

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FÍSICA**

POSGRADO EN NANOTECNOLOGÍA

**Manipulación nanotecnológica de células para el
tratamiento de enfermedades crónico degenerativas**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

BALTAZAR HIRAM LEAL MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSUÉ ELÍAS JUÁREZ ONOFRE

COORDIRECTOR DE TESIS:

DR. PABLO TABOADA ANTELO

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 Doctorado: **“Manipulación nanotecnológica de células para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas”**, presentada por:

BALTAZAR HIRAM LEAL MARTÍNEZ

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 Doctorado en Nanotecnología:

DR. JOSUÉ ELÍAS JUÁREZ ONOFRE

DR. MIGUEL ÁNGEL VALDÉS COVARRUBIAS

DRA. ROCÍO SUGICH MIRANDA

DR. PAÚL ZAVALA RIVERA

DR. PABLO TABOADA ANTELO (EXTERNO)

AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico y académico que me brindó durante la realización de mis estudios en el programa de Doctorado en Nanotecnología.

Al Dr. Josué Juárez, director de esta Tesis, por su paciencia, sus consejos, sus regaños y múltiples lecciones tanto académicas como de vida, ya que sin su ayuda no hubiese podido continuar este proyecto y llevarlo a buen puerto. Por no perder la fe en mí y por motivarme a seguir con mis estudios.

Al Dr. Pablo Taboada, co-director de este proyecto, quien fue una pieza clave en el desarrollo de este trabajo, por su apoyo académico, logístico y personal a lo largo de todos estos años y especialmente durante mi estancia doctoral en el Grupo de Física de Coloides y Partículas de la Universidad de Santiago de Compostela.

A la Dra. Silva Barbosa por su apoyo, regaños y consejos a lo largo de este proyecto.

Al comité de tesis por su asesoría, revisión, corrección y seguimiento durante las distintas etapas del desarrollo de este trabajo.

A mis entrañables amigos, compañeros de laboratorio y compañeros de café, Alberto Pardo, Mateo Blanco, Pablo Fernández, Ramón Rial, Vicente Domínguez, Ángel Daniel Garaboa, Ángel Aragón, Víctor García, Pablo Ventoso, por sus consejos, su amistad, por recibirme como a uno de los suyos durante mi estancia doctoral y por la incontable cantidad de anécdotas que vivimos y conocimos.

A la familia Blanco Rodríguez, Mateo, Carmela y Mariña, por su cariño, hospitalidad y una amistad que atesoro, a la familia Pardo Montero, Juan, Herminia, Juan, Daniel y Alberto por su amistad y gran cariño.

DEDICATORIA

A mis padres, Baltazar Leal y María Martínez, por siempre creer en mí y apoyarme; a mis hermanos, Reyna Leal y Misael Leal por su cariño y estima.

A mi amada esposa Heneisis, quien ha creído en mi desde que la conocí y me ha apoyado en los buenos tiempos, pero sobre todo en los malos, gracias por todo y por tanto.

ÍNDICE

VOTOS APROBATORIOS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIA.....	III
CAPÍTULO I.....	1
Enfermedades crónico degenerativas.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Epidemiología.....	2
1.2 Factores de riesgo generalizados.....	3
1.3 Una amenaza creciente.....	3
1.4 La respuesta mundial es insuficiente.....	3
1.5 Panorama Actual.....	4
HIPÓTESIS.....	6
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
REFERENCIAS.....	7
CAPÍTULO II.....	8
Nanovarillas de Oro.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Síntesis de GNRs.....	13
RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO LbL DE LAS GNRs.....	15
2.2.1 PSS/PLL/siRNA/HA-GNRs.....	15
2.2.2 (PSS/PLL/siRNA) ₂ /HA-GNRs.....	15
2.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA.....	16
2.3.1 Dispersión dinámica de Luz.....	16
2.3.2 Movilidad electroforética.....	16
2.3.3 Análisis cuantitativo de siRNA.....	17
2.3.4 Liberación in vitro.....	17
2.3.5 Liberación de siRNA asistida por proteasas.....	18
2.3.6 Liberación de siRNA asistida por luz en el infrarrojo cercano.....	18
2.4 ENSAYOS CELULARES.....	19
2.4.1 Líneas celulares.....	19

2.4.2 Toxicidad celular <i>in vitro</i> .	19
2.4.3 Internalización celular observada en TEM.	20
2.4.4 Internalización celular y silenciamiento génico por microscopía de fluorescencia.	20
2.4.5 Captación celular y silenciamiento génico por citometría de flujo.	22
RESULTADOS	23
2.5.1 Obtención y caracterización físico-química de GNRs recubiertos con siRNA.	24
2.5.2 Movilidad electroforética.	25
2.5.3 Dispersión dinámica de Luz.	25
2.5.4 Análisis cuantitativo del siRNA adsorbido.	26
2.5.5 Liberación de siRNA de GNR recubiertos con siRNA.	26
2.5.6 Liberación asistida por enzimas.	29
2.5.7 Liberación inducida por la luz NIR.	31
2.5.8 Citotoxicidad celular <i>in vitro</i> de GNRs recubiertos con siRNA.	32
2.5.9 Captación celular e internalización de GNRs recubiertos con siRNA.	33
2.5.10 Captación celular observada en TEM.	36
2.5.11 Captación celular y silenciamiento génico por citometría de flujo.	38
2.5.12 Actividad de silenciamiento del gen GFP.	39
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	47
CAPÍTULO III.	53
Nanopartículas de quitosano	53
INTRODUCCIÓN	54
MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.1.1 Síntesis y caracterización de derivados del quitosano.	59
3.1.2 Preparación de nanopartículas de quitosano.	60
CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA	61
3.2.1 Dispersión dinámica de la luz.	61
3.2.2 Movilidad electroforética.	61
3.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	62
3.2.4 Análisis cuantitativo de siRNA en CSNPs.	62
3.2.5 Ensayo de eficacia de unión.	63
3.2.6 Ensayo de estabilidad de siRNA en medio de cultivo.	63

3.2.7 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).	63
3.2.8 Estabilidad coloidal.	65
3.2.9 Estudios de liberación <i>in vitro</i> .	65
ENSAYOS CELULARES	65
3.3.1 Cultivo de células.	65
3.3.2 Citotoxicidad celular <i>in vitro</i> .	66
3.3.3 Captación celular y silenciamiento génico por microscopía de fluorescencia.	66
3.3.4 Captación celular y silenciamiento génico por citometría de flujo.	67
RESULTADOS	69
3.4.1 Síntesis y caracterización de derivados del quitosano.	69
3.4.2 Preparación y caracterización de nanopartículas de quitosano.	69
3.4.3 Energética de la formación de las CSNPs.	73
3.4.4 Encapsulación de siRNA dentro de nanopartículas de quitosano.	78
3.4.5 Estabilidad coloidal de las nanopartículas.	83
3.4.6 Estabilidad del siRNA encapsulado.	86
3.4.7 Liberación del siRNA.	88
3.4.8 Biocompatibilidad celular <i>in vitro</i> .	92
3.4.9 Captación celular y eficiencia de transfección.	95
3.4.10 Eficiencia del silenciamiento del gen del siRNA.	100
CONCLUSIONES	103
REFERENCIAS	105
CAPÍTULO IV.	114
Nanopartículas de PLGA.	114
INTRODUCCIÓN	115
TRATAMIENTOS PARA INFARTOS DE MIOCARDIO	119
4.1.1 Reperusión farmacológica.	119
4.1.2 Reperusión mecánica.	119
APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA	120
ANTECEDENTES	123
4.2.1 Enfoque con factores de crecimiento para enfermedades cardiovasculares.	123
4.2.2 Enfoque con hidrogeles de alginato para enfermedades cardiovasculares.	124
4.2.3 Enfoque con óxidos de hierro súperparamagnéticos para enfermedades cardiovasculares.	126

4.2.4 Direccionamiento de nanopartículas mediante el uso de péptidos y anticuerpos.	127
4.2.5 Enfoque con nanopartículas de polímeros cargadas con fármacos para enfermedades cardiovasculares.	128
4.2.6 Enfoque con nanopartículas colectoras de lipoproteínas de baja densidad para enfermedades cardiovasculares.	130
4.2.7 Enfoque con nanopartículas para diagnóstico e imagen médica.	131
JUSTIFICACIÓN	133
4.3 Comparado con las tecnologías existentes, el presente proyecto ofrece:	134
MATERIALES Y MÉTODOS	135
4.4.1 Fabricación de nanopartículas de PLGA.	135
4.4.2 Funcionalización de las nanopartículas con anticuerpo VCAM.	136
CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.	136
4.5.1 Medición del tamaño de las nanopartículas.	136
4.5.2 Medición de potencial zeta de las nanopartículas.	137
4.5.3 Espectroscopia de Infrarrojo.	137
4.5.4 Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).	138
4.5.5 Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).	138
ENSAYOS CON CULTIVOS CELULARES.	138
4.6.1 Condiciones estándar de cultivo.	138
4.6.2 Ensayos de citotoxicidad.	138
4.6.3 Análisis cuantitativo del miRNA.	139
4.6.4 Ensayos ELISA (ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas).	140
4.6.5 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).	140
IMÁGENES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.	141
4.7.1 Internalización de nanopartículas con siRNA.	141
4.7.2 Cambio de morfología.	141
4.7.3 Internalización de Ox-LDL.	142
4.7.4 Expresión de los receptores VCAM e ICAM-1.	142
ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO	143
4.8.1 Captación celular de Ox-LDL.	143
RESULTADOS	145
4.9.1 Caracterización de las nanopartículas de PLGA.	145
4.9.2 Potencial zeta.	147

4.9.3 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión.....	149
4.9.4 Imágenes de microscopía electrónica de barrido.....	149
4.9.5 Espectros de FTIR.....	150
ENSAYOS CON CULTIVOS CELULARES.....	151
4.10.1 Ensayos de citotoxicidad.....	151
4.10.2 Ensayos ELISA.....	154
4.10.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	156
4.10.4 Internalización de nanopartículas con siRNA.....	159
4.10.5 Cambio de morfología.....	163
4.10.6 Internalización de Ox-LDL.....	166
4.10.7 Expresión de los receptores VCAM e ICAM-1.....	169
ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	172
4.11.1 Análisis FACS de la captación celular de Ox-LDL por células RAW 264.7 y HUVEC.....	172
CONCLUSIONES.....	176
REFERENCIAS.....	178
ANEXO:.....	188
Artículos.....	188

CAPÍTULO I.

Enfermedades crónico degenerativas

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas son enfermedades de larga duración y por lo general de progresión lenta. Las enfermedades cardíacas, los infartos, el cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes, son las principales causas de mortalidad en el mundo, siendo responsables del 63% de las muertes. En 2008, 36 millones de personas murieron de una enfermedad crónica, de las cuales la mitad era de sexo femenino y el 29% era de menos de 60 años de edad [1].

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud. Lo son por varios factores: el gran número de casos afectados [2], su creciente contribución a la mortalidad general [3] la conformación en la causa más frecuente de incapacidad prematura y la complejidad y costo elevado de su tratamiento [4]. Su emergencia como problema de salud pública fue resultado de cambios sociales y económicos que modificaron el estilo de vida de un gran porcentaje de la población [5]. Los determinantes de la epidemia de ECNT tuvieron su origen en el progreso y la mejoría del nivel de vida y no podrán revertirse sin un enfoque individual, social e institucional.

1.1 Epidemiología.

Las ECNT son un grupo heterogéneo de padecimientos que contribuye a la mortalidad mediante un pequeño número de desenlaces (diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedad vascular cerebral). Los decesos son consecuencia de un proceso iniciado décadas antes [6]. La evolución natural de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares puede modificarse con acciones que cambien el curso clínico de las condiciones que determinan su incidencia [7-11]. Entre ellas se encuentran el sobrepeso y la obesidad, las concentraciones anormales de los lípidos sanguíneos, la hipertensión arterial, el tabaquismo, el sedentarismo, la dieta inadecuada y el síndrome metabólico. Esta característica introduce oportunidades para la prevención, el desarrollo de herramientas pronósticas y la creación de modelos farmaco-económicos. Por ejemplo, al conocer las modificaciones de la prevalencia nacional de estas anomalías es posible pronosticar el daño de las ECNT y evaluar el efecto de las acciones preventivas. En consecuencia, la evolución natural de las ECNT permite la institución de programas

preventivos dirigidos a diferentes estratos de la población, con resultados cuantificables a mediano y largo plazo.

1.2 Factores de riesgo generalizados.

Las enfermedades crónicas graves tienen por causa factores de riesgo comunes y modificables. Dichos factores de riesgo explican la gran mayoría de las muertes por ese tipo de enfermedades a todas las edades, en hombres y mujeres y en todo el mundo.

Entre ellos destacan:

- alimentación poco sana;
- inactividad física;
- consumo de tabaco;

Cada año, como mínimo:

4,9 millones de personas mueren de resultados del tabaco;

2,6 millones de personas mueren como consecuencia de su sobrepeso u obesidad;

4,4 millones de personas mueren como resultado de unos niveles de colesterol total elevados;

7,1 millones de personas mueren como resultado de una tensión arterial elevada.

1.3 Una amenaza creciente.

Se prevé que las defunciones por el conjunto de enfermedades infecciosas, dolencias maternas y perinatales y carencias nutricionales disminuirán en un 3% durante los próximos 10 años, y que las defunciones por enfermedades crónicas aumentarán un 17% en ese mismo periodo. Eso significa que de los 64 millones de personas que fallecerán en 2015, 41 millones lo harán de enfermedades crónicas, a menos que se tomen medidas urgentes. Se estima que 388 millones de personas morirán en los próximos 10 años de una enfermedad crónica

1.4 La respuesta mundial es insuficiente.

Pese a algunos éxitos mundiales, como el Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco (CMCT de la OMS), que constituye el primer instrumento jurídico destinado a reducir las defunciones y las enfermedades relacionadas con el tabaco en todo el mundo, las actividades internacionales de salud y desarrollo han descuidado en general

las enfermedades crónicas. La salud entendida en sentido más amplio, incluida la prevención de las enfermedades crónicas, contribuye a la reducción de la pobreza y por lo tanto al Objetivo 1 (Erradicar la pobreza extrema y el hambre, La salud y los Objetivos de Desarrollo del Milenio. OMS 2005). En respuesta a sus necesidades, varios países han adaptado ya sus metas e indicadores de los ODM para incluir las enfermedades crónicas y/o sus factores de riesgo.

En el informe de 2018 presentado por la Organización Mundial de la Salud se demuestra que las enfermedades crónicas dificultan el crecimiento económico y reducen el potencial de desarrollo de los países, y esto se aplica en especial a los países de rápido crecimiento económico, como China y la India. Sin embargo, es importante que la prevención se aborde en el contexto de las actividades internacionales de salud y desarrollo, incluso en países menos adelantados, como la República Unida de Tanzania, que ya están experimentando un repunte de los riesgos de enfermedades crónicas y de las defunciones asociadas.

1.5 Panorama Actual.

La epidemia de ECNT es un fenómeno complejo que tiene sus raíces en las modificaciones del comportamiento de un elevado porcentaje de la población y en factores genéticos. Pese a múltiples esfuerzos, el número de casos afectados ha continuado en ascenso. Es improbable que una intervención aislada pueda modificar la incidencia o la evolución natural del padecimiento. Cada país debe instituir sus propias medidas, diseñadas a partir de experiencias internacionales, pero con la flexibilidad para aplicarlas en todos los estratos de la población.

En el presente trabajo nos dimos a la tarea de evaluar la eficacia de tres sistemas nanoestructurados para el tratamiento de dos enfermedades crónico degenerativas, el cáncer y la aterosclerosis, dichas enfermedades tienen una alta prevalencia y una alta mortalidad tanto a nivel mundial como a nivel nacional, afectando a dos demográficos puntuales, en mujeres los cánceres cérvix uterino y cáncer de mama y para el caso de los hombres la ateroescclerosis.

En primera instancia nos dimos a la tarea de fabricar un nanosistema basado en nanovarillas de oro recubiertas con polímeros biocompatibles y biodegradables, así como el uso de fragmentos cortos ácido ribonucleico de interferencia (siRNA) para la realización de una terapia dual contra líneas celulares cancerígenas, específicamente, HeLa y MDA-MB-231 como modelo para su aplicación en el tratamiento de cáncer cérvico-uterino y de mama. La terapia dual propuesta se compone dos fases, una terapia fototérmica, aprovechando las propiedades ópticas de las varillas de oro y una terapia génica, utilizando ARN de interferencia para silenciar un gen modelo de proteína verde fluorescente.

En segundo término, nos enfocamos en la fabricación de un nanosistema para la internalización de material genético al interior de las células para el tratamiento del cáncer cérvico-uterino utilizando nanopartículas del biopolímero quitosano el cual modificamos mediante una aminación reductiva para agregarle cadenas hidrofóbicas, las cuales le confieren nuevas propiedades que podemos utilizar para mejorar la interacción de las nanopartículas con las membranas celulares, así como mejorar su estabilidad en solución, regular su tamaño y potencial zeta, al igual que conferir una mayor protección para el material genético atrapado al interior de las nanopartículas.

Finalmente, como tercer proyecto nos dedicamos a fabricar un nanosistema basado en polímeros biocompatibles y biodegradables, ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y quitosano, con la finalidad de encapsular el fármaco Atorvastatina, ampliamente utilizado en la práctica médica para la inhibición del metabolismo de lípidos y la reducción del colesterol en el flujo sanguíneo. Utilizamos para esta finalidad un enfoque de terapia dual mediante el uso del fármaco antes citado y micro ácidos ribonucleicos (miRNA), el primero encapsulado entre las cadenas del polímero PLGA y el segundo acompañado de manera electrostática al polímero quitosano. El propósito de este nanosistema dual es la liberación controlada del material genético para el silenciamiento del gen responsable de la expresión de la interleucina 6, uno de los afectores del proceso de inflamación que es de vital importancia para el inicio y progresión de la aterosclerosis, así como la liberación controlada del fármaco atorvastatina que inhibe el metabolismo del colesterol al interior de la célula, ayuda a reducir la inflamación.

Los trabajos se describen a detalle en los capítulos II, III y IV respectivamente.

Para la realización de este trabajo nos planteamos la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

“Los nanosistemas fabricados serán capaces de llevar las moléculas biofuncionales al interior de las células, liberarlos y mantener su funcionalidad de terapia dual para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas”

OBJETIVO GENERAL

Fabricar sistemas de terapia dual para encapsular fármacos y material genético basados en nanopartículas metálicas y polímeros sintéticos y naturales para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Fabricar nanopartículas híbridas basadas en partículas inorgánicas y/o poliméricas que integren funcionalidades de terapia dual (génica y química) para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas.
- 2.- Caracterizar fisicoquímicamente los nanosistemas utilizando técnicas de microscopia electrónica de transmisión y de barrido, técnicas espectroscópicas para la determinación de las propiedades físicas, químicas y biológicas del nanosistema.
- 3.- Evaluación *in vitro* de las aproximaciones terapéuticas propuestas, así como la determinación de los mecanismos de señalización implicados en los procesos de disminución y/o desaparición de la enfermedad a tratar.

REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud. (2019). Enfermedades crónicas. Ginebra, Suiza. Recuperado de https://www.who.int/topics/chronic_diseases/es/.
- [2] Rivera JA, Barquera S, Gonzalez-Cossio T, Olaiz G, Sepulveda J. Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutr Rev* 2004;62(7 Pt 2):S149-S157.
- [3] González-Pier E, Gutiérrez-Delgado C, Stevens G, Barraza-Lloréns M, Porrás-Condey R, Carvalho N, et al. Definición de prioridades para las intervenciones de salud en el Sistema de Protección Social en Salud de México. *Salud Publica Mex* 2007;49 (suplI):S37-S52.
- [4] Bodenheimer T, Wagner E, Grumbach K. Improving primary care for patients with chronic illness. *JAMA* 2002;288:1775-1779.
- [5] World Health Organization. Preventing chronic diseases: WHO global report. Genova, Suiza: WHO, 2005.
- [6] Aguilar-Salinas CA, Mehta R, Rojas R, Gomez-Perez FJ, Olaiz G, Rull JA. Management of the metabolic syndrome as a strategy for preventing the macrovascular complications of type 2 diabetes: controversial issues. *Curr Diab Rev* 2005;1:145-158.
- [7] Epping-Jordan J, Galea G, Tukuitonga C, Beaglehole R. Preventing chronic diseases: taking stepwise action. *Lancet* 2005;366:1667-1671.
- [8] Lindstr_m J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson J, Hemio K, et al. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 2006;368:1673-1679.
- [9] Satterfiled D, Volansky M, Caspersen C, Engelgau M, Bowman B, Gregg E, et al. Community-based lifestyle interventions to prevent type 2 diabetes. *Diab Care* 2003;26:2643-2652.
- [10] Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high-risk individuals: a randomized placebo controlled trial. *Lancet* 2002;360:7-22.
- [11] Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet* 2000;355:253-259.
- [12] Organización Mundial de la Salud. (2019). Reporte de Enfermedades crónicas. Ginebra, Suiza. https://www.who.int/chp/chronic_disease_report/part1/es/index4.html.

CAPÍTULO II.

Nanovarillas de Oro

INTRODUCCIÓN

El ARN de interferencia de silenciamiento (siRNA, por sus siglas en inglés) es una molécula de ARN de cadena doble, la cual se fragmenta en ARN mensajero complementario (mRNA) a través del complejo enzimático RISC, suprimiendo la expresión de genes relacionados con enfermedades [1]. Como consecuencia, el silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia utilizando siRNA ha emergido rápidamente como una herramienta poderosa para la inhibición de la expresión de genes [2]. Su uso para este fin se deriva del descubrimiento de que múltiples enfermedades son consecuencia de una expresión anormal de genes, como el cáncer o diversas enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer o Parkinson). En consecuencia, una disminución en la expresión o el bloqueo total de estos genes en las células o tejidos específicos puede tener importantes beneficios terapéuticos. Sin embargo, existen algunos desafíos que tienen que superarse antes de que esta aproximación terapéutica pueda pasar a la práctica clínica convencional. Por ejemplo, la función de bloqueo del siRNA es obstaculizada por su baja o pobre biodistribución y su captación celular, su limitada estabilidad en la circulación sanguínea, y su rápida degradación por nucleasas y reacciones inmunes no específicas. Con la finalidad de abordar esta problemática, distintas metodologías para el transporte y la liberación de siRNA in vitro e in vivo han sido investigadas hasta el momento [2-6].

En este sentido, las nanopartículas (NP's) pueden ser consideradas como un eficiente y potente vector no viral para la encapsulación y transporte de polinucleótidos como plásmidos de ADN (pDNA) y siRNA para su distribución in vitro e in vivo, en la denominada terapia génica [3,4,7,8]. Estas NPs muestran características superiores comparadas con los actuales vectores de administración, principalmente transportadores virales que presentan una importante toxicidad asociada, reactividad inmune, potencial carcinogénico o un desarrollo de formas patogénicas del virus [9-12]. Distintos tipos de nanovectores como polímeros catiónicos [13,14], lípidos [15, 16] y nanopartículas [17-20] orgánicas e inorgánicas han sido utilizados para superar las dificultades antes mencionadas. Puntualmente, las nanopartículas basadas en sílice [7,

20], óxidos de hierro [19, 20] y oro [23, 24] han sido extensamente investigadas como sistemas emergentes de transporte y liberación de siRNA.

Las nanopartículas de oro (Au NPs) presentan distintas ventajas como potenciales nanovectores como son su biocompatibilidad, procesos de obtención/fabricación simples, facilidad para modificar su tamaño, forma y superficie, esta última, mediante la conjugación con biomoléculas [25]. Entre los diferentes tipos de Au NPs, las nanocilindros de oro (GNRs) son de especial interés debido a sus propiedades ópticas únicas. Los GNRs muestran dos bandas de plasmones de resonancia superficiales: el plasmón de resonancia superficial longitudinal, el cual puede ser ajustado en el espectro electromagnético hacia la región del infrarrojo cercano (NIR), donde la luz es transparente a los tejidos (la llamada ventana biológica, comprendida entre 700-1200 nm); y el plasmón de resonancia transversal, el cual está en el rango visible del espectro electromagnético. Además, los GNRs han sido ampliamente investigados debido a su intensa absorción transversal en el NIR y su alta eficiencia de conversión fototérmica [26]. Como consecuencia, este tipo de NPs ha sido propuesto como una herramienta prometedora en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer [27]. Adicionalmente, estas NPs poseen una gran relación área-volumen y su superficie se puede funcionalizar de manera sencilla, lo cual las hace un nanovector atractivo para transportar distintos tipos de fármacos [28, 29], agentes fotosensibilizadores [30], biomoléculas pequeñas [31] y material genético [32, 33]. Recientemente, distintos ejemplos de nanocomplejos multifuncionales de GNR-siRNA han sido desarrollados para combatir diversos tipos de cánceres como el de mama [32], páncreas [34], coloo-rectal [35] y tumores de cabeza y cuello [36]. En estos estudios, se ha comprobado que los complejos GNR-siRNA pueden ser potenciales nanovectores para terapia combinada (también denominada multimodal), pues pueden encapsular y transportar de forma simultánea siRNA, fármacos y/o ejercer como agentes fototérmicos y de imagen para el diagnóstico y el tratamiento de tumores [37-39].

No obstante, para utilizar los GNRs como nanoplataformas para terapia génica varias limitaciones deben de ser superadas: i) su carga positiva y la inherente citotoxicidad de la capa de surfactante (bromuro de cetil-trimetil amonio, CTAB) resultante del proceso de síntesis [40, 41], ii) la liberación no específica de la molécula bioactiva de interés, y

iii) la capacidad de direccionamiento no específica. La carga superficial positiva de los GNRs puede inducir una unión no específica con los componentes del suero sanguíneo, resultando en su agregación y que pueda dar lugar a un embolismo dentro del aparato circulatorio [42]. Por otra parte, la unión específica de las cargas positivas de los GNRs con las cargas negativas de las membranas celulares pueden inducir una liberación temprana del siRNA, resultando en la reducción drástica del efecto terapéutico deseado [42]. Para sortear estos inconvenientes, distintos recubrimientos superficiales han sido propuestos con la finalidad de reducir el efecto tóxico de los GNRs tales como “esconder” la capa de CTAB con polielectrólitos [40] y fosfolípidos [43] o bien, cambiando el surfactante por otras moléculas como polietilén glicol tiolado (PEG-SH) [44].

En este trabajo, desarrollamos una estrategia de recubrimiento capa por capa (LbL) de los GNRs con sulfonato de poliestireno (PSS) como capa aniónica y poli-L-lisina (PLL) como capa catiónica con el propósito de enmascarar la capa de CTAB tóxica [40, 45]. El siRNA se coloca de manera ensamblada entre las capas aprovechando la interacción electrostática de este con las cadenas subyacentes de PLL. Finalmente, se utilizó ácido hialurónico (HA) como capa más externa del recubrimiento de las NPs debido a su habilidad de evitar las interacciones no específicas con los componentes del suero sanguíneo [46], y para localizar y unirse con receptores CD44 típicamente sobre-expresados en algunos tipos de células cancerosas, como las de cáncer cervical y de mama [47, 48]; dicha habilidad permitirá tener una estrategia activa de direccionamiento de la nanoplateforma hacia las células o tejidos enfermos.

La exitosa formación de las diferentes capas de polímeros en los GNRs fue confirmada por el desplazamiento de la banda del plasmón de resonancia longitudinal de la NP metálica, así como la observación de los patrones en zig-zag típicos en sus valores de potencial zeta. Se observó que en condiciones fisiológicas simuladas (pH 7.4 mimetizando en el del plasma sanguíneo, y pH 5.5 mimetizando el entorno lisosomal citoplasmático) la liberación del siRNA de la nanoplateforma puede ser modulada de manera fácil gracias a la biodegradabilidad del PLL por las proteasas sanguíneas y/o a la sensibilidad a la luz del nanovector híbrido desarrollado bajo irradiación con luz NIR proporcionando, así, mecanismos controlados de activación endógenos y eógenos, respectivamente, de la liberación de las biomoléculas desde las nanoplateformas.

Además, se observó que el diseño de las mismas tiene una importante influencia tanto en la liberación de la carga terapéutica como en las propiedades fototérmicas, es decir, la presencia de un recubrimiento de dos capas de polímero-siRNA en las NPs permite velocidades de liberación más lentas y un efecto fototérmico mejorado in vitro en comparación con sus contrapartes con una sola capa. La plataforma híbrida de GNRs recubiertas con PE-siRNA mostraron ser biocompatibles además de ser captadas e internalizadas por células tumorales en importantes cantidades. Adicionalmente, la nanoplataforma fue capaz de liberar su contenido terapéutico al interior de las células, como se evidenció por microscopía de fluorescencia, dando lugar al apagamiento de la proteína verde fluorescente (GFP) sobre-expresada en la línea celular de tumor cervical modificada HeLa-GFP. Dicho apagamiento fue más eficiente cuando las plataformas híbridas recubiertas con dos capas de siRNA estuvieron bajo irradiación de luz NIR de baja intensidad (0.5 W/cm^2), proporcionando incluso mejores resultados terapéuticos que el vector Lipofectamine RNAiMAX, utilizado como control positivo en experimentos de transfección.

MATERIALES Y MÉTODOS

El bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB), ácido tetracloroáurico tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), nitrato de plata (AgNO_3), borohidruro de sodio (NaBH_4), poli(sodio-4-estirénsulfonato) (PSS) de peso molecular 70,000 g/mol, hidrobromuro de poli-L-lisina (PLL) de peso molecular 22,000 g/mol y ácido hialurónico de peso molecular 15,000 g/mol, se compraron en Sigma-Aldrich. El ácido ascórbico fue comprado en Fluka. El resto de los reactivos son de grado analítico y/o adecuados para cultivo celular. Todos los reactivos fueron usados en las condiciones en las cuales se recibieron. El oligómero BLOCK-IT™ Control (1 Mm) se compró en Invitrogen. Este es un oligómero de dsRNA marcado fluorescentemente tiene la misma longitud, carga y configuración que un siRNA bioactivo. El siRNA inhibidos de GFP fue comprado en Ambion (silencer GFP (eGFP) siRNA). El agua destilada UltraPure DNase/RNase-free fue adquirida en Gibco, Life Technologies. El suero bovino inactivado por calor (FBS) y la tripsina 0.25% (w/v) con EDTA se adquirió en Hyclone, Thermo Scientific. Todos los disolventes orgánicos fueron grado HPLC, y el resto de los reactivos usados tienen el máximo grado de pureza y están disponibles comercialmente.

