mejor medición.

6.4.2.3 Técnica de análisis de fase de luz dispersada

PALS es una mejora adicional a la LDV tradicional. En general, la aplicación de esta técnica permite mejor precisión de la medición de partículas a bajas velocidades, además al utilizar un bajo voltaje puede lograr la medición de soluciones con una alta conductividad.

En lugar de utilizar el desplazamiento de frecuencia Doppler causado por partículas en movimiento para medir sus velocidades, PALS, como el nombre sugiere, usa el desplazamiento de fase para medir la velocidad. La energía se conserva en la luz dispersada por partículas en movimiento, pero ocurre un desplazamiento de la fase proporcional a la velocidad de las partículas. Este desplazamiento de fase es medido comparando la fase de la luz dispersada por las partículas con la fase de un haz de referencia.

El análisis de la fase de la señal puede ser determinada de forma precisa incluso en la presencia de otros efectos ajenos a la electroforesis, e.g., ruido térmico debido al efecto Joule. Esto se puede lograr debido a que la forma de la fase cambia cuando se presentan este tipo de fenómenos y pueden ser separados [46].

Dado que el fenómeno de electroósmosis es filtrado por la técnica M3, entonces la detección de cambios de fase es muy sensible a los cambios en movilidad, aún más que en el método tradicional que utiliza las detecciones en cambios de frecuencia. La μ_e , y por consiguiente el ζ , es determinada sumando los cambios de fase medidos durante la parte de FFR en la medición.

6.4.3 Microscopía confocal

La microscopía confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) es una valiosa herramienta para la obtención de imágenes con mejor resolución que un microscopio de campo amplio, además de poder obtener reconstrucciones 3D de una amplia variedad de especímenes biológicos marcados fluorescentemente. Una de las principales ventajas del CLSM es que es un método no invasivo, i.e., la preparación de

la muestra es libre de reactivos especiales y muchas de las características originales de la muestra son conservadas.

El microscopio confocal ofrece muchas ventajas sobre el microscopio óptico convencional, dado que esta técnica ofrece la posibilidad de controlar la profundidad del campo, reducir o eliminar la información de fondo fuera del plano focal y la capacidad de recolectar varias secciones ópticas de muestras gruesas, sin mencionar también que es posible estudiar diferentes organismos marcados con distintos marcadores fluorescentes. El enfoque de un solo plano obtenido mediante esta técnica permite recolectar la fluorescencia de un plano de interés obteniendo imágenes con mejor detalle cómo se ejemplifica en la figura 6.11 (d, e y f), mientras que utilizando un microscopio convencional no se logran estos detalles para las mismas muestras (a, b y c), esto debido a la captura de emisión fuera del plano de interés. La clave para el enfoque confocal es el uso de técnicas de filtrado espacial que permiten eliminar la luz desenfocada de muestras cuyo espesor se encuentra inmediata al plano del foco [50].

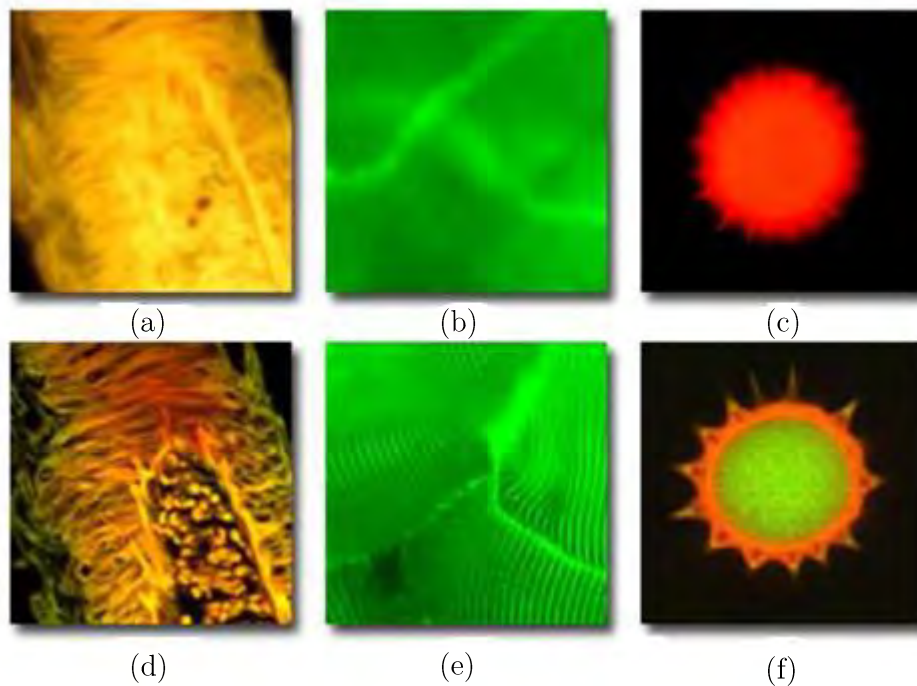


Fig. 6.11 (a), (b) y (c) corresponden a micrografías capturadas con un microscopio de fluorescencia de campo amplio, mientras que (d), (e) y (f) corresponden a micrografías capturadas con un microscopio de fluorescencia confocal [50].

El láser que se utiliza es usado para excitar a un marcador fluorescente (fluorocromo). Además, diferentes compuestos pueden ser identificados en la muestra simultáneamente, por detección de fluorescencias específicas de distintas partes asociadas a ellas utilizando varios canales de detección.

La figura 6.12 muestra un esquema del principio físico de la técnica de microscopía confocal de barrido láser. Aquí, la luz emitida de la fuente de excitación, pasa a través de la apertura del pinhole que está situado en el plano focal con un punto de escaneo en la muestra y el segundo pinhole está situado enfrente del detector (tubo fotomultiplicador). El espejo dicroico refleja la luz de la fuente hacia la muestra en el plano focal definido, después una segunda fluorescencia es emitida de los puntos de la muestra pasando de nuevo por el espejo dicroico y enfocado al punto focal de la abertura en el pinhole del detector. La apertura del segundo pinhole se encarga de eliminar la emisión fuera del plano focal de interés dejando pasar unicamente la radiación emitida dentro de este plano de la muestra, como se aprecia en la figura 6.12, de esta forma una pequeña fracción de la radiación de fluorescencia pasa a través del pinhole (por lo que es necesario fuentes muy intensas de iluminación) y es recolectada por el fotomultiplicador, amplificando y transformando la radiación en señales eléctricas, lo cual se muestra finalmente en la computadora. El filtro de excitación y el filtro de barrera de fluorescencia realizarán tareas similares, logrando en conjunto con lo anterior un mejor resultado.

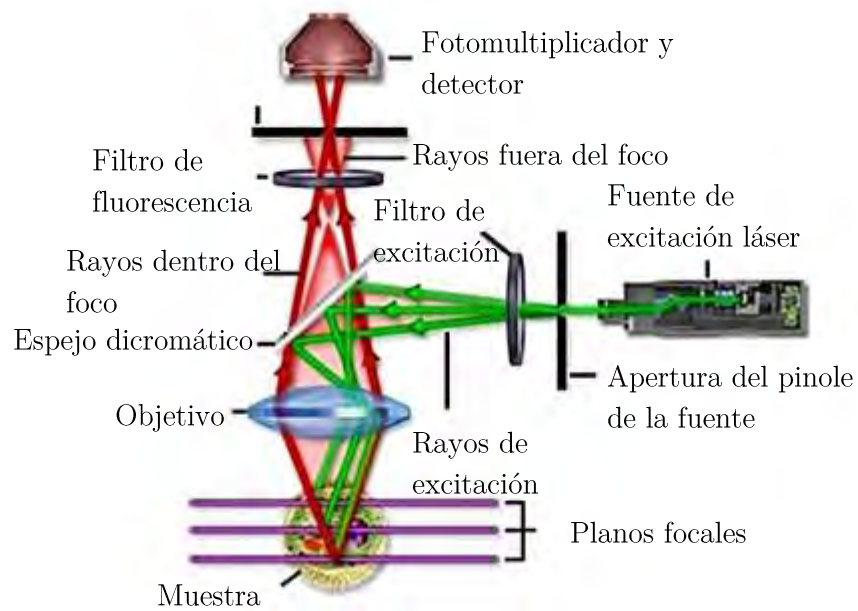


Fig. 6.12 Diagrama de la configuración de un CLSM.

El equipo utilizado para obtener las micrografías de este trabajo fue un equipo modelo LSM800 de la marca Carl Zeiss (figura 6.13).



Fig. 6.13. Fotografía del microscopio confocal utilizado.

6.4.4 Microscopía electrónica de barrido

Los microscopios electrónicos se han desarrollado debido a las limitaciones que presentan los microscopios ópticos. Los microscopios ópticos han sido y continúan siendo de gran importancia en la investigación científica, a pesar de que estos tienen un límite de resolución de $\sim 2,000 \text{ \AA}$ y una magnificación de 500x o 1000x. Por otro lado, los microscopios electrónicos pueden alcanzar una magnificación de hasta el orden de 10^6 x. Los microscopios electrónicos son instrumentos científicos que utilizan un rayo de electrones de alta energía para observar objetos a una escala muy baja debido a que la longitud de onda de estos es mucho menor a la del espectro visible.

El microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es uno de los instrumentos más versátiles disponibles para la examinación y análisis de microestructura, morfología y caracterización de composición química en muestras. El SEM está compuesto de dos componentes principales, la consola electrónica y la columna de electrones (figura 6.14). La consola electrónica proporciona el control de perillas e interruptores lo que permite ajustar parámetros del equipo como la corriente

que pasa a través del filamento, el voltaje de aceleración, el foco, aumento, brillo y contraste.

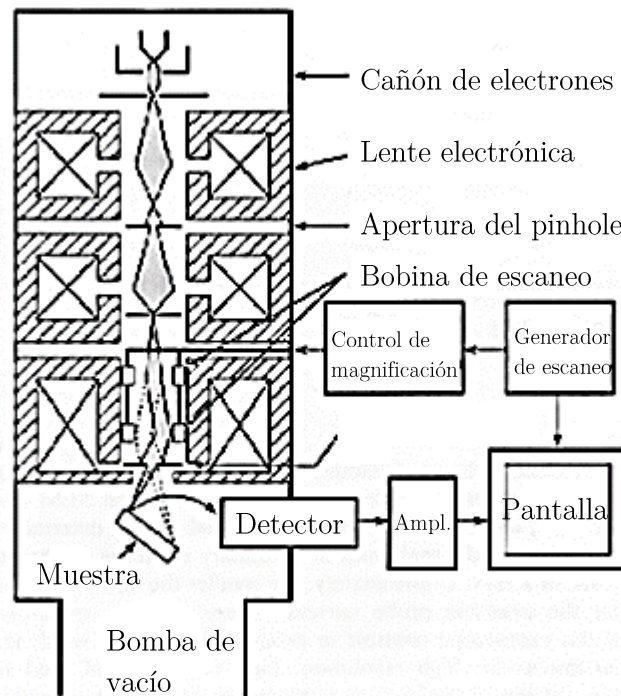


Fig. 6.14. Diagrama esquemático de la columna de un SEM.

La columna de electrones es donde se genera el rayo de electrones en condiciones de vacío, enfocándolo en un diámetro pequeño, y escaneando en una superficie de una muestra debido a bobinas electromagnéticas. En la parte más baja de la columna se encuentra la cámara de la muestra. El detector de electrones secundarios se encuentra sobre el lugar donde se coloca la muestra dentro de la cámara de la muestra. A continuación, se describen brevemente los componentes de la columna de electrones.



Fig. 6.15 Fotografía del microscopio electrónico de barrido utilizado.

Cañón de electrones: Se coloca en la parte superior de la columna y es donde se generan los electrones libres mediante emisión termoiónica de un filamento de tungsteno a $\sim 2700\text{K}$. Se controla la emisión de electrones mediante el Wehlnelt. Los electrones son acelerados hacia un ánodo mediante un potencial ajustable que va desde 200 V hasta 30 kV.

Lentes condensadores: Después de que el rayo pasa el ánodo es perturbado por dos lentes condensadores, los cuales causan que el rayo converja y pase a través de un punto focal, dando lugar a que el haz de electrones se enfoque en un punto 1000 veces más pequeño que su tamaño original.

Aperturas: Dependiendo del microscopio, se pueden encontrar alrededor de la columna una o más aperturas. La función de estas es reducir y excluir electrones fuera de foco en los lentes. La apertura de lente final localizada justamente arriba de la cámara de la muestra determina el diámetro o el tamaño del rayo cuando llega a la muestra. El tamaño del haz en la muestra determinará en parte la resolución y la profundidad de campo. Por lo que reducir el tamaño del haz o del punto permite un incremento en la resolución y en la profundidad de campo sacrificando brillo.

Para el correcto funcionamiento del SEM es necesario que la columna cuente con un estricto control en sus condiciones de alto vacío. Esta condición es requerida por varias razones, entre ellas, a que el filamento de tungsteno se calienta a muy altas temperaturas y esto podría provocar la oxidación de éste y que se queme en presencia

de aire a presión atmosférica. Por otro lado, para el correcto control del haz de electrones (enfoque, condensación, etc.) es necesario un ambiente libre de partículas de polvo o aire que puedan desviar la trayectoria de los electrones.

Cuando el haz de electrones interactúa con los átomos de la muestra, pueden ocurrir dos tipos de dispersiones, elástica e inelástica. En la primera cambia únicamente la trayectoria conservando el momento constante. En el caso de la dispersión inelástica, algunos electrones incidentes colisionarán con otros electrones desplazándolos de sus órbitas hacia el núcleo de los átomos de la muestra. Las interacciones inelásticas (figura 6.16) son las utilizadas para examinar muestras gruesas o en bulto (SEM).

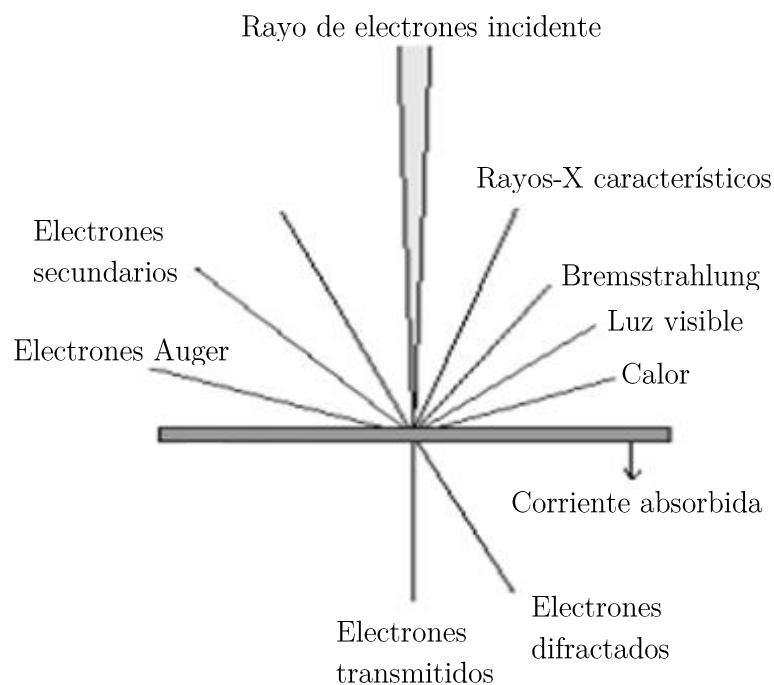


Figura 6.16. Efectos producidos por un electrón al bombardear un material.

Cuando una muestra es bombardeada con electrones, la región más fuerte del espectro de energía de los electrones pertenece a los electrones secundarios. La producción de electrones secundarios depende de varios factores, y son generalmente superiores para componentes con alto número atómico y ángulos de incidencia grandes.

La producción de electrones secundarios da información muy precisa de las propiedades topológicas de una muestra. Debido a su baja energía (5 eV) sólo los electrones que se encuentran muy cerca de la superficie (<10 nm) pueden escapar de la muestra y ser examinados.

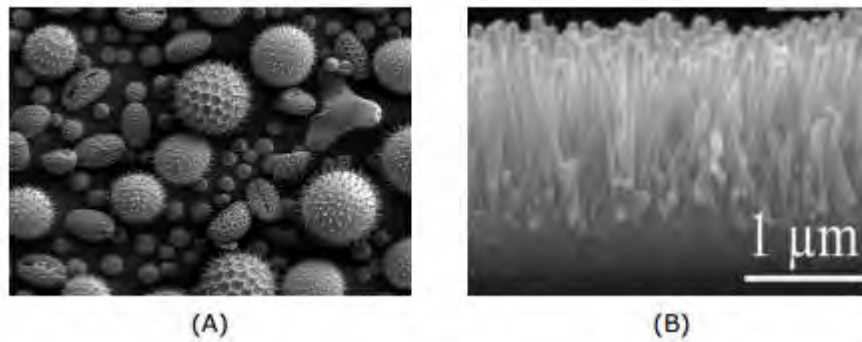


Figura 6.17. Imagen generada mediante SEM utilizando electrones secundarios. (A) Polen de varios tipos (B) Nanotubos de Óxido de Zinc (ZnO) (vista lateral).

Los electrones retrodispersados consisten en electrones de alta energía originados en el rayo de electrones, estos son reflejados o retrodispersados al interactuar con la muestra. La producción de electrones retrodispersados varía directamente con el número atómico de la muestra. Esta diferencia de producción causa que los elementos con mayor número atómico luzcan más brillantes que los elementos con menos número atómico. Esta interacción es utilizada para diferenciar las partes de una muestra que tienen diferentes números atómicos promedio (Figura 6.18).

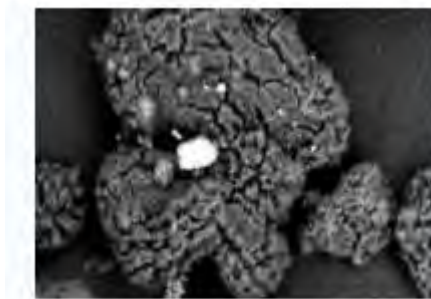


Figura 6.18. Imagen de una región de una muestra mediante electrones retrodispersados.

Un requerimiento fundamental para las muestras a medir en SEM es que estas sean conductoras de electricidad, las muestras que se utilizaron al ser liposomas y lipoplejos no son conductoras de electricidad por lo que se utilizó el método de tinción negativa para poder medir las muestras utilizando ácido fosfotúngstico (PTA) como agente de tinte.

El método de tinción negativa permite examinar la estructura de organelos, macromoléculas, virus, etc., a nivel de microscopía electrónica. Este método no permite examinar muestras en modo de alta resolución. Para esto se utilizan métodos de criogenización y vitrificación de la muestra. Sin embargo, el método de tinción negativa es un método muy utilizado por su facilidad y rapidez dado que no requiere ningún equipo especial que no se encuentre en un laboratorio normal [51].