2.1 Síntesis de GNRs.

Los GNRs fueron sintetizados utilizando el método de crecimiento mediado por semillas. Primero, se obtuvieron las semillas de oro recubiertas con CTAB. Para hacer esto, 7.5 mL de una disolución 0.2 M de CTAB fue agitada junto con 0.25 mL de una disolución 0.01 M de HAuCl_4 en un baño de agua a 27 °C. Para la preparación de las disoluciones, semillas y GNRs, la disolución de CTAB debe de solubilizarse durante un día a una temperatura y agitación constante de 27 °C y 200 rpm, respectivamente, evitando la formación de espuma. A continuación, se preparó una disolución 0.01 M de NaBH_4 en un baño de agua fría. La disolución se dejó reposar por espacio de 3 minutos para asegurar la correcta dispersión del agente reductor. Después, mientras se agitaba la disolución Au-CTAB a 200 rpm, 0.6 mL de la disolución 0.01 M NaBH_4 se agregó en frío a la anterior disolución, después de lo cual esta tomó un tono marrón-amarillento. Esta disolución se agitó vigorosamente con la mano por espacio de 2 minutos, y posteriormente se dejó reposar por 1 hora en un baño de agua a 27 °C sin agitación para que el exceso de

borohidruro de sodio se descomponga.

Para el crecimiento de los GNRs, 425 μL de la disolución 0.01 M de HAuCl_4 se agregaron a 10 mL de la disolución 0.2 M de CTAB en un baño de agua a 27 °C y a 500 rpm; después, la disolución mezcla se tornó de color amarillo brillante. En paralelo, se preparó una disolución 0.01 M de nitrato de plata (AgNO_3) y se mantuvo en oscuridad. Se agregaron a continuación 83 μL de la disolución de AgNO_3 a la disolución de crecimiento de GNRs y se agitó gentilmente con la mano. Después, 68 μL de una disolución 0.1 M de ácido ascórbico (AA) se agregó a la anterior disolución, seguido de una agitación a 500 rpm hasta que esta se tornó transparente, y se dejó en un baño de agua a 27 °C por 4 minutos. Finalmente, 110 μL de la disolución de semillas de oro fueron agregados a la disolución de crecimiento, se agitó por 2 minutos y después se detuvo la reacción. La disolución anterior se dejó reposar toda la noche en un baño de agua a 27 °C, cambiando a un color rosa-rojiza. Los GNRs fueron centrifugados dos veces a 27 °C por 20 minutos y redispersados en 10 mL de agua desionizada.

Se obtuvo el espectro de absorción UV-Vis de los GNRs utilizando un espectrofotómetro Cary Bio 100 UV-Vis (Agilent Technologies). El tamaño de los GNRs fue medido utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM), (JEOL JEM 1011) operándolo a un voltaje de aceleración de 120 kV. La concentración de los GNRs por mL fue calculada teniendo en cuenta los tamaños de NP obtenidos por TEM y la concentración de átomos de oro obtenidos mediante espectroscopia de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). En el caso de los GNRs con una banda del plasmón de resonancia longitudinal (LSPR) centrado en 780 nm, 1 mL de tres diferentes lotes a una densidad óptica (OD) ~ 1 tienen una concentración de oro cercana a $49.22 \pm 0.37 \mu\text{g/mL}$, considerando la amplitud y longitud de las NPs obtenida mediante TEM. La concentración obtenida bajo estas condiciones fue de $5 \cdot 10^{14}$ GNRs/L.

RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO LbL DE LAS GNRs.

2.2.1 PSS/PLL/siRNA/HA-GNRs.

Utilizando la técnica de ensamblaje LbL múltiples capas de PSS, PLL y HA fueron depositadas en la superficie de los GNRs (ver Esquema 1). Para el recubrimiento con PSS se preparó una disolución de 10 mg/mL de PSS en NaCl 12 mM. Cuando está completamente disuelto, se agrega esta disolución a 1 mL de NaCl 12 mM y se agitó a 500 rpm. Posteriormente, esta disolución fue agregada gota a gota a 1 mL de GNRs (DO ~ 1) mientras se agitaban. Después de 1 hora, la disolución resultante se centrifugó a 15000 rpm por 20 minutos y se resuspendió en 1 mL de agua MilliQ. A continuación, se realizó la deposición del PLL. Para ello, se preparó una disolución de 5 mg/mL de PLL en agua, se tomaron 100 μ L de esta disolución y se agregaron a 700 μ L de agua y se agitó a 500 rpm durante 1 minuto. A continuación, 1 mL de GNRs recubiertos con PSS fueron agregados gota a gota. Después de 1 hora la disolución se centrifugó a 15000 por 20 minutos y se redispersó en 1 ml de agua libre de RNAsas. Posteriormente, se disolvieron 0.5 nmol de siRNA en agua libre de RNAsas con una agitación de 500 rpm y en un baño de agua a 37 °C por espacio de 30 minutos. Concluido este paso, se agregó 1 mL de la disolución de GNRs recubiertos con PSS-PLL gota a gota, y se agitó por 2 horas en un baño de agua a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se centrifugó a 15000 rpm y el pellet fue redispersado en 1 mL de agua libre de RNAsas. Finalmente, se adicionó una capa de HA, para lo cual se preparó una disolución de HA 1 mg/mL en agua, se tomaron 60 μ L de esta disolución y se disolvieron en 1 mL de agua MilliQ agintándose a 500 rpm durante 5 minutos. La disolución previamente obtenida de GNRs recubiertos con PSS-PLL-siRNA se agregó gota a gota a la disolución de HA y se dejó reaccionar por espacio de 1 hora. Al término de este tiempo, la disolución se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos y el pellet se resuspendió en 1 mL de agua libre de RNAsas.

2.2.2 (PSS/PLL/siRNA)₂/HA-GNRs.

Para la creación de estas nanoplataformas, las tres primeras capas correspondientes a PSS, PLL y siRNA fueron obtenidas como se explicó previamente. A continuación, el proceso se repitió para generar otras 3 capas adicionales de la misma manera y,

finalmente se agregó una capa de HA como se describió anteriormente.

2.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

2.3.1 *Dispersión dinámica de Luz.*

Las medidas de DLS fueron realizadas utilizando el sistema de correlación digital ALV-5000 (ALV 5000/E, ALV GmbH, Germany) equipado con control de temperatura fijado a 25 °C. La luz fue verticalmente polarizada a 488 nm con un láser de estado sólido (2 W). El radio hidrodinámico r_H , fue obtenido de la medición por DLS de las muestras de partículas diluidas a un ángulo de dispersión de 90°. El análisis de datos de DLS se realizó con el algoritmo CONTIN y empleando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_H = kT/6\pi\eta D \quad (1)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad de la disolución y D el coeficiente de difusión de las partículas en disolución diluida. Las medidas se realizaron por triplicado, con un tiempo de muestreo de 120 segundos cada una y promediadas.

2.3.2 *Movilidad electroforética.*

El potencial zeta de las nanoplataformas preparadas fue determinado por velocimetría Doppler usando un Nano ZS (Nanoseries, Malvern Instruments, UK). Las nanopartículas fueron suspendidas en agua ($\text{pH} \approx 6$) y las medidas se llevaron a cabo a 25°C. Se realizaron tres medidas independientes y los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar. El instrumento midió la movilidad electroforética de las partículas y la convirtió al potencial Z utilizando la expresión clásica de Smoluchowski:

$$\alpha = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad (2)$$

donde α , ϵ , ζ y η denotan la movilidad electroforética, la permitividad del medio, el potencial Z de las partículas y la viscosidad del medio, respectivamente. Las nanopartículas se suspendieron en agua ($\text{pH} = 6$) y tampón fosfato ($\text{pH} = 7,4$) y se

introdujeron en una célula desechable, transparente, capilar y plegada. Las mediciones se iniciaron después de alcanzar automáticamente el tiempo determinado por el software.

2.3.3 Análisis cuantitativo de siRNA.

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (LC) de las nanopartículas híbridas de PSS/PLL/siRNA/HA-GNR y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA-GNR, estas fueron centrifugadas a 15000 rpm a 20 °C por 20 minutos. El contenido de siRNA en el sobrenadante fue medido por espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia. Previamente se creó una curva de calibración con siRNA disuelto en agua libre de RNAsas a 37 °C. Las gráficas de UV-Vis fueron obtenidas a 260 nm substrayendo las potenciales contribuciones de los residuos de las proteínas a 280 nm. Las curvas estándar de fluorescencia fueron fijadas a una longitud de onda de excitación de 494 nm y recolectadas a una longitud de onda de emisión de 519 nm. Los espectros de UV-Vis fueron medidos con el espectrofotómetro Cary Bio 100 UV-Vis (Agilent Technologies, USA) mientras que el espectro de fluorescencia fue monitorizado con un espectrofotómetro Cary Eclipse (Agilent Technologies, USA). Cada muestra fue medida por triplicado de 3 diferentes lotes y promediado. La EE y la LC fueron calculadas mediante las siguientes expresiones:

$$E.E. (\%) = \frac{\text{Cantidad total de siRNA agregado} - \text{siRNA en sobrenadante}}{\text{Cantidad total de siRNA agregado}} \times 100 \quad (3)$$

$$L.C. (\%) = \frac{\text{Cantidad total de siRNA agregado} - \text{siRNA en sobrenadante}}{\text{Cantidad total de siRNA agregado}} \times 100 \quad (4)$$

2.3.4 Liberación in vitro.

Los perfiles de liberación del siRNA desde las nanopartículas híbridas fueron medidos *in vitro* durante varios días a una temperatura constante de 37 °C, con agitación magnética

a 300 rpm y a dos pH, 7.4 (fisiológico) y 5.5 (ambiente lisosomal). Para obtener los perfiles de liberación, 1 mL de GNR híbridos fueron puestos en tubos de diálisis (SpectraPore®, MWCO 50 kDa) y sumergidos en 50 mL de buffer suplementado con 10% (v/v) de FBS y a los pH antes mencionados. La concentración del siRNA liberado fue determinado a diferentes intervalos de tiempo para cada pH. Para cada tiempo, una muestra de 1 mL de medio fue retirado y reemplazado con el mismo volumen de buffer nuevo. El contenido de siRNA fue medido mediante UV-Vis y fluorescencia utilizando las curvas de calibración previamente establecidas. Las medidas se realizaron por triplicado.

2.3.5 Liberación de siRNA asistida por proteasas.

La liberación de siRNA asistida por enzimas desde los GNR híbridos fue medida *in vitro* durante varios días a una temperatura constante de 37 °C, con agitación magnética a 300 rpm a pH 7.4 y 5.5 en presencia y ausencia de 0.25% (v/v) de tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a razón de 50 µL por cada 40 mL de buffer. Para tal efecto, 1 mL de los GNRs híbridos fueron puestos en tubos de diálisis (SpectraPore®, MWCO 50 kDa) y sumergidos en 50 mL de buffer suplementado con 10% (v/v) de FBS, con la cantidad correspondiente de tripsina-EDTA y a los pH antes mencionados. La concentración liberada de siRNA fue determinada como se explicó anteriormente.

2.3.6 Liberación de siRNA asistida por luz en el infrarrojo cercano.

Con la finalidad de analizar el efecto de la exposición a luz láser NIR en la liberación de siRNA desde los GNRs híbridos, 1 mL de estas NPs (1×10^{11} NP/mL) fue incubado a 37 °C bajo agitación magnética a pH 5.5. Las condiciones experimentales fueron similares a las previamente establecidas en ausencia de tripsina-EDTA excepto que, después de 6 y 24 horas de incubación los GNRs híbridos fueron expuestos a la radiación de luz en el infrarrojo cercano a 0.5 y 3 W/cm² por espacio de 5 minutos. La irradiación fue llevada a cabo utilizando un láser de onda continua a una longitud de onda de 808 nm (50 W, Oclaro, Inc, USA). El láser fue alimentado por un controlador de diodo láser Newport 5700-80 (Newport Corporation, USA). Una fibra óptica con apertura de 200 µm fue utilizada para transferir la luz desde la unidad láser a la disolución de partículas y conectada con un colimador que permite ajustar de manera precisa el tamaño del “spot”

del láser en el rango de 1-10 mm. La potencia de salida se calibró de forma independiente mediante un medidor de potencia óptica (Newport 1916-C), y el tamaño del “spot” se midió con un perfilador de haz (Newport LBP-1-USB) que se colocó a la distancia de 8 cm entre la salida del colimador y la muestra de GNRs.

2.4 ENSAYOS CELULARES

2.4.1 Líneas celulares.

Se utilizaron las líneas de cáncer cervical HeLa y HeLa-GFP, y la línea de cáncer de pecho MDA-MB-231 obtenidas de Cell Biolabs (San Diego, USA). Las células fueron cultivadas en condiciones estándares de cultivo (5% CO₂ a 37°C) en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS, 2 mM de L-glutamina, 1 % (v/v) de penicilina/estreptomicina, 1 mM de piruvato de sodio y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA).

2.4.2 Toxicidad celular *in vitro*.

La toxicidad de los GNRs híbridos cargados con siRNA fue probada *in vitro* mediante el kit de proliferación CCK8. Las células HeLa y MDA-MB-231 fueron sembradas en una placa de 96 pozos (1.5·10⁴ células/pozo) y se dejaron crecer por 24 horas en condiciones estándares de cultivo en 100 µL de medio. Pasadas las 24 horas, 100 µL de NPs a una concentración de 2.5·10¹⁰ Np/mL, correspondientes a las nanopartículas híbridas de PSS/PLL/siRNA/HA-GNR y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA-GNR, fueron diluidas en medio de cultivo, se agregaron a cada pozo con células e incubadas por 6 horas. Algunas células fueron transfectadas con 1 Mm de oligo de control fluorescente siRNA BLOCK-iT™ (Invitrogen, USA) utilizando Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, USA) como control positivo siguiendo las instrucciones del fabricante. También algunas células fueron dejadas sin tratamiento alguno como control negativo. Después de los períodos de incubación correspondientes, el medio de cultivo fue descartado, las células fueron lavadas con PBS 10 mM a pH 7.4 y se agregaron 100 µL de medio de cultivo fresco a cada pozo. Así mismo, algunas células fueron previamente irradiadas con un láser de haz continuo acoplado a una fibra óptica con un diodo fuente de 808 nm (50 W, Oclaro, Inc, USA). Las fluencias utilizadas fueron de 0.5, 1.0 y 3.0 W/cm² durante 5 minutos en

cada pozo. Después de 18 y 42 horas de incubación adicionales, las células fueron lavadas con PBS 10 mM a pH 7.4 y se agregaron 100 μ L de medio de cultivo fresco a cada pozo. En este punto, 10 μ L del reactivo CCK8 fue añadido a cada pozo. Después de 2 horas de incubación, se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de absorbancia de microplacas UV-Vis Bio-Rad 689 (Bio-Rad, USA). La viabilidad celular fue calculada de la siguiente manera:

$$C.V (\%) = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100 \quad (5)$$

donde, la *absorbancia de la muestra* es la absorbancia a 450 nm de las muestras con nanopartículas y *absorbancia del blanco* es la absorbancia a 450 nm de las células sin nanopartículas.

2.4.3 Internalización celular observada en TEM.

Las células HeLa fueron sembradas en placas de 6 pozos con 2 mL de medio de cultivo DMEM suplementado a una concentración de $5 \cdot 10^4$ células por pozo e incubadas por 24 horas en condiciones estándares de cultivo. Transcurrido ese tiempo, 200 μ L de nanopartículas GNRs híbridas fueron agregadas a las células a una concentración de $2.5 \cdot 10^{10}$ NP/mL e incubadas por 6 horas. Después de este tiempo, las células fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y centrifugadas a 1500 rpm por 4 minutos. Los pellets de células fueron fijados con 500 μ L de glutaraldehído al 2.5 % (w/v), posteriormente introducido en un pellet de agar, postfijado con tetraóxido de osmio en 0.1 M de buffer cacodilato al 1% (w/v) y, finalmente, pelletizado con Eponate (Ted Pella Inc, USA). Cortes ultra finos de las células fueron obtenidos con un ultramicrotomo (UltraCut S, Leica Microsystems GmgH) y analizados con microscopía electrónica de transmisión (JEOL JEM 1011, Japan).

2.4.4 Internalización celular y silenciamiento génico por microscopía de fluorescencia.

La captación de partículas y la transfección de siRNA también fueron seguidas por

microscopía de fluorescencia mediante el cultivo de células HeLa (para experimentos de internalización) y HeLa-GFP (para silenciamiento de genes), respectivamente, en presencia de PSS/PL/siRNA/HAGNRs y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA/GNR (a una concentración de $2.5 \cdot 10^{10}$ NP/mL) y los complejos siRNA-Lipofectamine RNAiMAX utilizados como controles. El efecto del silenciamiento fue analizado registrando la pérdida de fluorescencia en la línea celular HeLa-GFP, mientras que la captación celular fue seguida por los aumentos de las señales de fluorescencia en células HeLa normales (provenientes de la fluorescencia del oligo siRNA empleado) después de la internalización de ambos tipos de nanopartículas híbridas.

Para ello, las células ($5 \cdot 10^4$ células por pocillo) se sembraron en cubreobjetos de vidrio revestidos con poli-L-lisina (12×12 mm²) colocados dentro de placas de 6 pozos con 3 mL de medio, y se cultivaron durante 24 horas en condiciones de cultivo estándar. Luego, se agregaron 250 μ L de nanopartículas a cada pozo con células. Después de 6 horas, algunas células se irradiaron con luz NIR suministrada por la fuente de luz láser a $0,5$ W/cm² durante 5 min. Luego, las células se incubaron durante diferentes períodos de tiempo. Posteriormente, las células que contenían nanopartículas se lavaron tres veces con PBS pH 7,4 y, a continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4% (w/v) durante 10 min, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con 0,2% (w/v) de Triton X-100, y se tñieron con BODIPY Phalloidin (Invitrogen, USA). Las células se lavaron de nuevo con PBS, se montaron en portaobjetos de vidrio teñidos con ProLong Gold antifade DAPI (Invitrogen) y se curaron durante 24 horas a -20 ° C.

Las muestras se visualizaron con un objetivo 63X utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica DMI6000B con un sistema modular Leica AF6000, y equipado con una cámara DFC3665FX (Leica Microsystems GmbH, Alemania), donde el canal azul corresponde a DAPI ($\lambda_{ex} = 355$ nm), el canal rojo a BODIPY Phalloidin ($\lambda_{ex} = 633$ nm), y la luz transmitida se observó en el modo de contraste de interferencia diferencial (DIC). El canal verde correspondió a la excitación del colorante FITC que funcionalizaba el oligo de siRNA (para experimentos de captación). Se usó el mismo canal para la excitación a 520 nm de la proteína fluorescente verde en células HeLa-GFP (para experimentos de silenciamiento).

2.4.5 Captación celular y silenciamiento génico por citometría de flujo.

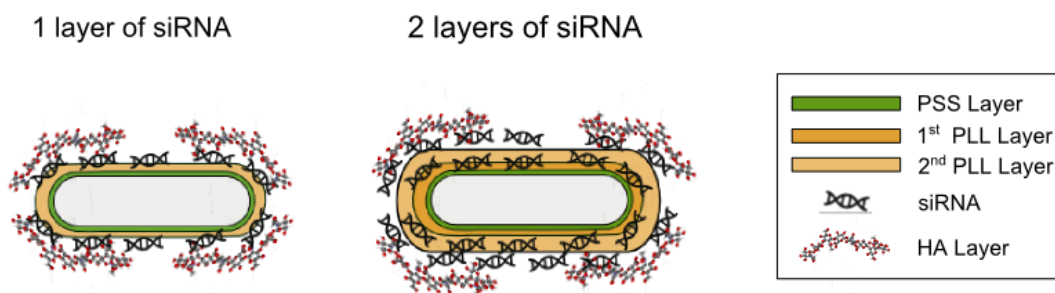
La captación de siRNA por las células HeLa se cuantificó midiendo la fluorescencia de un oligo de siRNA marcado con FITC (Invitrogen, USA) cargado en los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA a una concentración de $2.5 \cdot 10^{10}$ NP/mL por citometría de flujo. Para ello, se utilizaron células HeLa que expresan la proteína de fluorescencia verde (GFP) para investigar la eficacia de silenciamiento génico de los GNR recubiertos de PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA que encapsulan un siRNA específico contra GFP (Ambion silencer GFP, eGFP siRNA).

Se usaron células HeLa estándar como control negativo, células HeLa-GFP no transfectadas como control positivo y se utilizó el vector de transfección para siRNA Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, USA) como control positivo adicional para la transfección. Se utilizaron $2 \cdot 10^5$ células por pocillo, y estas se incubaron durante 6, 12, 24, 48 y 72 horas; luego, se lavaron una vez con PBS y se tripsinizaron. Se hicieron varios lavados a 1200 rpm durante 4 minutos para evitar la autofluorescencia del rojo de fenol del medio de cultivo. Luego, las células se resuspendieron en 1 mL de PBS. Los datos se obtuvieron mediante citometría de flujo directa (Guava EasyCyte HT Millipore). Los experimentos se realizaron en ausencia y presencia de irradiación con luz NIR suministrada por una fuente de láser de diodo acoplado a fibra de onda continua a 808 nm (50 W, Oclaro, Inc., USA) a una fluidez de $0,5 \text{ W/cm}^2$.

RESULTADOS

Las metodologías de RNA de interferencia para la eliminación/inhibición de genes en células de mamíferos involucran el uso de RNA sintético que consiste en un RNA de doble cadena corta (siRNA) con carga negativa y 21-23 nucleótidos de longitud, con una dimensión similar a una varilla de 5.5 nm x 2.0 nm [49].

Algunos estudios previos han demostrado que al usar la técnica de recubrimiento de LbL, el siRNA se puede unir a la superficie de partículas cargadas positivamente a temperatura ambiente o incluso a temperaturas superiores [23,50]. Aquí, utilizamos GNRs estabilizados con CTAB como nanopartículas con carga positiva, que se prepararon mediante una metodología de crecimiento mediada por semillas modificada [51]. El exceso de CTAB se eliminó extensamente por centrifugación; posteriormente, los GNRs estabilizados con CTAB se recubrieron alternativamente con el polímero PSS y el polímero PLL siguiendo la técnica de auto ensamblaje LbL. Aquí, el PSS se seleccionó por su naturaleza biocompatible, mientras que el PLL se empleó aprovechando su biodegradabilidad por las proteasas para lograr una nanoplataforma con la liberación de la carga terapéutica activada de manera endógena [41,52]. El siRNA se encapsuló en la superficie de las nanopartículas en forma de una o dos capas de recubrimiento a través de la adsorción electrostática en la capa de PLL subyacente (ver Esquema 1). Finalmente, se ensambló una capa externa de HA alrededor de las partículas para que proporcione a la nanoplataforma de suficiente estabilidad coloidal y una capacidad de direccionamiento hacia las células cancerosas que sobreexpresan receptores CD44, como las de pulmón, mama, colonrectal, gástricas, pancreáticas, renales, hepáticas y cervicales [53-55].



Esquema 1: Representación de los GNRs recubiertos con una sola capa (izquierda) y dos capas de siRNA (derecha).

2.5.1 Obtención y caracterización físico-química de GNRs recubiertos con siRNA.

No es esperable que el siRNA se enrolle fácilmente alrededor de las nanopartículas de oro ya que es una molécula rígida, similar a una varilla [56]. Por lo tanto, es necesario encontrar las condiciones adecuadas para optimizar su unión sobre estas. En este sentido, se analizó la influencia de la temperatura de la disolución en la adsorción del siRNA sobre los GNRs funcionalizados mediante la técnica de LbL ya que esta variable posee una gran importancia en la capacidad del siRNA para ser adsorbido en las superficies de las nanopartículas.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el recubrimiento con el siRNA, el proceso de recubrimiento LbL se monitorizó mediante espectrofotometría UV-Vis. Los espectros UV-vis (Figura 1) muestran que el pico correspondiente al plasmón superficial longitudinal de los GNRs se desplaza progresivamente después de cada etapa de adsorción de los polielectrólitos como consecuencia de la extrema sensibilidad de las nanopartículas a las propiedades dieléctricas del entorno circundante, [58] lo que confirma su exitosa adsorción. También se observa que no hay un ensanchamiento o desplazamiento importantes hacia el NIR del pico del plasmón longitudinal de los GNRs como resultado del proceso de recubrimiento, lo que sugiere la ausencia de agregación de partículas

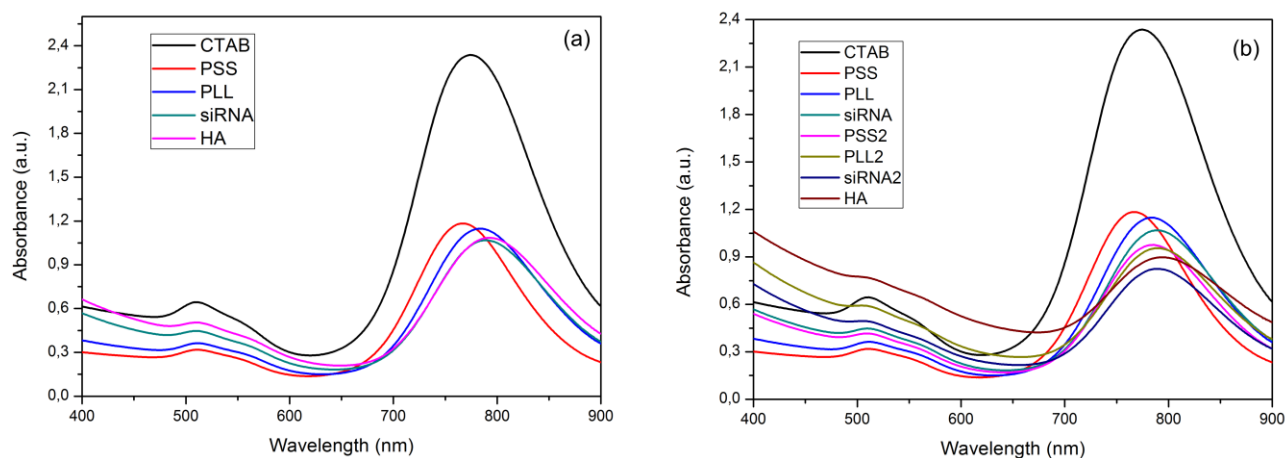


Figura 1. Espectros de absorción UV-vis después de cada capa de polielectrólitos depositada en los GNRs para (a) GNRs con recubrimiento de PSS/PLL/siRNA/HA, y (b) con recubrimiento de (PSS/PLL/siRNA)₂/HA.

Además, la intensidad del pico del plasmón longitudinal cae bruscamente cuando la primera capa de PSS se une a la superficie de las nanopartículas. Esta atenuación de la luz puede ser el resultado de una disminución en la amplitud de la oscilación de los electrones relacionada con: i) cierta absorción de la luz por la capa de polielectrólitos, ii) una disminución de las oscilaciones electrónicas en la superficie metálica [60]. Sin embargo, para las siguientes capas de polielectrólitos depositadas no se observaron disminuciones adicionales (ver Figura 2a). La banda correspondiente al plasmón transversal permanece constante durante el proceso de acomplejamiento de los polielectrólitos, excepto cuando las capas de siRNA están adsorbidas, para la cual se observa un aumento. El aumento observado cerca de 490-495 nm puede provenir de la absorción de luz por la sonda FITC presente en el oligo-siRNA empleado.

2.5.2 Movilidad electroforética.

Los datos de potencial Z revelaron una inversión en la carga eléctrica de las nanopartículas después de la deposición de cada capa de PSS y PLL. Este patrón zig-zag característico (Figura 2b, d) confirma la deposición alternada satisfactoria de los polielectrólitos cargados positivamente y negativa, respectivamente.

Sin embargo, este patrón no se observa al depositar el siRNA y HA. Para el siRNA, la cantidad de oligonucleótidos no es suficiente para revertir la carga de las nanopartículas, permaneciendo grupos cargados de la PLL expuestos. El ensamblaje de la capa externa de HA se diseñó teniendo en cuenta que las nanopartículas ligeramente positivas deberían ser más efectivas para interactuar con las membranas celulares con carga negativa. Por lo tanto, se agregó HA con el objetivo de disminuir la carga neta positiva de la superficie de las partículas, pero evitando la inversión completa de la carga de la superficie.

2.5.3 Dispersión dinámica de Luz.

La Figura 2e muestra los radios hidrodinámicos de los GNRs recubiertos con siRNA medidos por DLS. Las dimensiones hidrodinámicas de las nanopartículas híbridas aumentan a medida que aumenta el número de capas ensamblado, con radios de aproximadamente 60 y 90 nm para los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA, respectivamente (donde el subíndice denota el número de

capas). Es necesario recordar que los datos de DLS se basan en el supuesto de geometrías esféricas para las partículas por lo que los radios hidrodinámicos obtenidos solo deben tomarse como una aproximación del tamaño real.

Con el fin de descartar cualquier contribución potencial de la agregación de partículas o el acoplamiento de las GNRs a los incrementos de tamaños observados, también se adquirieron imágenes TEM de las nanopartículas (PSS/PLL/siRNA)₂/HA (Figura 2f). Así, no se observaron signos aparentes de agregación de las partículas. Desafortunadamente, el recubrimiento polimérico que envuelve las nanopartículas metálicas apenas se pudo observar.

2.5.4 Análisis cuantitativo del siRNA adsorbido.

La EE para una cantidad inicial de siRNA de 0.5 nmol en una disolución de GNRs a la concentración de $5 \cdot 10^{11}$ NP/mL se estimó en $77.6 \pm 8.3\%$ para la primera capa de siRNA y $44.2 \pm 9.7\%$ para la segunda, con una eficiencia total de $62 \pm 15\%$ (es decir, se cargaron aproximadamente 600 y 380 pmol de siRNA, respectivamente), que corresponden a valores de LC cercanos al $14.2 \pm 7.1\%$ y $11.0 \pm 3.0\%$ (ver Tabla 1).

2.5.5 Liberación de siRNA de GNR recubiertos con siRNA.

Los perfiles de liberación de siRNA de GNR recubiertos con siRNA y la influencia potencial de los activadores tanto endógenos como exógenos se analizaron en diferentes condiciones de solución, en particular, a pH 7,4 y 5,5 que simulan el pH del plasma sanguíneo y el micro entorno ácido de los citoplasmas celulares, respectivamente. La degradabilidad de la capa de PLL por proteasas endógenas como la catepsina B lisosomal, que a menudo se sobre expresa en células cancerosas e inflamadas y la tripsina puede conferir una degradación lenta del recubrimiento de polielectrolitos de las nanopartículas dentro de las células para lograr una liberación de siRNA activada gradualmente, resultando en un prolongado efecto de silenciamiento génico.

Tabla 1. Concentración, LC y EE del siRNA complejo a los GNR recubiertos con PSS/PLL en forma de una capa de recubrimiento ensamblada mediante la técnica LbL. IF denota el siRNA agregado en 1 mL de GNR recubiertos con PSS/PLL a una concentración de $1 \cdot 10^{11}$ G

IF siRNA (nmol)	siRNA-loaded GNRs (nmol)	LC (%)	EE (%)
0.5	0.03 ± 0.01	0.029	5.6
0.8	0.07 ± 0.02	0.020	5.0
1.6	0.10 ± 0.02	0.030	6.3
2.0	0.32 ± 0.05	0.090	16
3.0	1.07 ± 0.05	0.250	36
5.0	2.00 ± 0.05	0.383	60
10	6.00 ± 0.06	0.651	60
15	10.5 ± 0.06	0.757	70

También se puede observar que dentro del rango de concentración analizado, el LC del siRNA alcanza hasta aproximadamente 10.5 nmol de siRNA encapsulado con un EE de aproximadamente 70% sin saturación, lo que sugiere la posibilidad de aumentar aún más la concentración de carga si es necesario.

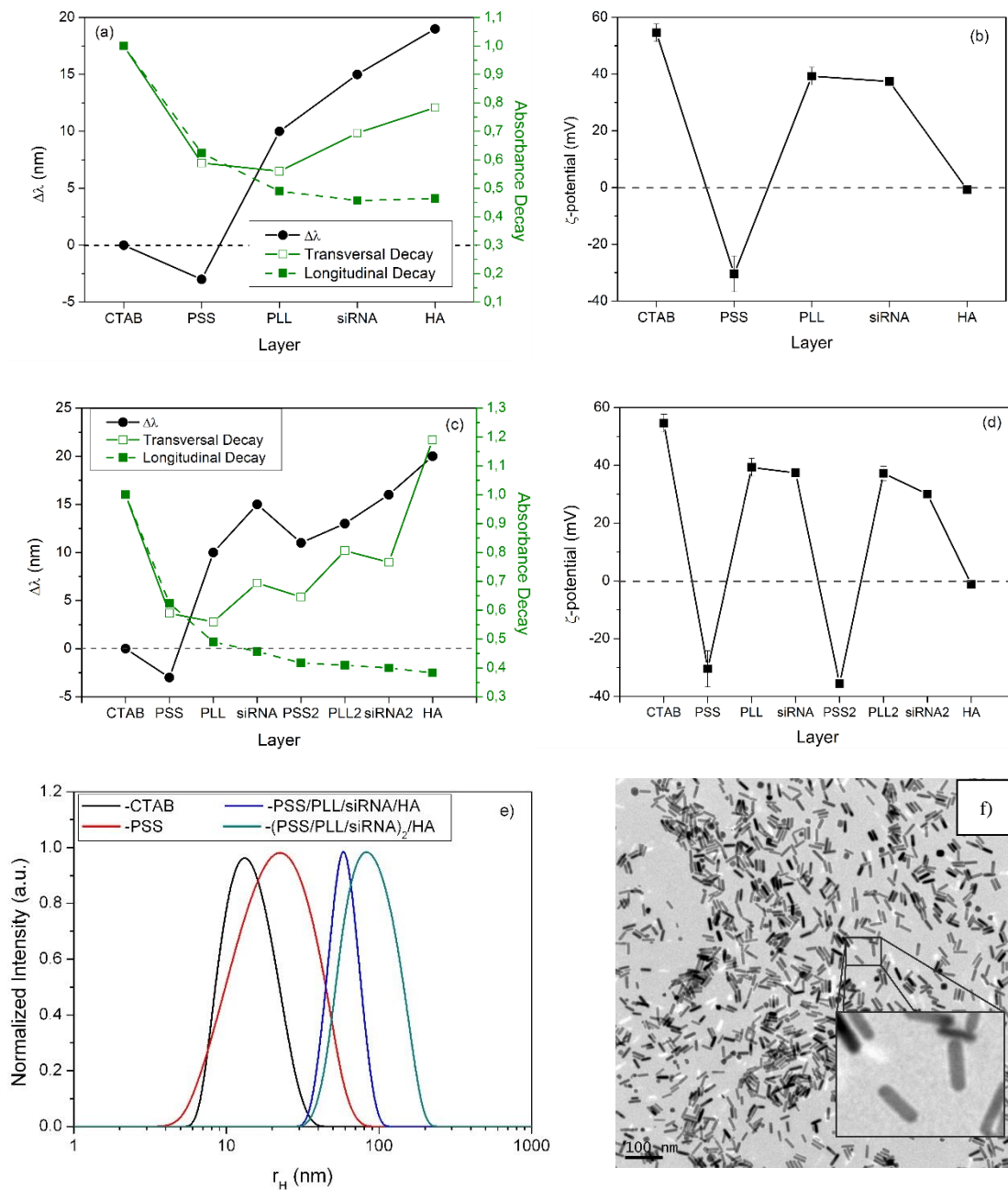


Figura 2. Desplazamientos de LSPR longitudinales (●), decaimientos de absorbancia longitudinales (■) y transversales (□) y potenciales z (■) después de cada etapa de recubrimiento para (a, b) GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (c, d) GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA. El cambio de LSPR de los GNRs recubiertos con la capa i se define como $\Delta\lambda = \lambda(i) - \lambda(\text{CTAB})$. Los decaimientos longitudinales y transversales se construyen como la relación entre la absorbancia óptica en la capa i con respecto a la capa CTAB: decaimiento (SPR) = $\text{abs}(i)/\text{abs}(\text{CTAB})$. (e) Radios hidrodinámicos para los GNRs con recubrimiento de CTAB (negro), con recubrimiento de PSS (rojo), con recubrimiento de PSS/PLL/siRNA/HA (azul), y con recubrimiento de (PSS/PLL/siRNA)₂/HA (verde). (f) Imágenes de TEM de GNRs con recubrimiento de (PSS/PLL/siRNA)₂/HA.

Por otro lado, las propiedades de absorción óptica y la posterior capacidad de actuar como agentes fototérmicos hacen que las plataformas basadas en GNRs sean adecuadas para usar la luz NIR como un activador externo de cara a obtener una liberación controlada de las moléculas encapsuladas gracias a los cambios sutiles de temperatura en el entorno de las nanopartículas bajo la estimulación lumínica.

2.5.6 Liberación asistida por enzimas.

Como se mencionó anteriormente, el PLL (que se ha mostrado anteriormente como un material prometedor para desarrollar vectores de suministro de genes y nanotransportadores de fármacos) se seleccionó como el polielectrolito catiónico gracias a su biodegradabilidad bajo la acción de las proteasas [61]. El PLL está cargado positivamente a pH fisiológico por lo que puede asociarse electrostáticamente con el esqueleto de fosfato aniónico del siRNA. Para estudiar la liberación del siRNA, se incubaron GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA a 37 ° C en presencia y ausencia de tripsina a pH 7,4 y 5,5 durante cuatro días (Figura 3a-b).

A pH 7,4, se observa que los perfiles de liberación de siRNA son independientes del número de capas poliméricas pero, al contrario, las tasas de liberación no lo son [62]. Así, existe una fase de liberación ultrarrápida inicial dentro de las primeras 12 a 15 horas de incubación, seguida de un patrón de liberación más sostenido con liberaciones del agente bioactivo de hasta aproximadamente el 85%, y entre 50 y 65% en presencia y ausencia de tripsina, respectivamente. En ausencia de la enzima, el 50% del siRNA se liberó de los GNRs recubiertos con PSS/PLL/ siRNA/HA en 58 h, en comparación con las 96 h necesarias para la liberación desde los GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA. Este hecho confirma que la nanopartícula híbrida de dos capas es más resistente a la difusión del siRNA fuera del recubrimiento, probablemente como consecuencia de la estructura de capas más gruesas que puede ofrecer una mayor protección para el material genético junto con una liberación más sostenida y lenta.

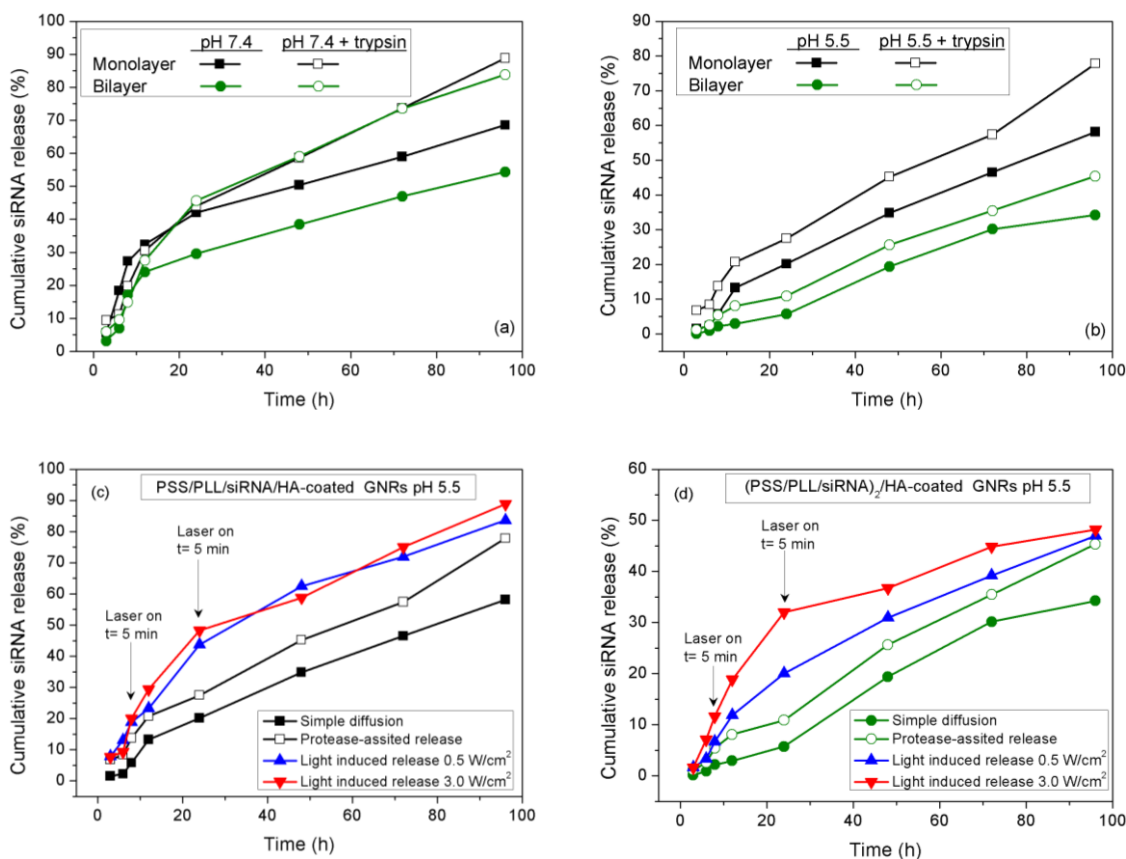


Figura 3. Liberación del siRNA a (a) pH 7,4 y (b) pH 5,5 para GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA (■, □) y recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA (●, ○) en ausencia (símbolos cerrados) y presencia (símbolos abiertos) de tripsina. Liberación de siRNA inducida por la luz NIR de (c) GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (d) recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA. Las potencias empleadas del láser fueron 3 (▼) y 0.5 (▲) W/cm². También se incluyen para la comparación la difusión simple del siRNA (■, ●) y la liberación asistida enzimática (□, ○). La desviación estándar relativa fue menor al 10.0%. Las barras de error no se muestran para una mayor claridad.

A pH 5.5 también se observa una clara fase de liberación ultrarrápida para los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA, siendo esta más corta para los recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA, especialmente cuando la enzima no está presente en el medio circundante. Esta primera fase es seguida por un patrón de liberación más sostenido, como ocurrió a pH 7.4. Las tasas de liberación son mayores para los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA tanto en presencia como en ausencia de tripsina, con una liberación adicional en torno 15-25% del siRNA cuando la enzima está presente en

disolución.

Además, la cantidad de siRNA liberado es menor en condiciones ácidas respecto a pH 7,4, probablemente como resultado de: i) la adopción de una conformación de cadena al azar de las moléculas de PLL a este pH en contraste con una configuración más expandida en pH fisiológico; [63] y ii) este polielectrolito está más densamente cargado a pH 5.5 facilitando así las interacciones con las cadenas de siRNA.

2.5.7 Liberación inducida por la luz NIR.

La excitación con luz láser a la misma longitud de onda del LSPR de los GNRs produce una importante absorción lumínica. La energía absorbida modula la atracción entre las nanopartículas metálicas y las moléculas cargadas circundantes, lo que da como resultado la liberación del agente terapéutico (siRNA) bajo demanda mediante dos mecanismos posibles: i) un mecanismo térmico basado en el calentamiento localizado alrededor de cada NP libera aumentos de temperatura de la solución de siRNA antes ii) uno no térmico, donde la excitación lumínica genera electrones calientes que modifican las interacciones entre los polielectrolitos y el siRNA [64].

Los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA se incubaron a 37 °C a una concentración de $1 \cdot 10^{11}$ NP/mL y a pH 5,5. Se expusieron a una irradiación con láser NIR de onda continua (808 nm) a 0.5 y 3 W/cm² durante 5 min después de 6 y 24 h de incubación bajo agitación moderada. Los perfiles de liberación observados muestran una fase de liberación ultrarrápida a tiempos de incubación cortos (10 a 15 horas de incubación) seguido de un patrón más sostenido como en el caso de la liberación desencadenada por enzimas. Así, se obtuvieron tasas y extensiones de liberación similares para irradiaciones de luz de 0.5 y 3 W/cm² para los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA de hasta 85%. Por el contrario, los GNRs con recubrimiento de PSS/PLL/siRNA₂/HA exhiben mayores liberaciones de carga a 3 W/cm² que a 0.5 W/cm², lo que concuerda con la necesidad de un mayor aporte de energía para lograr una absorción de la luz suficiente y el consiguiente incremento térmico requerido para obtener la desestabilización de las interacciones electrostáticas entre las capas internas de polielectrolitos para la liberación exitosa de siRNA.

Además, la comparación de los perfiles de liberación activados por la luz y mediante la

enzima denota que este último proporciona tasas de liberación mucho más rápidas, como se observa en la Figura 3c-d. A tiempos cortos de incubación (< 24 h), el revestimiento de PLL apenas se degrada por la tripsina, mientras que la irradiación con láser logra una desestabilización más rápida de las capas de polielectrolito a través de los mecanismos descritos anteriormente, permitiendo la liberación de la carga terapéutica. Por el contrario, a tiempos de incubación más prolongados (aprox. 96 h), las extensiones de liberación son bastante similares ya que las enzimas degradan mucho las cadenas de PLL y, por lo tanto, difunden más moléculas de siRNA al medio acuoso.

2.5.8 Citotoxicidad celular in vitro de GNRs recubiertos con siRNA.

Para probar el uso potencial de las nanopartículas híbridas desarrolladas como posibles plataformas terapéuticas multimodales, en primer lugar se analizó su estabilidad coloidal y su potencial citotoxicidad in vitro.

Así, los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA fueron completamente estables en disoluciones acuosas. En presencia de proteínas séricas, solo se observó la presencia de agregados muy pequeños (aproximadamente 4 partículas por clúster) después de 48 h de incubación, que es mucho más largo que el tiempo requerido para una internalización exitosa de la nanoplataforma dentro de las células.

Para evaluar la citotoxicidad y la eficacia fototérmica de los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA *in vitro*, se realizó un ensayo de proliferación CCK-8 después de la administración de NPs a las células a una concentración de $2,5 \cdot 10^{10}$ NP/mL e incubación posterior durante 24 y 48 horas en líneas celulares cancerosas tanto cervicales como de mama HeLa y MDA-MB-231 respectivamente. Parte de estas células se irradiaron con una fuente de láser de onda continua a 808 nm durante 5 minutos a diferentes intensidades (0, 0.5, 1 y 3 W/cm²). Algunas células también se transfectaron con el oligo de siRNA usando Lipofectamine RNAiMAX como control positivo.

En ausencia de irradiación de luz, la citotoxicidad asociada a la nanoplataforma es despreciable para las células MDA-MB-231, y se encuentra dentro del 10-20% para las células HeLa. La transfección de siRNA con Lipofectamine RNAiMAX induce toxicidades

celulares similares (que oscilan entre el 10-20%, especialmente para las células HeLa que son más sensibles) [65].

Existe una excepción para los GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA después de 48 h de incubación, para las cuales la citotoxicidad es de aproximadamente el 35% (ver figura 4). Este mayor valor podría estar asociado a una mayor sobreexpresión de los receptores CD44 en la última línea celular, que permiten mayores captaciones de partículas a través de un proceso de endocitosis mediado por receptor hasta niveles que pueden comprometer la función y la viabilidad celular.

Por otro lado, la irradiación con luz NIR no afecta la viabilidad celular en ausencia de nanopartículas. Cuando las células se irradian con luz NIR, se observan citotoxicidades progresivas más altas a medida que aumenta la fluencia. Específicamente, se observa que las células HeLa son mucho más sensibles a la irradiación con láser que las MDA-MB-231, incluso a la irradiación más baja (0.5 W/cm²), con viabilidades celulares por debajo del 50%. De hecho, para las células MDA-MB-231 las tasas de supervivencia son muy superiores al 50% en toda la gama de fluencias analizadas, excepto en la más alta (3 W/cm²). Este comportamiento se derivaría de una mayor internalización de partículas en las células HeLa como se mencionó anteriormente, lo que aumentaría la producción de calor dentro de las células mejorando, así, los efectos fototérmicos citotóxicos. Los GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA irradiados poseen una menor actividad fototérmica de destrucción de células que los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA probablemente como consecuencia de una atenuación de la luz NIR absorbida por la presencia de más capas de polielectrólitos sobre las superficies de las nanopartículas [60].

2.5.9 Captación celular e internalización de GNRs recubiertos con siRNA.

Para confirmar si los GNRs se pueden usar como nanotransportadores para la administración de siRNA, se monitorizó la captación y la internalización de estas nanopartículas híbridas. Los GNRs recubiertos de (PSS/PLL/siRNA)₂/HA se incubaron en células HeLa durante 6 horas y se tomaron, a continuación, imágenes de microscopía de fluorescencia.

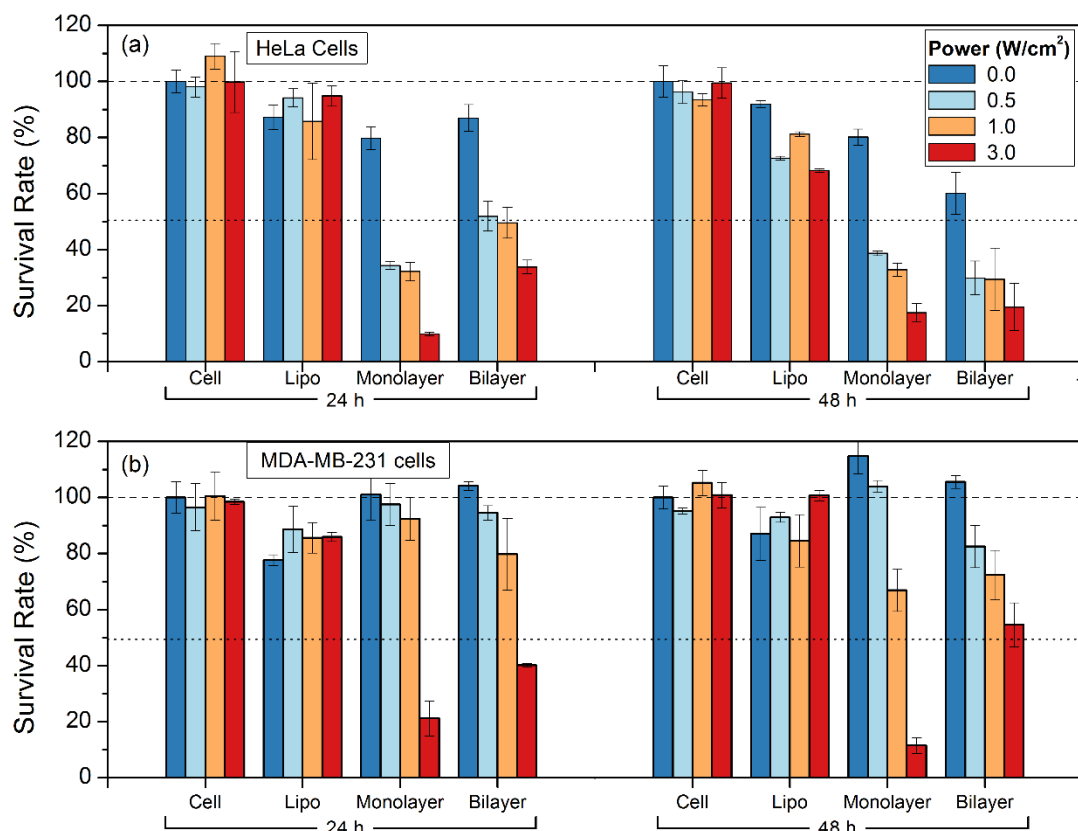
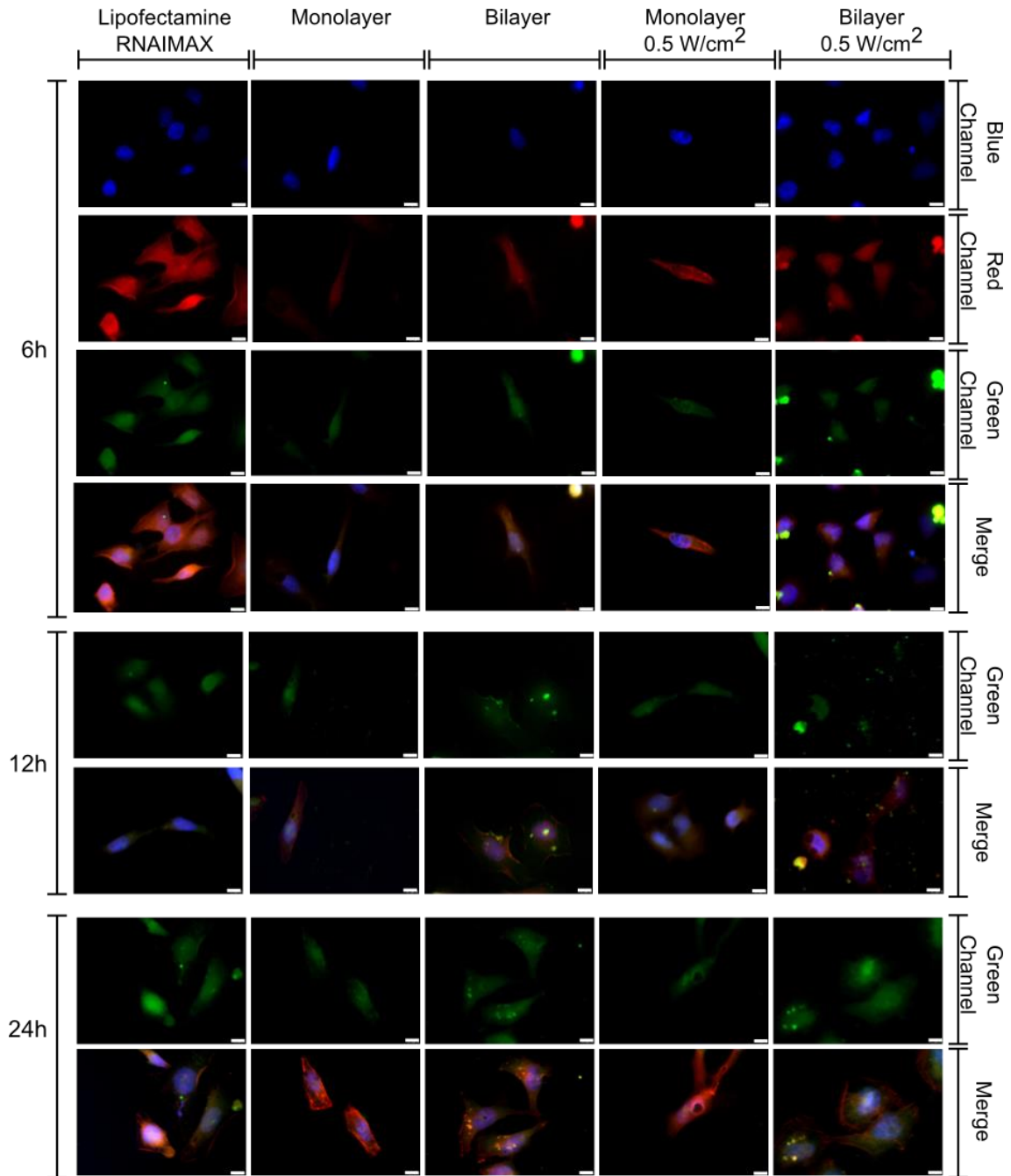


Figura 4. Toxicidad fototérmica inducida por los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA en líneas celulares de cáncer (a) HeLa y (b) MDA-MB-231. Las células se irradiaron con un láser de onda continua a 808 nm a 0 (azul), 0,5 (azul claro), 1 (rojo claro) y 3 W/cm² (rojo) durante 5 min.

De cara a optimizar las condiciones para una transfección de siRNA eficiente empleando los GNR recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA, la evolución temporal de la internalización del siRNA se monitorizó mediante microscopía de fluorescencia en células HeLa durante 3 días usando (Figura 5). Se utilizó lipofectamina RNAiMAX como control positivo. Algunas células también se irradiaron con el láser de 808 nm a 0.5 W/cm² durante 5 min después de 6 y 24 h de incubación para descifrar la influencia potencial (si la hubiera) de la irradiación de luz NIR en el proceso de transfección.

Como se mencionó anteriormente, el siRNA se encontró principalmente en el citoplasma

celular. La señal FITC derivada del siRNA fue progresivamente más fuerte hasta 48 h de incubación (color naranja en las imágenes fusionadas). En presencia de irradiación NIR, no se encontraron diferencias considerables en la liberación de siRNA, excepto en los GNR recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA después de 6 a 12 h de incubación, para las cuales la liberación de la carga se mejora ligeramente en concordancia con los datos de liberación mostrados previamente.



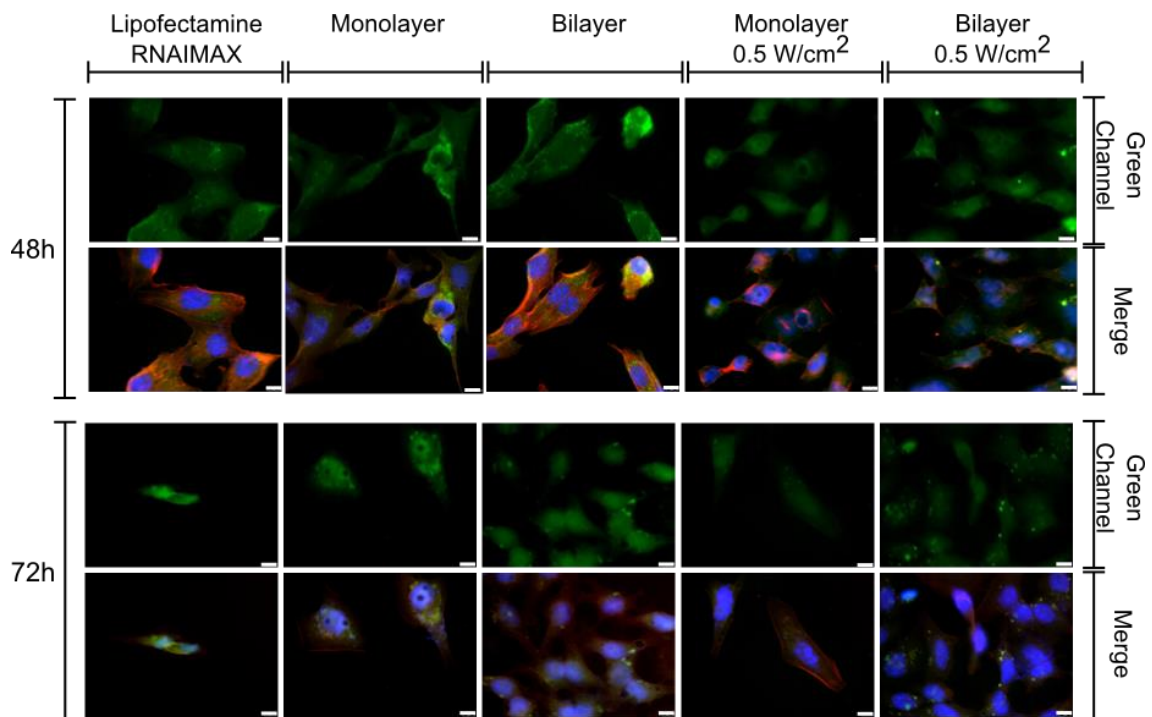


Figura 5. Células HeLa con GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA, con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA y complejo de Lipofectamine-siRNA en presencia y ausencia de irradiación de luz NIR (808 nm) a 0.5 W/cm² durante 5 min. Los núcleos se tiñeron con DAPI (canal azul), membranas celulares con Bodipy-faloidina (canal rojo), mientras que el siRNA se modificó con una sonda FITC (canal verde).

Después de 72 h de incubación, la señal de fluorescencia aún es apreciable pero con una intensidad más baja, lo que podría indicar cierto progreso en la degradación del siRNA por nucleasas citoplasmáticas. Además, se corrobora que las señales de fluorescencia correspondientes a los GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA son más fuertes que las señales de los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA (particularmente visibles después de 24, 48 y 72 horas de incubación), de acuerdo con su mayor LC y las concentraciones de siRNA liberadas, como se indicó anteriormente.

2.5.10 Captación celular observada en TEM.

Para confirmar adicionalmente la exitosa captación e internalización celular de las presentes nanoplateformas híbridas, se adquirieron imágenes de microscopía

electrónica de transmisión (TEM). Los GNRs recubiertos con $(\text{PSS}/\text{PLL}/\text{siRNA})_2/\text{HA}$ presentes en el citoplasma celular se observaron en el interior de de vesículas, particularmente lisosomas y autofagosomas (Figura 6a-d). Esto estaría de acuerdo con que las nanopartículas híbridas son captadas por endocitosis mediada por receptores, en particular, a través de receptores CD44 sobre-expresados en las superficies de la membrana de las células HeLa.