A pesar de que existen un gran número de métodos para preparar las muestras, en este trabajo de tesis se aplicó esta técnica de la siguiente manera:

1. Se preparó una solución al 2% de PTA.
2. Sobre el portaobjetos utilizado para microscopio electrónico, se depositó 10 μL de la muestra.
3. Se dejó transcurrir un tiempo de aproximadamente dos min y se removió cuidadosamente de la parte superior de la rejilla el excedente de la muestra utilizando papel filtro.
4. Se depositó sobre la muestra 10 μL de la solución a 2% de PTA.
5. De igual forma, al transcurrir dos min se retiró cuidadosamente el excedente de la solución con un papel filtro, en ambos casos, el papel filtro no debe tocar de ninguna manera el portaobjetos, únicamente se retira el excedente que suba al papel mediante capilaridad.
6. Se cubrió del ambiente el portaobjetos, con un recipiente limpio y se deja secando aproximadamente 24 h para asegurar que la muestra está libre de humedad (este paso es importante puesto que, dentro de la cámara de vacío, la muestra no debe estar húmeda ya que podría dañar el cañón de electrones o alterar la medición).

6.4.5 Espectroscopia Ultravioleta-Visible

La espectrometría ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica ampliamente utilizada para la medición de la absorbancia de muestras en el rango de la luz UV al Vis, realizándose mediciones a una longitud de onda en específico o haciendo un barrido en todo el espectro disponible. El rango de UV se encuentra entre 190 a 400 nm y la región del espectro visible de 400 a 800 nm. Esta técnica puede ser utilizada de forma cuantitativa y cualitativa [52].

La absorción de la radiación electromagnética en el rango UV-Vis está asociada con la excitación de los electrones en átomos y moléculas, desde sus niveles bajos hacia

niveles superiores de energía. Dado que los niveles de energía están cuantizados, sólo la luz con la cantidad de energía precisa para provocar estas transiciones de un nivel a otro será absorbida por la molécula o átomo. En la figura 6.19 se muestran las posibles transiciones electrónicas que pueden ocurrir en moléculas y átomos debido a la radiación UV-Vis. En cada caso posible, un electrón excitado parte de un orbital lleno (energía baja, estado basal) a un orbital de anti-enlace vacío (alta energía, estado excitado).

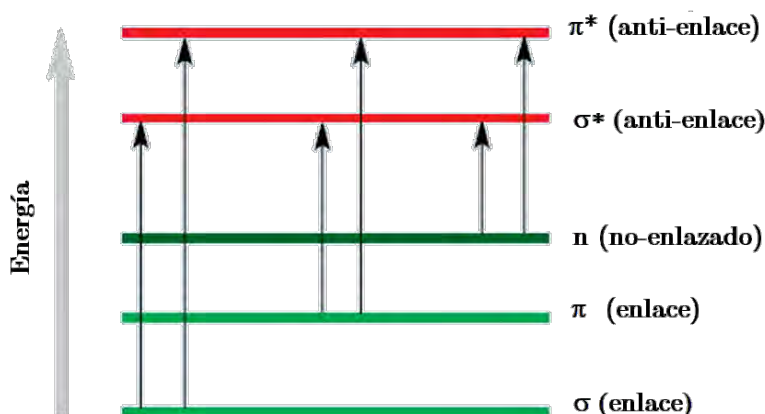


Fig. 6.19 transiciones electrónicas posibles que puede causar la luz.

Entre más grande sea la brecha de separación entre los niveles de energía, mayor será la energía requerida para lograr promover un electrón a un nivel superior de energía, esto significa que la luz de mayor frecuencia (menor longitud de onda) requerida será absorbida. Todas las moléculas experimentarán una excitación electrónica al absorber luz, sin embargo, para la mayoría de las moléculas se requiere una energía de radiación muy elevada ($UV < 200 \text{ nm}$). Mientras mayor sea la energía requerida para una determina transición, menor es la longitud de onda de la radiación que debe aplicarse para conseguir la transición; por ejemplo: la transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$ para propano requiere una radiación de 135 nm por lo que para detectar estas transiciones es necesario un equipo de alto vacío. En la figura 6.20 se muestran las transiciones posibles por absorción de luz en la región de UV-Vis.

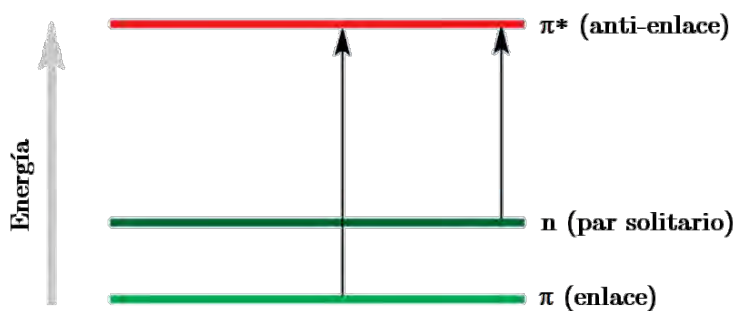


Fig. 6.20 Transiciones de energía permitidas por radiación electromagnética en la región UV-Visible.

Como se puede observar, únicamente los enlaces π y π^* contribuyen en la técnica de espectroscopia UV-Vis debido a las longitudes de onda necesarias para lograr estas transiciones electrónicas. Los enlaces π se forman por la superposición lateral de los orbitales p incompletos en los dos átomos de carbono de un doble enlace [52].

En un espectrómetro, la fuente de luz (generalmente una lámpara de tungsteno combinado con un halógeno) es capaz de proporcionar un espectro amplio de emisión que va desde el Vis hasta el ultravioleta cercano, cubriendo una región de 200 - 800 nm. En la salida de la fuente se coloca un arreglo óptico llamado *monocromador*, cuya función es separar la luz en todas sus longitudes de onda (fenómeno de dispersión) utilizando arreglo óptico, similar al efecto que causa un prisma, y mediante un mecanismo interno cambiar la posición del arreglo, con el fin de seleccionar una longitud de onda, la cual saldrá del monocromador por una pequeña rejilla.

Seguido, un espejo separa el haz monocromático en dos, para dirigirlo hacia la celda de referencia y la celda de la muestra. Finalmente, la señal de ambas celdas llega a un par de detectores que interpretan la intensidad de la luz y utilizando la ecuación (9) determinan la absorbancia de la muestra.

Para las muestras líquidas se utilizan celdas transparentes y rectangulares de cuarzo. En los equipos de doble haz se utilizan dos celdas simultáneamente. La primera, llamada celda de referencia contiene el solvente en el cual se encuentra disuelta la muestra y comúnmente refiere a esta como blanco.

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (9)$$

A es la absorbancia de la muestra que se relaciona con la intensidad medida en el blanco (I_0) y la intensidad de la celda de la muestra (I) a una cierta longitud de onda.

El espectro UV-Vis de las moléculas está asociado a transiciones electrónicas entre los diferentes niveles energéticos en ciertos grupos o átomos de la molécula, como se mencionó anteriormente, por lo que no caracterizan a la molécula como entidad (como sucede en el caso de la absorción en la región infrarroja que si logra estimular la molécula completa causando cambios vibracionales y rotacionales).

La ley de Beer-Lambert relaciona la atenuación de la luz que pasa a través de un material con sus propiedades mediante una relación lineal, la absorbancia A es función de la concentración de la sustancia en solución de acuerdo a la ecuación:

$$A = \epsilon cl \tag{10}$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar, c la concentración de la solución y l la longitud del camino óptico (dimensión de la celda en cm).

Si se realizan mediciones de absorbancia de una muestra a distintas concentraciones conocidas y se grafica absorbancia vs. concentración, la gráfica debe ser lineal, si se cumple la ley de Beer-Lambert. A esta gráfica se le conoce como *curva de calibración*. Una curva de calibración sirve para determinar la concentración de una solución de una muestra desconocida conociendo su coeficiente de extinción molar ϵ [53].

7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección se presentan, analizan y discuten los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas experimentales utilizadas (DLS, Electrocinética, CLSM, SEM, UV-Vis y viabilidad celular). Los sistemas estudiados son: Liposomas catiónicos (DODAB-DOPC), ADN proveniente de timo de ternera y Lipoplejos Catiónicos (Liposomas de DODAB-DOPC/ADN). En esta sección, con propósito de compactar la escritura se utilizarán los corchetes cuadrados [] para indicar las concentraciones utilizadas, i.e., todo lo que esté encerrado en corchetes hará referencia a concentraciones.

7.1 Liposomas catiónicos

Como se mencionó anteriormente, para la formación de los liposomas catiónicos se utilizó una mezcla de lípidos de DODAB y DOPC en una relación de 50:50 en peso molecular.

7.1.1 Determinación de tamaños mediante DLS

Utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS se realizaron mediciones de tamaños de liposomas de DODAB-DOPC. Para la formación de los lipoplejos y para las pruebas de viabilidad celular se utilizaron liposomas previamente filtrados, con un filtro de 500 nm y después con uno de 100 nm. Los tamaños de estos liposomas fueron medidos utilizando esta técnica y se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de 112 ± 3 nm con un índice de polidispersidad de 0.149, como se muestra en la figura 7.1. En esta figura se muestran los resultados de tres mediciones para la muestra de liposomas filtrados, debido a que esta gráfica se obtuvo mediante digitalización, no se pudo realizar un promedio de las tres mediciones, en donde los datos del eje x coincidieran, lo mismo sucedió con las gráficas de zetasizer siguientes.

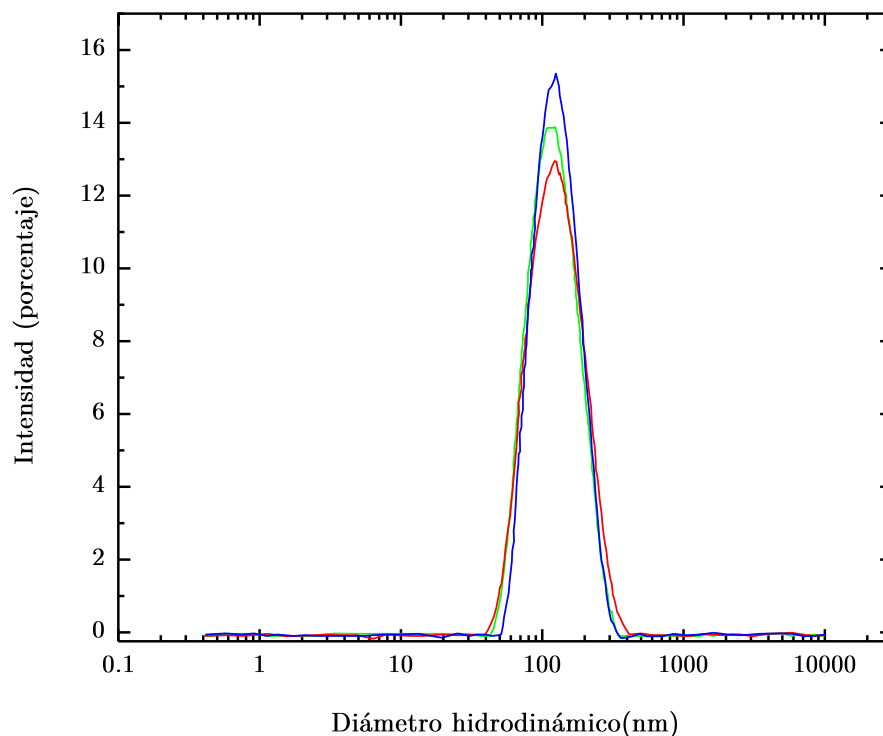


Fig. 7.1. Distribución de tamaños de los liposomas filtrados por intensidades.

Para obtener las medidas de los tamaños se utilizó el valor de 1.45 como índice de refracción de los fosfolípidos [54,55], esto permite una mejor aproximación en la distribución de tamaños por número. En la figura 7.2 se muestra la distribución de tamaños obtenida por número, obteniendo la mayor población en 68.1 nm. Puesto que los liposomas se filtraron utilizando un filtro con un tamaño de poro de 100 nm se esperaba una distribución de tamaños similar a esta, i.e., con tamaños menores a 100 nm, en comparación con la distribución de la figura 7.1, en la cual la media se posiciona en 112 nm. Las distribuciones por intensidades si bien son correctas, no siempre dan información de la conformación de sistemas polidispersos, en un sistema polidisperso existen coloides pequeños y de gran tamaño, estos últimos generalmente dispersan mayor cantidad de luz que los pequeños, es por eso por lo que en una distribución obtenida por intensidades la población de mayor tamaño suele tener mayor protagonismo.

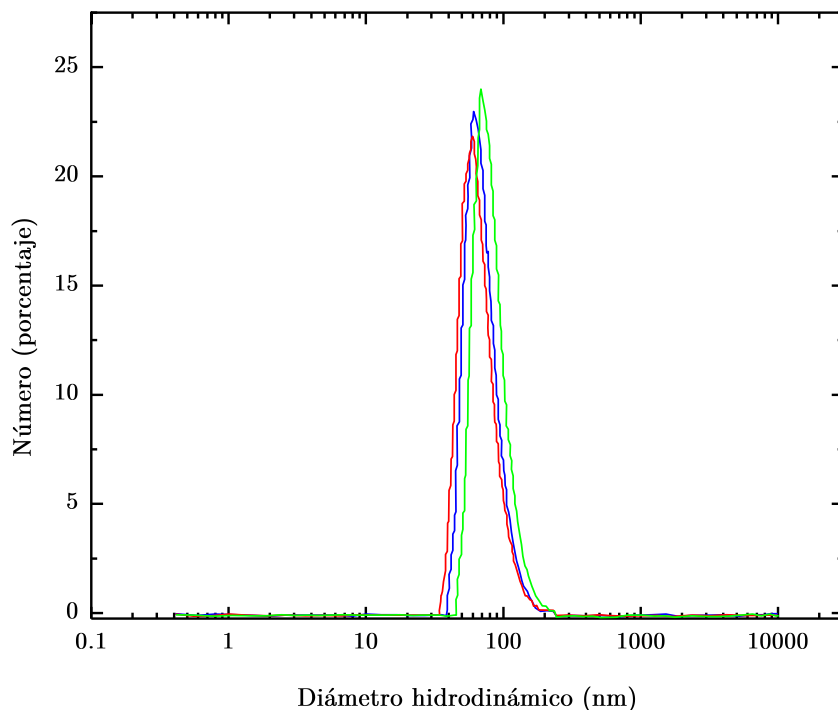


Fig. 7.2. Distribución de tamaños por número de liposomas.

Por otro lado, en las distribuciones obtenidas por número, se mide el número (en porcentaje) de partículas medidas y sus respectivos tamaños. En esta distribución se puede obtener información acerca del porcentaje de partículas que se tienen de diversos tamaños, como en este caso se utilizó esta distribución para verificar que en las muestras obtenidas por centrifugación se tenga un bajo porcentaje de partículas de tamaños inferiores a 700 nm. Esta es una medición que generalmente hace uso de otras consideraciones teóricas para obtenerse tales como: dilución de la muestra, forma, índice de refracción y polidispersidad. Es por esto por lo que la mayoría de las veces se considera una mejor opción utilizar las medidas obtenidas por intensidad.

Además, con el objetivo de separar de la solución a los liposomas de tamaños pequeños y trabajar con la mayor cantidad de liposomas grandes en lo posible (tamaños superiores a 700 nm) necesarios para hacer mediciones de fluctuaciones de la membrana de los liposomas sin obtener contribuciones de comportamientos difusivos, se utilizó el método de centrifugación descrito en el capítulo 6.2.1. Para encontrar las condiciones de centrifugación óptimas, se realizaron diferentes experimentos variando la velocidad de centrifugación y los tamaños resultantes fueron medidos mediante esta técnica de DLS.

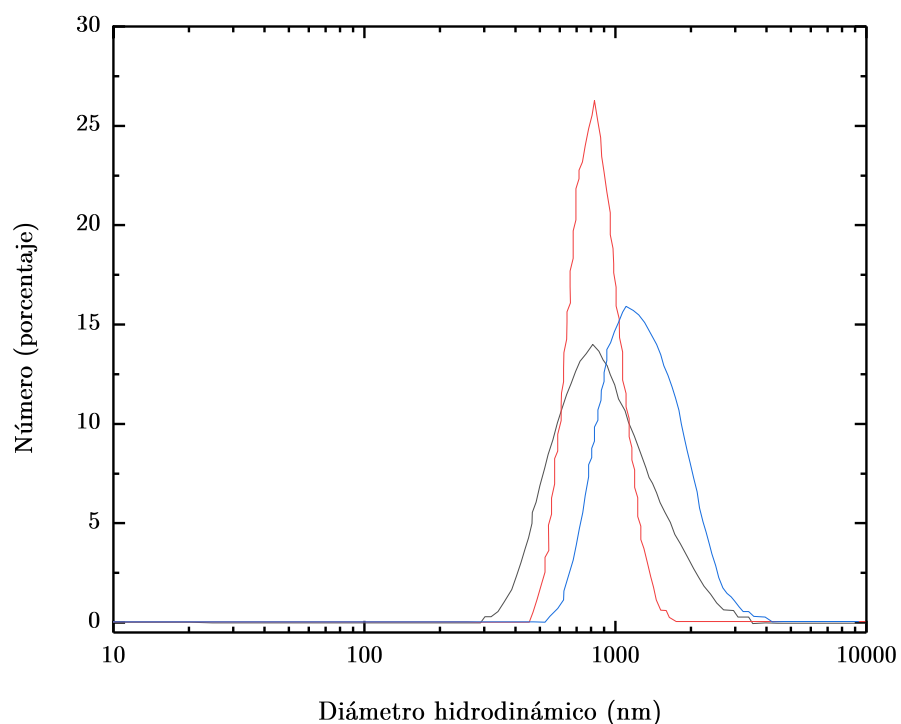


Fig. 7.3. Distribución de tamaños por número de liposomas de DODAB-DOPC-NBD-PE centrifugados a 8,000 RPM.

Observando las distribuciones por número, se midió el tamaño de los liposomas centrifugados a distintas velocidades con el objetivo de determinar qué velocidad es la óptima para obtener tamaños superiores a 700 nm y el menor porcentaje de liposomas de menor tamaño en lo posible. En la figura 7.3 Se muestra la distribución de tamaños de una muestra de liposomas de DODAB-DOPC-NBD-PE centrifugada a 8,000 RPM durante 30 min, en esta se observa un amplio rango de tamaños partiendo desde alrededor de 400 nm y obteniendo picos en promedio de 918 nm y una polidispersidad de 0.613, debido a que se encuentra un gran porcentaje de tamaños menores a 700 nm se aumentó la velocidad de centrifugación hasta encontrar la óptima.

La figura 7.4 corresponde a la misma muestra de liposomas centrifugada, pero esta vez a 13,000 RPM. Se observa una diferencia clara con respecto a la distribución anterior puesto que esta parte de tamaños de 620 nm con un pico en 955 nm y resulta además más estrecha con una polidispersidad de 0.527.