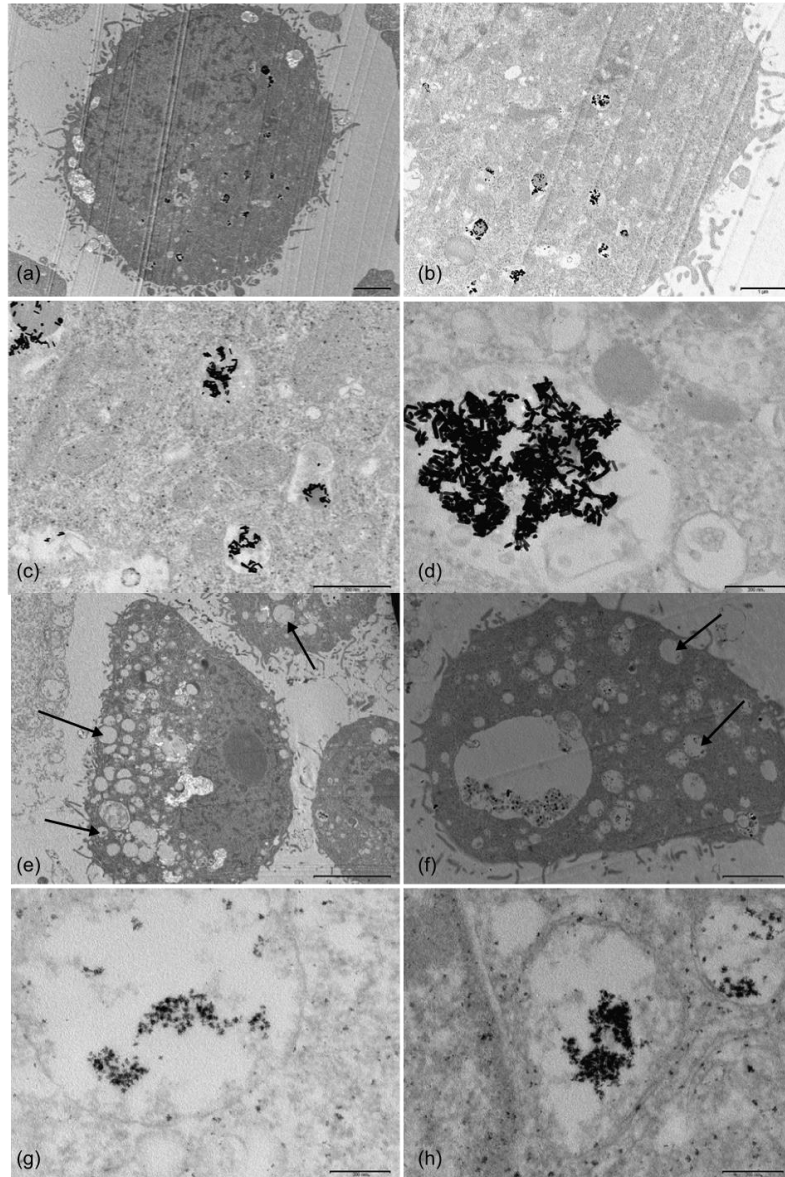


Figura 6. Imágenes TEM de la captación en células HeLa irradiadas a $0,5 \text{ W}/\text{cm}^2$ durante 5 min de (a, d) GNRs recubiertos de $(\text{PSS}/\text{PLL}/\text{siRNA})_2/\text{HA}$ y de (b, c) GNRs recubiertos de $(\text{PSS}/\text{PLL}/\text{siRNA})_2/\text{HA}$. Las flechas apuntan a la formación de burbujas debido a la irradiación lumínica. La barra de escala representa $3 \mu\text{m}$ en (a) y (e); $2 \mu\text{m}$ en (f), $1 \mu\text{m}$ en (b); 500 nm en (c); y 200 nm en (d), (g) y (h).

Cuando las partículas híbridas se irradian después de una incubación durante 6 h en células HeLa con un láser de onda continua (808 nm) a $0,5 \text{ W/cm}^2$ durante 5 min, las vesículas intracelulares que contienen las nanopartículas metálicas aumentan su volumen, probablemente como consecuencia de un daño citoplasmático inducido por un incremento de temperatura (Figura 6e-f). La generación de calor bajo la irradiación de luz NIR dentro de las células puede llevar a la formación de burbujas (flechas en la Figura 6e-f) y la posterior expansión del volumen [66]. Además, se observa una pérdida de la forma de los GNRs dentro de los lisosomas, que probablemente se deriva de la combinación de algunas potenciales remodelaciones de las nanopartículas bajo irradiación luz NIR y el ambiente ácido del medio lisosomal (Figura 6g-h).

2.5.11 Captación celular y silenciamiento génico por citometría de flujo.

Con el fin de realizar un análisis cuantitativo del siRNA transfectado dentro de las células en presencia y ausencia de irradiación con luz NIR, se realizaron experimentos de citometría de flujo. Para ello, las células HeLa se incubaron durante 6 h con GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y $(\text{PSS/PLL/siRNA})_2/\text{HA}$, un complejo Lipofectamine-siRNA (como control positivo), y algunas de ellas fueron expuestas a irradiación de luz NIR a $0,5 \text{ W/cm}^2$ durante 5 minutos. Posteriormente, las células se dejaron bajo incubación durante otras 6 a 72 horas adicionales.

La Figura 7 muestra que la internalización y la posterior liberación de siRNA de los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y $(\text{PSS/PLL/siRNA})_2/\text{HA}$ alcanza un máximo después de 72 horas de incubación, y es más alta para este último tipo de nanopartículas, en concordancia con su capacidad para transportar y liberar grandes cantidades de siRNA.

La fluorescencia observada en ausencia de irradiación podría estar relacionada con la liberación progresiva de siRNA en el interior de las células gracias a la biodegradación de las capas de PLL por las proteasas citoplasmáticas. Específicamente, la fluorescencia permanece apenas constante dentro de las primeras 24 horas para ambos tipos de nanopartículas con intensidades de fluorescencia comprendidas entre el 20 y 35% para los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y $(\text{PSS/PLL/siRNA})_2/\text{HA}$, respectivamente. A tiempos más largos, la fluorescencia disminuye y aumenta

posteriormente después de 72 horas de incubación. La disminución de la fluorescencia observada podría originarse a partir de un nuevo ciclo de división celular, en el que las nuevas células no presentan fluorescencia FTIC (las células muertas se descartaron en lavados de células); así, el porcentaje total de células con fluorescencia disminuye. A la inversa, con Lipofectamine RNAiMAX la mayor parte del siRNA se internaliza dentro de las primeras 24 horas, pero también se observa una disminución similar a las 48 horas y un aumento posterior a las 72 horas.

Por otro lado, las señales de fluorescencia dentro de las células son ligeramente mayores en presencia de irradiación con luz NIR, particularmente a tiempos de incubación más largos tal y como se observa en la Figura 7, gracias a la combinación de los mecanismos de liberación activados por enzimas e inducidos luz NIR.

2.5.12 Actividad de silenciamiento del gen GFP.

La funcionalidad del siRNA transfectado para silenciar la expresión de un gen objetivo se probó utilizando GNRs modificados mediante LbL como nanotransportadores para siRNA. Para analizar la actividad terapéutica del siRNA se usaron células HeLa que expresan la proteína fluorescente verde (HeLa-GFP) como modelo *in vitro* y se encapsuló en los distintos tipos de GNRs un siRNA contra la expresión de GFP. La actividad de silenciamiento génico se analizó cualitativamente y cuantitativamente mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, respectivamente, después de 72 horas de incubación en ausencia y presencia de irradiación con luz NIR (808 nm, 0,5 W/cm² durante 5 min).

A partir de las imágenes de microscopía de fluorescencia (Figura 8), observamos que los niveles de fluorescencia de las células HeLa-GFP disminuyen progresivamente de 6 a 72 horas de incubación. La actividad de la inhibición de la señal de fluorescencia es mayor para GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA₂/HA en comparación con los recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA como consecuencia de las mayores cantidades de material genético encapsulado y posteriormente liberado.

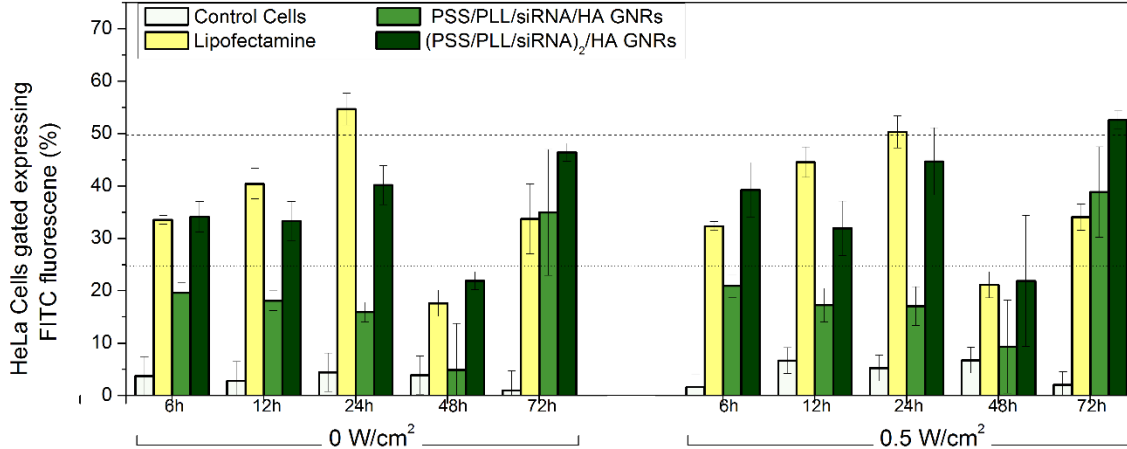
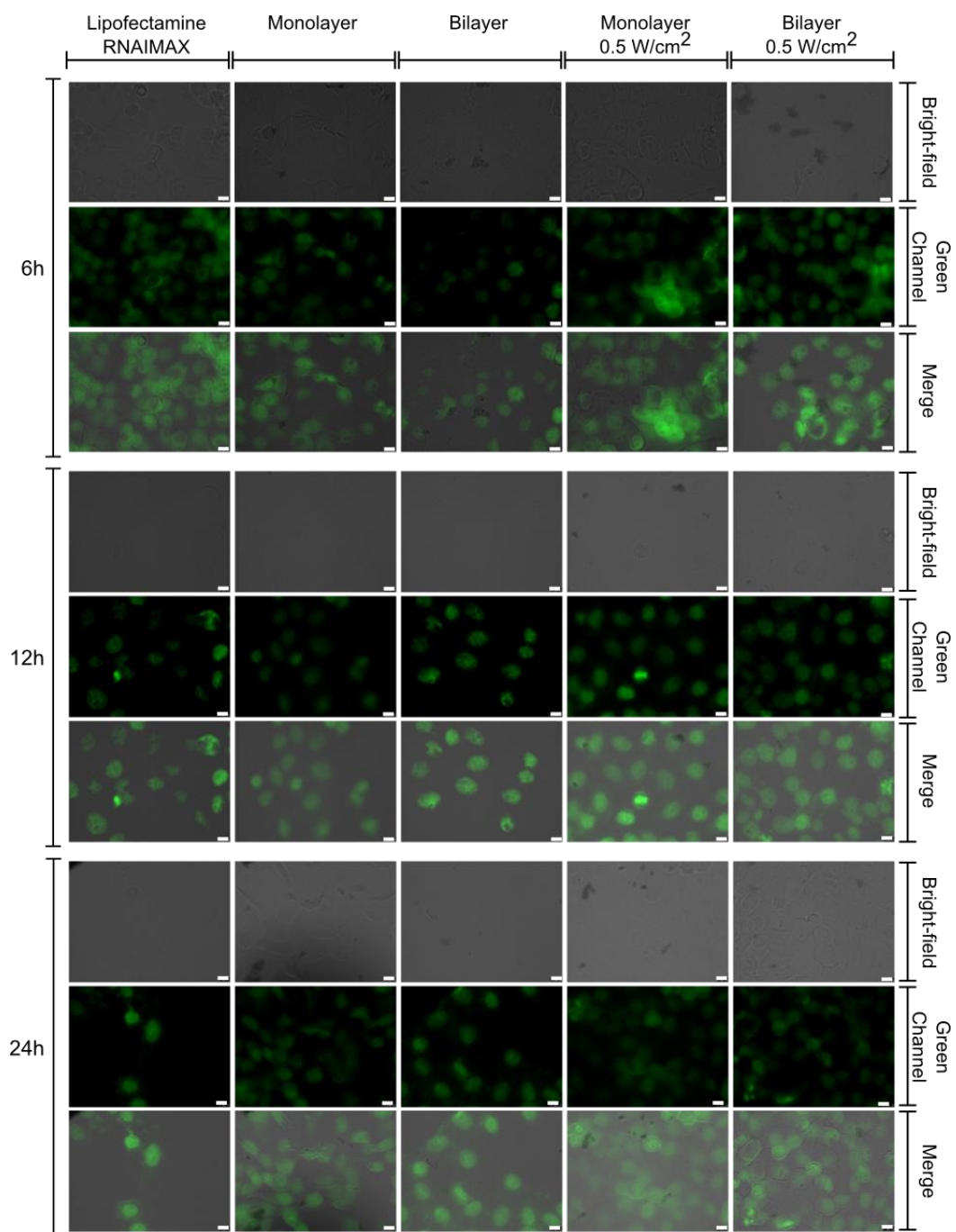


Figura 7. Transfección de siRNA en células HeLa utilizando Lipofectamine RNAiMAX (amarillo), GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA (verde claro) y GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA (verde oscuro) después de incubación durante 6, 12, 24, 48 y 72 horas en ausencia y presencia de irradiación con luz NIR (láser de onda continua 808 nm, 0,5 W/cm² durante 5 min). Las líneas punteadas y discontinuas son solo para guiar el ojo. En ausencia de GNRs, las células exhiben un porcentaje de autofluorescencia inferior al 8%.

Además, se observa una mayor actividad de silenciamiento de las nanoestructuras híbridas en comparación con la del control positivo de lipofectamina. Cuando las células se irradian con luz, la fluorescencia celular se reduce considerablemente después de 48 horas de incubación para los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA, y la caída se prolonga adicionalmente. Como se mencionó anteriormente, la irradiación con láser mejora la liberación de siRNA y la extinción de la fluorescencia celular observada, lo que confirma la idea de que la irradiación con luz NIR no afecta su funcionalidad.

Un análisis cuantitativo de la actividad de silenciamiento se realizó adicionalmente por citometría de flujo. La actividad de silenciamiento del gen se determinó midiendo la inhibición (en porcentaje medio) de la autofluorescencia celular. De esta manera, el control positivo (100%) se consideró la intensidad de fluorescencia de las células HeLa modificadas con GFP en ausencia de nanopartículas, y las células HeLa normales se consideraron como el control negativo. Además, se utilizó Lipofectamine RNAiMAX como control positivo adicional para la actividad de silenciamiento.



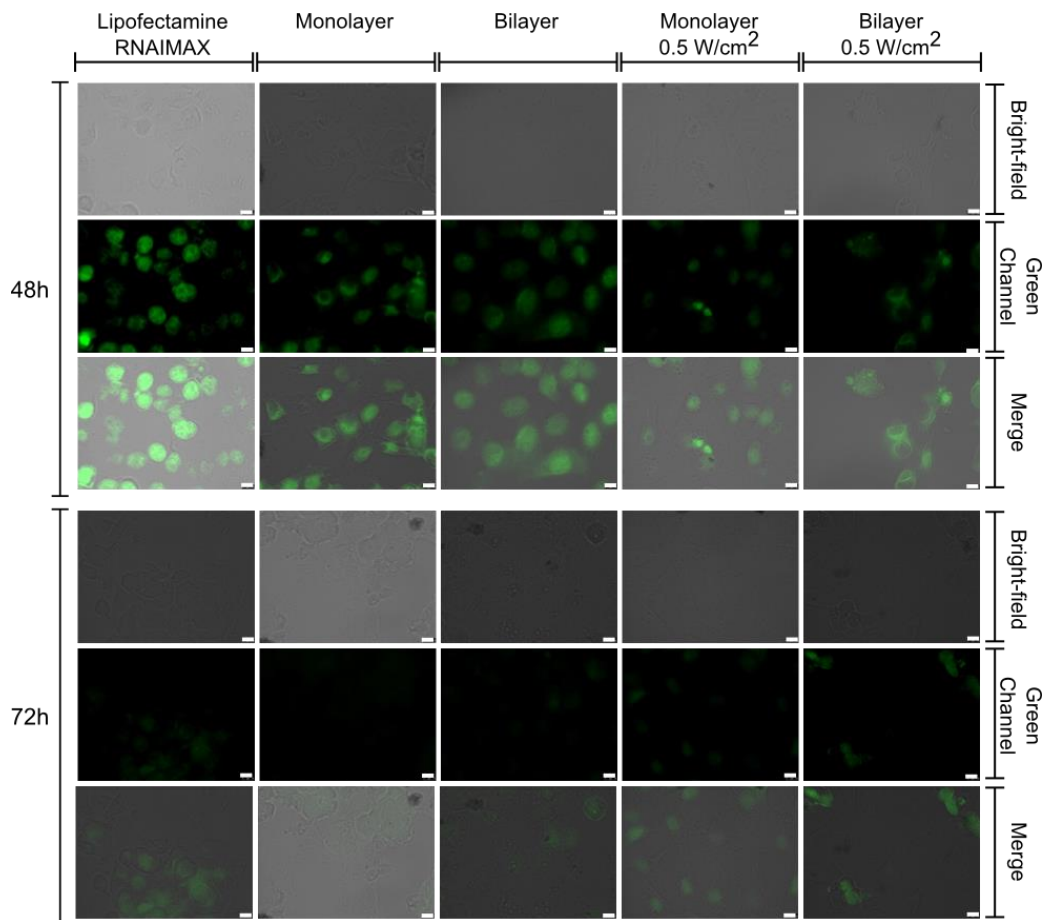


Figura 8. Inhibición de la fluorescencia de células HeLa-GFP (analizada por microscopía de fluorescencia) empleando GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA (monocapa) y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA (bicapa) en ausencia y presencia de luz NIR irradiación (0,5 W/cm² durante 5 min, 808 nm). Se utilizó lipofectamina RNAiMAX como control positivo. En las imágenes, se muestra la transmisión de campo claro, la fluorescencia de GFP (canal verde) y las imágenes fusionadas. La barra de la escala representa 1 μ m.

La Figura 9 muestra que se obtiene una actividad de inhibición de GFP del 60, 40 y 35% utilizando Lipofectamine, GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA y GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA después de 6 h de incubación, respectivamente. A las 12 y 24 horas el silenciamiento logrado por ambas clases de GNRs se vuelve similar a del control de Lipofectamine, mientras que, a incubaciones más largas, la actividad de

silenciamiento de los GNRs recubiertos con $(PSS/PLL/siRNA)_2/HA$ aumenta aún más, hasta alcanzar el 93% después de 72 horas. Estos resultados concuerdan con la mayor capacidad de estas nanopartículas híbridas para transportar grandes cantidades de siRNA, mientras se asegura su liberación sostenida. Además, la actividad de silenciamiento de las GNR recubiertas con PSS/PLL/siRNA/HA también es mayor (85%) que la del control de lipofectamina (aprox. 70%).

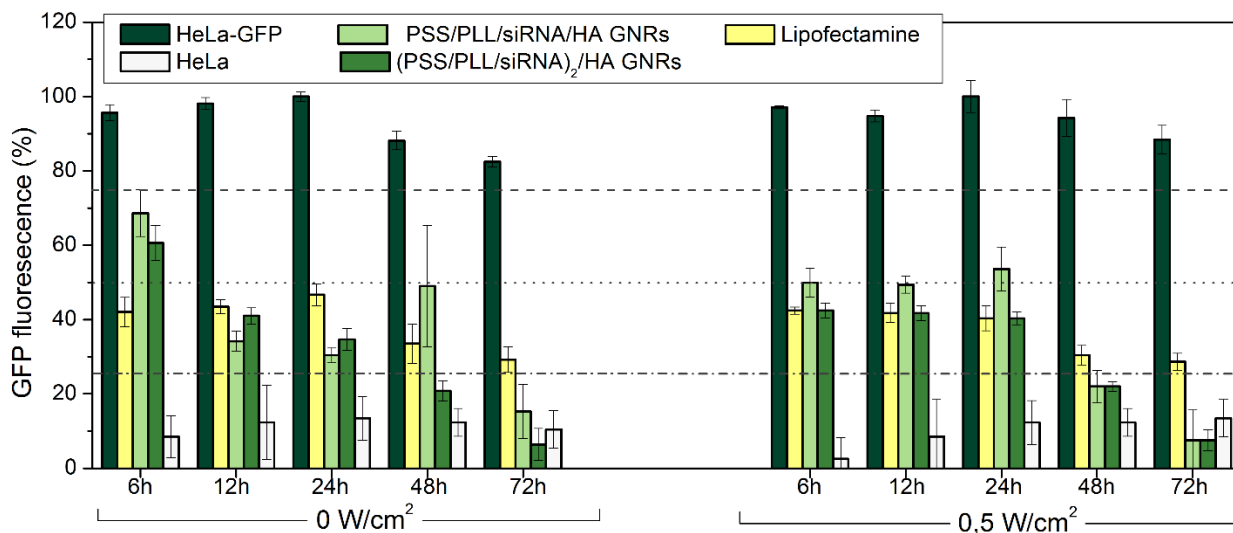


Figura 9. Porcentaje de silenciamiento de proteína fluorescente verde (GFP) en células HeLa-GFP usando Lipofectamine RNAiMAX, GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA, y GNRs recubiertos con $(PSS/PLL/siRNA)_2/HA$ durante 72 h en presencia y ausencia de irradiación con luz NIR a 0,5 W/cm² (luz láser de onda continua a 808 nm). Se usaron células HeLa no modificadas como control negativo y HeLa-GFP como control positivo. Las líneas son sólo para guiar el ojo.

Cuando se aplica la irradiación con luz NIR sobre los GNRs recubiertos con $(PSS/PLL/siRNA)_2/HA$ y con PSS/PLL/siRNA/HA estos muestran actividades de silenciamiento similares a las de la Lipofectamine (aprox. 50-60%), pero más grandes que en ausencia de irradiación con luz NIR. Este comportamiento también está en consonancia con la liberación mejorada del siRNA inducida por la luz en las nanopartículas híbridas y el mantenimiento de su funcionalidad, como se mencionó anteriormente.

A tiempos de incubación prolongados (48 y 72 horas), los niveles de fluorescencia para

los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA son más bajos que los obtenidos en ausencia de irradiación NIR, lo que confirma la liberación más rápida del siRNA para las partículas bajo iluminación. En cualquier caso, los niveles de fluorescencia están por debajo del 5% para ambos tipos de nanopartículas.

En resumen, los resultados preentados sugieren que los GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA son más efectivos que los recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA para el silenciamiento de genes *in vitro*. Por lo tanto, se prevé para un futuro la posibilidad de incorporar varios siRNA dirigidos a diferentes genes o al mismo gen con diferentes secuencias en las presentes nanopartículas híbridas de múltiples capas para buscar un efecto silenciador génico de carácter sinérgico [67].

CONCLUSIONES

En este trabajo, se desarrollaron GNRs como nanoagentes efectivos para el transporte y suministro de siRNA al interior de las células. Estos GNRs se funcionalizaron por medio de la técnica de ensamblaje LbL con PSS (la capa aniónica), PLL (la capa catiónica), siRNA, y una capa final de HA externa que actúa simultáneamente como un recubrimiento estabilizante y un agente de direccionamiento para unir las nanopartículas híbridas a los receptores CD44 sobre-expresados en la superficie de diferentes tipos de células cancerosas. Se pudieron formar capas de siRNA simples y duales dentro de las recubrimientos formados por los polielectrólitos ensamblados en la superficie de los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA, respectivamente. Se observó que las temperaturas más altas permiten una mejor incorporación del material genético en el revestimiento de la superficie ensamblada, como se indica por los valores más grandes de EE y LC.

La liberación del siRNA pudo controlarse mediante activadores internos (enzimas) y externos (luz NIR) mediante la biodegradabilidad de PLL asistida por proteasas y la modulación inducida por la luz de las interacciones de los polielectrólitos, así como mediante el diseño de la nanoplataforma. A este respecto, se observó que la irradiación de luz permite velocidades de liberación más rápidas que las asistidas por proteasas, y cuanto mayor sea el número de capas de polielectrólitos ensamblados menor será la liberación.

No se detectó una citotoxicidad celular significativa de las nanoplataformas híbridas en ausencia de irradiación de luz, y aumentando esta a medida que lo hizo la intensidad de la irradiación. Además, los GNRs recubiertos con (PSS/PLL/siRNA)₂/HA mostraron una menor toxicidad celular inducida por fototermia, ya que más capas de polielectrólitos reducen la eficiencia de la transformación de luz en calor.

Se investigó también la capacidad de los GNRs recubiertos con PSS/PLL/siRNA/HA y (PSS/PLL/siRNA)₂/HA para ingresar a las células, administrar la carga y silenciar la expresión del gen de interés mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Los datos obtenidos indicaron que las nanopartículas híbridas se pueden internalizar dentro de las células sin requerir agentes de transfección adicionales, y una vez dentro

se puede liberar el siRNA de las partículas a demanda al menos durante 72 horas. Esto fue corroborado por la caída en la fluorescencia en células HeLa modificadas con GFP. No se observaron diferencias en el silenciamiento génico cuando se irradiaron las células con luz láser NIR. Finalmente, los GNRs recubiertos de (PSS/PLL/siRNA)₂/HA lograron el mejor efecto de silenciamiento como consecuencia de llevar una mayor concentración de siRNA y proporcionar una liberación de carga más sostenida.

REFERENCIAS

- [1] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* 2001, **411**, 494–499.
- [2] R. Maheshwari, M. Tekade, P. Gondaliya, K. Kalia, A. D’Emanuele, R. K. Tekade, Recent Advances in Exosome-based Nanovehicles as RNA Interference Therapeutic Carriers. *Nanomedicine*. 2017, **12**, 2653-2675.
- [3] H. Ragelle, R. Riva, G. Vandermeulen, B. Naeye, V. Pourcelle, C. S. Le Duff, C. D’Haese, B. Nysten, K. Braeckmans, S. C. De Smedt, C. Jérôme, V. Préat, V. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: Optimizing Formulation to Increase Stability and Efficiency. *J. Control. Release* 2014, **176**, 54-63.[
- [4] H. J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Precise Engineering of siRNA Delivery Vehicles to Tumors Using Polyion Complexes and Gold Nanoparticles. *ACS Nano* 2014, **8**, 8979-8991.
- [5] M. Martínez-Negro, K. Kumar, A. L. Barrán-Berdón, S. Datta, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya, E. Aicart, Efficient Cellular Knockdown Mediated by siRNA Nanovectors of Gemini Cationic Lipids Having Delocalizable Headgroups and Oligo-Oxyethylene Spacers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, **8**, 22113-22126.
- [6] F. Liu, C. Wang, Y. Gao, X. Li, F. Tian, Y. Zhang, M. Fu, P. Li, Y. Wang, F. Wang, Current Transport Systems and Clinical Application for Small Interfering RNA (siRNA) Drugs. *Mol. Diagn. Ther.* 2018, **22**, 551-569.
- [7] Q.-S. Pan, T.-T. Chen, C.-P. Nie, J.-T. Yi, Y.-L. Hu, X. Chu, In Situ Synthesis of Ultrathin ZIF-8 Film-Coated MSNs for Codelivering Bcl 2 siRNA and Doxorubicin to Enhance Chemotherapeutic Efficacy in Drug-Resistant Cancer Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, **10**, 33070-33077.
- [8] O. S. Fenton, K. J. Kauffman, R. L. McClellan, J. C. Kaczmarek, M. D. Zeng, J. L. Andresen, L. H. Rhym, M. W. Heartlein, F. DeRosa, D. G. Anderson, Customizable Lipid Nanoparticle Materials for the Delivery of siRNAs and mRNAs. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, **57**, 13582-13586.
- [9] Y. F. Tan, Y. S. Lee, L.-F. Seet, K. W. Ng, T. T. Wong, S. Venkatraman, Design and In Vitro Release Study of siRNA Loaded Layer by Layer Nanoparticles With Sustained Gene Silencing Effect. *Exp. Opin. Drug Deliv.* 2018, **15**, 937-949.
- [10] H. J. Kin, Y. Yi, A. Kim, K. Miyata, Small Delivery Vehicles of siRNA for Enhanced Cancer Therapy. *Biomacromolecules* 2018, **19**, 2944-2956.

- [11] L. Johannes, M. Lucchino, Current Challenges in Delivery and Cytosolic Translocation of Therapeutic RNAs. *Nucleic Acid Ther.* 2018, **28**, 178-193.
- [12] X. Chen, L. S. Mangala, C. Rodriguez-Aguayo, X. Kong, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood, RNA Interference-based Therapy and Its Delivery Systems. *Cancer Metastasis Rev.* 2018, **37**, 107-124.
- [13] D. Li, A. S. Sharili, J. Connelly, J. E. Gautrot, Highly Stable RNA Capture by Dense Polymer Brushes for the Design of Cytocompatible, Serum-Stable siRNA Delivery Vectors. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 606-615.
- [14] J. S. Lee, J. J. Green, K. T. Love, J. Sunshine, R. Langer, D. G. Anderson, Poly(β -amino ester) Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery. *Nano Lett.* 2009, **9**, 2402–2406.
- [15] J. B. Miller, P. Kos, V. Tieu, K. Zhou, D. J. Siegwart, Development of Cationic Quaternary Ammonium Sulfonamide Amino Lipids for Nucleic Acid Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, **10**, 2302-2311.
- [16] Z. R. Cohen, S. Ramishetti, N. Peshes-Yaloz, M. Goldsmith, A. Wohl, Z. Zibly, D. Peer, Localized RNAi Therapeutics of Chemiresistant Grade IV Glioma Using Hyaluronan-Grafted Lipid-Based Nanoparticles. *ACS Nano* 2015, **9**, 1581-1591.
- [17] T. Nishimura, A. Yamada, K. Umezaki, S.-I. Sawada, S.-A. Mukai, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Self-Assembled Polypeptide Nanogels with Enzymatically Transformable Surface as a Small Interfering RNA Delivery Platform. *Biomacromolecules* 2017, **18**, 3913-3923.
- [18] S. Al-Qadi, M. Alatorre-Meda, E. M. Zaghloul, P. Taboada, C. Remuñán-López, Chitosan-Hyaluronic Acid Nanoparticles for Gene Silencing: The role of Hyaluronic Acid on the Nanoparticles' Formation and Activity. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 2013, **103**, 615-623.
- [19] J. Bruniaux, S. B. Djemaa, K. Hervé-Aubert, H. Marchais, I. Chourpa, S. David, Stealth Magnetic Nanocarriers of siRNA as Platform for Breast Cancer Theranostics. *Int. J. Pharm.* 2017, **532**, 660-668.
- [20] C. Pinese, J. Lin, U. Milbreta, M. Li, Y. Wang, K. W. Leong, S. Y. Chew, Sustained Delivery of siRNA/Mesoporous Silica Nanoparticle Complexes from Nanofiber Scaffolds for Long-Term Gene Silencing. *Acta Biomaterialia* 2018, **76**, 164-177.
- [21] R. Kamegawa, M. Naito, K. Miyata, Functionalization of Silica Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Nano Res.* 2018, **11**, 5219-5239.
- [22] M. Abdelrahman, L. Douziech-Eyrolles, S. Y. Alkarib, K. Hervé-Aubert, S. Ben Djemaa, H. Marchais, I. Chourpa, S. David, siRNA Delivery system Based on Magnetic Nanovectors: Characterization and Stability Evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2017, **106**, 287-293.

- [23] J. Yue, T. J. Feliciano, W. Li, A. Lee, T. W. Odom, Gold Nanoparticle Size and Shape Effects on Cellular Uptake and Intracellular Distribution of siRNA Nanoconstructs. *Bioconj. Chem.* 2017, **28**, 1791-1800.
- [24] W. J. Song, J. Z. Du, T. M. Sun, P. Z. Zhang, J. Wang, Gold Nanoparticles Capped with Polyethyleneimine for Enhanced siRNA Delivery. *Small* 2010, **6**, 239–246.
- [25] N. Li, T. Larson, H. H. Nguyen, K. V. Sokolov, A. D. Ellington, Directed Evolution of Gold Nanoparticle Delivery to Cells. *Chem. Commun.* 2010, **46**, 392–394.
- [26] M. Hu, J. Chen, Z. Li, L. Au, G. V. Hartland, X. Li, M. Marquez, Y. Xia, Gold Nanostructures: Engineering Their Plasmonic Properties for Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* 2006, **35**, 1084-1094.
- [27] C. Yan, Y. Wang, Q. Tian, H. Wu, S. Yang, Concentration Effect on Large Scale Synthesis of High Quality Small Gold Nanorods and Their Potential role in Cancer Theranostics. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, **87**, 120-127.
- [28] V. Mosquera, E. Villar-Alvarez, A. Cambon, A. Pardo, V. X. Mosquera, A. Bouzas-Mosquera, A. Topete, S. Barbosa, P. Taboada, Gold Nanorod-Based Nanohybrids for Combinatorial Therapeutics. *ACS Omega* 2018, **3**, 12633-12647.
- [29] Y. Xiao, H. Hong, V. Z. Matson, A. Javadi, W. Xu, Y. Yang, Y. Zhang, J. W. Engle, R. J. Nickles, W. Cai, D. A. Steeber, S. Gong, Gold Nanorods Conjugated with Doxorubicin and cRGD for Combined Anticancer Drug Delivery and PET Imaging, *Theranostics* 2012, **2**, 2757-2768.
- [30] S. B. Kim, T. H. Lee, I. Yoon, Y. K. Shim, W. K. Lee, Gold nanorod-photosensitizer complex obtained by layer-by-layer method for photodynamic/photothermal therapy in vitro, *Chem-Asian J.* 2015, **10**, 563-567.
- [31] C. K. Kim, P. Ghosh, C. Pagliuca, Z. J. Zhu, S. Menichetti, V. M. Rotello, Entrapment of Hydrophobic Drugs in Nanoparticle Monolayers with Efficient Release into Cancer Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, **131**, 1360-1361.
- [32] J. L. Shen, H. C. Kim, C. F. Mu, E. Gentile, J. H. Mai, J. Wolfram, L. N. Ji, M. Ferrari, Z. W. Mao, H. Shen, Multifunctional Gold Nanorods for siRNA Gene Silencing and Photothermal Therapy, *Adv. Health. Mater.* 2014, **3**, 1629-1637.
- [33] B. -K. Wang, X.-F. Yu, J.-H. Wang, Z.-B. Li, P.-H. Li, H. Wang, L. Song, P. K. Chu, C. Li, Gold Nanorods-siRNA Complex Nanoplex for Improved Photothermal Therapy by Gene Silencing. *Biomaterials* 2016, **78**, 27-39.
- [34] F. Yin, C. Yang, Q. Wang, S. Zeng, R. Hu, G. Lin, J. Tian, S. Hu, R. F. Lan, H. S. Yoon, F. Lu, K. Wang, K. T. Yong, A Light-Driven Therapy of Pancreatic Adenocarcinoma Using Gold Nanorods-Based Nanocarriers for Co-delivery of Doxorubicin and siRNA. *Theranostics* 2015, **5**, 818-833.

- [35] A. K. Parchur, G. Sharma, J. M. Jagtap, V. R. Gogineni, P. S. Laviolette, M. J. Flister, S. B. White, A. Joshi, Vascular Interventional Radiology-Guided Photothermal Therapy of Colorectal Cancer Liver Metastasis with Theranostic Gold Nanorods. *ACS Nano* 2018, **12**, 6597-6611.
- [36] R. Masood, I. Roy, S. Zu, C. Hochstim, K. T. Yong, W. C. Law, H. Ding, U. K. Sinha, P. N. Prasad, Gold Nanorod-Sphingosine Kinase siRNA Nanocomplexes: A Novel Therapeutic Tool for Potent Radiosensitization of Head and Neck Cancer. *Integr. Biol.* 2012, **4**, 132-141.
- [37] Y. Xiao, R. Jaskula-Sztul, A. Javadi, W. Xu, J. Eide, A. Dammalapati, M. Kunnimalaiyaan, H. Chen, S. Gong, Co-delivery of Doxorubicin and siRNA Using Octreotide-Conjugated Gold Nanorods for Targeted Neuroendocrine Cancer Therapy. *Nanoscale* 2012, **4**, 3309-3314.
- [38] D. Cui, P. Huang, C. Zhang, C. S. Ozkan, B. Pan, P. Xu, Dendrimer-Modified Gold Nanorods as Efficient Controlled Gene Delivery System Under Near-Infrared Light Irradiation. *J. Control. Release* 2011, **152**, e137-e139.
- [39] J. H. Choi, B. K. Oh, Development of Two-Component Nanorod Complex for Dual-Fluorescence Imaging and siRNA Delivery. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014, **24**, 1291-1299.
- [40] A. M. Alkilany, P. K. Nalaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* 2009, **5**, 701–708.
- [41] J. Wan, J.-H.; Wang, T. Liu, Z. Xie, X.-F. Yu, W. Li, Surface Chemistry But Not Aspect Ratio Mediates the Biological Toxicity of Gold Nanorods In Vitro and In Vivo. *Sci. Rep.* 2015, **5**, 11398.
- [42] K. Park, M. Y. Lee, K. S. Kim, S. K. Hahn, Target Specific Tumor Treatment by VEGF siRNA Complexed with Reducible Polyethyleneimine/Hyaluronic Acid Conjugate. *Biomaterials* 2010, **31**, 5258–5265.
- [43] S. E. Lee, D. Y. Sasaki, T. D. Perroud, D. Yoo, K. D. Patel, L. P. Lee, Biologically Functional Cationic Phospholipid- Gold Nanoplasmonic Carriers of RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, **131**, 14066–14074.
- [44] T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome, PEG- Modified Gold Nanorods with a Stealth Character for In Vivo Applications. *J. Control. Release* 2006, **114**, 343–347.
- [45] H. Ding, K. Yong, I. Roy, H. E. Pudavar, W. C. Law, E. J. Bergey, P. N. Prasad, Gold Nanorods Coated with Multilayer Polyelectrolyte as Contrast Agents for Multimodal Imaging. *J. Phys. Chem. C* 2007, **111**, 12552–12557.
- [46] T. Ito, T. Iida-Tanaka, K. Niidome, K. Kawano, T. Kubo, Z. Yoshikawa, Y. Sato, Y. Koyama. Hyaluronic Acid and its Derivative as a Multifunctional Gene Expression

- Enhancer: Protection from Nonspecific Interactions, Adhesion to Targeted Cells, and Transcriptional Activation. *J. Control. Release* 2006, **112**, 382–388.
- [47] A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, B. Seed, CD44 is the Principal Cell Surface Receptor for Hyaluronate. *Cell* 1990, **61**, 1303–1313.
- [48] J. Entwistle, C. L. Hall, E. A. Turley, HA Receptors: Regulators of Signalling to the Cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.* 1996, **61**, 569–577.
- [49] M.-Y. Lee, S.-J. Park, K. Park, K. S. Kim, H. Lee, S. K. Hahn, Target-Specific Gene Silencing of Layer-by-Layer Assembled Gold–Cysteamine/siRNA/PEI/HA Nanocomplex. *ACS Nano* 2011, **5**, 6138–6147.
- [50] A. C. Bonoiu, E. J. Bergey, H. Ding, R. Hu, R. Kumar, K.-T. Yong, P. N. Prasad, S. Mahajan, K. E. Picchione, A. Bhattacharjee, T. A. Ignatowski, Gold Nanorod–siRNA Induces Efficient In Vivo Gene Silencing in the Rat Hippocampus. *Nanomedicine* 2011, **6**, 617–630.
- [51] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, M. A. El-Sayed, Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 2115–2120.
- [52] T. S. Hauck, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, Assessing the Effect of Surface Chemistry on Gold Nanorod Uptake, Toxicity, and Gene Expression in Mammalian Cells. *Small* 2008, **4**, 153–159.
- [53] D. Naor R. V. Sionov, D. Ish-Shalom, CD44: Structure, Function, and Association with the Malignant Process. *Adv Cancer Res.* 1997, **71**, 241–319.
- [54] H. S. S. Qhattal, X. Liu, Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes. *Mol. Pharm.* 2011, **8**, 1233–1246.
- [55] K. Wang, J. Zeng, L. Luo, J. Yang, J. Chen, B. Li, K. Shen, Identification of a Cancer Stem Cell-like Side Population in the HeLa Human Cervical Carcinoma Cell Line. *Oncol. Lett.* 2013, **6**, 1673-1680.
- [56] D. J. Gary, N. Puri, Y. Y. Won, Polymer-Based siRNA Delivery: Perspectives on the Fundamental and Phenomenological distinctions from Polymer-Based DNA Delivery *J. Control. Release* 2007, **121**, 64–73.
- [57] H. A. Wagenknecht, Charge Transfer in DNA: From Mechanism to Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH, KGaA, Weinheim, 2005.
- [58] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coord. Chem. Rev.* 2005, **249**, 1870–1901.
- [59] C. Yu, J. Irudayaraj, Quantitative Evaluation of Sensitivity and Selectivity of Multiplex NanoSPR Biosensor Assays. *Biophys. J.* 2007, **93**; 3684–3692.

- [60] P. Mulvaney, M. Giersig, A. Henglein, Surface Chemistry of Colloidal Gold: Deposition of Lead and Accompanying Optical Effects. *J. Phys. Chem.* 1992, **96**, 10419–10424.
- [61] J. T. Sparrow, V. Edwards, C. H. Tung, M. J. Logan, M. S. Wadhwa, J. Duguid, L. C. Smith, Synthetic Peptide-Based DNA Complexes for Nonviral Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, **30**, 115-131
- [62] S. K. Lee, M. S. Han, S. Asokan, C. Tung, Effective Gene Silencing by Multilayered siRNA-Coated Gold Nanoparticles. *Small* 2011, **7**, 364–370.
- [63] S. E. Burke, C. J. Barrett, pH-Responsive Properties of Multilayered Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Surfaces. *Biomacromolecules* 2003, **4**, 1773–1783.
- [64] R. Huschka, J. Zuloaga, M. W. Knight, L. V. Brown, P. Nordlander, N. J. Halas, Light-Induced Release of DNA from Gold Nanoparticles: Nanoshells and Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 12247–12255.
- [65] H. Lv, S. zhang, B. Wang, S. Ciu, J. Yan, Toxicity of Cationic Lipids and Cationic Polymers in Gene Delivery. *J. Control. Release.* 2006, **114**, 100-109.
- [66] T. B. Huff, L. Tong, Y. Zhao, M. N. Hansen, J. Cheng, A. Wei, Hyperthermic Effects of Gold Nanorods on Tumor Cells. *Nanomedicine* 2007, **2**, 125–132.
- [67] W. Tai, B. Qin, K. Cheng, Inhibition of Breast Cancer Cell Growth and Invasiveness by dual Silencing of Her-2 and VEGF. *Mol. Pharm.* 2010, **7**, 543-556.

CAPÍTULO III.

Nanopartículas de quitosano

INTRODUCCIÓN

En comparación con la terapia génica convencional basada en el ácido desoxirribonucleico (ADN), el uso del ácido ribonucleico de interferencia corto (siRNA) para silenciar los genes mediante la interferencia del ARN (iRNA) ha atraído mucha atención recientemente [1]. Este es un proceso biológico en el que las moléculas de siRNA interfieren en la expresión de genes específicos al degradar el ARN mensajero (mRNA) después de la transcripción; esto evita su traducción y, posteriormente, conduce al silenciamiento génico. Tras la introducción en las células, el siRNA se une a un complejo de nucleasas denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Dentro del RISC, el siRNA se desenrolla para formar un siRNA de cadena simple, donde una cadena se integra como una plantilla dentro del complejo RISC para reconocer cadenas de mRNA complementarias. Después de la segmentación de la doble hebra de siRNA, las ribonucleasas (RNAsas) se activan induciendo la ruptura de la hebra del mRNA y la supresión subsiguiente de la expresión del gen/proteína asociada a la codificación del mRNA [2,3]. La hebra del mRNA no incorporado se elimina durante el proceso de ensamblaje del siRNA y, probablemente, se degrada posteriormente [4]. El ARN de interferencia es ventajoso sobre otras terapias debido a su especificidad y nula citotoxicidad [3]. Además, ya se ha demostrado la administración efectiva de siRNA's sintéticos *in vivo* y la posterior disminución en la expresión de una diana endógena particular sin efectos secundarios indeseables [5]. Gracias a su selectividad y potencial, la interferencia de ARN se está convirtiendo en un enfoque muy atractivo para futuras terapias con el fin de proporcionar un silenciamiento específico de la expresión génica y el control posterior de los trastornos genéticos.

Sin embargo, para lograr una acción eficiente y un uso generalizado de las terapias de siRNA, primero se deben superar varios desafíos importantes como: i) el logro de una concentración óptima de las cadenas dobles de oligonucleótidos dentro de los citoplasmas celulares para inducir un silenciamiento génico efectivo y de larga duración; ii) la protección del siRNA contra la degradación por las nucleasas séricas después de la administración que conduce a una mejora de la vida media del siRNA al interior de las células; 6 iii) la imposibilidad de que las cadenas del siRNA se difundan a través de las membranas celulares por su tamaño y carácter aniónico, este último involucra fuertes

interacciones electrostáticas repulsivas con las membranas celulares [7]. Por lo tanto, la administración eficiente, segura y constante de los siRNA depende en gran medida del desarrollo de nanosistemas adecuados para su transporte y entrega controlados [8]. Un vehículo ideal para el transporte y la entrega de siRNA debe entonces cumplir los siguientes requisitos: I) ser capaz de unir y condensar hebras de siRNA dentro del nanovehículo; II) proteger esta carga terapéutica de la degradación de las enzimas presentes en el suero y líquido intercelular; III) orientar el siRNA específicamente al sitio de acción; IV) para facilitar/mejorar la captación celular y la internalización del material bioactivo; V) permitir el escape del siRNA de los endosomas/lisosomas hacia el citosol, y finalmente, VI) promover un silenciamiento efectivo y una posterior inhibición del gen/proteína de interés.

Estudios anteriores han demostrado que el quitosano es un biomaterial portador muy prometedor para el suministro de ARN con el fin de lograr una expresión efectiva de los genes reporteros *in vitro* e *in vivo*, destacando el uso potencial del quitosano como constituyente principal de los nanotransportadores para el suministro de siRNA. Para establecer su efectividad, es clave determinar la influencia de los parámetros de la formulación en el rendimiento físico y biológico de los complejos formados de quitosano-siRNA para una respuesta terapéutica efectiva y para garantizar la protección correcta de siRNA a la degradación enzimática. Por ejemplo, Liu et al. analizaron el silenciamiento de genes *in vitro* con nanopartículas de quitosano-siRNA para dilucidar que este fenómeno depende en gran medida del peso molecular (Mw) y del grado de desacetilación (DD) del biopolímero [9]. Katas et al. Mostraron que la eficacia de la transfección del siRNA depende del método de la asociación del siRNA con el quitosano, siendo la gelificación iónica la mejor metodología para proporcionar el mayor efecto biológico [10]. Un notable estudio *in vivo* desarrollado por Howard et al. también demostró la eficacia de las nanopartículas de quitosano encapsulando siRNA, administradas por vía nasal en ratones transgénicos que sobre expresan la proteína fluorescente verde (GFP), en la que se logró una importante reducción de la expresión de dicha proteína [11].

Recientemente, estudios adicionales han investigado el papel que desempeña la hidrofobicidad del quitosano, la proporción de nitrógeno a fosfato (N/P) durante el proceso de gelificación iónica, el tamaño de las partículas y la dirección mediante ligandos para la mejora de la eficiencia de la transfección y el silenciamiento de genes específicos. Por ejemplo, la combinación de dímeros de ARN de bacteriófagos (pRNA) con nanopartículas de quitosano modificados con polietilenglicol (PEG) y funcionalizados con folato dio lugar a un sistema de administración de siRNA dirigido a tumores con una acumulación de carga mucho mayor en el tejido diana *in vivo* [12].

Sin embargo, las nanopartículas para la administración de siRNA basadas en quitosano tienen sus propias limitaciones. Uno de los principales inconvenientes es su baja solubilidad en agua a pH fisiológico, lo que puede impedir su exitosa administración *in vivo*. Vale la pena recordar que, a un pH fisiológico, el número de grupos amino cargados positivamente disponibles en el esqueleto de quitosano se reduce en gran medida, lo que puede impedir el acomplejamiento electrostático del siRNA e impedir la estabilidad de las partículas *in vivo*. Además, la eficiencia de transfección del quitosano nativo todavía está lejos de ser óptima, se han logrado niveles de liberación intracelular de siRNA *in vivo* insuficientes [13]. Este problema puede originarse en las proteínas séricas (albúmina, fibrinógeno) que pueden causar la agregación de partículas, lo que favorece la probabilidad de sufrir embolia y/o citotoxicidad aumentada. Además, los componentes sanguíneos cargados negativamente, principalmente proteínas, pueden competir con el siRNA para unirse al biopolímero catiónico y, por lo tanto, las partículas pueden disociarse en el torrente sanguíneo, dando como resultado una liberación prematura del siRNA seguida de su degradación y/o depuración renal [14]. Por lo tanto, la modificación química del quitosano aparece como una forma interesante de proporcionar nuevas características físico-químicas a la biomolécula de quitosano para superar estas dificultades.

Las cadenas de quitosano tienen tres sitios reactivos para su modificación química: dos grupos hidroxilo y una amina primaria dentro de las unidades de glucosamina, que pueden modificarse químicamente para superar las barreras para la entrega de genes: sin embargo, para la unión de los ácidos nucleicos, esta última debe mantenerse.

De esta manera, varios derivados de quitosano han surgido de manera interesante como alternativas potencialmente para la administración de siRNA, como quitosanos modificados con grupos trimetil- [15], grupos tiol- [16], grupos glicol- [17], grupos PEGilados [18,19], grupos guanidini- [20] o cadenas alquílicas [21]. Todas estas modificaciones dieron como resultado una solubilidad y estabilidad mejoradas de las partículas, mayores eficiencias de transfección e/o independencia del pH. Entre estas, la modificación hidrófoba del esqueleto de biopolímero parece particularmente interesante ya que ha demostrado un gran potencial para mejorar el rendimiento de los nanovectores genéticos. Por ejemplo, se encontró que la eficiencia de la transfección de siRNA en líneas celulares C2C12 que usan quitosanos alquilados con diferentes longitudes de cadena lateral aumenta a medida que la longitud de la cadena de alquilo aumenta hasta aproximadamente ocho de carbonos de longitud [22]. Esta mayor transfección dotada por quitosanos alquilados podría asignarse, por un lado, al acomplejamiento del quitosano con el siRNA mejorado por el debilitamiento inducido por la hidrofobicidad de las atracciones electrostáticas entre el siRNA y el biopolímero catiónico y, por el otro, a la mayor absorción del nanovector a través de los dominios hidrófobos de las membranas celulares [22, 23].

El presente trabajo describe la obtención mediante el método de gelificación iónica de diferentes nanovectores de quitosanos modificados con cadenas de alquilo y el papel desempeñado por la longitud de la cadena lateral alifática y el grado de sustitución en la carga, protección, estabilidad, perfiles de liberación, transfección y eficiencias de silenciamiento del siRNA para la construcción de portadores de genes adecuados. En particular, las cadenas laterales alifáticas de diferente longitud (octilo, decilo y dodecilo) se injertaron en diferentes extensiones en el esqueleto del polímero para lograr varios grados de sustitución. Estos quitosanos modificados se utilizaron para obtener nanopartículas de quitosano-siRNA, (denominadas de ahora en adelante como CSNP), mediante el proceso de gelificación iónica. Se observó que la incorporación de siRNA dentro de las nanopartículas se debía a una combinación de fuerzas electrostáticas, de hidrógeno e hidrófobas, como lo demuestran los experimentos de titulación isotérmica. Esta incorporación también condujo a cambios adicionales tanto en el tamaño de las partículas como en las cargas superficiales. A este respecto, las CSNP no modificados

mostraron, en general, tamaños más voluminosos que las contrapartes sin carga de material genético y no derivadas, (denominadas CNP) correspondientes, mientras que se encontró una tendencia opuesta para las CSNP modificados. Las modificaciones hidrófobas mejoraron la carga de siRNA y la eficiencia de encapsulamiento dentro de las partículas, brindando una mayor protección contra el medio circundante, así como un control adicional sobre la cinética de liberación de la carga al reducir la fase de “estallido” inicial de siRNA mientras se mantiene una entrega sostenida durante más tiempo. Se observó que las CSNP modificadas hidrofóticamente eran bastante estables en medios fisiológicos relevantes, con un ligero agrupamiento después de una larga incubación. Para probar la citotoxicidad, la eficiencia de transfección y la actividad de silenciamiento de las nanopartículas, también se realizaron una serie de experimentos *in vitro* en células HeLa de cáncer cervical y macrófagos RAW 264.7, con una mirada adicional a las posibles diferencias de toxicidad y eficiencia de transfección según el tipo de célula y fisiología [24]. Las células HeLa fueron más sensibles que los macrófagos a la presencia de CSNPs modificadas hidrofóticamente de una manera dependiente de la dosis. De manera impresionante, las CSNP, formadas con los quitosanos hidrofobizado, administraron el siRNA dentro del citoplasma celular en mayor medida que sus contrapartes no modificadas gracias a su mayor capacidad de internalización celular. Posteriormente, estas CSNPs modificadas exhibieron un silenciamiento génico efectivo al inhibir la expresión de GFP sobre expresada en células HeLa modificadas, siendo ligeramente mayor que la de Lipofectamine 2000, un agente de transfección utilizado ampliamente para la introducción de material genético en células.

MATERIALES Y MÉTODOS

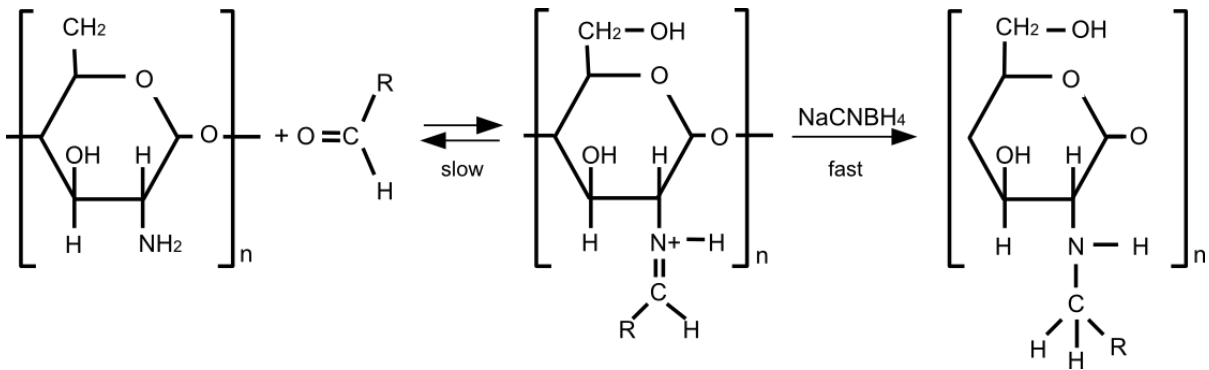
Se utilizó quitosano con un peso molecular promedio de 415000 g/mol y 90% de grado de desacetilación (Fluka, grado de viscosidad media). Se utilizaron quitosanos de grado de viscosidad baja y alta, también de Fluka, para comparación. El cianohidrobtorato de sodio (NaCNBH₄), los aldehídos de octilo, decilo y dodecilo, y el tripolifosfato de pentasodio (TPP) se adquirieron en Sigma (Sigma-Aldrich Co., EE. UU.) Y se utilizaron como se recibieron. Se utilizó la sonda oligo fluorescente de control BLOCK-iT™ de Invitrogen (Carlsbad, MA, EE. UU.). Este oligómero de ARN de doble cadena marcado con fluoresceína tiene la misma longitud, carga eléctrica y estructura que el siRNA estándar. El agua destilada ultra pura exenta de DNAsas/RNAsas fue de Gibco (Life Technologies, EE. UU.). Todos los disolventes orgánicos fueron de grado HPLC y todos los demás productos químicos fueron de la mayor pureza comercialmente disponible.

3.1.1 Síntesis y caracterización de derivados del quitosano.

Los derivados de quitosano se obtuvieron mediante un proceso de aminación reductora [25-27] (ver Esquema 1). Como se describió anteriormente, la reacción de alquilación implicó el injerto de cadenas laterales de alquilo de 8, 10 y 12 carbonos en el esqueleto de quitosán [25,28]. Brevemente, se disolvieron 2 g de quitosano en 110 ml de ácido acético 0,2 M. Después de la disolución, se agregaron 75 ml de etanol y se ajustó el pH a 5.1 para evitar la precipitación del biopolímero. Se añadieron diferentes proporciones de aldehído (5,10, o 50% cuando correspondía) diluidas en etanol a la solución de quitosano, seguido de un exceso triple molar de cianohidrobtorato de sodio. A continuación, se dejó que la reacción procediera bajo agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. El quitosano alquilado se precipitó con etanol, el pH se ajustó a 7 y, a continuación, el precipitado se lavó varias veces en mezclas de etanol/agua con un contenido creciente de etanol de 70 al 100% (v/v). El grado de sustitución de quitosano se determinó mediante resonancia magnética nuclear ¹H (¹H RMN) utilizando un instrumento Bruker® (XRD-500) que funciona a 500 MHz y 11.74 T. Las muestras se prepararon disolviendo 5 mg de los diferentes quitosanos modificados en 0,5 ml de una mezcla de DCI/D₂O al 2% (v/v) a pH 3,2.

3.1.2 Preparación de nanopartículas de quitosano.

Las nanopartículas de quitosano (CNP) y quitosano-siRNA (CSNP) se prepararon mediante gelificación iónica a través de la reticulación de las cadenas de TPP y quitosano, como se describió anteriormente, [29] con algunas modificaciones. En resumen, se preparó una solución 1 mg/ml de quitosano en ácido acético 0,2 M (pH 4,2) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después, se disolvieron 0,5 mg de TPP en 0,75 ml de agua libre de RNAsas y se agregó directamente en la solución de quitosano con agitación constante. Para la producción de CSNPs, se disolvió una cantidad específica de siRNA en 0,75 ml de solución de TPP antes de su adición gota a gota sobre la solución de quitosano. La agitación magnética se mantuvo a 700 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las nanopartículas sintetizadas (NP) se centrifugaron a 15000 rpm durante 20 minutos y se resuspendieron en agua destilada libre de RNAsas. Finalmente, las muestras de partículas se filtraron (filtros Millipore Millex, tamaño de poro de 0,45 μm) y se almacenaron a 4 $^{\circ}\text{C}$.



Esquema 1: Esquema del proceso de reacción de alquilación para la derivatización del esqueleto de quitosano.

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

3.2.1 Dispersión dinámica de la luz.

Las mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) se realizaron utilizando un instrumento SLS/DLS (ALV-5000F, ALV-GmbH, Alemania) equipado con un láser de estado sólido Nd:YAG (Coherent Inc., CA, EE. UU.) Que suministra luz verticalmente polarizada ($\lambda = 488 \text{ nm}$) y un correlador digital ALV SP-86. Las mediciones se realizaron con un ángulo de dispersión de 90° al haz incidente con una duración de 2-5 min. Previo a la medición, las muestras se filtraron y se equilibraron térmicamente durante 10 min. La escala de intensidad se calibró contra la dispersión del tolueno y cada medición se repitió al menos tres veces. Las funciones de correlación obtenidas se analizaron mediante el método CONTIN [30]. Los valores del radio hidrodinámico aparente (R_H) se calcularon a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_H = kT/6\pi\eta D \quad (1)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad de la disolución y D el coeficiente de difusión de las partículas en disolución diluida. Las medidas se realizaron por triplicado, con un tiempo de muestreo de 120 segundos cada una y promediadas.

3.2.2 Movilidad electroforética.

El potencial zeta de las nanoplateformas preparadas fue determinado por velocimetría Doppler usando un Nano ZS (Nanoseries, Malvern Instruments, UK). Las nanopartículas fueron suspendidas en agua y las medidas se llevaron a cabo a 25°C . Se realizaron tres medidas independientes y los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar. El instrumento midió la movilidad electroforética de las partículas y la convirtió al potencial zeta utilizando la expresión clásica de Smoluchowski:

$$\alpha = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad (2)$$

donde α , ε , ζ y η denotan la movilidad electroforética, la permitividad del medio, el potencial zeta de las partículas y la viscosidad del medio, respectivamente.

3.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para obtener imágenes de TEM, se aplicó una gota de 5 μL de nanopartículas CNP y CSNP sobre las rejillas de cobre recubiertas con carbono, se secó, se lavó, se tiñó negativamente con una solución 2% (p / v) de ácido fosfotústico, se secó al aire y se examinó con una Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1011 (Japón) a 120 kV. Las muestras se diluyeron, cuando fue necesario, antes de depositarlas en las rejillas.