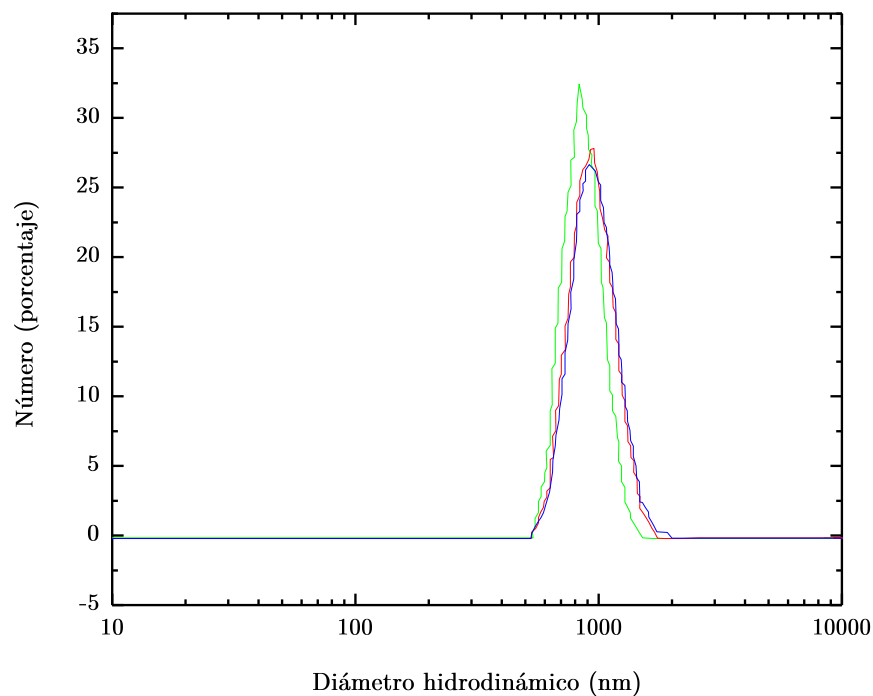


Fig. 7.4. Distribución de tamaños por número de liposomas de DODAB-DOPC-NBD-PE centrifugados a 13,000 RPM.

Finalmente se realizó una última prueba de separación por centrifugación a 14,000 RPM, y se obtuvo un resultado muy similar al anterior, con un pico promedio en 1005 nm y una polidispersidad de 0.369 como se muestra en la figura 7.5.

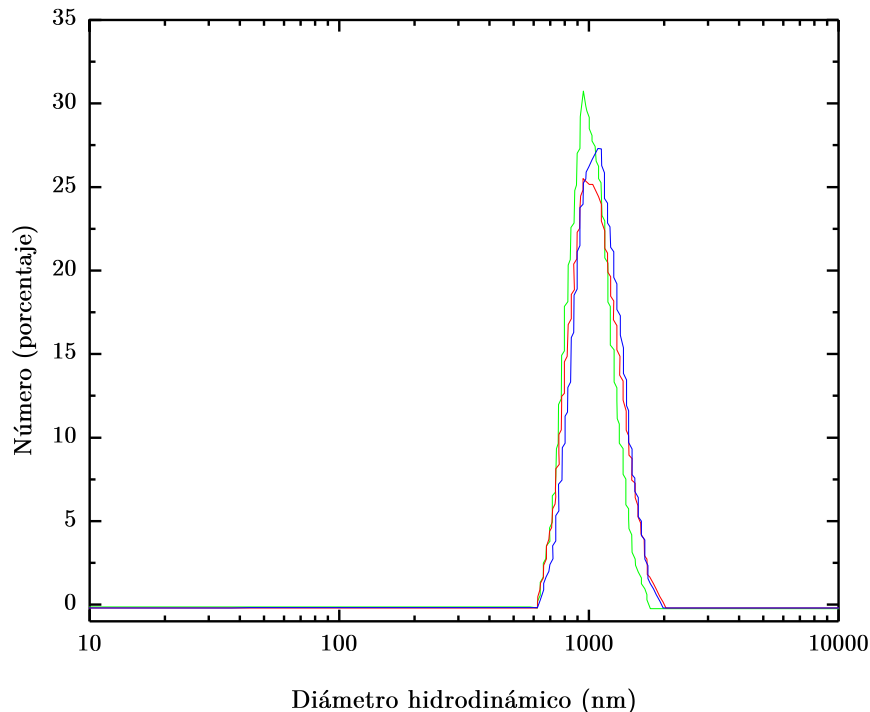


Fig. 7.5. Distribución de tamaños por número de liposomas de DODAB-DOPC-NBD-PE centrifugados a 14,000 RPM.

7.1.2 Propiedades electrocinéticas

Es importante estudiar las propiedades electrocinéticas de los sistemas, tanto liposomas como lipoplejos, puesto que la carga superficial de estos juega un rol importante en la respuesta inmune de un sistema lo cual es importante para llevar a cabo procesos de transfección dentro de un organismo, de acuerdo con Y. Ma y col. [56].

La solución de liposomas utilizada para los estudios de electrocinética fue tomada de la misma muestra que se utilizó para las medidas de tamaños. Utilizando 285 μL de una solución de liposomas a una $[10^{-3} \text{ M}]$ y 567 μL de HEPES a una $[40 \text{ mM}]$.

Para el caso de los liposomas solos, se obtuvo un ζ promedio de 56.8 mV y una conductividad de 0.539 mS/cm. Se realizaron las mediciones aumentando el número de corridas a 30 veces por medición y se obtuvieron varios picos lo que pudo representar una medición muy polidispersa, quizá debido a una alta concentración de liposomas. Sin embargo, el valor promedio da información del ζ antes de agregar la solución de ADN a los liposomas. En la fig. 7.6 se muestra el comportamiento del ζ , en este se

observa un comportamiento similar al obtenido en una muestra de liposomas con alta polidispersidad a pesar de que para esta muestra se obtuvo una buena medida de tamaños con baja polidispersidad.

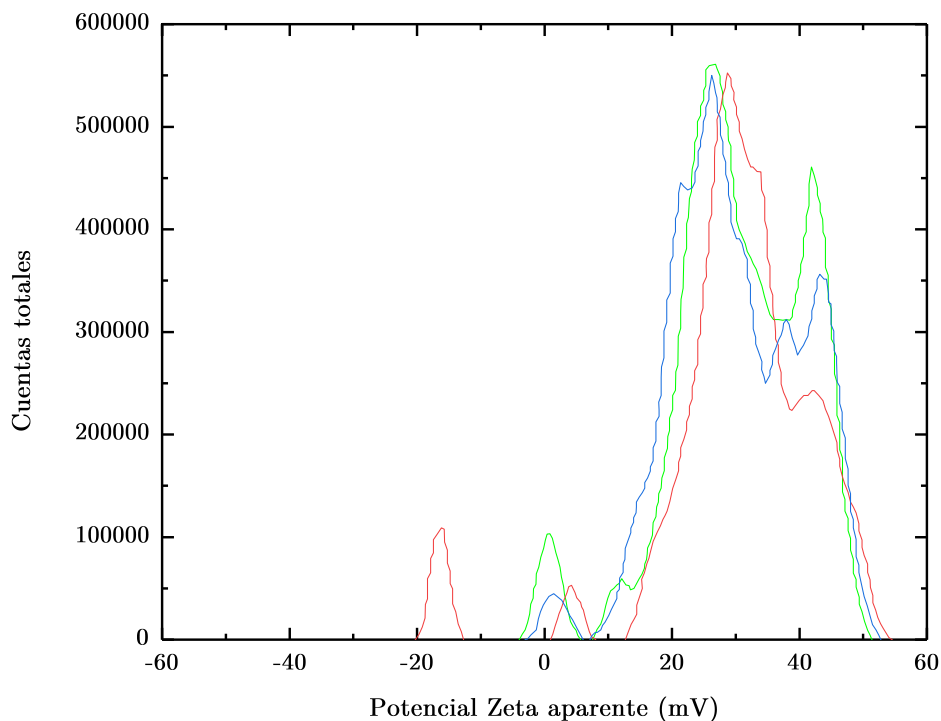


Fig. 7.6. Distribución del ζ de liposomas filtrados a 100 nm.

Se realizaron también mediciones del ζ de los liposomas separados por centrifugación, se encontró una notable diferencia en la distribución del ζ con respecto a los liposomas filtrados a 100 nm. Por otro lado, el valor promedio del ζ medido fue de 52.9 mV resultando ligeramente menor al de los liposomas filtrados.

En la figura 7.7 se muestra la distribución del ζ obtenido para los liposomas separados mediante centrifugación a una velocidad de 8,000 RPM y se observa como la distribución resulta ser mucho más estrecha que la mostrada en la figura 7.6. Este resultado se puede atribuir a que, para los resultados mostrados en la fig. 7.6, había una alta concentración de liposomas, mientras que para estos nuevos resultados (Fig. 7.6) la muestra fue más diluida debido a la separación de volúmenes de liposomas por la centrifugación.

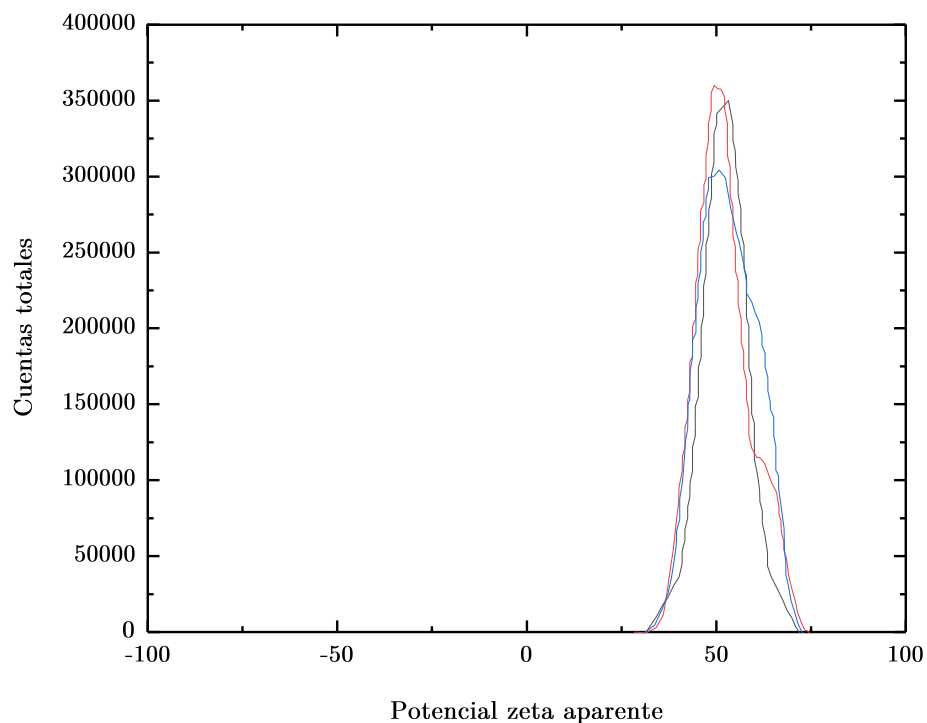


Fig. 7.7. Distribución del ζ de liposomas centrifugados a 8,000 RPM.

También se midió el ζ para la muestra centrifugada a 13,000 y 14,000 RPM, obteniendo un promedio de 52.4 y 52.8 mV, respectivamente, por lo que no se encontró un cambio notable en el valor promedio. Sin embargo, como se muestra en la figura 7.8, la distribución es más estrecha que la mostrada en la figura 7.7, resultado atribuido a los índices de polidispersidad asociados a las figuras 7.3 y 7.4.

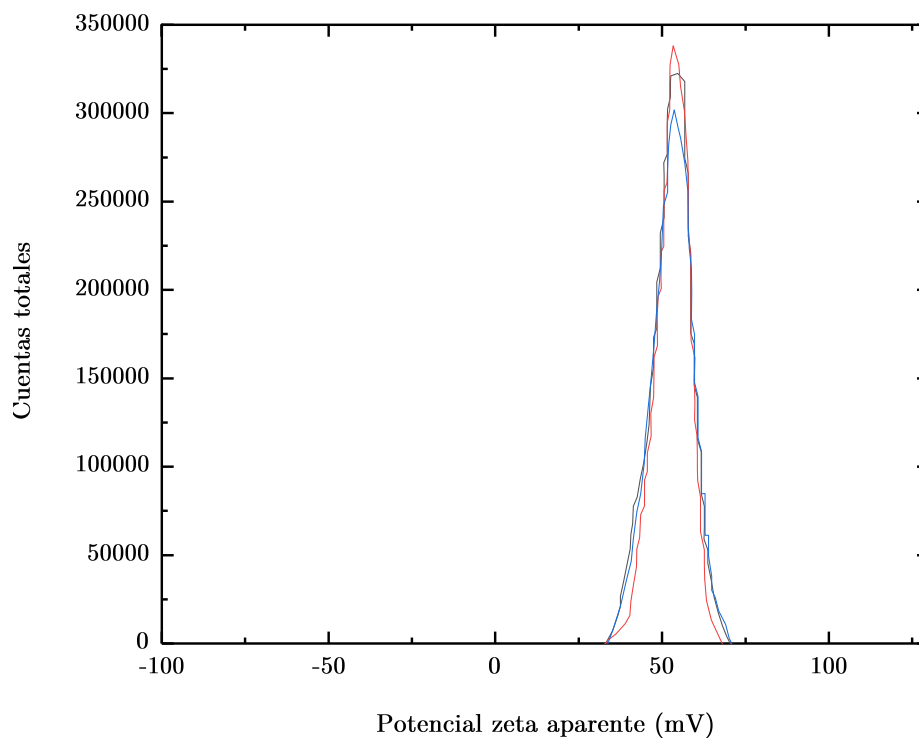


Fig. 7.8. Distribución del ζ de liposomas centrifugados a 13,000 RPM.

Tabla 7.1. Tabla comparativa de los tamaños promedio de liposomas centrifugados a distintas velocidades.

Velocidad (RPM)	Diámetro (nm)	Polidispersidad	Potencial Zeta (mV)
8000	918	0.613	52.9
13000	955	0.527	52.4
14000	1005	0.369	52.8

7.1.3 Micrografías de CLSM

Con el fin de observar las estructuras cuasiesféricas de los liposomas, se utilizó la técnica de microscopía confocal de fluorescencia, para ello se prepararon liposomas de DODAB–DOPC–NBD–PE, los cuales, como se explicó anteriormente en el capítulo 6, apartado 6.1.1, están marcados por la molécula fluorescente NBD. En la preparación de estos liposomas marcados no se realizó el paso de filtrado, puesto que para poder

observarlos con mejor claridad mediante esta técnica se requieren tamaños superiores a los 600 nm.

Una vez preparados los liposomas se llevó a cabo una centrifugación de 3 fases con el fin de eliminar la emisión de fondo de los fosfolípidos que lograron formar liposomas muy pequeños. Todas las fases se realizaron a la misma velocidad (13,000 RPM) y temperatura (4°C) durante un tiempo de centrifugado de 30 min y 15 min para la tercera fase.

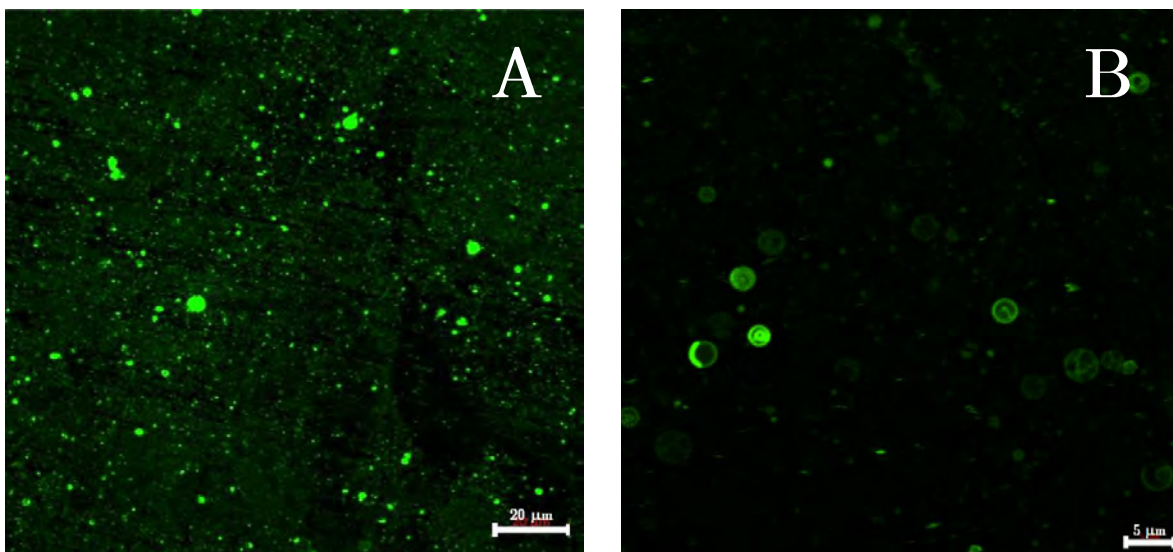


Fig. 7.9. Micrografías obtenidas por CLSM. Liposomas sin centrifugar (A) y centrifugados (B).

En la figura 7.9 se muestran dos micrografías, A y B, obtenidas mediante CLSM en las cuales se compara una imagen obtenida de liposomas sin separar por el método de centrifugación (A) y una muestra de liposomas separados mediante centrifugación a 13,000 (B). Claramente la micrografía B muestra liposomas con estructuras esféricas bien definidas, sin ruido de fondo y de monodispersidad mejorada. De esta figura (7.9 B) se realizó una estadística de tamaños utilizando el software ImageJ y se obtuvo una amplia distribución de tamaños con un máximo alrededor de los 700 nm (Figura 7.10). Como se mencionó anteriormente, esta distribución de tamaños cambia ligeramente al aumentar o disminuir la velocidad de centrifugación obteniendo liposomas de diámetros menores o mayores, respectivamente.

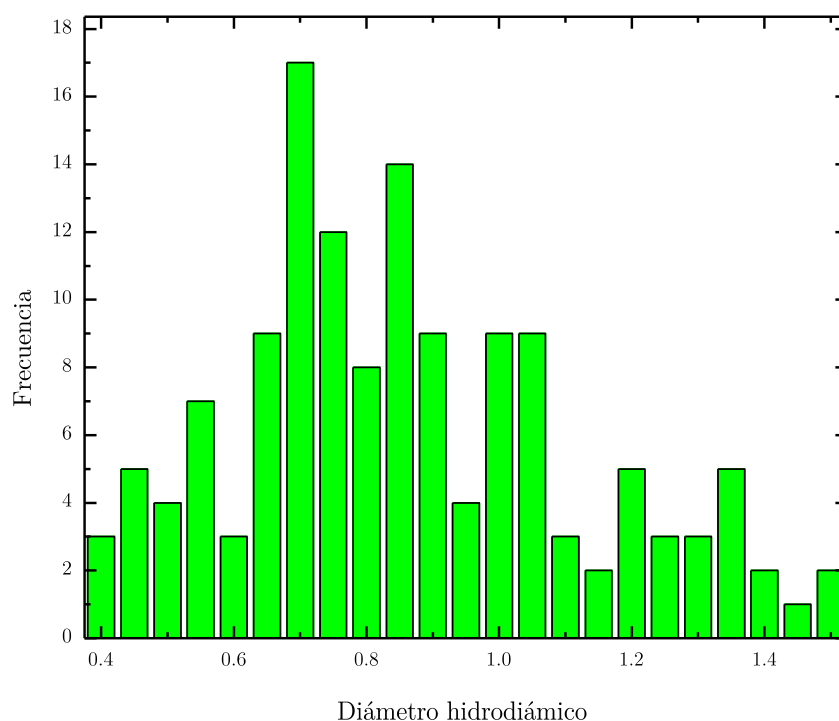


Fig. 7.10. Distribución de tamaños de liposomas separados mediante el método de centrifugación a 13,000 RPM.

7.1.4 Microscopía electrónica de barrido

Se realizó una medición de una solución de liposomas filtrados a 100 nm, utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM), con el objetivo de observar mediante imagen los liposomas que se forman al pasar la solución por un filtro de 100 nm y los cuales se utilizaron en los estudios de viabilidad celular y potencial zeta mostrados más adelante.

Para observar muestras biológicas utilizando SEM, se utilizó la técnica de tinción negativa para la preparación de muestra, donde se utilizó PTA al 2%, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 6, sección 6.4.4. Las imágenes se tomaron utilizando una diferencia de potencial de 5.0 kV y se utilizó el detector de electrones secundarios.

En la figura 7.11 se muestran las micrográficas obtenidas, donde se observa como los liposomas sufren deformaciones estructurales, que se debe a las condiciones de alto vacío y al proceso de tinción requerido para la visualización de la muestra.

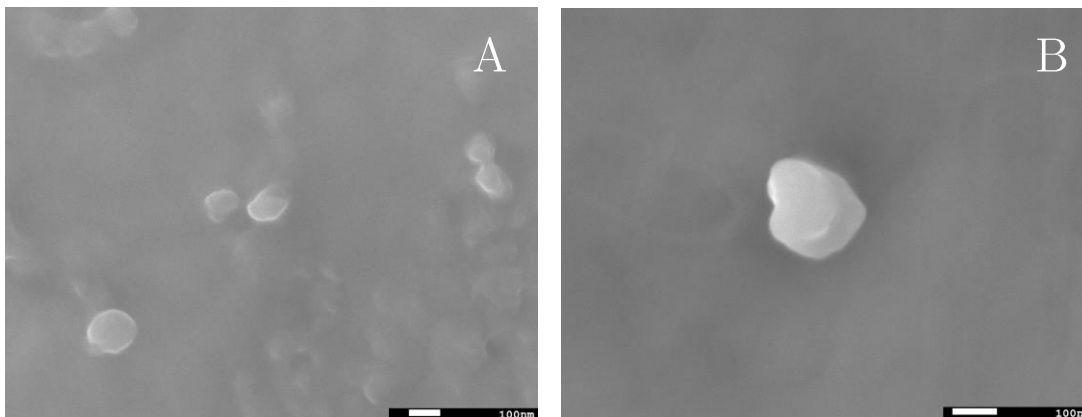


Fig. 7.11. Micrografía de liposomas obtenida por SEM en el modo de electrones secundarios.

Sin embargo, a pesar de su deformación, los liposomas presentaron un tamaño promedio de 98 nm, los cuales coinciden de acuerdo con el tamaño de poro del filtro utilizado (100 nm).

7.1.5 Espectroscopia UV-Vis

Hasta ahora se han realizado los análisis para tamaños y potencial Zeta de los liposomas, en esta sección, se presentan los resultados obtenidos utilizando la técnica de espectroscopia UV-Vis. Para ello se realizó una curva de calibración, i.e., se hicieron varias mediciones en un rango de 200 a 900 nm y se midió la absorbancia de cada muestra a una determinada longitud de onda. Las concentraciones de la muestra se variaron desde 7.78×10^{-5} hasta 6.94×10^{-4} M.

Los valores obtenidos para cada [liposomas] se muestran la figura 7.12. Se observa un pico de absorción en $\lambda=228$ nm para la concentración de liposomas más grande (6.94×10^{-4} M), con un ligero corrimiento hacia la izquierda y una disminución de la intensidad a medida que la concentración disminuye.

Con base a estas curvas de absorción, se construyó la curva de calibración de los liposomas graficando [liposomas] (M) vs. Absorbancia (u.a.), en $\lambda = 228$ nm, y se obtuvo la curva de la figura 7.13 la cual presenta un comportamiento lineal, como se esperaba dado que la absorbancia depende linealmente de la concentración de una muestra[52]. De este resultado se puede obtener el coeficiente de extinción molar de la siguiente manera.

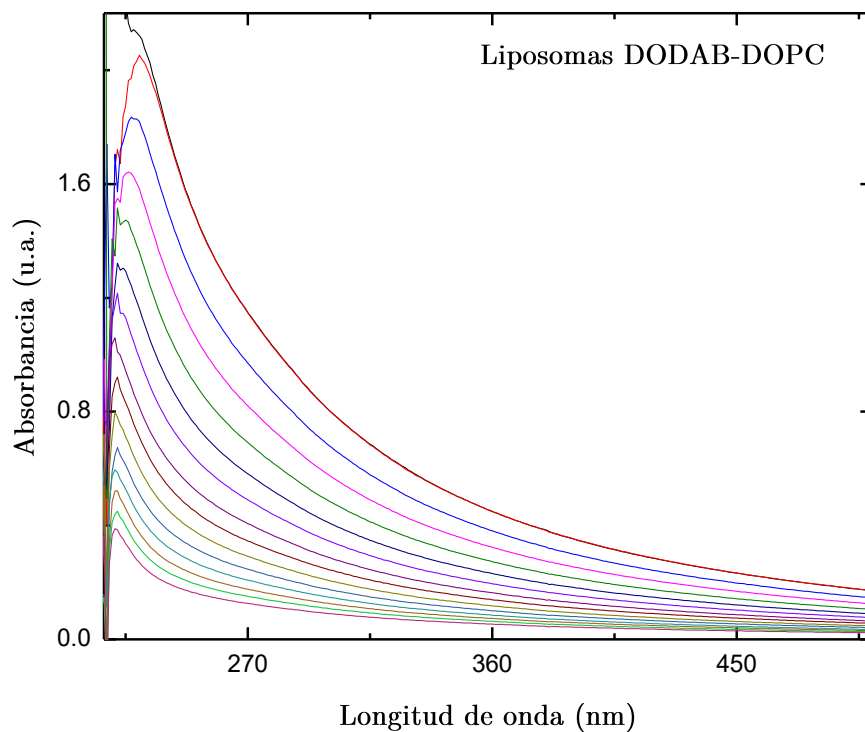


Fig. 7.12 Curvas de absorción UV-Vis de liposomas a distintas [liposomas].

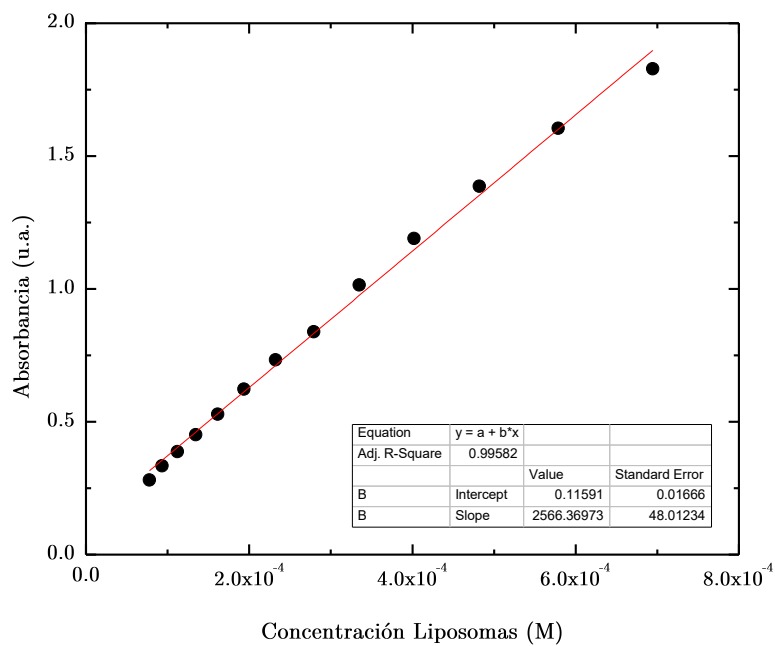


Fig. 7.13 Curva de calibración de liposomas a distinta concentración.

Relacionando la ecuación asociada a la curva obtenida con la ley de Beer-Lambert se obtiene:

$$y = 0.11 + 2566.36 \pm 48.01x \quad (11)$$

Aproximando a cero el primer término del lado derecho de la ecuación.

$$y = 2566.36 \pm 48.01x \quad (12)$$

La ecuación de Beer-Lambert.

$$A = \epsilon cl \quad (13)$$

De aquí se obtiene que:

$$\epsilon = 2566.36 \pm 48.01$$

Tomando $l = 1 \text{ cm}$, como especificación del equipo.

El cuál es el coeficiente de extinción molar para los liposomas, este valor mide qué tanto atenúa esta muestra de liposomas una luz de $\lambda=228 \text{ nm}$. Utilizando este resultado se puede calcular la [liposomas] de una muestra desconocida, como es el caso de la solución de liposomas separados por el método de precipitación por centrifugación.

En la siguiente sección se utilizó una muestra de liposomas separados por centrifugación de esta se obtuvo una absorción $A = 0.3315 \text{ u.a.}$ y utilizando los resultados anteriores se calculó la [liposomas] resultando ser de aproximadamente $129 \mu\text{M}$.

7.1.6 Propiedades elásticas utilizando DLS

Además de medir los tamaños, mediante la técnica de DLS, se realizó una medición indirecta de las propiedades elásticas de la membrana de los liposomas, como se describió en el capítulo anterior.

Para esto, se realizaron diferentes mediciones de dispersión de luz a distintos ángulos, utilizando una solución de liposomas de gran tamaño, esto con el fin de evitar contribuciones de comportamiento difusivo en las curvas de correlación por liposomas pequeños (menores a la longitud de onda del láser utilizado). Para obtener una solución de liposomas de gran tamaño, se utilizó el método de separación por centrifugación,

separando de la solución liposomas de diámetros menores de aproximadamente 700 nm.

Se realizaron dos experimentos utilizando el equipo de DLS de la marca Brookhaven Instruments con un láser de $\lambda = 637$ nm y fotodetector de avalancha. Para asegurar una buena dispersión de la muestra, se hizo una medición colocando ésta a un ángulo fijo del detector, 90° . Se realizó una breve medición (~ 1 s) de la luz dispersada en estas características procurando que la intensidad de la señal de la luz detectada no sobrepase las 600 kilo cuentas por segundo (kcps), esto es porque al aumentar el ángulo de detección, el número de cps detectadas aumenta de forma no-lineal y una señal de gran intensidad (1.5 Mcps) supone un grave riesgo de daño para el fotodetector.

En la figura 7.14 se observan las curvas de correlación obtenidas para diferentes ángulos de medición (de 40° a 140° , de 10 en 10°) correspondientes al primer experimento. En estas curvas, se observa mucha dispersión para tiempos largos, debido a diversos factores, como: alta dispersión de intensidades en el histograma cps en función del tiempo, tiempo insuficiente para la adquisición de datos en la curva de correlación y alta polidispersidad de la muestra analizada.

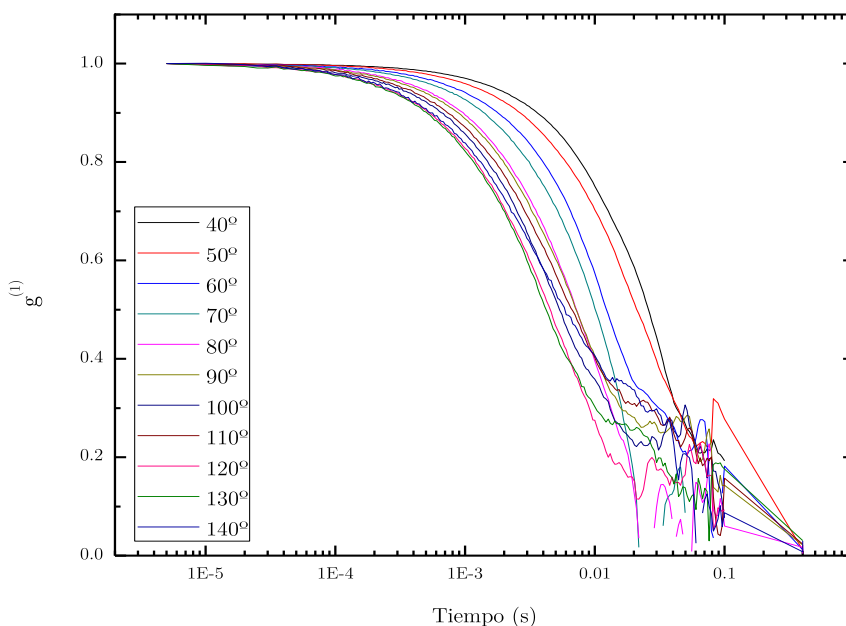


Fig.7.14 Curvas de correlación $g^{(1)}$ normalizada de los liposomas a distintos ángulos.

De los datos obtenidos, se realizó un ajuste de curva utilizando la expresión de exponencial estrecha $g^{(1)} \sim a \exp(-\Gamma t)^b$, previamente seleccionada [57]. En la ecuación Γ corresponde a la frecuencia de relajación, cuyo valor está relacionado con el vector de onda q obtenido para cada ángulo ($q = 4\pi\eta \sin(\theta/2)^1/\lambda$), de manera que el coeficiente de difusión D tiene dependencia directa de la forma $\Gamma_q \sim Dq^2$ [57]. Por otro lado, estudios previos han mostrado una dependencia entre la frecuencia de relajación y el módulo elástico de la forma $\Gamma_q \sim \kappa^{-1/2} q^3$ [57]. En la figura 7.15 se muestra el comportamiento de Γ en función de q^3 correspondiente a la medición anterior. En la gráfica no se observa un comportamiento lineal, lo que puede sugerir que la monodispersidad de los liposomas utilizados no fue la adecuada, i.e., la polidispersidad fue grande.

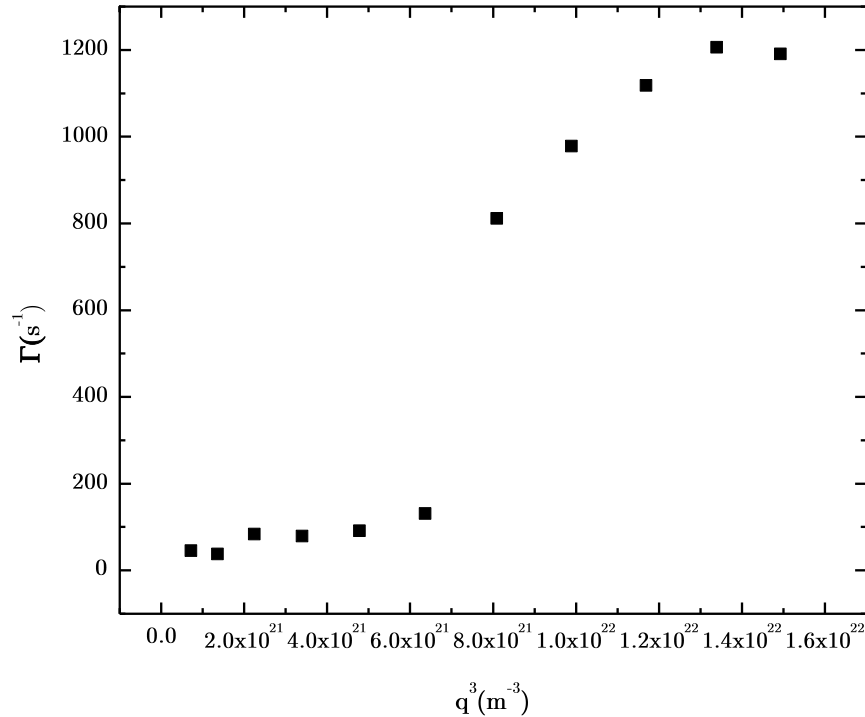


Fig. 7.15 Relación de Γ en función de q^3 de los liposomas.

Debido a esto, se llevaron a cabo nuevas mediciones utilizando criterios adicionales para verificar la calidad de las medidas obtenidas en los experimentos. El primer criterio tomado en cuenta fue verificar para cada medición realizada la señal, que representa la intensidad medida en cps. La intensidad de la señal varía, siendo mayor

si liposomas de gran tamaño pasan por el haz dispersando una gran cantidad de luz o menor si liposomas de mucho menor tamaño dispersan el haz en ese instante de tiempo.

En la figura 7.16 se muestra la señal obtenida de la medición de liposomas a 50° , en esta señal se obtuvo una buena fluctuación de cps alrededor de un valor medio. En las todas medidas obtenidas se corroboró que la señal de cps fuera de esta misma naturaleza, con el fin de obtener datos confiables, i.e., obtener curvas de correlación bien comportadas.

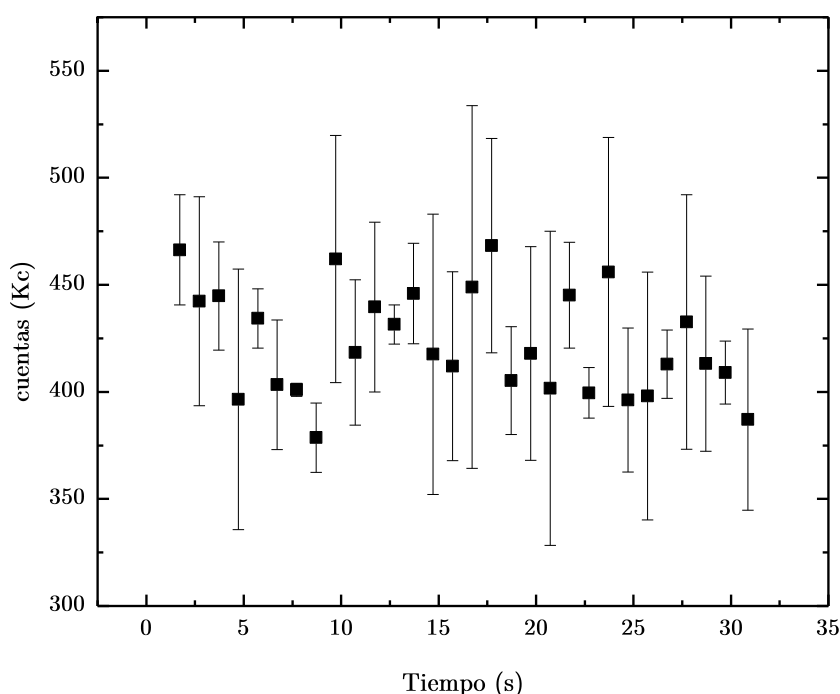


Fig. 7.16 Señal de cps en liposomas a 50° .