3.2.4 Análisis cuantitativo de siRNA en CSNPs.

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (LC) de las nanopartículas obtenidas, las CSNP se centrifugaron a 15000 rpm a 20 °C durante 20 min. A continuación, se determinó la concentración de siRNA en el sobrenadante mediante espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia utilizando el sobrenadante de las CNP como blanco. Los espectros de UV-Vis se realizaron a 260 nm restando la contribución potencial a 280 nm de pequeños residuos de proteínas en los medios de solución. Los espectros de fluorescencia se adquirieron estableciendo $\lambda_{\text{exc}} = 494$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 519$ nm. Los espectros UV-Vis se midieron utilizando un espectrofotómetro Cary Bio 100 UV-Vis (Agilent Technologies, EE. UU.), Mientras que los de fluorescencia se adquirieron en un espectrofotómetro Cary Eclipse (Agilent Technologies, EE. UU.). Cada muestra se midió por triplicado a partir de tres lotes de partículas diferentes y se promediaron los resultados finales. Las EE y LC se calcularon mediante las siguientes expresiones:

$$\text{E.E. (\%)} = \frac{\text{Cantidad total de siRNA agregado} - \text{siRNA en sobrenadante}}{\text{Cantidad total de siRNA agregado}} \times 100 \quad (3a)$$

$$\text{L.C. (\%)} = \frac{\text{Cantidad total de siRNA agregado} - \text{siRNA en sobrenadante}}{\text{Cantidad total de siRNA agregado}} \times 100 \quad (3b)$$

3.2.5 Ensayo de eficacia de unión.

Se usó electroforesis en gel de agarosa para determinar la unión exitosa de siRNA al quitosano. Los diferentes nanovectores basados en quitosanos modificados que encapsulan una carga inicial de 150 pmol de siRNA se cargaron en cada pocillo (20 μ L). Los experimentos de electroforesis en gel se realizaron a un voltaje constante de 150 V durante 30 minutos usando geles de agarosa al 2%. El siRNA se tiñó con SYBR Green I (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, EE. UU.) en una dilución 1: 10000 en buffer TE (Tris · HCl 10 mM, pH, EDTA sódico 1 mM) durante 15 min. Se utilizó un transiluminador en tiempo real E-Gel® Safe Imager™ y un sistema de energía E-Gel® iBase™ (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EE. UU.) Para visualizar las muestras. Las fotografías fueron tomadas con una cámara CANON IXUS 155.

3.2.6 Ensayo de estabilidad de siRNA en medio de cultivo.

Siguiendo un protocolo previamente informado [10], se incubaron CSNP cargados con 150 pmol de siRNA a 37°C en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 5% y 50% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) a diferentes tiempos (0, 0.5, 2, 4, 7, 24, 48 y 72 h), se retiraron 100 μ L de cada solución de partículas y se almacenaron a -20°C hasta que se realizó la electroforesis en gel. Para llevar a cabo los experimentos, primero se detuvo la actividad del medio de cultivo, para hacer esto, se incubaron muestras a 80°C durante 10 minutos y luego se agregaron 5 μ L de heparina (1000 U/mL) para desplazar el siRNA de las CSNP. El análisis de la integridad de siRNA se llevó a cabo utilizando un gel de agarosa al 4%, utilizando el método que se describió anteriormente.

3.2.7 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

Las interacciones y la unión entre el siRNA y los diferentes quitosanos modificados se analizaron utilizando un microcalorímetro de titulación VP-ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA, EE. UU.) A 25 °C. La muestra y las celdas de referencia del calorímetro se llenaron con quitosano (1,06 μ M, en buffer de acetato 10 mM, pH 4,8) y soluciones de buffer puro, respectivamente. A continuación, la solución aniónica que contenía siRNA (2 μ M) y TPP (2,88 mM) disuelta en agua destilada libre de RNAasas se introdujo en la celda de la muestra termostatazada utilizando una jeringa controlada por computadora y se agitó a 350 rpm. Cada experimento consistió en una inyección inicial

de 2 μL (despreciada en el análisis) seguida de otras 27 inyecciones de 10 μL con un tiempo de espaciado de 600 segundos, tiempo suficiente para que la señal de calor regrese a la línea de base. Las gráficas de ITC representan los calores de inyección normalizados por la concentración de siRNA agregada por inyección, Q^* , en función de la relación molar siRNA/quitosano. Los calores de dilución correspondientes a la titulación de la solución aniónica en buffer de acetato puro se restaron para obtener los calores de unión netos. Todos los experimentos se realizaron tres veces.

Los datos de ITC sin procesar se analizaron como se describió anteriormente [31, 32]. Brevemente, las isotermas de unión se ajustaron a un modelo de dos sitios de unión que hace uso del equilibrio de unión de la isoterma de Langmuir para dos tipos de asociación independientes:

$$Q = M \cdot V \cdot (n_1 \cdot \theta_1 \cdot \Delta H_1 + n_2 \cdot \theta_2 \cdot \Delta H_2) \quad (4a)$$

donde Q es el calor por inyección, M la concentración de macromolécula (en este caso, siRNA), V el volumen de la celda, n y ΔH son la estequiometría y la entalpía de las interacciones, respectivamente, θ la fracción de ligando unido a la macromolécula y los subíndices 1 y 2 representan los dos conjuntos de sitios.

Usando un algoritmo de ajuste no lineal, la ecuación anterior se puede resolver para θ_1 y θ_2 usando las ecuaciones de equilibrio para unir las constantes K_1 y K_2 como:

$$K_1 = \frac{\theta_1}{(1 - \theta_1)[X]}, \quad K_2 = \frac{\theta_2}{(1 - \theta_2)[X]}$$

$$[X] = X - M(n_1 \cdot \theta_1 + n_2 \cdot \theta_2) \quad (4b)$$

siendo X la concentración total de ligando y $[X]$ la concentración de ligando libre (quitosano).

3.2.8 Estabilidad coloidal.

La estabilidad coloidal de las CNP y los CSNP se evaluó mediante la dilución de las partículas (1/50) a 37 °C en diferentes condiciones de solución (soluciones acuosas de diferentes pH que varían de 3 a 9; medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con FBS al 10%, y libre de agua RNAsas) [10] y agitación moderada durante 5 días. El potencial zeta y los tamaños hidrodinámicos se adquirieron utilizando un Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern Instruments, Reino Unido). Los experimentos se realizaron por triplicado.

3.2.9 Estudios de liberación *in vitro*.

La liberación del siRNA de las CSNP se midió *in vitro* a una temperatura constante de 37 °C con agitación magnética (300 rpm) durante varios días a tres pH diferentes (7.4, 5.0 simulando el microentorno ácido del citoplasma [33], y pH 2.0, que se encuentran en el rango de pH gástrico) [34]. La concentración de siRNA liberada se determinó a diferentes intervalos de tiempo para cada pH de la solución al colocar 1 mL de las CSNP en tubos de diálisis (SpectraPore®, MWCO 3500, SpectraLab, EE. UU.) sumergidos en 50 mL de buffer de fosfatos complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) a el pH de interés. En cada tiempo de muestreo, se retiró 1 mL del medio y se reemplazó con el mismo volumen de buffer de fosfatos fresco para mantener las condiciones de hundimiento requeridas. El contenido de siRNA en el sobrenadante se midió mediante espectroscopias de UV-Vis y de fluorescencia utilizando curvas de calibración en los correspondientes buffers, como se describió anteriormente. Los ensayos se realizaron por triplicado.

ENSAYOS CELULARES

3.3.1 Cultivo de células.

Se cultivaron células de cáncer cervical HeLa y células HeLa modificadas con proteína verde fluorescente (GFP) (Cell Biolabs, San Diego, CA) en condiciones de cultivo estándar (5% de CO₂ a 37 °C) en DMEM complementado con 10% (v/v) de FBS, 2 mM L- glutamina, 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina, piruvato de sodio 1 mM y MEM 0.1 mM (NEAA). Los macrófagos RAW 264.7 se cultivaron en medio mixto 50:50 DMEM/F12-Ham suplementado con FBS al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina 2

mM, piruvato sódico 1 mM, y aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1 mM a (37 °C, 5% CO₂, en atmósfera humidificada).

3.3.2 Citotoxicidad celular *in vitro*.

La citotoxicidad de las CSNP se analizó *in vitro* utilizando el ensayo de citotoxicidad CCK-8. Se sembraron células de cáncer cervical HeLa y macrófagos RAW 264.7 en una confluencia de 80-90% en placas de 96 pocillos (100 µL, 1.5·10⁴ células/pocillo) y se cultivaron durante 24 horas en condiciones de cultivo estándar. Después de 24 h, se inyectaron 100 µL de nanopartículas CNP y CSNP diluidas en los medios de cultivo celular correspondientes en los pocillos y se incubaron durante 24 h y 48 h, respectivamente. Algunas células se transfectaron con oligo fluorescente de control de siRNA BLOCK-iT™ 1 mM (Invitrogen) utilizando Lipofectamine 2000 como control positivo (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) Siguiendo las instrucciones del fabricante. Algunos pozos también se dejaron sin nanopartículas como control negativo (blanco). Después del tiempo de incubación correspondiente, el medio de cultivo se desechó, las células se lavaron con PBS 10 mM, pH 7,4 varias veces, y se añadió un medio de cultivo nuevo (90 µL). A continuación, se inyectaron 10 µL de reactivo CCK-8 en cada pocillo. Después de 2 h, la absorción a 450 nm se midió con un lector de absorbancia de microplacas UV-vis (Bio-Rad modelo 689, EE. UU.). La viabilidad celular, CV, la tasa de supervivencia, se calculó como sigue:

$$C.V (\%) = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

(5)

donde, la *absorbancia de la muestra* es la absorbancia a 450 nm de las muestras con nanopartículas y *absorbancia del blanco* es la absorbancia a 450 nm de las células sin nanopartículas.

3.3.3 Captación celular y silenciamiento génico por microscopía de fluorescencia.

La internalización celular de las CSNPs se monitorizó mediante microscopía confocal sembrando células HeLa, HeLa-GFP y RAW 264.7 en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina (12×12 mm²) colocados dentro de placas de 6 pocillos (3 mL, 5·10⁴

células por pozo) crecidas durante 24 horas en condiciones de cultivo estándar. Luego, se agregaron 250 μ L correspondientes a 0.5 mg de nanopartículas que contienen alrededor de 37 pmol de siRNA.

Después de la incubación, las células que contenían nanopartículas se lavaron tres veces con PBS pH 7,4 y, a continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4% (w/v) durante 10 minutos, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con 0,2% (w/v) de Triton X-100, y fueron teñidas con BODIPY Faloidina (Invitrogen). Posteriormente, las células se lavaron nuevamente con PBS, se montaron en portaobjetos de vidrio teñidos con ProLong Gold antifade DAPI (Invitrogen) y se mantuvieron durante 24 horas a -20° C. Las muestras se visualizaron con un objetivo 63X utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica DMI6000B equipado con un sistema modular Leica AF6000 y una cámara DFC3665FX (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg Mannheim, Alemania). En las imágenes obtenidas, el canal azul correspondió a DAPI ($\lambda_{ex} = 355$ nm), el rojo a BODIPY Phalloidin ($\lambda_{ex} = 633$ nm), y la luz transmitida se obtuvo en modo de contraste de interferencia diferencial (DIC). Finalmente, el canal verde correspondió a la excitación del oligo fluorescente siRNA dopado con FITC (Invitrogen). Se usó el mismo canal para la excitación a 355 nm de la proteína fluorescente verde en células HeLa-GFP.

3.3.4 Captación celular y silenciamiento génico por citometría de flujo.

La captación de celular del siRNA en células HeLa se cuantificó adicionalmente mediante citometría de flujo midiendo la fluorescencia de un oligo ds-siRNA marcado con FITC encapsulado en las CSNP. Se usaron células HeLa que expresan GFP para investigar la eficacia de silenciamiento génico de los CSNP cargados con un siRNA específico que inhibe la fluorescencia de la GFP (Ambion, EE. UU.). Se usaron células HeLa normales como control negativo y se usaron células HeLa-GFP no transfectadas como positivas. Se utilizó siRNA transfectado con Lipofectamine 2000 como referencia de transfección adicional. Las células ($2 \cdot 10^5$ por pocillo) se lavaron una vez con PBS y, luego, se recogieron con tripsina al 0.05% / EDTA al 0.025% seguido de varios lavados a 1200 rpm durante 4 minutos y resuspensión en 1 mL de PBS. La eficacia del silenciamiento del gen se determinó mediante la recopilación de datos de fluorescencia a través de citometría de flujo (BD FACSAria II, BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). En todos los análisis, se adquirieron $2 \cdot 10^5$ eventos, se calificaron con un analizador FACS Aria II (BD,

Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) y se procesaron mediante el programa de software PC FACSDiva (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). El recuento de células se realizó siempre por 10^6 eventos. La eficacia de la transfección se expresó como el porcentaje de intensidad de fluorescencia de las células recolectadas en comparación con la intensidad de fluorescencia total de células HeLa-GFP no transfectadas (control positivo).

RESULTADOS

3.4.1 Síntesis y caracterización de derivados del quitosano.

Los espectros de ^1H -RMN de los distintos quitosanos son mostrados en la Figura 1. Los picos a 2.1 ppm corresponden a los protones del grupo acetilo de los monómeros de N-Acetilglucosamina (NHCOCH_3). Asimismo, las señales a 3.3 ppm y entre 3.5-4.0 ppm corresponden a los hidrógenos unidos al carbono C2 y a los carbonos C3, C4, C5 y C6 del anillo glucopiranososa, respectivamente. Los picos a 4.5 y 4.8 ppm fueron asignados a los protones unidos al carbono C1 de los residuos de glucosamina y N-acetilglucosamina, respectivamente [35]. Esta asignación de picos es aplicable para todos los quitosanos. Sin embargo, en los quitosanos derivatizados encontramos la aparición de más picos característicos de la presencia de cadenas alifáticas unidas al quitosano, cadenas producto de la derivatización del quitosano, lo que nos demuestra que la reacción de sustitución fue llevada a cabo con éxito. Estas señales aparecen a 0.7 ppm, 1.2 ppm y 1.4 ppm y fueron asignadas a los hidrógenos del grupo metilo ($-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$), a los hidrógenos del grupo metileno ($\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$) y a los hidrógenos del carbono unido covalentemente al nitrógeno ($\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$), respectivamente [36, 37].

3.4.2 Preparación y caracterización de nanopartículas de quitosano.

Las nanopartículas de quitosano se prepararon mediante el método de gelificación ionotrópica. Este procedimiento no utiliza solventes orgánicos o sonicación común a otros métodos de preparación, que pueden ser perjudiciales para los péptidos y las proteínas al alterar sus conformaciones estructurales (ver Apéndice B para más detalles). Para la formación de las nanopartículas, el pKa de los grupos amino de los quitosanos derivados utilizados aquí osciló entre 6.5 y 6.8. Por lo tanto, más del 90% de las aminas estaban protonadas y cargadas positivamente a pH 5.5. Los valores de pKa de los grupos fosfatos de siRNA fueron cercanos a cero [38], por lo que más del 99% se cargaron negativamente a un pH superior a 2.0. La caracterización físico-química de las nanopartículas de quitosano (CNP) y quitosano-siRNA (CSNP) se investigó utilizando un quitosano de peso molecular medio no modificado, y el mismo biopolímero derivado con cadenas de aldehído octil o aldehído dodecil a un grado de sustitución de 5, 10, y 50% en el esqueleto del polímero, a menos que se indique lo contrario. Esta elección se basó en los tamaños y los potenciales zeta de las nanopartículas obtenidas (ver Figura

S2, Apéndice B), que deberían garantizar una buena estabilidad coloidal, largos tiempos de circulación y una mayor acumulación pasiva en el sitio objetivo. Además, las nanopartículas de CNP y CSNP, también se prepararon nanopartículas basadas en un quitosano derivado con decil aldehído en un grado de sustitución del 10% para comparar el efecto de la longitud de la cadena hidrófoba con una densidad de injerto determinada en las propiedades físico-químicas de las partículas formadas. La nomenclatura utilizada para etiquetar los diferentes NP basados en quitosano se resume en la Tabla 1.

Tabla 1: Nomenclatura de quitosanos derivados formando nanopartículas CNPs y CSNPs. X denota el peso molecular de la cadena de quitosano original, Y la longitud de la cadena hidrófoba sustituida y Z el grado de sustitución de la cadena de aldehído en el esqueleto de quitosano.

C{X}{Y}{Z}		
X = P_M	Y = número de átomos de carbono en la cadena hidrofóbica	Z = grado de sustitución
H = High	8	a = 5%
M = Medium	10	b = 10%
L = Low	12	c = 50%

Para determinar la influencia de la sustitución de las cadenas hidrófobas en el tamaño y la carga eléctrica de la superficie de las CNP, se tomaron datos de DLS y potencial zeta a 37 °C. Además, se adquirieron imágenes de TEM para comprender mejor la morfología de las nanopartículas. Algunas diferencias en los potenciales zeta y en el tamaño de las partículas surgieron cuando se modificó el esqueleto del quitosano con diferentes extensiones de cadenas alifáticas de varias longitudes, como se observa en la Figura 2. Para las CNP que contienen quitosanos derivatizados con un grado de sustitución del 5%, los potenciales zeta aumentaron ligeramente a medida que la longitud de la cadena alifática también aumentó.

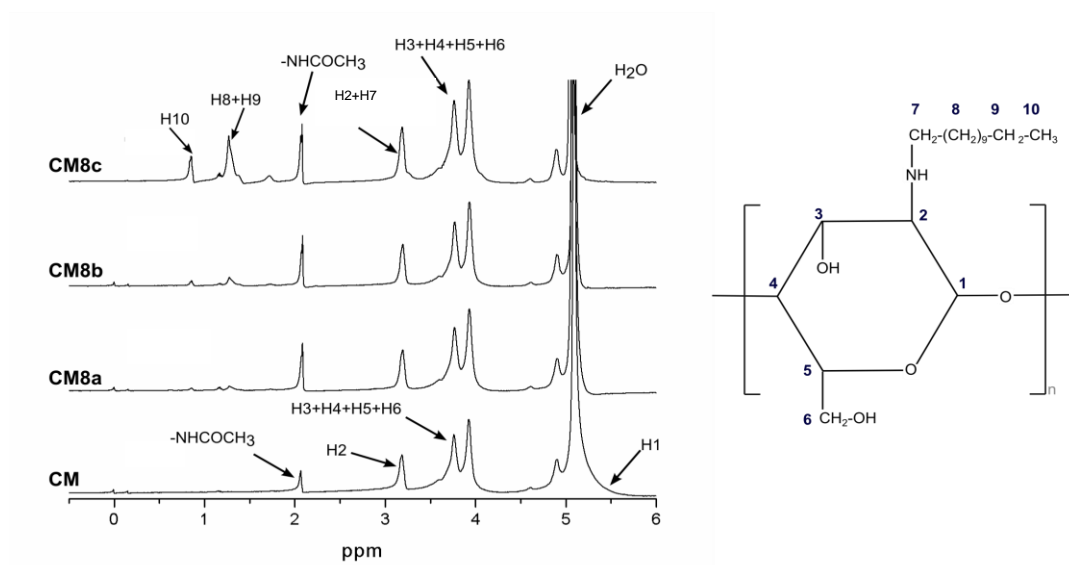


Figura 1. Espectros de ^1H -RMN de quitosano no modificado (CM) y tres quitosanos hidrófobos diferentes derivados con cadenas de ocho carbonos en un grado de sustitución del 5% (CM8a), 10% (QM8b) y 50% (CM8c), respectivamente.

Por el contrario, se observó una tendencia opuesta en los grados de sustitución más altos. Esto puede explicarse basándose en la suposición de que, en grados de sustitución más bajos, las cadenas laterales no cargadas e hidrofobizadas de quitosán podrían haberse dispuesto preferiblemente hacia el interior de las CNP, permitiendo una exposición relativamente mayor de sus grupos amina cargados positivamente a la superficie de las partículas. En otras palabras, cuando el grado de sustitución aumentó, se notaron menores cargas superficiales de las CNP como consecuencia de i) el número de reducción de aminas protonadas en la sustitución [26,27] y/o ii) la presencia potencial de cadenas laterales en las superficies de las nanopartículas debido a las restricciones de ensamblaje, que adicionalmente cubren las cargas de la superficie catiónica.

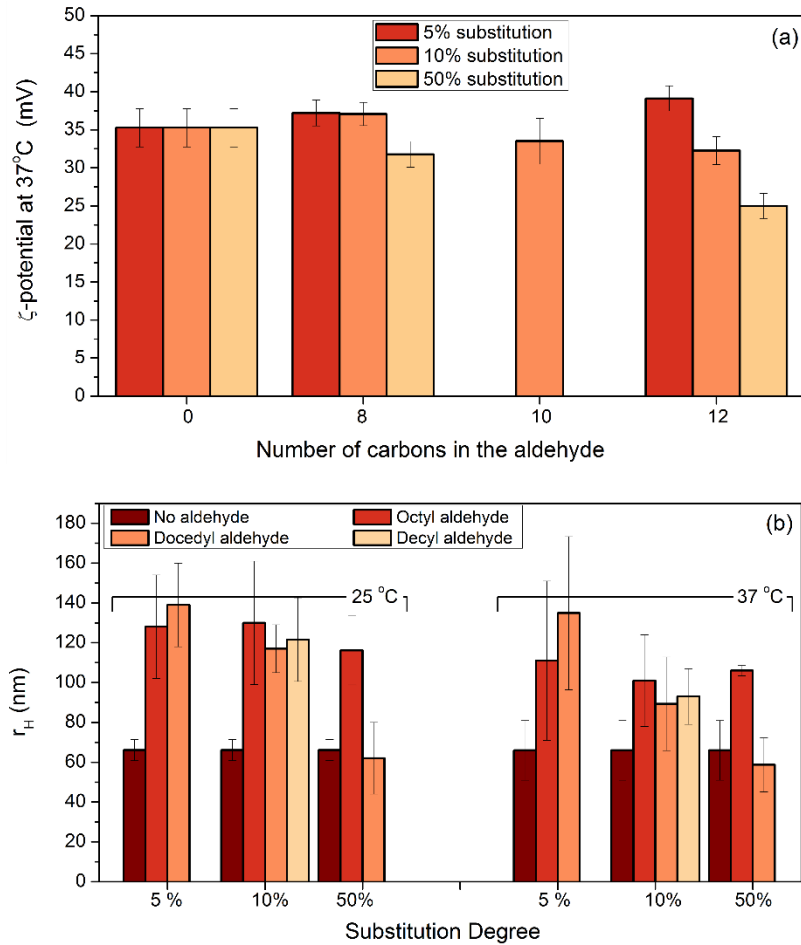


Figura 2. (a) Potenciales zeta de las CNP derivatizadas con cadenas laterales de 0, 8, 10, 12 carbonos con 5%, 10% y 50% de grado de sustitución a 37°C. (b) Radios hidrodinámicos de las CNP no modificados, derivatizadas con 8, 10 y 12 carbonos a 25°C y 37°C.

Los tamaños promedio de las CNP no hidrofobizadas ($R_H = 66 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$) fueron más pequeños que los de las nanopartículas hidrofobizadas (ver Figura 1b), que oscilaron entre aproximadamente 70 y 140 nm dependiendo de la longitud de la cadena lateral y el grado de sustitución [39]. Los segmentos hidrófobos del quitosano derivatizado de las CNP podrían haber apuntado hacia adentro, dando lugar a núcleos más densos y aumentos de tamaño. Este efecto fue más evidente para las CNP hechas de quitosano derivatizado con el grado más bajo de sustitución (5%), siempre que todas las cadenas alifáticas estuvieran ancladas en los núcleos de las nanopartículas, de acuerdo con los valores de potencial zeta.

En contraste, los tamaños de partícula generalmente disminuyeron a medida que aumenta el grado de sustitución, aparentemente como consecuencia de una compactación más fuerte de los núcleos de las CNP para evitar la exposición de sus cadenas laterales hidrófobas al agua, especialmente notable para aquellas que tienen una sustitución de una cadena de 12 carbonos. Dado que el empaquetamiento completo de cadenas laterales de sustitución dentro de los núcleos de partículas no es probable, también podría haber ocurrido un reordenamiento de algunas de estas en o cerca de las superficies de las nanopartículas, lo cual está de acuerdo con los datos de potencial zeta. Por otro lado, se observó que la longitud de la cadena alifática desempeñaba un papel clave en la determinación del tamaño de las nanopartículas, en particular para aquellas partículas que contenían quitosano derivatizado con altos grados de sustitución, que tenían tamaños más pequeños [25,28]. Además, se observó que los radios hidrodinámicos de partículas disminuían en aproximadamente 30 nm cuando la temperatura de la solución aumentaba de 25 a 37 °C. Cabe mencionar que los trabajos anteriores han mostrado nanopartículas a base de quitosano más grandes producidas mediante la gelificación ionotrópica que las obtenidas en el trabajo actual [22,38,39].

Se obtuvieron imágenes TEM de CNP (Figura 3) para los diferentes tipos de quitosanos derivados. La morfología de las CNP era casi esférica, especialmente para las CNP no modificadas, con cierta rugosidad de la superficie. Este efecto se observó más claramente para las CNP con sustitución de cadenas laterales de longitud corta, que mostraban cierta apariencia con filamentos (Figura 3d-f) en contraste con las que tenían las cadenas de 12 carbonos, mostrando superficies más suaves. Los tamaños medios de las CNP estuvieron de acuerdo con los datos obtenidos por DLS.

3.4.3 Energética de la formación de las CSNPs.

La capacidad de cualquier sistema de administración para evitar la disociación prematura y promover la liberación de carga al órgano o tejido objetivo está fuertemente relacionada con la afinidad de unión entre la macromolécula terapéutica y el vector seleccionado. Además, la adición de ARNsi junto con las moléculas de TPP durante el proceso de gelificación iónica ha conducido previamente a mejores actividades de silenciamiento génico en comparación con otros métodos para la formación de partículas/poliplejos [10].

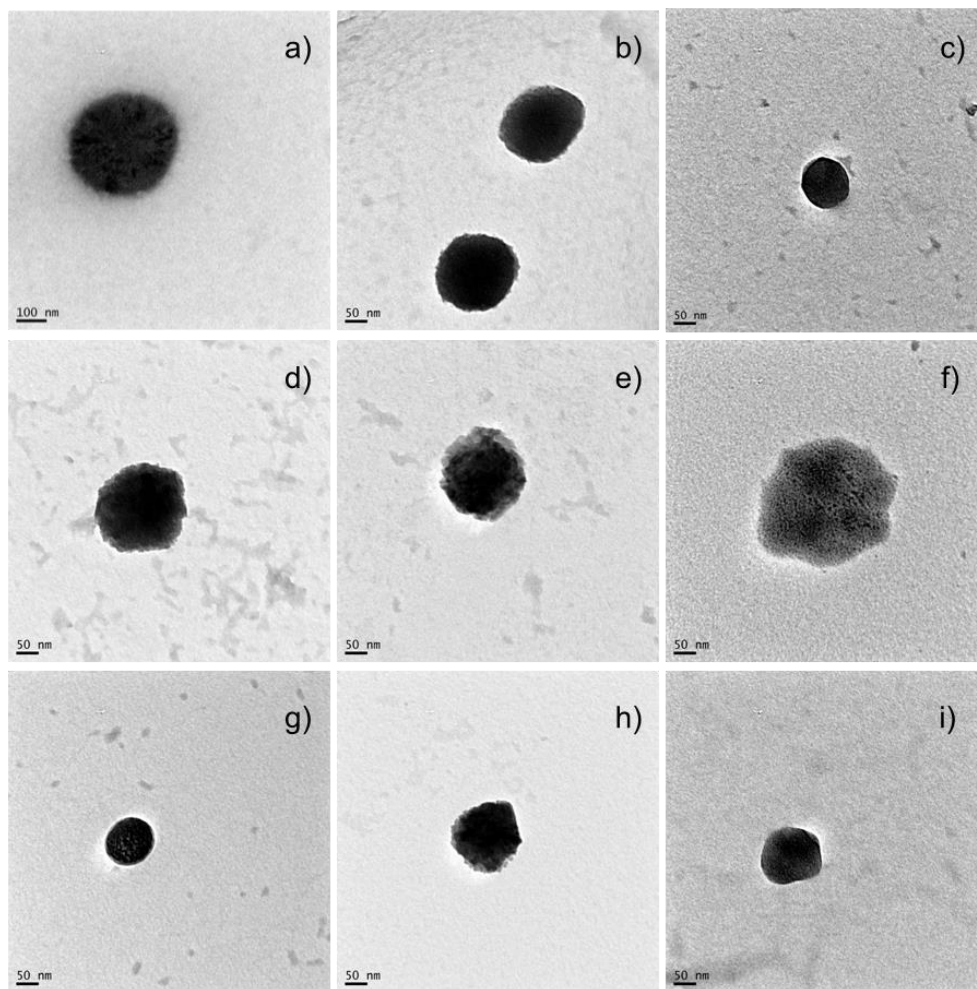


Figura 3. Imágenes de TEM de las CNP obtenidas de (a) CL, (b) CM, (c) CH, (d) C8Ma, (e) C8Mb, (f) C8Mc, (g) C12Ma, (h) C12Mb, y (i) quitosanos C12Mc. La nomenclatura de la muestra corresponde a la indicada anteriormente en la Tabla 1.

Una manera efectiva de evaluar las interacciones involucradas es medir los calores producidos/absorbidos en dicho proceso de acomplejación y evaluar las cantidades termodinámicas de unión asociadas. Para este propósito, el ITC se ha convertido en una de las técnicas más útiles para analizar el tipo y el alcance de las interacciones que juegan un papel en la acomplejación del siRNA y la posterior formación de nanopartículas. Para determinar los calores de unión de siRNA-quitosano en presencia del reticulante TPP durante el proceso de formación de las nanopartículas, se llevaron a cabo dos series de experimentos, es decir, se titularon soluciones aniónicas que contenían siRNA con TPP y solo TPP (como control) en la celda de muestra que contiene

una solución de quitosano. Luego, se obtuvieron los calores netos de interacción entre el siRNA y el quitosano a lo largo del proceso de formación de las nanopartículas después de la sustracción de los calores derivados del experimento de control. De esta manera, se descuidaron de alguna manera los calores de la dilución de siRNA y las interacciones TPP-quitosano. La influencia de la naturaleza y el grado de sustitución en el esqueleto de quitosano en la energía de la formación de nanopartículas y el atrapamiento de siRNA también se evaluó seleccionando los siguientes tipos de quitosano como componentes de las nanopartículas: CM, C8Mb, C8Mc y C12Mc.

La Figura 4 muestra los calores netos de la interacción tras la inyección de una solución de siRNA + TPP en soluciones de quitosano (después de que la sustracción del calor evolucionó después de la titulación de TPP en la misma solución de quitosano) en función de la relación molar de siRNA/quitosano para diferentes tipos de los quitosanos modificados hidrofólicamente. Las líneas continuas representan los ajustes a los datos experimentales. La Tabla 2 muestra los parámetros termodinámicos derivados. De la Figura 4, las interacciones siRNA-quitosano se caracterizan por interacciones electrostáticas iniciales y enlaces de hidrógeno entre el biopolímero y el siRNA como se denota por los valores negativos de los calores de interacciones (ΔH_i , donde el subíndice denota el sitio de unión, ver abajo). ΔH_i aumentó progresivamente, volviéndose menos negativo, como lo hizo la proporción molar siRNA/quitosano. Este hallazgo es consistente con los reportados para otros sistemas como la proteína-fármaco [28,31,40] y los sistemas de polielectrolito-polielectrolito como, por ejemplo, las interacciones de quitosano-ADN [32]. A medida que la relación molar siRNA/quitosano aumentaba aún más, los calores evolucionados se volvieron positivos (alrededor de 0.02-0.04), dependiendo del tipo de quitosano, y luego pasaron a través de un máximo endotérmico para luego disminuir nuevamente. En este sentido, el aumento de los valores positivos de ΔQ_i puede atribuirse a la deshidratación de las cadenas de quitosano y siRNA, los efectos de protección de la carga en la interacción mutua y el importante papel de las interacciones hidrófobas. Además, la subsiguiente disminución endotérmica podría generarse por las interacciones dipolo-dipolo de las moléculas de agua orientadas favorablemente a las nanopartículas adyacentes formadas, como se observa en otros

sistemas [41]. Finalmente, se observó una región de meseta en las mayores relaciones molares de siRNA/quitosano ($> 0,14$) correspondientes a los efectos de dilución.