Una vez obtenidas las medidas, se utilizó el software Origin-Pro para el tratamiento de los datos obtenidos, y realizar posteriormente un ajuste con la expresión exponencial descrita anteriormente. Del experimento, se obtuvieron las curvas $g^{(2)}$ y mediante la relación de Siegert se calcularon las curvas de correlación $g^{(1)}$. Para realizar el ajuste de curva con mayor precisión se prescindió de los datos de $g^{(1)}$ a tiempos largos.

El comportamiento exponencial de la curva de correlación se puede apreciar de mejor manera en el espacio $\ln(x)$ vs. lineal (figura 7.17), en el que se observa la región donde este comportamiento discrepa del modelo. Esta discrepancia se puede apreciar aún de mejor manera en el espacio lineal vs. $\ln(y)$ (figura 7.18), dado que la zona lineal

es aquella que sigue este comportamiento exponencial en este espacio. Con esto se obtuvo nuevamente Γ para este experimento y se comparó nuevamente con q^3 (figura 7.19).

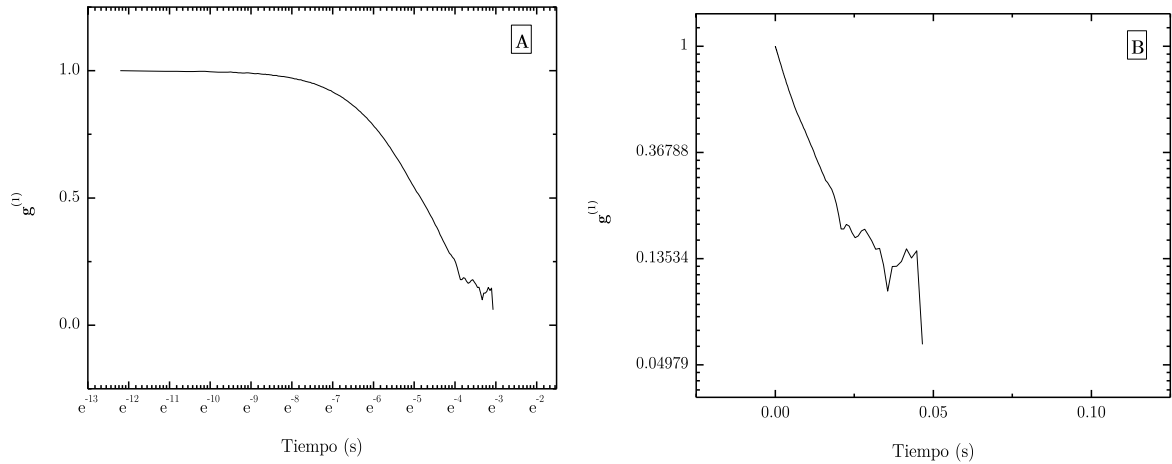


Fig. 7.17 (A) Curva de correlación de liposomas a 50° en escala ln vs. lineal.
 (B) Curva de correlación de liposomas a 50° en escala lineal vs. ln.

Las curvas de correlación normalizadas obtenidas para el segundo experimento se muestran en la figura 7.18, donde se observa un mejor comportamiento para tiempos grandes.

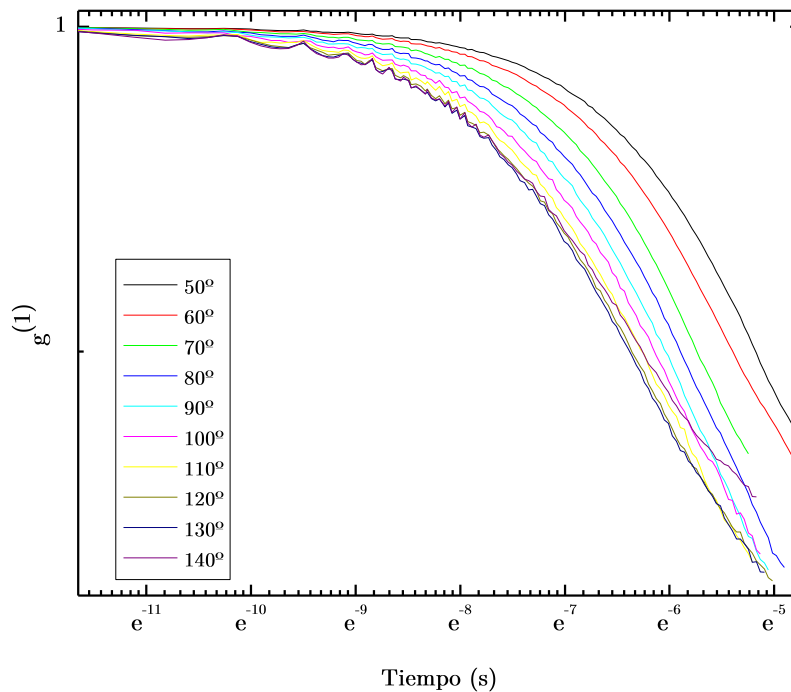


Fig. 7.18 Curvas de correlación normalizadas $g^{(1)}$ de liposomas.

Para cada curva se ajustó el modelo de exponencial estrecha, como en el caso anterior, y se construyó la curva de Γ vs. q^3 (figura 7.19).

Además, como se mencionó anteriormente, la dependencia de las fluctuaciones de membrana dependen de t^β donde β ha sido obtenido teóricamente por Zilman y Granek [57] obteniendo un valor de $2/3$, para esto se comparó β en función de θ (figura 7.20) y se obtuvo valores fluctuantes alrededor de $2/3$.

Se realizó un ajuste lineal a los valores de Γ vs q^3 , y se obtuvo la ecuación de la recta $y = (1.1408 \times 10^{-20} \pm 1.013 \times 10^{-21})x + 54.03 \pm 6.06$, donde la pendiente 1.1408×10^{-20} corresponde al valor de m en la ecuación:

$$m = \frac{0.025 \gamma_k (K_B T)^{\frac{1}{2}} K_B T}{\eta \cdot \kappa^{\frac{1}{2}}}$$

Esta ecuación contiene información del módulo elástico (κ) promedio de la membrana de los liposomas [47]. Se obtuvo un valor de $\kappa = 102.38 K_B T$ o bien, $\kappa = 4.2078 \times 10^{-19}$ J el cual es un valor muy aproximado a los valores publicados por X. Liang y col. utilizando distintos métodos incluyendo microscopía de fuerza atómica [58].

En la figura se aprecia un mejor comportamiento lineal de Γ vs. q^3 , comparado con el comportamiento de la figura 7.15. Sin embargo, esta linealidad no parece seguir el mismo comportamiento para los ángulos muy pequeños y muy grandes.

El comportamiento de β vs. θ (Figura 7.20), se observa una oscilación en un valor medio correspondiente a $\beta = 0.7$, donde β corresponde al factor exponencial que acompaña al tiempo t de la forma $\sim t^\beta$. En el comportamiento exponencial de las curvas de correlación, se espera que haya una dependencia respecto al tiempo de la forma $\sim t^{2/3}$, el valor obtenido en este experimento es un valor muy cercano al pronosticado por Zilman y Granek [57].

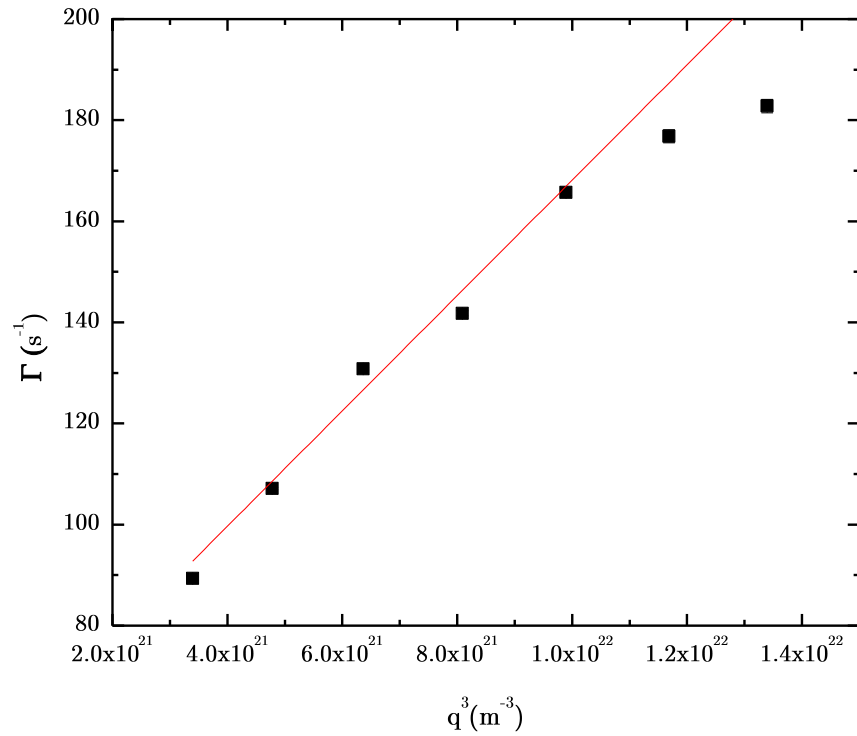


Fig. 7.19 Relación de Γ vs. q^3 de los liposomas.

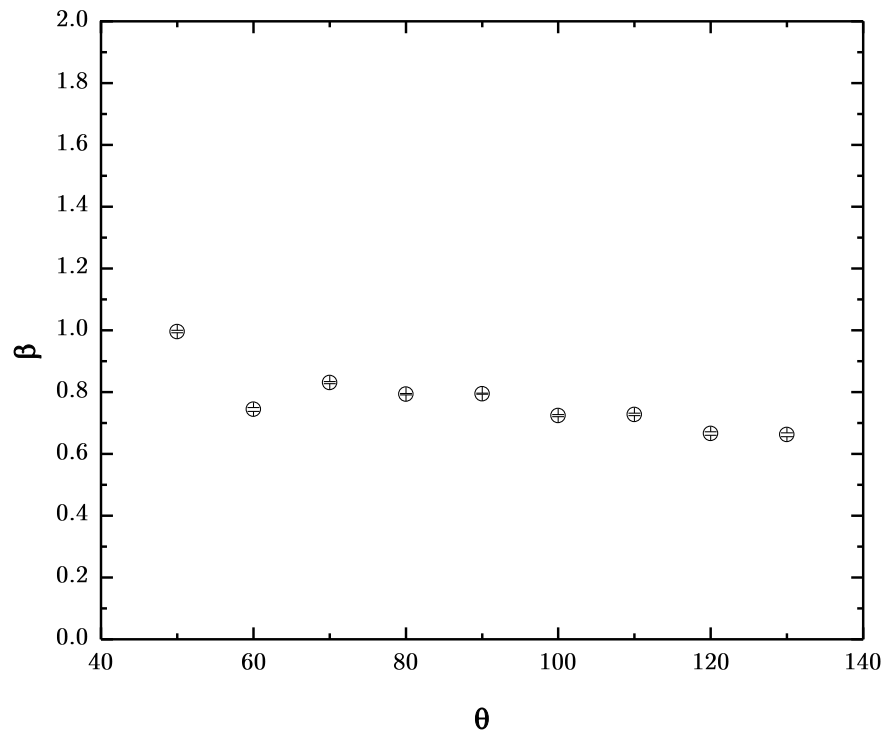


Fig. 7.20 Relación de β vs. θ de los liposomas.

7.1.7 Pruebas de viabilidad celular

Hasta ahora, se han estudiado las propiedades fisicoquímicas de los liposomas. En esta sección se discutirán los resultados obtenidos en pruebas de viabilidad celular, utilizando a los liposomas como transportadores de ADN para transferirlo a células MDA-MB-231 y HeLa CCL-2. Se utilizaron liposomas filtrados de tamaños de 100 nm.

Los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad fueron mediante un ensayo de MTT utilizando cuatro concentraciones distintas de liposomas DODAB-DOPC-NBD-PE, en una placa de 96 pozos con sus respectivos triplicados. Se sembró una cantidad aproximada de 5,000 células MDA-MB-231 por pozo previamente contabilizadas utilizando una cámara de Neubauer, para una [liposomas] variable de 13.33 a 100 μM , las concentraciones de liposomas se decidieron en base a los resultados reportados por Yuhuong Xu y col. [60].

Se utilizó como control negativo células MDA-MB-231 sin tratamiento y, como control de muerte, células con alcohol. Los resultados se muestran en la figura 7.21, donde se puede apreciar como a medida que aumenta la [liposomas], el % células vivas disminuye ligeramente, este resultado sirve como punto de partida para conocer la [liposomas] que se utilizará para los ensayos de toxicidad con lipoplejos.

En la figura se aprecia que el porcentaje de células sobrevivientes, utilizando liposomas DODAB-DOPC-NBD-PE, es igual o inferior al 60%, según aumenta la concentración, mostrando que para estas concentraciones el tratamiento menos favorable para las células MDA-MB-231. Observando estos resultados se utilizó una concentración de 40 μM para probar liposomas DODAB-DOPC como tratamiento, es decir, liposomas sin lípidos marcados NBD-PE, puesto que se sospechó que la presencia de estos lípidos afectó la medición presentada en la figura 7.21 aunque en principio se realizó este experimento utilizando NBD-PE para observar la fusión del liposoma a la célula mediante microscopía confocal, estudio que fue descartado posteriormente.

De los resultados obtenidos utilizando liposomas de DODAB-DOPC a 40 μM se observa que éstos son menos tóxicos que los marcados con NBD-PE (figura 7.22). Se obtuvo viabilidad para células MDA-MB-231 ligeramente inferior al 90% contra el 60% obtenido en la medición de la figura 7.21 y 70% de sobrevivencia para el caso de las células HeLa CCL-2.

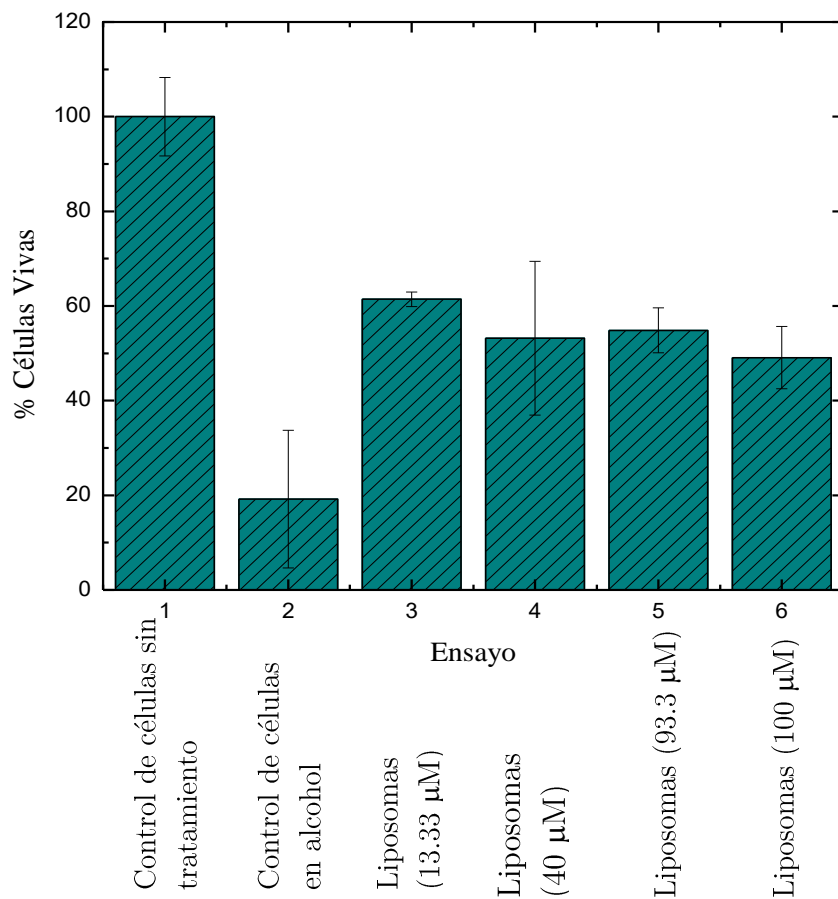


Fig.7.21. Histograma de % células vivas utilizando como tratamiento liposomas a distintas concentraciones.

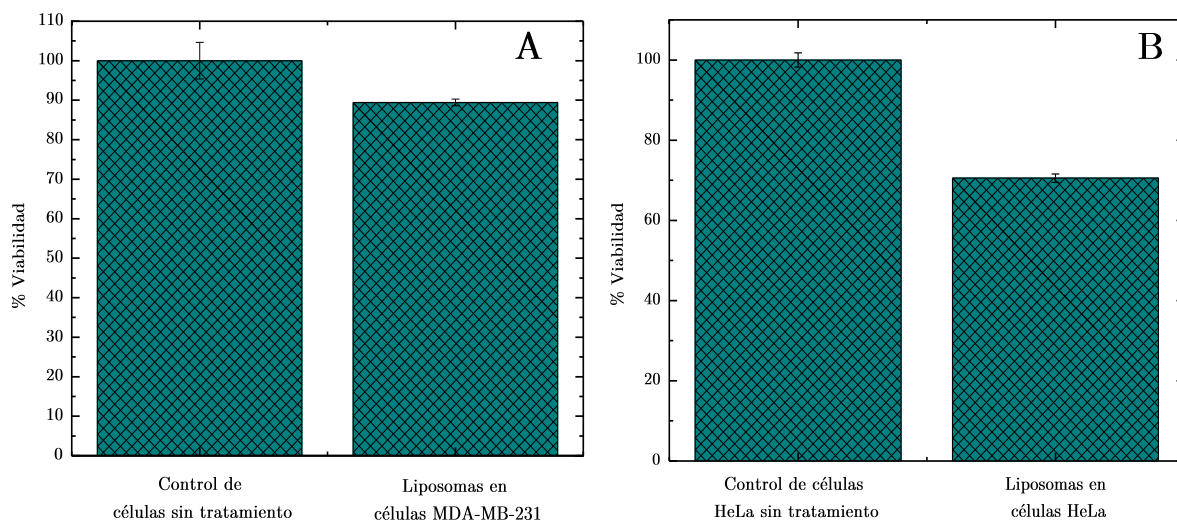


Fig.7.22. Histograma de % células vivas utilizando como tratamiento liposomas a una [40 µM].

7.2 ADN

Se utilizó ADN comercial proveniente de timo de ternera (Sigma-Aldrich), con un $\zeta = -95$ mV de acuerdo con las medidas efectuadas. Este ADN se conforma de distintas secuencias, las cuales no son repetitivas ni son bien definidas (como en el caso de un oligonucleótido), presenta una cantidad de pares de base (pb) muy polidispersos, debido a esto, se realizaron experimentos con el fin de homogeneizar los tamaños. A continuación, se presentan los resultados de los experimentos realizados para caracterizar el ADN.

7.2.1 Gel de electroforesis

Debido a la polidispersidad en los tamaños del ADN, se propuso homogeneizar la muestra utilizando un método mecánico, i.e., se utilizó un método de homogenización por sonicación siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial Diagenode [59]. Se utilizaron 9 muestras de ADN con 1.5 mL c/u, a una $[\text{ADN}] = 2.5 \times 10^{-8}$ M y distintos tiempos de sonicación, en intervalos de encendido y apagado. Las muestras se mantuvieron a una temperatura cercana a los 4°C, misma que se controló utilizando pequeños trozos de hielo en el contenedor del sonicador. Una vez finalizada la homogenización, las muestras de ADN fueron almacenadas a una temperatura de 4°C durante 24 h.

Para medir los tamaños de las muestras de ADN fragmentado se utilizó la técnica de gel de electroforesis. Se preparó un gel de agarosa al 1.4% y se siguió el protocolo descrito en el capítulo 6, Sección 1.3.4, los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.23.

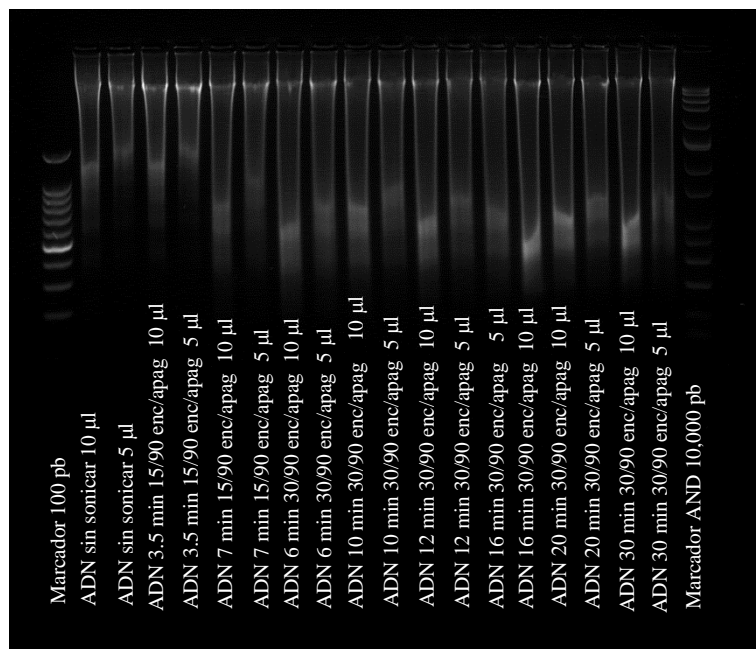


Fig. 7.23. Electroforesis en gel de agarosa para ADN a distintos tiempos de sonicación.

En la figura se observan bandas de ADN, dado que el método de fragmentación por sonicación no es selectivo, i.e., la fragmentación puede ocurrir en cualquier cantidad de pares de base, por esta razón se obtiene una banda continua correspondiente a un rango de tamaños. Comparando con la muestra de ADN sin sonicar, únicamente las muestras correspondientes a 3.5, 7 y 6 min presentan variaciones apreciables en los tamaños del ADN. Debido al barrido presente en todas las muestras, se concluyó que el ADN se encontraba contaminado por ARN, enzimas, etc., y se procedió a realizar una purificación de la muestra para eliminar estos contaminantes. Para ello se utilizó un "kit" comercial de purificación de la marca Qiagen y, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 6, sección 6.1.3.3.1. Una vez obtenido la muestra de ADN purificada, se realizó un experimento de electroforesis en gel de agarosa y se comparó con una muestra no purificada. En la figura 7.24 se observa que, al purificar el ADN utilizando este método, se obtiene una medida más limpia que la que se obtiene en la muestra sin purificar. Hay diversos factores que pueden provocar lo anterior, uno de ellos es la concentración de la muestra, ya que, al utilizar una columna de purificación, la cantidad de ADN que se recupera es menor a la que se tiene en la muestra original siendo estas de 10 µg (como máximo) [61] y 0.4 mg, respectivamente.

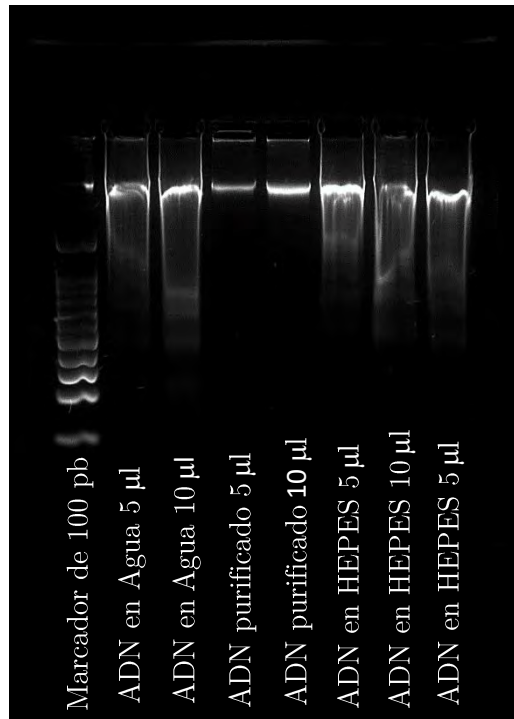


Fig. 7.24 Electroforesis en gel de agarosa para muestras de ADN purificado por método de columna y sin purificar.

Se realizó otra purificación de ADN utilizando el método de purificación por precipitación de etanol descrito en capítulo 6, sección 6.1.3.3.2 y se realizó un experimento de gel de electroforesis para observar nuevamente el comportamiento del ADN. En la figura 7.25 se muestran los resultados obtenidos mediante esta técnica y se observa una gran concentración de emisión en los tamaños correspondientes a 8,000 pb, y tres franjas de emisión que se sospecha pertenecen a ARN (ARN mensajero, ribosomal y de transferencia).

Se observa un barrido como en las muestras anteriores, lo que se adjudica también a la concentración alta de la muestra (2 mg/mL). Sin embargo de esta medición se concluye que gran parte del ADN de timo de ternera tiene un tamaño cercano a los 8 kpb.

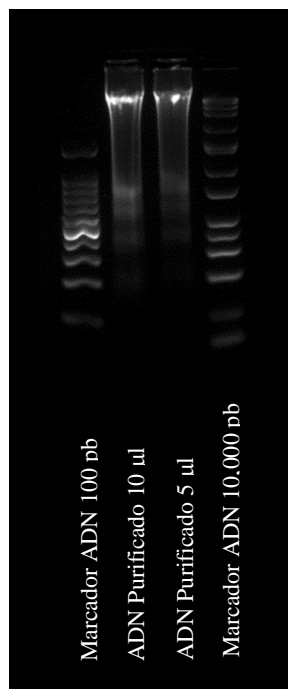


Fig. 7.25 Electroforesis en gel de agarosa para muestras de ADN purificado por método de precipitación de etanol.

7.2.2 Espectroscopia UV-Vis

Utilizando espectroscopia UV-Vis se realizó la prueba A_{260}/A_{280} para comprobar la pureza del ADN purificado mediante la técnica de precipitación de etanol. Esta prueba consiste en medir, la absorbancia de una solución de ADN a dos valores fijos de longitud de onda (λ), 260 y 280 nm, para obtener el cociente de estos dos valores. Los valores cercanos a $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ corresponden a muestras de ADN más puro. Para este experimento se obtuvo un cociente de 1.9 el cual es un valor aceptado para la pureza de una muestra de ADN [62].

Al igual que con la muestra de liposomas, se realizó una medición de la absorbancia de ADN disuelto en HEPES en un rango de entre 200 y 900 nm, a distintas concentraciones partiendo de una concentración de 2.5×10^{-10} a 1.66×10^{-9} M.

Las curvas obtenidas de absorbancia para cada [ADN] se muestran la figura 7.26, donde se observan dos picos de absorción en $\lambda_1 = 212$ y $\lambda_2 = 258$ nm con un ligero corrimiento hacia la izquierda a medida que la [ADN] disminuye.

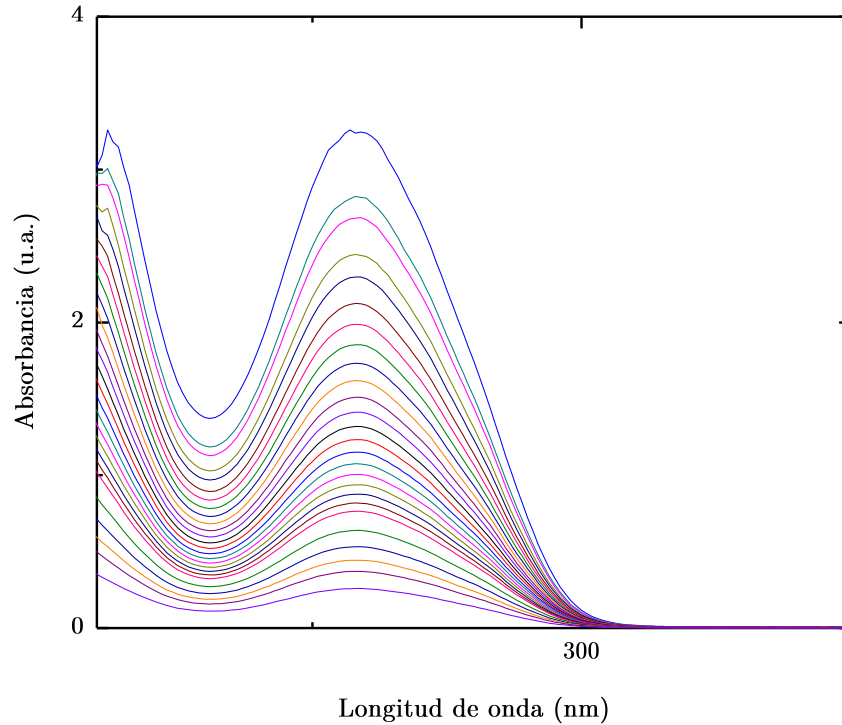


Fig. 7.26 Curvas de absorción UV-Vis a distintas [ADN].

De la misma manera, con base a las curvas de absorción se construyó la curva de calibración para la muestra de ADN disuelto en HEPES, graficando [ADN] (M) vs. Absorbancia (u.a.) en $\lambda = 258 \text{ nm}$ y, se obtuvo la curva de la figura 7.27.

Relacionando la ecuación asociada a la curva obtenida con la ley de Beer-Lambert se obtiene:

$$y = -0.08551 + 1.9099 \times 10^9 \pm 2.46 \times 10^7 x$$

Aproximando a cero el primer término del lado derecho de la ecuación.

$$y = 1.9099 \times 10^9 \pm 2.46 \times 10^7 x$$

La ecuación de Beer-Lambert.

$$A = \epsilon cl$$

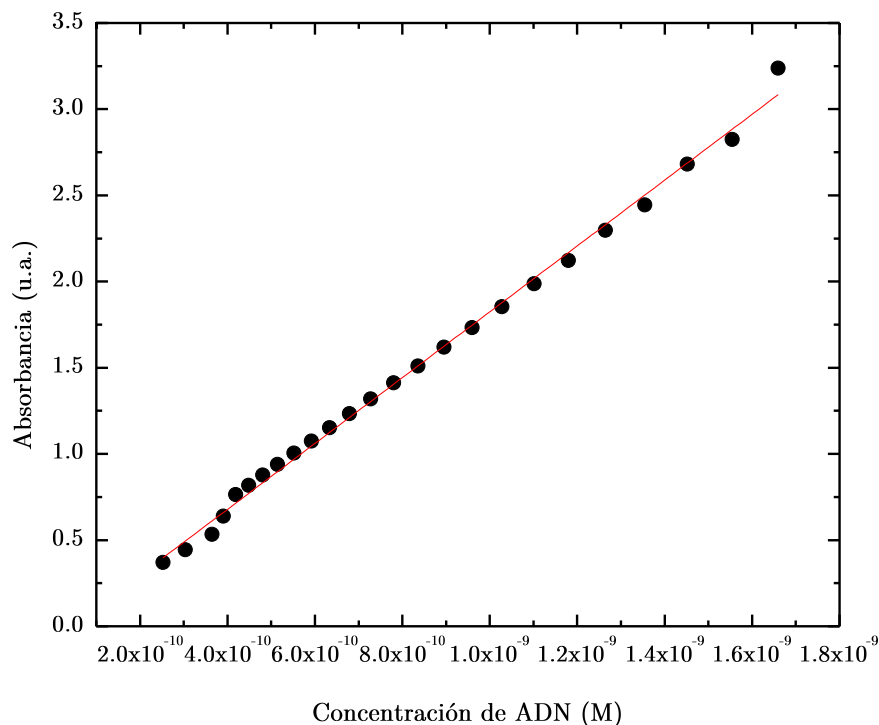


Fig. 7.27 Curva de calibración de ADN a distinta concentración.

Donde l corresponde a la longitud que atraviesa la luz en el medio y se toma $l = 1\text{ cm}$, como especificación del equipo. De aquí se obtiene que: $\epsilon = 1.9099 \times 10^9 \pm 2.46 \times 10^7$, el cual es un valor mucho mayor al obtenido para los liposomas y corresponde a la cantidad de luz ($\lambda = 258\text{ nm}$) absorbida por la muestra por unidad de moles/litro.

Utilizando este resultado se puede calcular la [ADN] que se recupera mediante el proceso de purificación por etanol o por columna.

7.3 Lipoplejos catiónicos

La formación de los lipoplejos catiónicos se llevó a cabo utilizando liposomas DODAB-DOPC filtrados con el método de extrusión a tamaños menores de 100 nm y utilizando una muestra de ADN purificada anteriormente, el cual tiene tamaños cercanos a los 8,000 pb.

Este sistema se caracterizó utilizando DLS, electrocinética, UV-Vis, microscopía confocal y SEM. Además, se probó como tratamiento en las líneas celulares HeLa y MDA-MB-231. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las caracterizaciones realizadas.

7.3.1 Determinación de tamaños mediante DLS

Para la determinación de tamaños se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZS. Los lipoplejos se formaron utilizando una concentración de liposomas fija y una concentración de ADN variable con el fin de estudiar la variación de los tamaños en función de la concentración de ADN que se agrega y determinar las concentraciones adecuadas para utilizarse en las pruebas de viabilidad celular sin obtener agregados ni aumentar mucho el tamaño de los lipoplejos. Mediante el método de agitación magnética se aseguró la incorporación del ADN a los liposomas tratando de obtener una distribución lo más homogénea posible.

Los liposomas presentaron un tamaño promedio de 112 ± 3 nm como se reportó anteriormente, con un crecimiento que parte desde los 239 nm hasta los 625 nm para las concentraciones más baja y más alta de ADN, respectivamente. En la figura 7.28 se presenta el comportamiento obtenido para los lipoplejos DODAB-DOPC/ADN en función de la $[ADN]$ y se observa un crecimiento gradual de los tamaños, que se relacionan con el acomplejamiento del ADN a la superficie de los liposomas.

Se observa que para un volumen de ADN correspondiente a $15\ \mu\text{l}$ se obtuvieron agregados de lipoplejos, es decir, la solución se volvió inestable y los lipoplejos se sedimentaron rápidamente. Midiendo tamaños de hasta $3\ \mu\text{m}$ para esta concentración.

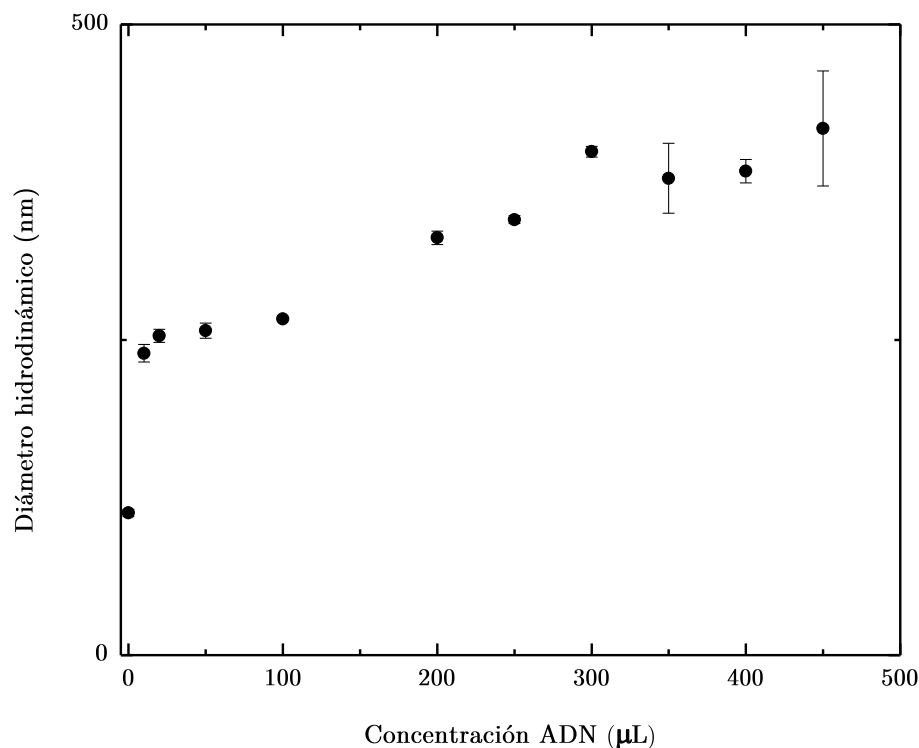


Figura 7.28 Diámetro hidrodinámico en función de la [ADN].

7.3.2 Propiedades electrocinéticas

Al igual que los liposomas, se midió el ζ de los lipoplejos en función de la concentración de ADN y se estudió su comportamiento con el fin de obtener lipoplejos con una baja carga superficial. Las muestras utilizadas para este experimento fueron tomadas de la medición de tamaños por DLS. Se observaron dos comportamientos importantes, el primero, es la disminución de ζ en función del aumento de la [ADN] obteniendo lipoplejos con ζ positivo para bajas [ADN] y con ζ negativo para concentraciones altas de ADN. En la figura 7.29 se muestra el comportamiento de ζ en función del volumen de ADN. Se observa que para 15 μl de ADN, la cual es la misma concentración donde se obtuvieron agregados en la medición por tamaños, el ζ es cercano a cero. En este punto se encuentra la concentración en donde las cargas superficiales de liposoma y ADN se igualan, i.e., se neutralizan. A este punto también se le conoce como punto isoeléctrico.