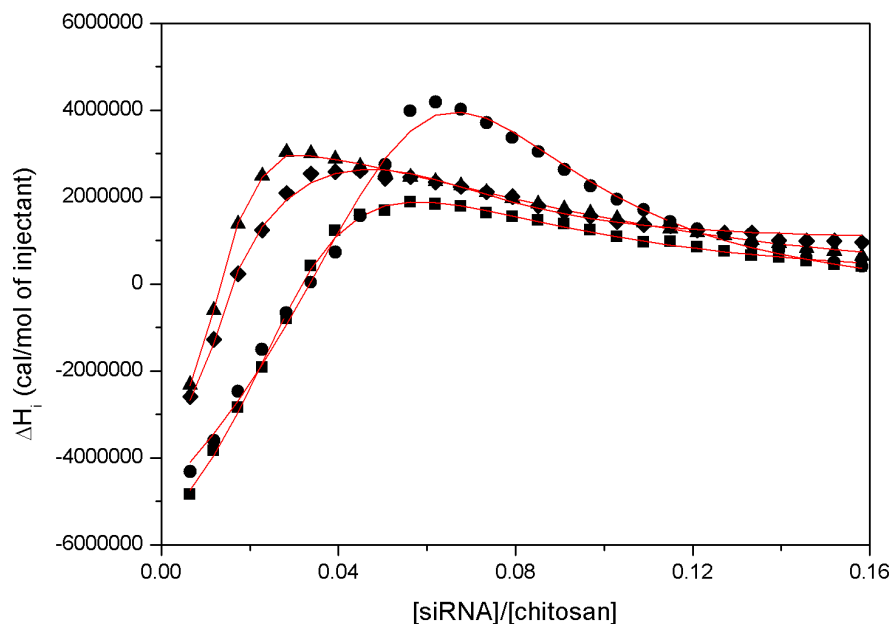


Figura 4. Experimentos de ITC que muestran la evolución de los calores de interacción en función de la proporción molar [siRNA]/[quitosano] para (■) CM, (●) C8Mb, (▲) C8Mc y (◆) C12Mc a 25 °C en solución acuosa. Las líneas rojas representan el ajuste de los datos experimentales al modelo de dos sitios de unión utilizado.

Con respecto a la caracterización termodinámica, la Tabla 2 resume la entalpía, la entropía, la constante de unión y la estequiometría de la unión de siRNA-quitosano derivada de la base del modelo de dos sitios de unión. Como se observó, la unión del siRNA a los quitosanos modificados de manera diferente implicaba constantes de unión del orden de alrededor de 10^7 - 10^8 y 10^6 - 10^7 para la primera y la segunda clase de sitios de unión, respectivamente. Se observó que cuanto más corta era la cadena lateral unida al esqueleto del biopolímero, más grande era la unión. Esto podría atribuirse a la mayor disponibilidad de grupos de aminas libres para interactuar electrostáticamente con los fosfatos de siRNA en derivados de quitosano que llevan cadenas laterales más cortas y menores extensiones de sustitución.

Vale la pena mencionar que se pueden esperar niveles mucho más bajos de constantes de unión de segunda clase, como consecuencia de restricciones estéricas superpuestas. Sin embargo, la gran mejora de las interacciones hidrófobas compensa parcialmente este punto.

La estequiometría de la unión es fraccionaria (valores n menores que 1.0) correspondiente a la interacción multivalente de sustrato/ligandos [42]. Con respecto a la entalpía de la interacción, las entalpías exotérmicas relativamente altas para la primera clase de sitios de unión denotan el predominio de las de hidrógeno y las interacciones electrostáticas, mientras que las entalpías positivas grandes señalan la gran predominancia de las fuerzas hidrofóbicas en el proceso de unión. Esto se verificó adicionalmente por el cambio en la entropía de la unión, que apuntaba a un proceso claro impulsado por la entalpía para las primeras etapas del proceso de unión (denotado por valores negativos en ΔS_i), y uno de carácter entrópico para el segundo conjunto de sitios de unión denotado por los valores positivos observados. Este comportamiento podría estar relacionado con la liberación de moléculas de agua al disolvente y los reordenamientos moleculares de las cadenas poliméricas dentro de las CNP modificados en esta etapa.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos de la interacción entre siRNA y quitosano sobre la formación de las CSNPs. K , constante de equilibrio de unión; n , estequiometría de unión; ΔH , cambios de entalpía; ΔS , cambios de entropía.

CSNP	$10^8 K_i$ (M^{-1})	$10^{-2} n_i$	$10^3 \Delta H_i$ (kcal/mol)	ΔS_i (kcal/mol K)
CM	2.8±0.5	2.6±0.3	-7.4±0.4	-24.8±3.2
	0.3±0.01	3.4±0.7	2.2±0.3	7.5±0.6
C8Mb	1.4±0.2	7.7±0.5	-6.8±0.5	-22.5±2.1
	0.5±0.1	0.06±0.01	4.2±0.2	14.2±0.3
C8Mc	1.3±0.1	0.2±0.3	-4.3±0.2	-14.2±1.6
	0.2±0.1	5.1±0.8	3.1±0.1	10.5±1.7
C12Mc	0.6±0.1	0.6±0.2	-4.9±0.3	-16.3±2.3
	0.07±0.01	1.9±0.06	2.8±0.4	9.4±1.4

3.4.4 Encapsulación de siRNA dentro de nanopartículas de quitosano.

Con el fin de dilucidar carga óptima de siRNA dentro de las partículas biopoliméricas para un silenciamiento efectivo, analizamos las eficiencias de encapsulación (EE) y las capacidades de carga (LC) en las nanopartículas derivadas de quitosano en diferentes concentraciones iniciales de siRNA. Se mezclaron cuatro cantidades iniciales (50, 100, 150 y 250 pmol) de material genético con los diferentes quitosanos hidrofobizados con la solución de TPP para obtener las CSNPs siguiendo la metodología descrita anteriormente. En la Tabla 3 se puede observar que cuanto menor sea la cantidad siRNA introducida, menor será la LC obtenida como resultado de la saturación incompleta de las nanopartículas dentro del rango de concentración analizado. Además, se obtuvieron valores más bajos de EE y LC para las CSNPs no derivatizados en comparación con los hidrofobizados; aquellas formadas por quitosano de peso molecular medio fueron las más efectivas, especialmente en las cantidades más bajas de siRNA introducidas. A pesar de una disminución en la LC y la EE se puede esperar cuando el número de grupos amino libres se reduce en la sustitución de la cadena lateral alifática, estas cantidades aumentan notablemente con la derivación del quitosano. Por ejemplo, es notable que la EE para las CSNP hidrofobizados fuera dos veces mayor que la de las no modificados. Por lo tanto, las modificaciones hidrófobas podrían mejorar la capacidad de carga/encapsulamiento del gen y podrían proporcionar un mayor control sobre la cinética de liberación de la carga mediante la modificación de las interacciones intermoleculares existentes (ver más abajo) [22,23,25,28,43,44]. Además, los valores de EE fueron apenas constantes para las CNP derivatizadas independientemente de la cantidad de siRNA que se introduce, en contraste con las no derivatizadas para las cuales se encontró una EE máxima a 150 pmol.

También vale la pena mencionar que anteriormente se usaron quitosanos derivados similares para atrapar la proteína insulina en las CNP [25]. En ese estudio, se alcanzaron valores máximos de EE y LC para nanopartículas que consisten en quitosano derivado con un grado de sustitución del 10%, mientras que los del 50% mostraron los valores más bajos.

Tabla 3. Capacidad de carga (LC) y eficiencia de atrapamiento (EE) de siRNA en las CSNPs no modificados y derivatizadas. IF se refiere a la carga inicial de siRNA.

Chitosan	LC (%)			
	IF 250 pmol	IF 150 pmol	IF 100 pmol	IF 50 pmol
CH	14.5 ± 3.1	12.61 ± 1.0	7.00 ± 1.3	3.0 ± 0.4
CM	18.5 ± 1.3	12.20 ± 3.9	7.60 ± 1.0	3.5 ± 1.2
CL	12.2 ± 0.5	10.77 ± 0.5	6.20 ± 0.9	1.9 ± 0.8
8 M a	29.6 ± 1.6	17.63 ± 0.4	12.0 ± 0.3	5.6 ± 0.8
8 M b	28.9 ± 0.9	17.29 ± 0.5	11.6 ± 0.2	5.4 ± 2.0
8 M c	26.6 ± 9.3	15.00 ± 2.9	9.70 ± 1.9	4.2 ± 1.0
10 M b	29.9 ± 1.0	19.21 ± 0.7	11.1 ± 1.2	4.5 ± 1.2
12 M a	28.2 ± 1.3	17.50 ± 0.7	11.4 ± 0.4	4.8 ± 1.0
12 M b	29.7 ± 1.0	16.00 ± 5.8	11.2 ± 0.7	4.9 ± 0.6
12 M c	25.1 ± 7.8	18.59 ± 0.2	11.5 ± 0.7	4.8 ± 0.3
	EE (%)			
CH	43.6 ± 9.3	63.2 ± 4.8	52.8 ± 9.5	45 ± 10
CM	55.7 ± 3.9	61.1 ± 1.9	57.2 ± 7.3	52 ± 18
CL	36.6 ± 1.4	54.0 ± 2.7	46.7 ± 6.7	28 ± 11
8 M a	89.2 ± 4.7	88.3 ± 1.9	90.5 ± 2.0	83 ± 12
8 M b	86.9 ± 2.8	86.6 ± 2.5	87.1 ± 1.6	81 ± 13
8 M c	80.0 ± 1.0	74.9 ± 4.0	73.1 ± 9.9	63 ± 16
10 M b	80.0 ± 2.9	96.3 ± 3.7	83.2 ± 9.1	68 ± 18
12 M a	89.4 ± 3.0	87.7 ± 3.5	85.6 ± 3.2	72 ± 16
12 M b	84.8 ± 3.8	80.2 ± 2.9	84.3 ± 5.0	73 ± 10
12 M c	89.1 ± 1.2	93.7 ± 1.1	85.6 ± 3.2	72 ± 16

Posiblemente, la competitividad entre el acomplejamiento de las proteínas y la compactación de las cadenas laterales hidrófobas en el núcleo de las nanopartículas podría explicar ese resultado. Sin embargo, ni la longitud de las cadenas laterales alifáticas ni el grado de sustitución de los quitosanos que forman las nanopartículas mostraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de LC y EE para la encapsulación de siRNA. Por otro lado, un ensayo de electroforesis en gel confirmó adicionalmente el acomplejamiento del siRNA en las CSNPs. En el experimento se seleccionó una concentración de CSNPs para obtener una concentración final de siRNA de 90 nM por pozo. Como se observa en la Figura 5, el siRNA libre (carril 1) exhibió una banda de arrastre generalmente asociada a la degradación de siRNA, y no se observó fluorescencia en el pozo asociado.



Figura 5. Acomplejamiento del siRNA a las CSNPs. Carril 1, siRNA nativo libre en agua libre de RNAasas. Los quitosanos no modificados CH, CL, CM y los quitosanos hidrofobizados 8Ma, 8Mb, 8Mc, 10Mc, 12Ma, 12Mb, 12Mc y 8Lb se muestran desde el carril 2 al 12, respectivamente.

Sin embargo, para los carriles restantes se observó una fuerte fluorescencia que indicaba que el siRNA estaba dentro de las CSNP y los rastros de siRNA no encapsulados se eliminaron después de los pasos de limpieza (consulte la sección de materiales y métodos para obtener detalles).

Además, los tamaños de las nanopartículas y los potenciales zeta de los diferentes tipos de las CSNPs cargados inicialmente con siRNA de 150 pmol se determinaron mediante DLS y análisis de movilidad electroforética, respectivamente (ver Figura 6). Se eligieron las CSNPs con una carga de 150 pmol para estudios adicionales porque mostraron un equilibrio adecuado entre la concentración de carga inicial y los valores altos de EE y LC. Como se muestra en la Figura 6a, las CSNP no derivados mostraron, en general, tamaños más voluminosos que sus contrapartes vacías (CNP), siendo esta tendencia sorprendentemente diferente cuando las nanopartículas se formularon con quitosano derivatizado. Como se discutió anteriormente, esto podría ser una consecuencia de la compactación de los núcleos de las nanopartículas para evitar la exposición de sus cadenas laterales alifáticas al medio acuoso, promoviendo así las interacciones colectivas dentro de las partículas, particularmente con moléculas de siRNA atrapadas.

A la inversa, y como se señaló en el caso de las CSNP con quitosano modificado con una cadena lateral de 12 carbonos, el efecto de exclusión del volumen de agua de las cadenas de polímeros podría haber impedido un empaquetamiento efectivo de nanopartículas que conduzca a un agrandamiento del tamaño de las nanopartículas. Con base en los resultados mencionados anteriormente, se podría tener cierta competencia entre el acomplejamiento de la carga y la compactación de las cadenas laterales hidrofóbicas del quitosano en los núcleos de las nanopartículas, que controlaban definitivamente las características generales de las nanopartículas [44,45].

Las imágenes de TEM también apoyan nuestros resultados previos. La Figura 6c,d muestran que las CSNP-8Mb derivadas exhibieron una cubierta exterior lisa que sugiere que las cadenas laterales estaban ubicadas en el interior (consulte el Esquema 2). A la inversa, las CSNPs-12Mc mostraron una superficie ciliada que indica que algunos segmentos de las cadenas laterales estaban ubicados en las superficies de las nanopartículas.

Esta imagen también fue corroborada por datos de potencial zeta. Los potenciales zeta para todas las CNP y CSNP probadas fueron relativamente altas y positivas (Figura 6b), lo que se espera que resulte en una buena estabilidad coloidal (consulte los detalles a continuación). Como se mencionó anteriormente, dichos valores disminuyeron con el peso molecular y el grado de sustitución del esqueleto de quitosano. A diferencia de las nanopartículas desnudas, las nanopartículas modificadas poseen valores de potencial zeta constantes, independientemente de la densidad del injerto y la longitud de la cadena lateral.

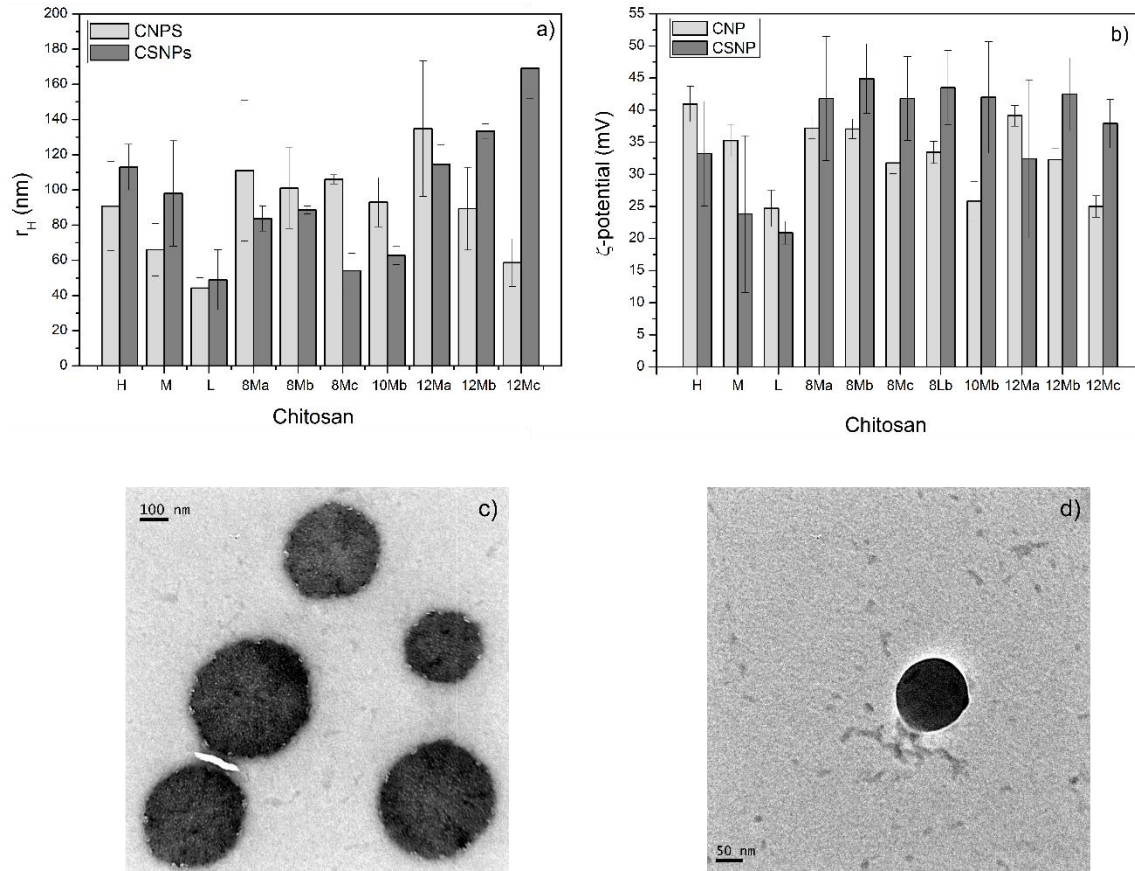
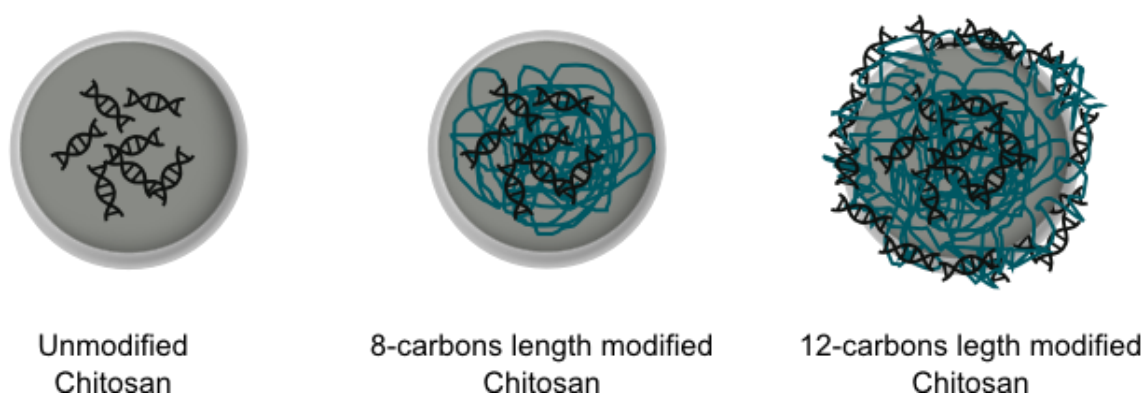


Figura 6. (a) Radios hidrodinámicos y (b) potenciales zeta de las CNP y CSNPs en solución acuosa. Imágenes de TEM de las CSNP cargadas con 150 pmol de siRNA para (c) 12Mc y (d) 8Mb.

Estas observaciones, por lo tanto, respaldarían los datos de DLS y nuestra hipótesis de que las cadenas laterales hidrofóbicas podrían haberse localizado hacia adentro, evitando el contacto con el agua a través del entrelazamiento con el siRNA y, al mismo tiempo, desplazando los grupos de aminas cargadas del quitosano a la capa exterior de la nanopartícula (ver esquema 1). Como lo muestran los datos de ITC (ver más arriba) e inferidos por otros [28,46,47], las interacciones hidrófobas dentro de las nanopartículas parecen jugar un papel importante en el proceso de acomplejamiento, lo que apoya aún más nuestra hipótesis anterior [25].



Esquema 2. Esquema que representa la posible distribución del siRNA y las cadenas laterales hidrófobas dentro de las CSNP.

3.4.5 Estabilidad coloidal de las nanopartículas.

Las distribuciones de tamaño adecuadas y la estabilidad coloidal de los CSNP son factores cruciales para su exitosa aplicación biofarmacéutica. Por ejemplo, la evolución del tamaño de partícula no solo afectará la endocitosis de las células tumorales, sino también la capacidad de las nanopartículas para evadir el reconocimiento y la eliminación por el sistema retículo-endotelial (RES). Por lo tanto, a continuación, analizamos la evolución temporal del tamaño de partícula y los potenciales zeta en diferentes condiciones como indicadores de la estabilidad coloidal de las CSNP obtenidos. Tras la incubación durante 3 días en agua a 37 °C, los potenciales zeta de las CSNP derivatizados se mantuvieron casi sin cambios (Figura 7a). Además, la evolución temporal del tamaño de las CSNP no modificadas y derivatizadas analizadas por DLS durante 5 días en solución acuosa a 37 °C (Figura 7b-d) indica que las CSNP derivatizadas con cadenas de 8 y 12 carbonos fueron muy estables en el agua durante todo el período de incubación, como se indica por los tamaños de partícula constantes a lo largo de toda la incubación. Se puede observar que las CSNP derivatizadas con cadenas de 12 carbonos volvieron a mostrar tamaños más grandes en agua en comparación con los hidrofobizados con cadenas de 8 carbonos, ya que las cadenas laterales no se empaquetarían completamente en el núcleo de la partícula, exponiéndose al solvente como se mencionó anteriormente.

Por lo tanto, esto se puede considerar una pista adicional de la exposición de cadenas laterales más largas cerca de/sobre las superficies de las partículas como resultado de su empaquetamiento ineficiente dentro de los núcleos de partículas. Para las nanopartículas que contienen quitosanos no modificados, se observó una cierta disminución de tamaño, durante las primeras 24 horas, que podría estar relacionada con la liberación de algunos siRNA de las partículas y/o la hidrólisis parcial inducida por la escisión de cadenas poliméricas [48].

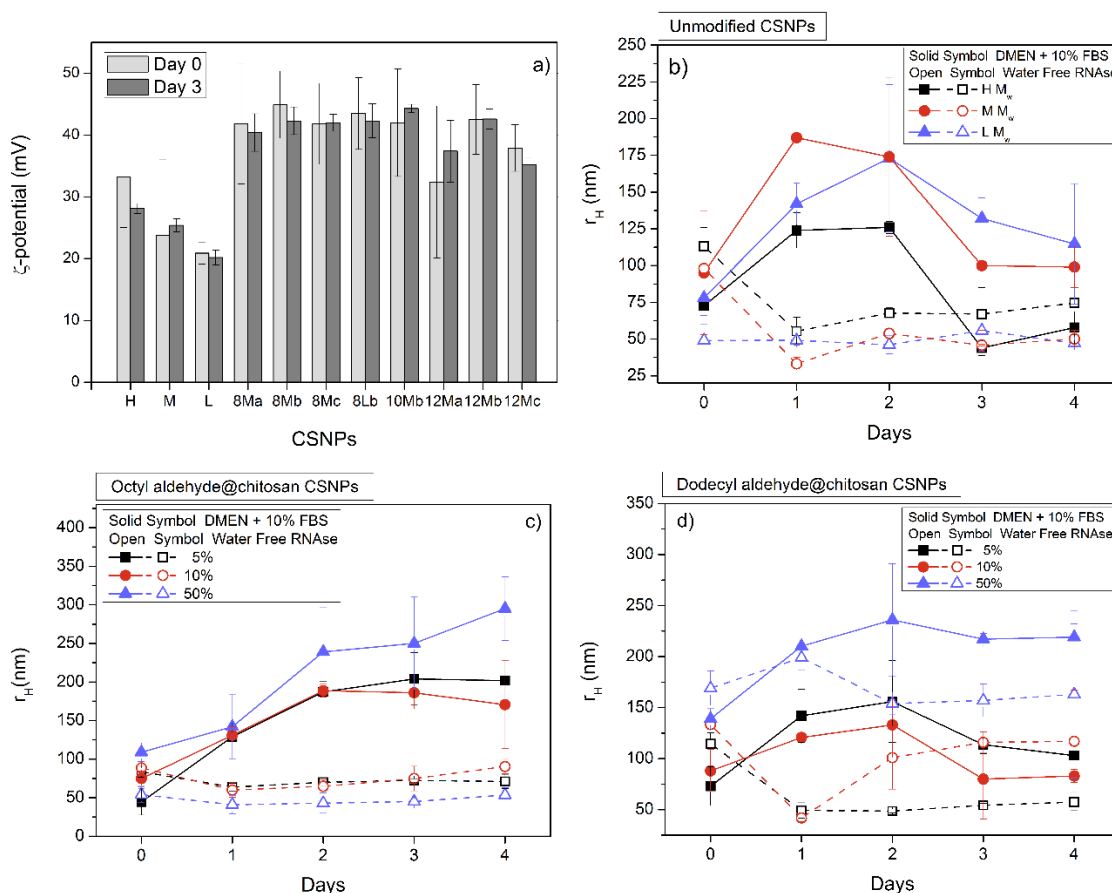


Figura 7. (a) Evolución temporal de los potenciales zeta de las CSNPs durante 3 días en agua sin RNAasa a 37 °C. (b-d) Evolución temporal del tamaño de las CSNP durante 5 días a 37 °C en agua sin RNAasa (símbolos abiertos) y DMEM suplementado con 10% de FBS (símbolos sólidos). (b) Nanopartículas que contienen quitosanos no modificados con (■, □) alto, (●, ○) medio y (▲, △) bajo peso molecular. (c) Nanopartículas que contienen 8 carbonos y (d) quitosanos derivados de 12 carbonos con (■, □) 5%, (●, ○) 10% y (▲, △) 50% de grado de sustitución.

A la inversa, en DMEM suplementado con un 10% (v / v) se observó que los tamaños de partícula de FBS aumentaban continuamente durante las primeras 48 h de incubación y, luego, permanecieron apenas constantes. Tales aumentos pueden surgir de la formación de agregados entre las CSNPs (de 3 a 6 unidades, en términos de un solo tamaño de nanopartículas) debido a la adsorción de proteínas sobre las superficies de las nanopartículas, particularmente la albúmina sérica, a través de interacciones electrostáticas e hidrófobas, dando lugar a la formación de una biocorona proteica en un proceso conocido como opsonización [49]. Junto con esto, puede ocurrir alguna aglomeración de nanopartículas, provocada por la fuerza iónica de la solución [50]. Es interesante observar que las CSNP basadas en el quitosano derivatizados con 12 carbonos mostraron incrementos de tamaño más pequeños, en comparación con los derivatizados con 8 carbonos. Esto podría explicarse basándose en la existencia de mayores atracciones electrostáticas entre los ácidos carboxílicos desprotonados de las proteínas presentes en el FBS y las aminas protonadas del quitosano en la superficie de estas nanopartículas. Además, también creemos que las cadenas laterales del quitosano modificado con cadenas de 12 carbonos, que supuestamente están expuestas cerca de las superficies de las partículas, podrían haber dificultado de alguna manera la adsorción de proteínas hasta cierto punto, evitando así incrementos de tamaño adicionales [51, 52]. Sin embargo, se necesitarían estudios adicionales para confirmar este punto. Después de 48 h de incubación, las CSNP hidrofobizadas con 8 carbonos no produjeron cambios sustanciales en el tamaño de las partículas, mientras que para los derivados con 12 carbonos se observó una cierta disminución. Finalmente, la estabilidad de las diferentes CSNPs a diferentes soluciones de pH durante 5 días también fue controlada por DLS. Los diferentes tipos de CSNP casi no mostraron cambios en el tamaño de las partículas durante la incubación, excepto en los pH más extremos de 3.0 y 8.0 (ver Figura 8).

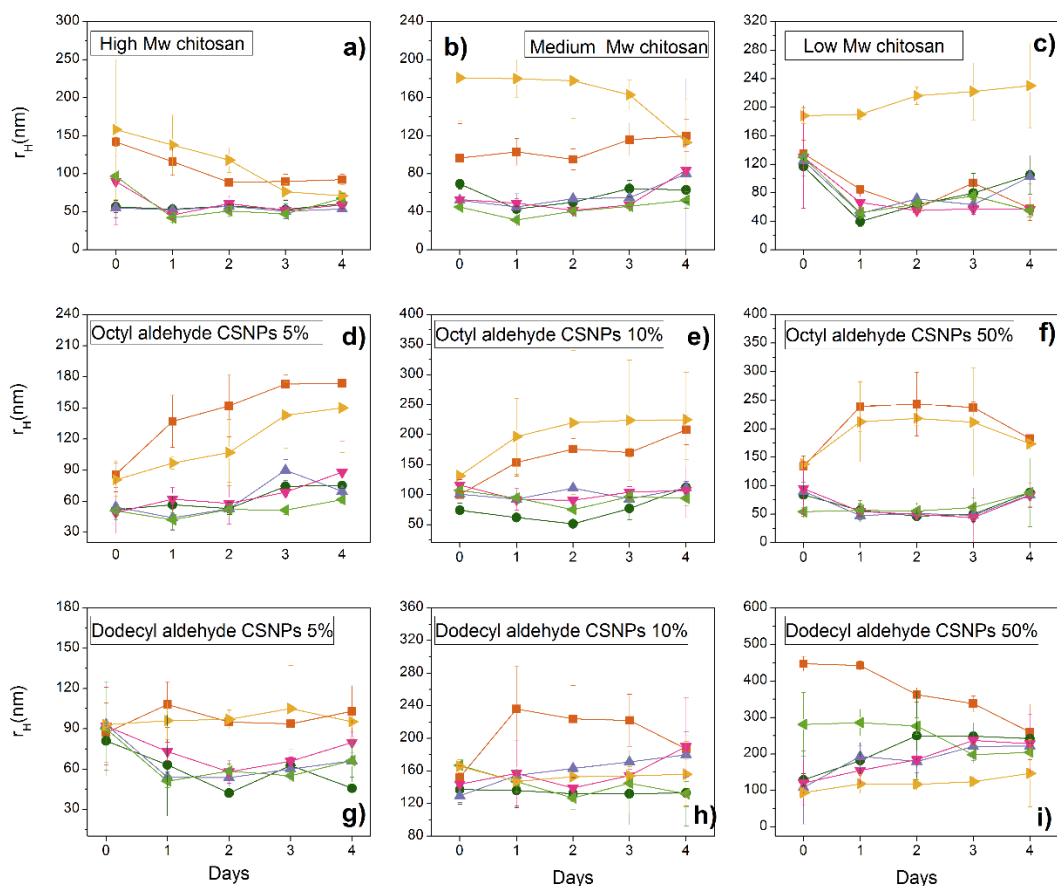


Figura 8. Evolución del tamaño de los CSNP medidos por DLS durante 5 días en un rango de pH entre 3.0 y 8.0: (a) CH; (b) CM; (c) CL; (d) 8Ma; (e) 8Mb; (f) 8Mc; (g) 12Ma; (h) 12Mb; (i) 12Mc a pH 3 (■), 4 (●), 5 (▲), 6 (▼), 7 (◊) y 8 (▶).