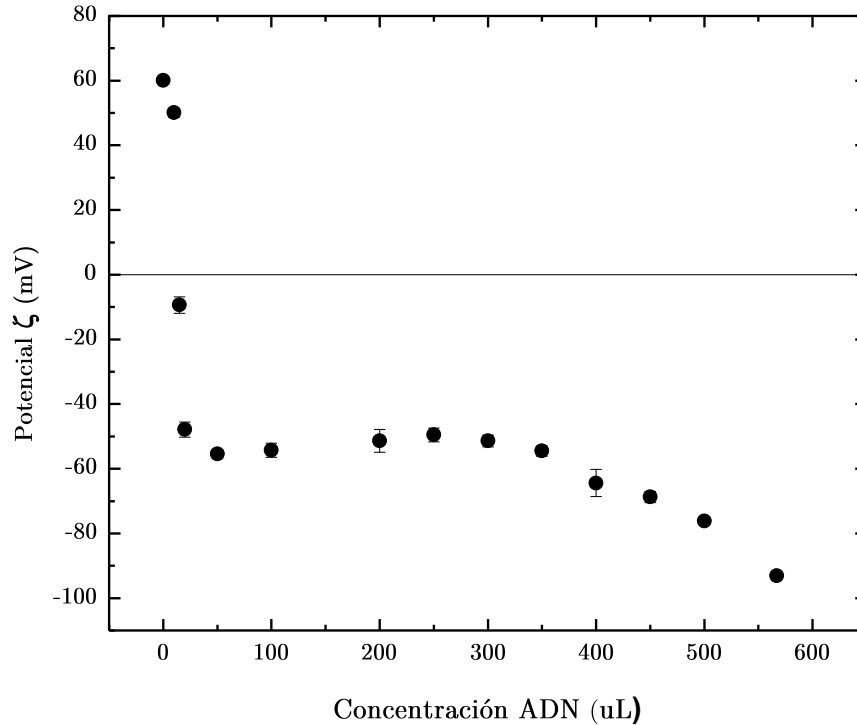


Figura 7.29 Comportamiento del ζ de los lipoplejos con el aumento de la [ADN].

Comparando los resultados con aquellos obtenidos en la figura 7.28, se observa como al ir disminuyendo aún más los valores del ζ (aumentando la concentración de ADN) los agregados desaparecen, i.e., los agregados se desagregan con el aumento de la [ADN], quedando nuevamente los lipoplejos separados, pero con carga superficial negativa por el exceso de ADN en la superficie del liposoma. A este comportamiento se conoce como *fenómeno de inversión de carga* [63], y debido a la *doble capa eléctrica*, la cual es una capa de iones o polielectrolitos acumulados sobre una superficie cargada de una macroión (como el liposoma) y que logran apantallar la carga superficie de este último.

En las pruebas de viabilidad celular se utilizarán concentraciones vecinas al punto isoeléctrico, con el fin de promover la interacción coulombiana entre los lipoplejos y las células cancerígenas y así estudiar los resultados, con la visión de que este sistema se utilizará in vivo, donde la carga eléctrica juega un papel importante.

7.3.3 Micrografías de CLSM

Con el fin de visualizar mediante imágenes, la unión del ADN con los liposomas, se hizo uso de la técnica de microscopía confocal de fluorescencia. Para ello se utilizaron liposomas marcados con el marcador fluorescente NBD en liposomas sin filtrar, ya que se requieren liposomas de mayor tamaño debido al límite inferior de la resolución del microscopio utilizado. Estos liposomas marcados se acomplejaron con ADN, también marcado fluorescentemente con DAPI.

El lípido marcado NBD-PE presenta fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 463 nm y emite en 536 nm, mientras que la longitud de onda de excitación del DAPI es de 340 nm y su emisión es de 488 nm. Para la preparación de la muestra de liposomas se realizó una separación de tamaños por centrifugación para separar los liposomas de tamaños muy pequeños de la solución y para eliminar la fluorescencia de fondo. A una muestra de ADN de 15 μl se le añadió una [DAPI] de a 10^{-6} M. En las micrografías de la figura 7.30 se muestran tres imágenes por fluorescencia, (A) corresponde a la emisión de los lípidos marcados con el fluorocromo NBD, (B) corresponde a la imagen obtenida de la emisión del DAPI y finalmente (C) muestra las dos emisiones. En las micrografías, tanto de NBD-PE como del DAPI, se observan claramente cómo las regiones en donde emite NBD existe emisión de DAPI, lo que sugiere que el ADN efectivamente se encuentra unido a la superficie de los liposomas formando los lipoplejos.

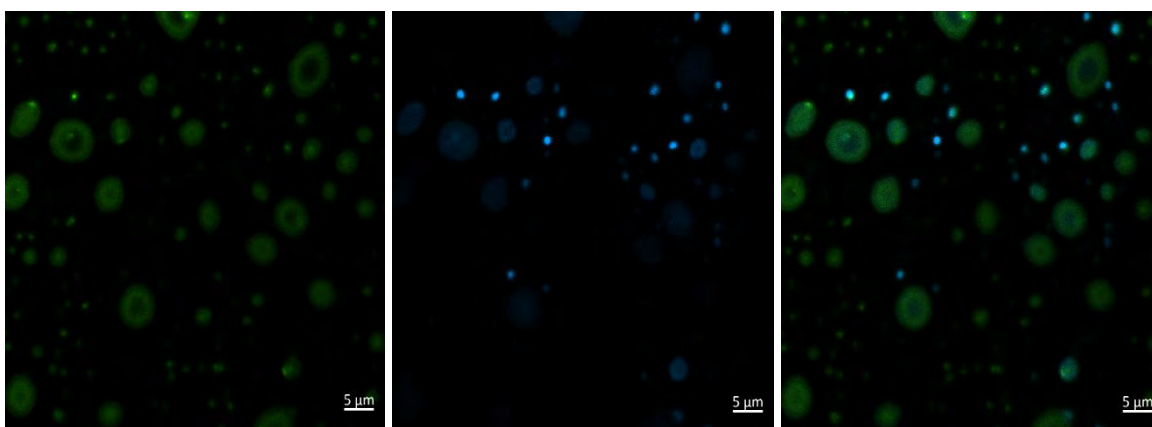


Figura 7.30 Micrografías obtenidas por CLSM. Emisión de lípidos marcados con NBD (A), emisión de ADN marcado con DAPI (B) y ambas emisiones NBD y DAPI (C).

Sin embargo, la distribución de ADN no resulta ser homogénea para todos los liposomas, puesto que se observan regiones con mayor emisión de DAPI que en otras. Incluso, hay liposomas que parecen no tener ADN en su superficie ya que no se observa emisión de DAPI.

7.3.4 Micrografías de SEM

Debido a la resolución de la CLSM y a los tamaños de liposomas utilizados se observó ADN acomplejando la superficie de los liposomas sin modificar aparentemente el tamaño hidrodinámico de los lipoplejos, mientras que en las mediciones utilizando DLS se observó un aumento del diámetro hidrodinámico de los lipoplejos a medida que se agregó mayores [ADN]. Para resolver este fenómeno, se utilizó microscopía electrónica de barrido, ya que utilizando esta técnica se puede observar imágenes de liposomas de tamaños cercanos a 100 nm con claridad. Se realizó una medición de una solución de lipoplejos de DODAB-DOPC filtrados a 100 nm con un volumen de 17 μ l de ADN purificado y así observar los lipoplejos que se forman utilizando el método de agitación magnética (Fig. 7.31).

Esto resulta ser de suma importancia puesto que estos lipoplejos fueron utilizados en las pruebas de viabilidad celular que se presentan más adelante y fue importante observar las morfologías y tamaños de estos complejos.

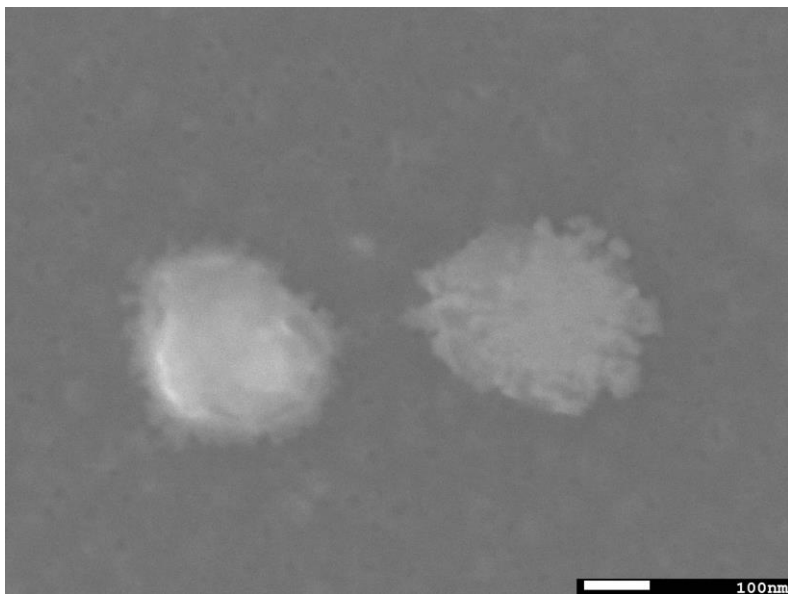


Fig. 7.31. Micrografía obtenida por SEM de los lipoplejos, en el modo de electrones secundarios.

En la figura se presenta una micrografía de una muestra de lipoplejos utilizando SEM mediante el método de tinción negativa con PTA al 2% y se observa lo que parecen ser liposomas con irregularidades en la superficie, las cuales se deben al ADN adherido a la superficie.

En la figura 7.32 se muestran dos micrografías de lipoplejos individuales, en donde se aprecia mejor el contorno formado por el ADN sobre la superficie de los liposomas. Se aprecia un aumento del diámetro del complejo de aproximadamente 271 nm hasta 384 nm. Este resultado sigue el comportamiento que se observó por DLS. Además, se observa claramente cómo el ADN no está distribuido de manera uniforme alrededor del liposoma si no que forma dominios (observados también mediante CLSM) sobre la superficie.

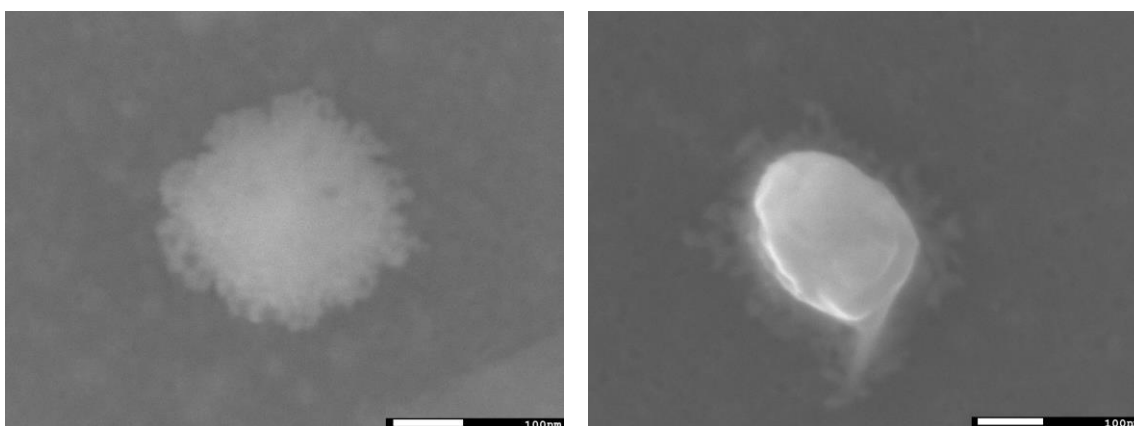


Fig. 7.32. Micrografía de SEM de los lipoplejos, en el modo de electrones secundarios.

Se encontró que en promedio los tamaños de los lipoplejos fueron de 219 nm con solo agregar un volumen de 17 μl de ADN a 2.5×10^{-8} M a un volumen de 287 μl de liposomas, en comparación de los 98 nm obtenidos para en las mediciones de los liposomas sin acomplejar.

7.3.5 Espectroscopia UV-Vis

Para el caso de los lipoplejos, al igual que con la muestra de liposomas y ADN, se realizó una medición de la absorbancia de lipoplejos en HEPES, en un rango de entre 200 y 900 nm. Los lipoplejos se formaron utilizando una concentración fija de liposomas a 3.86×10^{-5} M y un volumen de ADN de 17 μl , lo cual es aproximadamente la [ADN]

de 8.5×10^{-10} M. Se utilizaron distintas concentraciones partiendo de una de 3.86×10^{-5} a 9.4×10^{-5} M. En estas medidas (figura 7.33) se observan dos bandas de absorción en $\lambda_1 = 210$ nm y $\lambda_2 = 255$ nm, comparando con los picos de absorción obtenidos en los experimentos para ADN (figura 7.12) y liposomas (figura 7.25) en solución. Existe una relación con los picos obtenidos para la solución de ADN, cuyos máximos se encontraron posicionados en $\lambda_1 = 212$ nm y $\lambda_2 = 258$ nm. Este corrimiento de los máximos de absorción puede deberse a la [ADN], pues se observó que al disminuir su concentración hay un corrimiento de los picos de absorción hacia la izquierda.

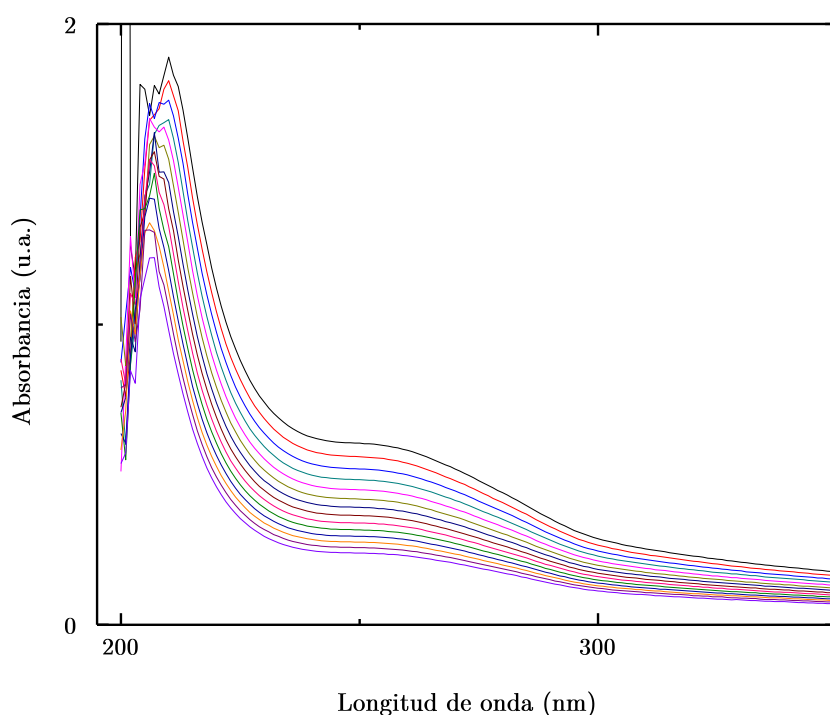


Fig. 7.33. Curvas de absorción UV-Vis de lipoplejos a distintas concentraciones.

Por otra parte, si en la misma solución existiesen liposomas que no se unieron con el ADN, entonces debería aparecer un pico de absorción cercano a $\lambda = 228$ nm, correspondiente a los liposomas, sin embargo, en esta curva no aprecia esto, puesto que la mayoría de los liposomas se encuentran recubiertos de ADN y la absorción en $\lambda = 228$ nm se ve apantallada por el gran pico en $\lambda_1 = 212$ nm del ADN.

En base a las curvas de absorción obtenidas, se construyó una curva de calibración para la muestra de lipoplejos, graficando [lipoplejos] (M) vs. absorbancia (u.a.) en $\lambda = 255$ nm, obteniendo la curva de la figura 7.34.

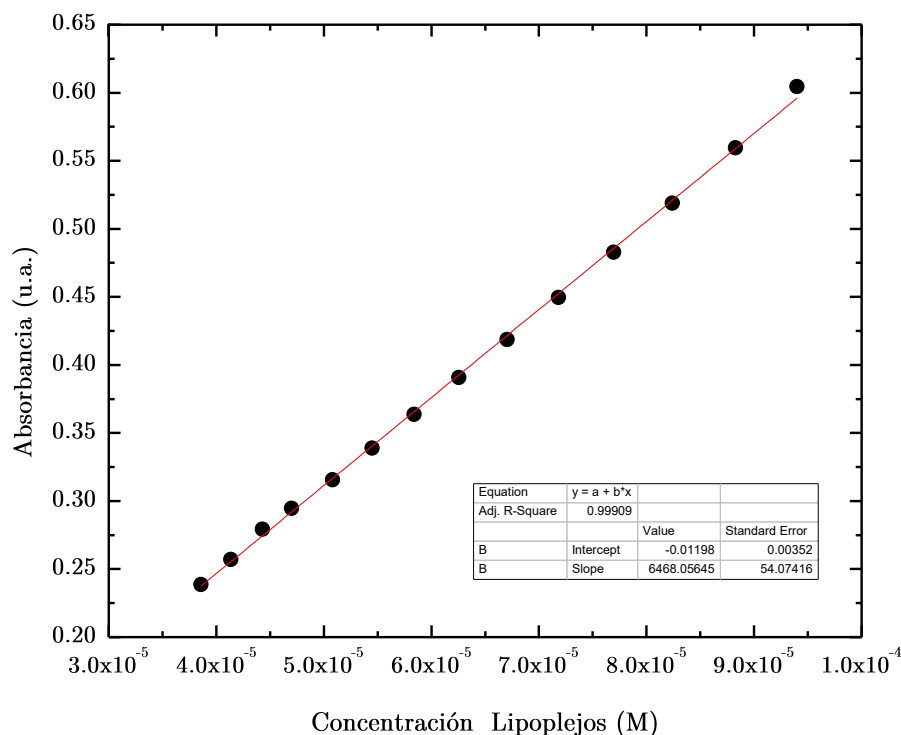


Fig. 7.34. Curva de calibración de lipoplejos a distintas concentraciones.

Nuevamente, se realizó una aproximación lineal a los puntos obtenidos y relacionando la ecuación asociada a la curva obtenida con la ley de Beer-Lambert se obtiene:

$$y = 6468.05 \pm 54.07x$$

De la ecuación de Beer-Lambert $A = \epsilon cl$ se obtiene que: $\epsilon = 6468.05 \pm 54.07$.

Utilizando este resultado se puede calcular la [liposomas] realizados bajo estas concentraciones. En el caso de disminuir la [ADN] se espera que gane protagonismo el pico de absorbancia en $\lambda = 228$ nm, debido a que más liposomas quedarían libres sin unirse al ADN.

7.3.6 Pruebas de viabilidad celular

Las pruebas de viabilidad celular se realizaron también utilizando lipoplejos. Para la formación de estos, se utilizaron liposomas catiónicos fabricados con DODAB-DOPC a una concentración de 40 μM , y filtrados utilizando un filtro con un tamaño de poro de 100 nm. Se formaron lipoplejos con cuatro [ADN] distintas con el fin de estudiar los posibles cambios en toxicidad de los lipoplejos al agregar ADN o aumentar la [ADN].

Nuevamente, los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad fueron mediante un ensayo de MTT. Se sembró una cantidad aproximada de 5,000 células MDA-MB-231 y HeLa por pozo, previamente contabilizadas utilizando una cámara de Neubauer. Se utilizaron como control, células sin tratamiento, células con liposomas a 40 μM y células con 10 μL de ADN, los ensayos se realizaron con triplicado y se variaron los volúmenes de ADN de 10 a 5 μl .

La figura 7.35 muestra los resultados obtenidos en este ensayo. En el caso de las células tratadas con liposomas catiónicos se observa únicamente una reducción del 10% de células vivas mientras que, para células en donde se utilizó ADN como tratamiento, se observa una reducción del 4.3%. Utilizando lipoplejos como tratamiento, se observa un porcentaje de muerte del 17.6% en promedio, y dentro de estas concentraciones de ADN cercanas al punto isoelectrico no se observa un incremento en la toxicidad, sin embargo, es importante señalar que los lipoplejos aumentan la toxicidad con respecto a los liposomas y ADN por separado, este comportamiento fue observado y estudiado por Lap Thi Nguyen y col. [64] asociándolo con una sinergia entre el ADN y los liposomas catiónicos y no necesariamente al tipo de ADN o célula.

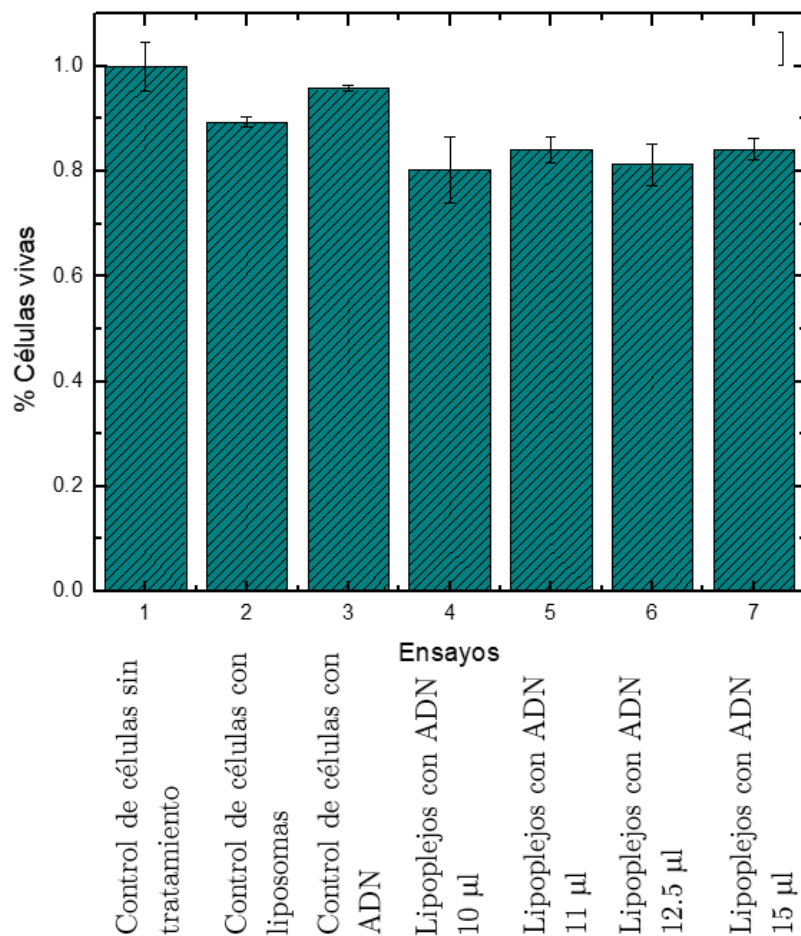


Fig. 7.35. Histograma de % células vivas MDA-MB-231 utilizando como tratamiento lipoplejos a distintas [ADN].

Se realizó el mismo ensayo de toxicidad con células HeLa CCL-2 manteniendo las mismas concentraciones utilizadas para células MDA-MB-231. Se encontró que estas células resultaron ser más sensibles al tratamiento con lipoplejos catiónicos, obteniendo un 30% de muerte celular para el tratamiento con liposomas con respecto al control sin tratamiento. Por otro lado, para el control de células con ADN existe una reducción del 9% de células vivas, lo cual indica que el ADN no resulta ser muy tóxico para las células HeLa CCL-2. Sin embargo, se aprecia nuevamente el incremento en la toxicidad de los lipoplejos con respecto a los liposomas y ADN separados obteniendo en promedio una viabilidad celular del 60.2% para las cuatro [ADN]. En la figura 7.36 se muestran los resultados obtenidos de este ensayo, en donde no se aprecia un aumento en la toxicidad de los lipoplejos a en este intervalo de [ADN].

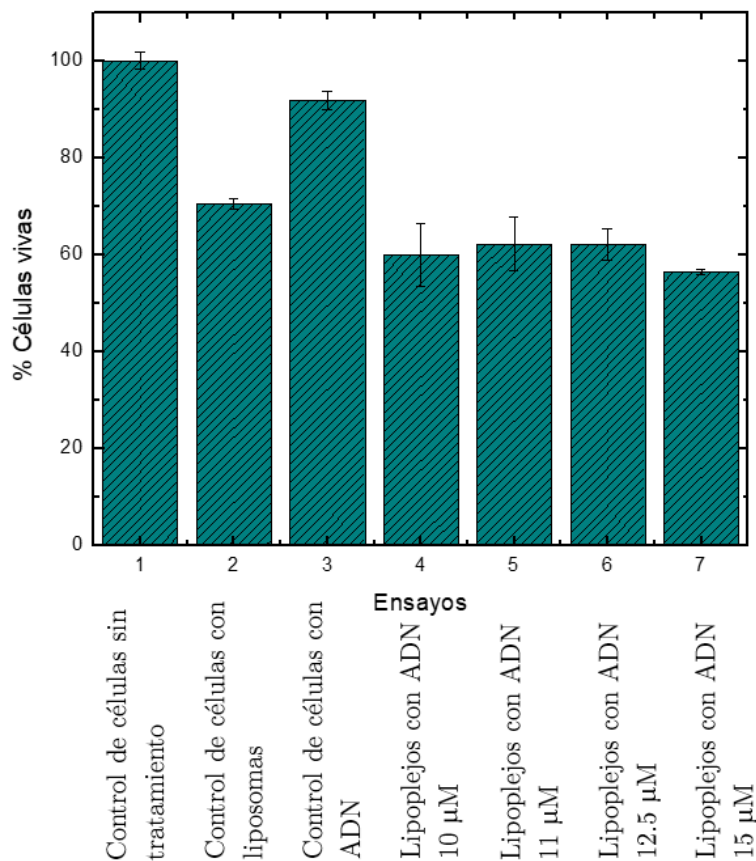


Fig. 7.36. Curva de calibración de lipoplejos a distinta concentración.

De estos resultados se observa que las células MDA-MB-231 son más resistentes al tratamiento de liposomas catiónicos, mientras los lipoplejos catiónicos producen alta toxicidad reduciendo cerca del 40% las células HeLa CCL-2 vivas. Además, en las concentraciones cercanas al punto isoeléctrico, i.e., en conformaciones de lipoplejos en donde el potencial zeta es bajo, no se observa un incremento de toxicidad en las pruebas realizadas.

8 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se pueden determinar las siguientes conclusiones:

1. Utilizando el método de extrusión y agitación magnética fue posible obtener liposomas y lipoplejos de manera exitosa y de acuerdo tamaños deseados.

2. Mediante centrifugación es posible separar los tamaños de los liposomas modificando la velocidad de centrifugación, de tal manera que, es relativamente sencillo separar los liposomas pequeños que se forman durante el proceso de fabricación.

3. Utilizando los liposomas centrifugados, se midió el módulo elástico de los liposomas mediante DLS, con base al modelo de Zilman–Granek [57], obteniendo resultados prometedores muy similares a los resultados encontrados en la bibliografía (X. Liang y col. [58]).

4. Se determino el tamaño del ADN utilizado, mediante electroforesis en gel, el cual es de $\sim 8,000$ pb.

5. Se confirmó la formación de los lipoplejos mediante los estudios de DLS, con la cual se determinaron los tamaños; de electroforesis, con la cual se determinó el potencial zeta. Además, se obtuvieron micrografías de los sistemas mediante CLSM, TEM y SEM.

6. Se determinó un alto porcentaje de viabilidad de las células de MDA-MB-231, con los ensayos citotóxicos de transfección de los lipoplejos. Mientras que para las células HeLa, los ensayos citotóxicos muestran una baja viabilidad.

9 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis abren como perspectivas:

1. El uso de distintos fosfolípidos y nuevas formulaciones con el fin de reducir la toxicidad de los liposomas catiónicos utilizados como vehículo transportador de genes. Acción que llevaría a reducir los niveles de toxicidad en diferentes células usadas.
2. Caracterizar con otras técnicas experimentales, tanto los sistemas usados como los propuestos, como lo son: microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) y SEM ambiental y Cryo-TEM, etc.
3. Profundizar los ensayos de transfección de los sistemas estudiados en células, para lograr comprender mejor los mecanismos de internalización de los liposomas y lipoplejos.
4. Estudiar el efecto de los lipoplejos, en células con enfermedades específicas, utilizando ADN plasmídico con secuencias específicas para transcribir el gen específico a estas células.

10 BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. Laín Entralgo. Historia de la medicina 1er ed. Salvat Editores, S. A. Barcelona, España. Pag 16 (1978).
- [2] Enrique Daniel Austin-Ward. Gene Therapy and its applications, Rev. Méd. Chile v.126 n.7 (1998).
- [3] Paulina Wyrozumka et al. Synthetic Vectors for genetic drug delivery. M.R. Mozafari (ed.), Nano carrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy, 139-174. Springer (2006).
- [4] Samppa Ryhänen. Biophysical studies on cationic liposomes - Implications for self-assembly and mechanism of lipofection. Helsinki university biomedical dissertations No.71 (2006).
- [5] Anas El-Aneed. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. Journal of controlled release 94: 1-14 (2004).
- [6] Davis BR. Micro-injection-mediated hematopoietic stem cell gene therapy. Curr Opin Mol Ther, 412-9 (2000).
- [7] Lambrecht L. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. Expert Opin Drug Deliv. 295-310 (2016).
- [8] Barbara Wetzer, Gerardo Byk et al. Reductible cationic lipids for gene transfer. Biochemistry journal Great Britain, 356, 747-456 (2001).
- [9] Cavazzana-Calvo et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency-X1 disease, 288:669-672 (2000).
- [10] The Journal of Gene Medicine –<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>
- [11] Samaneh Mahaghi et al. Lipid nanotechnology. Int. J. Mol. Sci. 14:4242-4282 (2013).
- [12] Bruce Alberts, Alexander Johnson et al. Molecular Biology of the cell 5th ed. Garland Science, NY, USA. Pag 197-201 (2008).
- [13] Samaneh Mahaghi et al. Lipid nanotechnology. Int. J. Mol. Sci. 14:4242-4282 (2013).
- [14] G. J. Nabel et al. Direct gene transfer with DNA-Liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. Proc. Natl Acad. Sci. USA. Vol- 90 pp. 11307-11311 (1993).

- [15] Sandra Gromelski and Gerald Brezesinski. DNA condensation and interaction with Zwitterionic phospholipids mediated by divalent cations. *Langmuir*, 22, 6293-6301 (2006).
- [16] Jacob N. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces* 3rd ed. Elsevier, Burlington, MA, USA. Pag. 536-550 (2011).
- [17] A. D. Bangham et al. Lipid bilayers and biomembranes. *Annual Review of Biochemistry*. Vol 41:753-776 (1972).
- [18] Arcan Güven, et al. Rapid and efficient method for the size separation of homogeneous fluorescein-encapsulating liposomes. *Journal of Liposome Research*, 19(2):148-154 (2009).
- [19] L.D. Mayer, et al. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta*, Elsevier 858:161-168 (1986).
- [20] Sérgio Simões, et al. Cationic Liposomes for Gene Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2(2) (2005).
- [21] Cyrus R. Safinya, et al. Cationic Liposome-DNA complexes: From liquid crystal science to gene delivery applications. *Phil. Tras. R. Soc. A* 364, 2573-2596 (2006).
- [22] National Cancer Institute – What is Cancer?. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [23] S. Jain. Et al. Gold Nanoparticles As Novel Agents For Cancer Therapy. *The British Journal of Radiology*. 85:101-113 (2012).
- [24] Svetlana A. Tatarkova and Satvinder Khaira. Characterization of Liposomes For Cancer Cell Transfection. *The Open Biomedical Engineering Journal*. 1:60-63 (2007).
- [25] Anas El-Aneed. An Overview of Current Delivery Systes in Cancer Gene Therapy. *Journal of Controlled Release* 94:1-14 (2004).
- [26] Jean-Paul Behr. Gene Transfer with Synthetic Cationic Amphiphiles: Prospects for Gene Therapy. *Bioconjugate Chem.* 5,382-389 (1994).
- [27] Xiaohuai Zhou, Leaf Huang. DNA Transfection Mediated by Cationic Liposomes Containing Lipopolysine: Characterization and Mechanism of Action. *Biochimica et biophysica Acta*. Vol. 1189, 195-203 (1994).
- [28] Marcel B. Bally. Et al. Biological Barriers to Cellular Delivery of Lipid-Based DNA Carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 38, 291-315 (1999).

- [29] Filion, M.C., et al., Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim Biophys* 1329(2): 345-356 (1997).
- [30] Lv, H., et al., Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control Release* 114(1): 100-109 (2004).
- [31] Nguyen, L.T., et al., Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biol. Pharm. Bull.* 30(4): 751-757 (2007).
- [32] Almofti, M.R., et al., Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. *Arch. Biochem. Biophys.* 410(2): 246-253 (2003).
- [33] Marija Brjles, et al. Influence of charge ratio of liposome/DNA complexes on their size after extrusión and transfection activity. *International Journal of Nanomedicine.* 393-401 (2012).
- [34] Pedro Pires, et al. Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1418 71-84 (1999).
- [35] M. Angelova y D. S. Dimitrov. A mechanism of liposome electroformation. *Progress in Colloid & Polymer Science.* 76:59-67 (1988).
- [36] Abolfazl Akbarzadeh et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters.* 8:102 (2013).
- [37] <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/#orderinginformation>
- [38] Carmen Alicia Padilla Peña. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.
- [39] Global Gel Electrophoresis Apparatus market <https://apexmarketreports.com/index.php#sample>
- [40] Motahareh Arjomandnejad MSc, et Al. HeLa Cell Line Xenograft Tumor as a Suitable Cervical Cancer Model: Growth Kinetic Characterization and Immunohistochemistry Array. *Archives of Iranian Medicine, Volume 17, No. 4* (2014).
- [41] L.D. Mayer, M.J. Hope and P.R. Cullis. Vesicles of variable sizes produced by rapid extrusion procedure. Elsevier, *Biochimica et Biophysica Acta* 858 161-168 (1996).
- [42] Lipex TM. 10/1.5 mL Thermobarrel and regular barrel extruder. Assembly and operation manual (2006).

- [43] Güven A et. Al. Rapid and efficient method for the size separation of homogeneous fluorescein-encapsulating liposomes. *Journal of liposome research* 19(2):148-154 (2009).
- [44] Cecília N.C. Sobral et al. Characterization of DODAB/DPPC vesicles. *Chemistry and physics of lipids* 152:38-45 (2008).
- [45] Bruce J. Berne, Robert Pecora. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry Biology, and Physics*. Courier Corporation (2000).
- [46] Olympus. *Zetasizer Nano User Manual*. MANO485 Issue 1.1. Malvern Instruments. (2013).
- [47] R. Iñiguez-Palomares et al. Effect of polymer on the elasticity of surfactant membranes: A light scattering study, *Phys. Rev. E* 84, 011604 (2011).
- [48] A. Arteaga-Jiménez et al. Polimorfismo de Liposomas, *Epistemus, UniSon*. (2015).
- [49] Peña DH, Camacho DM, Escobedo AF. Velocimetría Doppler de las arterias uterinas en el embarazo. *Rev Esp Med Quir.* 13 (4) (2008).
- [50] Theory of Confocal Microscopy. <http://flouview.magnet.fsu.edu/theory/confocalintro.html>
- [51] Negative Staining. Bio-imaging, SWDSOP (2010).
- [52] Spectroscopy in a Suitcase. Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV). *Advancing the Chemical Sciences*. RSC. (2009).
- [53] Skoog D.A. et al. *Principios de Análisis Instrumental*, 5 ed. McGraw-Hill pag. 353-367 (1998).
- [54] Katsumi Matsuzaki et al. Optical Characterization of Liposomes by Right Angle Light Scattering and Turbidity Measurement. *Biochimica et Biophysica Acta* 1467 219-226. (2000).
- [55] Malin Ardhhammar, Per Lincoln, Bengt Nordén. Invisible Liposomes: Refractive Index Matching With Sucrose Enables Flow Dichroism Assessment Of Peptide Orientation In Lipid Vesicle Membrane. *PNAS* vol. 99 no. 24 15315-15317 (2002).
- [56] Yifan Ma, et al. The role of Surface charge density in cationic liposome-promoted dendritic cell maturation and vaccine-induced immune responses. *Nanoscale*, 3 2307-2314 (2011).
- [57] A. G. Zilman and R. Granek. Undulations and Dynamic Structure Factor of Membranes. *Physical Review Letters*. Vol. 77 No. 23 (1996).

[58] Xuemei Liang, et al. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *Jornal of colloid and interface science.* 278, 53-62 (2004).

[59] Standard Protocols DNA shearing for Bioruptor Pico https://www.diagenode.com/files/protocols/Standard_protocols_for_DNAShearing.pdf

[60] Yuhong Xu, et al. Physicochemical Characterization and Purification of cationic lipoplexes. *Biophysical Journal* Vol. 77 341-353 (1999).

[61] QIAquick Gel Extraction Kit <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/dna-clean-up/qiaquick-gel-extraction-kit/#technicalspecification>

[62] Thermo Scientific <http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>

[63] Alberto Martín-Molina, César Rodríguez-Beas and Jordi Faraudo. Charge Reversal in Anionic Liposomes: Experimental Demonstration and Molecular Origin. *Physical Review Letters* 104, 168103 (2010).

[64] Lap Thi Nguyen et al. Complex Formation with Plasmid DNA Increases the Cytotoxicity of Cationic Liposomes. *Biol. Pharm. Bull.* 30(4) 751-757 (2007).