3.4.6 Estabilidad del siRNA encapsulado.

Para una expresión y/o inhibición génica efectiva, los ácidos nucleicos u oligonucleótidos atrapados en un vehículo de administración deben protegerse de la degradación por enzimas como las nucleasas séricas [53,54]. En el presente caso, si las CSNP fueran inestables, se liberaría prematuramente el siRNA [37]. Con el propósito de evaluar la capacidad de nuestro nanosistema de proteger el material genético, analizamos la influencia del grado de sustitución y la longitud de la cadena lateral sobre la estabilidad del siRNA atrapado en las nanopartículas seleccionando dos casos extremos: un quitosano modificado con una cadena alifática corta y un bajo grado de sustitución (C8Mb) y otro quitosano modificado con una mayor cadena lateral y un grado de sustitución mucho mayor (C12Mc).

Para hacer eso, se realizó un ensayo de electroforesis en gel de agarosa después de la incubación de las partículas en DMEM complementado con 5% y 50% (v/v) de FBS a 37 °C para asegurar la capacidad de las CSNPs modificados para proteger el siRNA de la digestión por nucleasas del suero. Como se observa en la Figura 9a, el siRNA desnudo estaba intacto solo al comienzo de la incubación en FBS al 5% (v/v) (no se observó ninguna banda de arrastre en el carril 1 a 0 min) y se degradó completamente a las 24 h. Por el contrario, a una concentración sérica más alta, 50% (v/v) de FBS, la presencia de una banda posterior en todos los carriles fue indicativa de degradación instantánea, coincidiendo con lo reportado anteriormente [10].

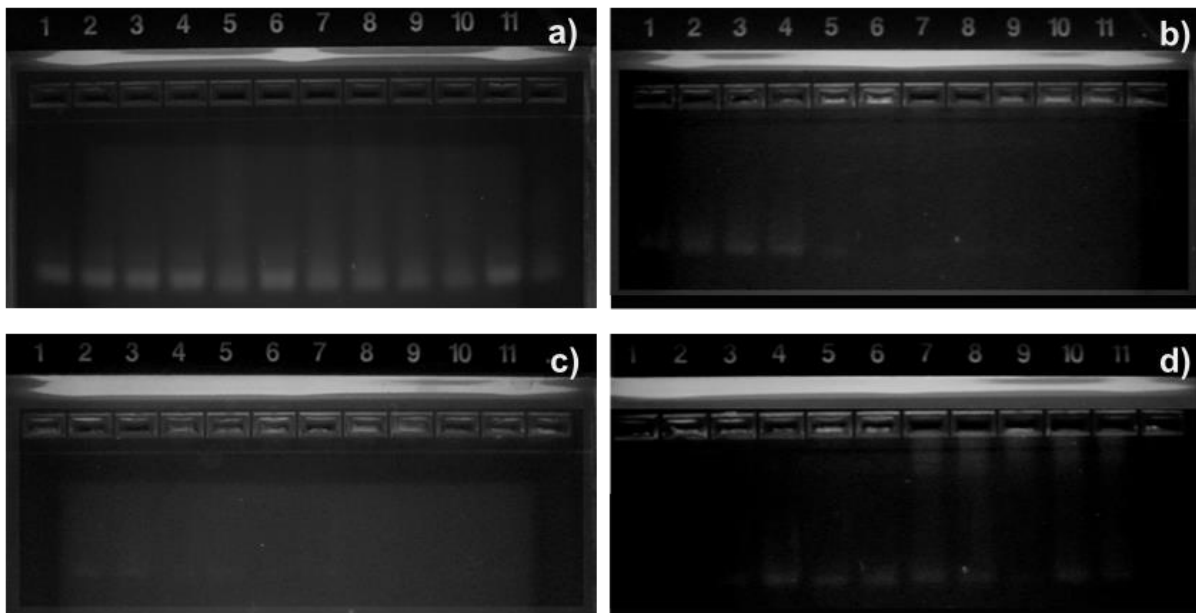


Figura 9. Movilidad del siRNA después de la incubación en medio enriquecido con FBS: (a) siRNA desnudo; CSNPs compuestas de (b) CM; (c) 8Mb; (d) 12Mc. Del carril 1 al 6, la incubación se realizó en FBS al 5% (v/v); los carriles de 7 a 12 de incubación estaban en 50% (v/v) de FBS, respectivamente. Los tiempos de incubación fueron: 0 min (carriles 1 y 7); 30 min (carriles 2 y 8); 2 h (carriles 3 y 9); 7 h (carriles 4 y 10); 24 h (carriles 5 y 11); y 48 h (carriles 6 y 12).

Cuando las CSNPs no modificados se incubaron en FBS al 5% (v/v), el siRNA comenzó a degradarse después de 30 minutos de incubación (no se observó una banda de arrastre en el carril 1), mientras que la degradación completa solo se observó después de 24 h (Figura 9b). A la inversa, el siRNA recuperado de los carriles de las CSNPs derivatizadas con C8Mb y C12Mc se mantuvo intacto después de 7 h de incubación y se acomplejó en gran parte al primer tipo de nanopartículas y se degradó completamente para el último después de 48 h de incubación (Figura 9c-d). El siRNA cargado en las CSNP de quitosano derivatizadas con C12Mc manifestó un comportamiento similar al siRNA desnudo en para el tratamiento con 50% (v/v) de FBS, es decir, la presencia de una banda de arrastre en todos los carriles (Figura 9d, carriles 7 a 12). Esta observación podría respaldar nuestra hipótesis de que para las CSNPs derivatizadas con C12Mc, el siRNA estaría atrapado especialmente alrededor de las superficies de las partículas, exponiéndose en gran parte a nucleasas. Sorprendentemente, las CSNPs derivatizadas con C8Mb parecen excluir el contacto del siRNA con el suero (ver Figura 9c), es decir, una gran parte del siRNA todavía estaría acomplejado con las cadenas de quitosano modificado dentro de las nanopartículas y solo se observó una pequeña separación en presencia de heparina, como lo confirman las señales más bajas en los carriles electroforéticos. Por lo tanto, se concluye que los presentes las CSNP-C8Mb protegieron significativamente el siRNA de la actividad de las nucleasas, lo que las convierte en un prometedor nanovector de suministro de genes.

3.4.7 Liberación del siRNA.

Como se mencionó anteriormente, una buena estabilidad de las nanopartículas es crucial para la protección extracelular del siRNA; sin embargo, también se necesita un proceso adecuado de desensamblaje de las partículas para permitir la entrega de la carga y el posterior silenciamiento génico mediado por ARN a través de interacciones con componentes intracelulares como el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Entonces, se debe lograr un equilibrio adecuado entre la protección del siRNA y su liberación para lograr una eficacia terapéutica. Con este fin, la capacidad de las CSNP para liberar el siRNA encapsulado se midió adicionalmente a 37 °C durante varios días a tres pH diferentes que simulan diferentes medios biológicos.

Para tal efecto, las CSNPs se incubaron a pH 7.4, 5.5 y 2.0, que imitan el pH fisiológico para la administración parenteral, el ambiente ácido de los tumores y algunos compartimentos intracelulares como los lisosomas, así como el ambiente gástrico, respectivamente [34].

Como se observa en la Figura 10, la liberación del siRNA de las CSNP se caracterizó por una liberación rápida inicial (fase de explosión) dentro de las primeras 9-13 h de incubación, en la que la cantidad de carga liberada puede corresponder al siRNA ubicado en/cerca de las superficies de las nanopartículas. La fase de estallido fue seguida por una región casi lineal que conduce a una liberación sostenida del siRNA durante varios días, como se observó anteriormente, por ejemplo, para nanopartículas a base de quitosano hidrofobizado con glicol [55]. Para el tratamiento de muchas enfermedades diferentes, se desea un patrón de liberación sostenida para mantener una concentración constante de carga en la sangre y prevenir su fuga prematura, lo que puede provocar efectos secundarios tóxicos no deseados. Una mirada adicional a los perfiles de liberación obtenidos indica que la derivatización de los quitosanos y la posterior formación de nanopartículas nos permitió ajustar perfectamente las tasas de liberación y la extensión, es decir, para una condición dada existe una CSNP con un perfil de liberación adecuado. De esta manera, se observó que el comportamiento de liberación *in vitro* del siRNA dependía tanto de la hidrofobicidad del biopolímero de quitosano como del pH del medio de liberación, especialmente dentro de la región de estallido. Brevemente, es necesario recordar que las cargas encapsuladas en matrices/nanopartículas poliméricas biodegradables se liberan mediante tres mecanismos que tienen lugar en secuencia: (i) desorción de la superficie de las partículas; (ii) difusión y reabsorción a través de los poros de la red polimérica; (iii) degradación y erosión de la red polimérica. Además, el pH de la solución puede haber afectado los valores y tamaños de potencial zeta (ver Figura 8) de las nanopartículas poliméricas [25]. Por ejemplo, las CSNP hechas de CM tenían un potencial zeta de 25.4 ± 1.0 mV a pH 5.0, 5.1 ± 0.8 mV para pH 7.0 y 52.2 ± 1.4 mV a pH 3.0, respectivamente. Por el contrario, para las CSNP que utilizan C12Mc, los potenciales zeta obtenidos fueron 22.7 ± 1.1 , 35.2 ± 1.1 y 48.3 ± 2.7 mV a pH 3.0, 5.0 y 7.0, respectivamente.

La extensión de la liberación del siRNA a partir de las diferentes CSNPs derivatizadas y no derivadas generalmente siguió la secuencia pH 7.4 > pH 5.5 > pH 2.0. Por lo tanto, cuando el pH de la solución es mayor que el pKa del TPP y el siRNA, las CSNP están al cargadas negativamente en mayor medida y las repulsiones electrostáticas internas deberían facilitar una liberación más rápida del siRNA. A pH 5.5, dichas fuerzas disminuyeron y las moléculas de carga (siRNA) se liberarían por difusión simple. A pH 2.0, los grupos amino del quitosano estaban completamente protonados y la tasa de liberación de carga fue mucho menor. En este caso, el siRNA podría haber actuado como un "reticulador" adicional, gracias a las atracciones electrostáticas con el esqueleto de la molécula de quitosano y sus grupos NH_3^+ [10,56,57].

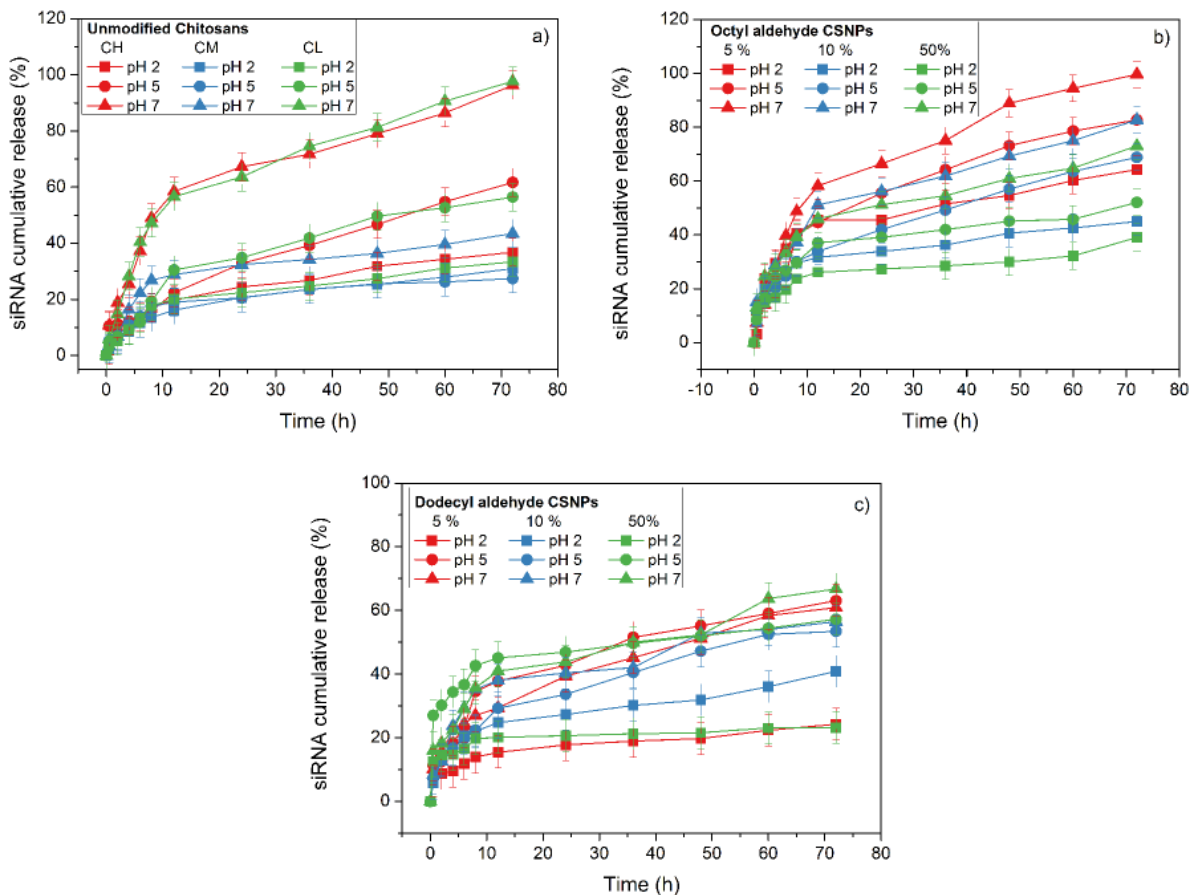


Figura 10. Liberación del siRNA de las CSNPs a pH 7.4 (▲), 5.5 (●) y 2.0 (■). (a) Nanopartículas que contienen quitosanos no modificados con (rojo) alto, (azul) medio, (verde) bajo peso molecular. (b) CSNP modificadas con una cadena lateral de 8 carbonos (c) y 12 carbonos con (rojo) 5%, (azul) 10% y (verde) 50% de grado de sustitución.

Los perfiles de liberación observados denotan una cierta dependencia del peso molecular del quitosano (Figura 10a). En particular, las nanopartículas CSNP basadas en quitosanos de peso molecular medio (CM) exhibieron una liberación más sostenida que las basadas en los de bajo (CL) y alto peso molecular (CH). Esta observación podría explicarse sobre la base de que las CSNP basadas en CL podrían no haber compactado completamente el siRNA en partículas estables, lo que permitiría una liberación más rápida [58,89]. Por otra parte, las CSNP basados en CH tendrían una densidad de reticulación más baja que las basadas en CM (mayor proporción de quitosano:TPP), lo que induce la formación de una red polimérica menos compacta y más porosa [60].

La hidrofobización de las cadenas de quitosano también tuvo una clara influencia en las tasas de liberación del siRNA, donde tanto la longitud de la cadena lateral como el grado de sustitución jugaron un papel importante. Li et al. analizaron la permeabilización y difusión de la vitamina B2 encapsulada en CNP no modificadas y alquiladas a diferentes pH [61]. Estos autores encontraron que la liberación del fármaco a partir de las CNP no modificadas aumentó al aumentar el pH de la solución como consecuencia de la disociación y reconstrucción de los enlaces de hidrógeno. En el medio básico, la disociación de los enlaces de hidrógeno redujo la fuerza de interacción intermolecular entre las cadenas laterales y la red polimérica, lo que la hizo débil y más porosa y, por lo tanto, el fármaco se difundió más fácilmente. A la inversa, para las CNP alquiladas, la permeabilización y la difusión de los medicamentos disminuyeron a medida que aumentaba el pH de la solución. En medio ácido, tanto la permeabilización como la difusión disminuyeron con el aumento en la longitud de la cadena lateral de alquilo, mientras que el comportamiento opuesto se encontró en condiciones básicas. Esta observación está de acuerdo con los resultados aquí mostrados, donde las CSNP modificadas con 8 carbonos mostraron, en general, perfiles de liberación más rápidos que los modificados con 12 carbonos en condiciones ácidas, mientras que la tendencia opuesta se encontró a pH 7.4. El alargamiento de las cadenas laterales incrementó la hidrofobicidad de la red polimérica dentro de las nanopartículas que, a su vez, dificultaron la difusión hacia afuera del siRNA a través de la matriz de las nanopartículas. En condiciones básicas, se observó una mejora de la difusión a medida que el número de átomos de carbono en la cadena lateral aumentaba probablemente en relación con un

mayor impedimento estérico. La extensión de la liberación de siRNA se redujo a medida que el grado de sustitución en el esqueleto de la molécula de quitosano aumentó como consecuencia de la mayor densidad del núcleo de la partícula, lo que finalmente restringió la difusión del siRNA fuera de las partículas.

3.4.8 Biocompatibilidad celular *in vitro*.

A continuación, evaluamos la potencial citotoxicidad tanto de las CNP como de las CSNP después de la captación celular y la internalización de las nanopartículas a través de la medición de la actividad metabólica celular mediante el ensayo de proliferación CCK-8 en dos líneas celulares diferentes: la línea cáncer cervical humano (HeLa) y las células de macrófagos de ratones (RAW 264.7). Se analizaron diferentes variables como la concentración de nanopartículas, el tiempo de exposición y la naturaleza de la nanopartícula (hidrofobicidad). Se eligieron células HeLa ya que representan una línea de células tumorales inmortalizadas clásicas para probar *in vitro* la eficacia de nuevos fármacos / formulaciones para el tratamiento del cáncer. Los macrófagos son una de las principales células efectoras inmunitarias que desempeñan funciones esenciales como células secretoras, fagocíticas y presentadoras de antígenos en el sistema inmunitario. Elegimos células de macrófagos RAW 264.7 ya que también muestran una alta sensibilidad a compuestos/químicos potencialmente tóxicos [62-64].

Se seleccionaron las CSNPs basados en C8Mb y C12Mc como ejemplos de derivatizaciones extremas (las nanopartículas de 8Mb poseen una cadena lateral corta y un bajo grado de sustitución, mientras que las de 12Mc tiene cadenas laterales más largas y un grado de sustitución mucho más alto), y también mostraron algunas de las mejores propiedades físico-químicas en términos de tamaño de partículas y cargas superficiales, protección de siRNA, estabilidad en medio de cultivo y perfiles de liberación sostenida. Además, las CSNP basadas en CM se seleccionaron como controles para comparación.

La Figura 11 muestra las viabilidades celulares de las CNP y CSNP seleccionadas en las líneas celulares HeLa y RAW 264.7 después de 24 y 48 h de incubación. Como se observa en esta figura, las células HeLa fueron más sensibles que los macrófagos a la presencia de las CNP y CSNP, de acuerdo con lo observado previamente por otros

autores [65]. En las células HeLa, la viabilidad celular era dependiente de la dosis para las CNP y, especialmente, para las CSNPs. Dicha dependencia no se observa particularmente en macrófagos, a excepción de las concentraciones de partículas más altas [17,66]. Sin embargo, se observó que las nanopartículas biopoliméricas presentes no son tóxicas para las células, con viabilidades siempre por encima del 50% excepto en la concentración más alta (2 mg/mL) después de 48 h de incubación [67]. En general, también se observó que la toxicidad celular era relativamente mayor en tiempos de incubación más prolongados. Además, la incorporación del siRNA en las CSNPs las hizo menos tóxicas para las células que las nanopartículas vacías (CNP), especialmente en macrófagos.

También se observó que las diferencias en las tasas de supervivencia también dependían del tipo de célula. En las células no fagocíticas como HeLa, las cargas superficiales catiónicas y los tamaños pequeños para la mayoría de las nanopartículas se correlacionan con mayores captaciones celulares (ver más abajo) y mayores citotoxicidades. De manera inversa, los fagocitos como los macrófagos y los monocitos son más sensibles a la presencia de nanopartículas más grandes y con carga negativa. La presencia de suero pareció reducir la captación de nanopartículas en células no fagocíticas, pero aumentó en las fagocíticas [68,69]. Para las células HeLa, se encontró que las CNP de C8Mb y CM tienen potenciales zeta similares, pero las partículas de C8Mb mostraron menores tasas de supervivencia a las 48 h de la incubación. Para las células RAW 264.7 se encontró la tendencia opuesta. Sorprendentemente, cuando el siRNA se incorporó dentro de las CSNP derivatizadas, se detectaron mayores tasas de supervivencia en ambos tipos de líneas celulares (ver Figura 12). Es importante destacar que las CSNP de quitosano derivatizado con una cadena alquílica de 12 carbonos lograron una mayor biocompatibilidad en comparación con las basadas en 8 carbonos y, en general, la toxicidad celular disminuyó progresivamente al aumentar el nivel de sustitución del esqueleto polimérico, en comparación con sus homólogos no modificados (ver Figura 12).

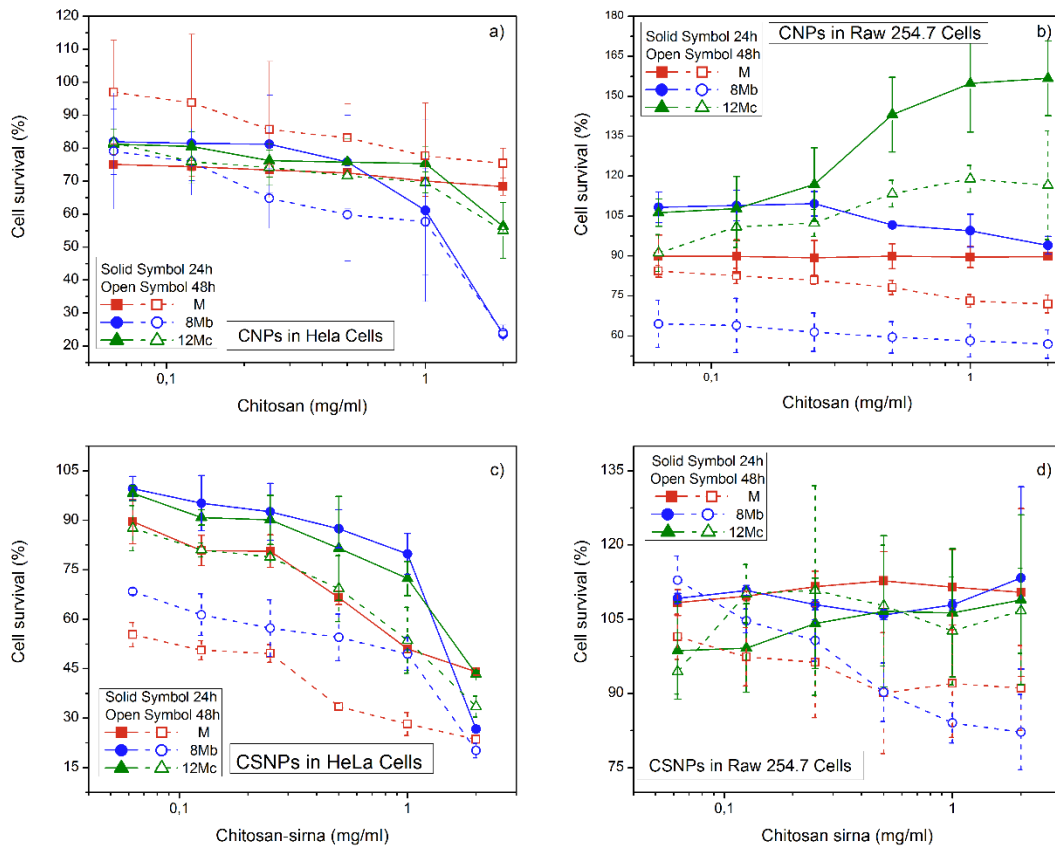


Figura 11. Supervivencia celular para las CNPs (a, b) y CSNPs (c, c) en células HeLa (a, c) y macrófagos (b, d). Los símbolos sólidos representaron la incubación durante 24 horas, mientras que los símbolos abiertos durante 48 horas. (■, □) quitosano de peso molecular medio; (●, ○) 8Mb; (▲, △) 12Mc.

El motivo de tal comportamiento aún no está claro, pero podría estar relacionado con la mayor hidrofobicidad de las CSNP derivatizadas.

Para aclarar aún más la influencia del tipo y la extensión de la hidrofobización del quitosán en la viabilidad celular, se calcularon las toxicidades celulares relativas (Δ). Se Δ define como la diferencia en la supervivencia celular en presencia de las CNP y CSNPs. $\Delta > 0$ implica que los CSNP indujeron tasas de supervivencia celular más bajas que los CNP, mientras que $\Delta < 0$ indicó el comportamiento opuesto.

La hidrofobización con quitosano mostró un efecto positivo en la viabilidad celular, y el tipo y el alcance de la modificación desempeñaron un papel clave. Se observó que las

CSNP eran más biocompatibles que las CNP, excepto en las células HeLa después de 48 h de incubación (ver Figura 13).

3.4.9 Captación celular y eficiencia de transfección.

Con el fin de analizar la captación celular *in vitro* y la eficiencia de transfección de los CSNP, se llevaron a cabo experimentos de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Se utilizó un oligo de RNA marcado con FITC como carga para confirmar efectivamente la internalización de partículas y la liberación de carga dentro de los citoplasmas celulares. Las CSNPs producidos a partir de C8Mb y C12Mc derivados de quitosano se probaron como portadores de siRNA óptimos, mientras que las basados en CM se usaron como referencia. La Figura 14 muestra la evolución temporal de la internalización de partículas dentro de las células HeLa. La captación celular se monitorizó a intervalos de 6, 12 y 24 h. La Figura 14 representa una acumulación progresiva de partículas y la posterior liberación de siRNA como indica el aumento de la fluorescencia en verde del oligo marcado durante la incubación. Curiosamente, las CSNP formulados con quitosano derivatizado dieron como resultado una acumulación progresiva del siRNA en células HeLa, donde el patrón de fluorescencia se volvió rojo a verde anaranjado en las imágenes combinadas. Sin embargo, las CSNP, que llevan quitosano no modificado, mostraron una señal fluorescente menos intensa, que podría atribuirse a la menor cantidad de siRNA cargado en comparación con aquellos con quitosano modificado. Para las CSNPs elaboradas con C8Mb y C12Mc, la fluorescencia fue bastante intensa después de 6 h de incubación, de acuerdo con sus tasas de liberación de carga ligeramente mayores en tiempos de incubación cortos (consulte la Figura 10). Sin embargo, la señal de fluorescencia después de 12 h para C12Mc disminuyó sorprendentemente mientras que a las 24 h se recuperó. Estos hallazgos respaldarían nuestra hipótesis con respecto a la liberación inicial de siRNA desde la capa más externa de las CSNPs C12Mc poco después de la incubación, seguida por su lenta difusión desde el núcleo de las nanopartículas.

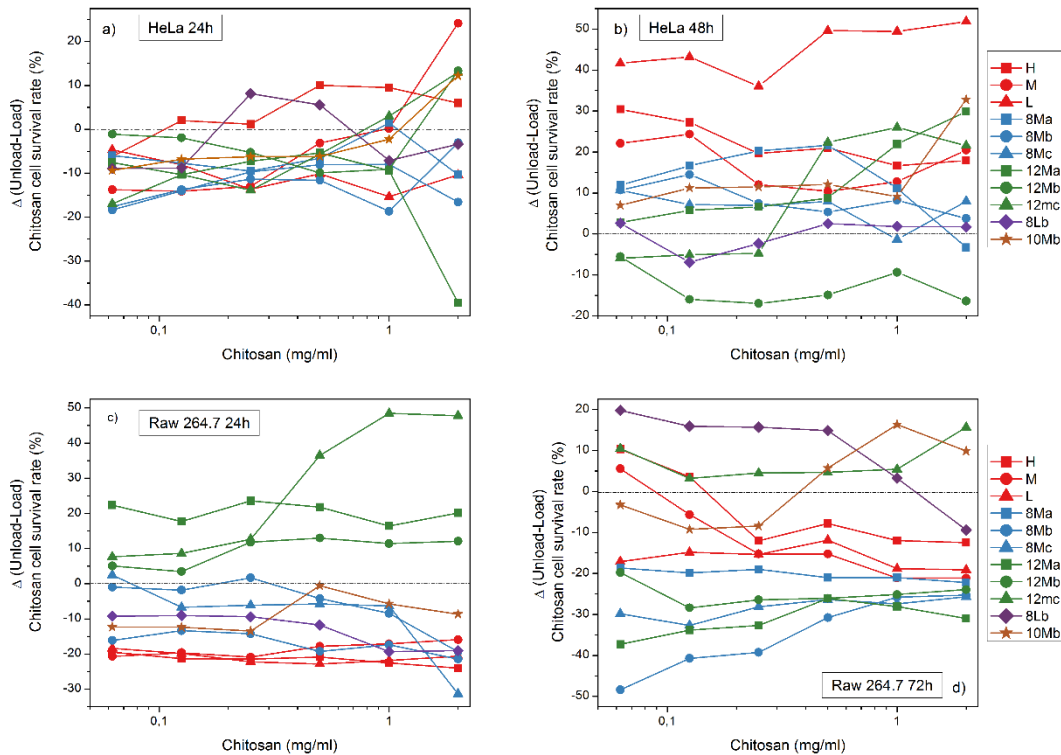


Figura 12. Supervivencia celular relativa (Δ) en presencia de las CNP y CSNPs en células HeLa después de 24 h (a) y 48 h (b) de incubación; y en células RAW 264.7 a las 24 h (c) y 48 h (d) de incubación.

Finalmente, también se realizó un análisis cuantitativo de la captación de partículas y la posterior transfección en términos del porcentaje de fluorescencia con FITC dentro de las células HeLa por medio de citometría de flujo. La Figura 14b muestra que las células transfectadas con CSNPs-CM mostraron una baja fluorescencia durante el período de incubación seleccionado. Esto podría deberse a los menores LC obtenidos, así como a las velocidades de liberación más lentas observadas para esta clase de nanopartículas en soluciones de pH 5.5-7.4. Además, las células transfectadas con CSNPs-C8Mb mostraron una señal de fluorescencia bastante similar, alrededor del 20%, que las transfectadas con CSNPs-CM después de 24 h de incubación; por el contrario, a las 48 h, el grado de transfección aumentó en gran medida hasta un 70%, siendo similar al de Lipofectamine2000 utilizado como control positivo. Finalmente, las CSNPs-C12Mc logró niveles comparables de transfección con el control a las 24 h, que disminuyó sustancialmente después de 48 h de transfección.

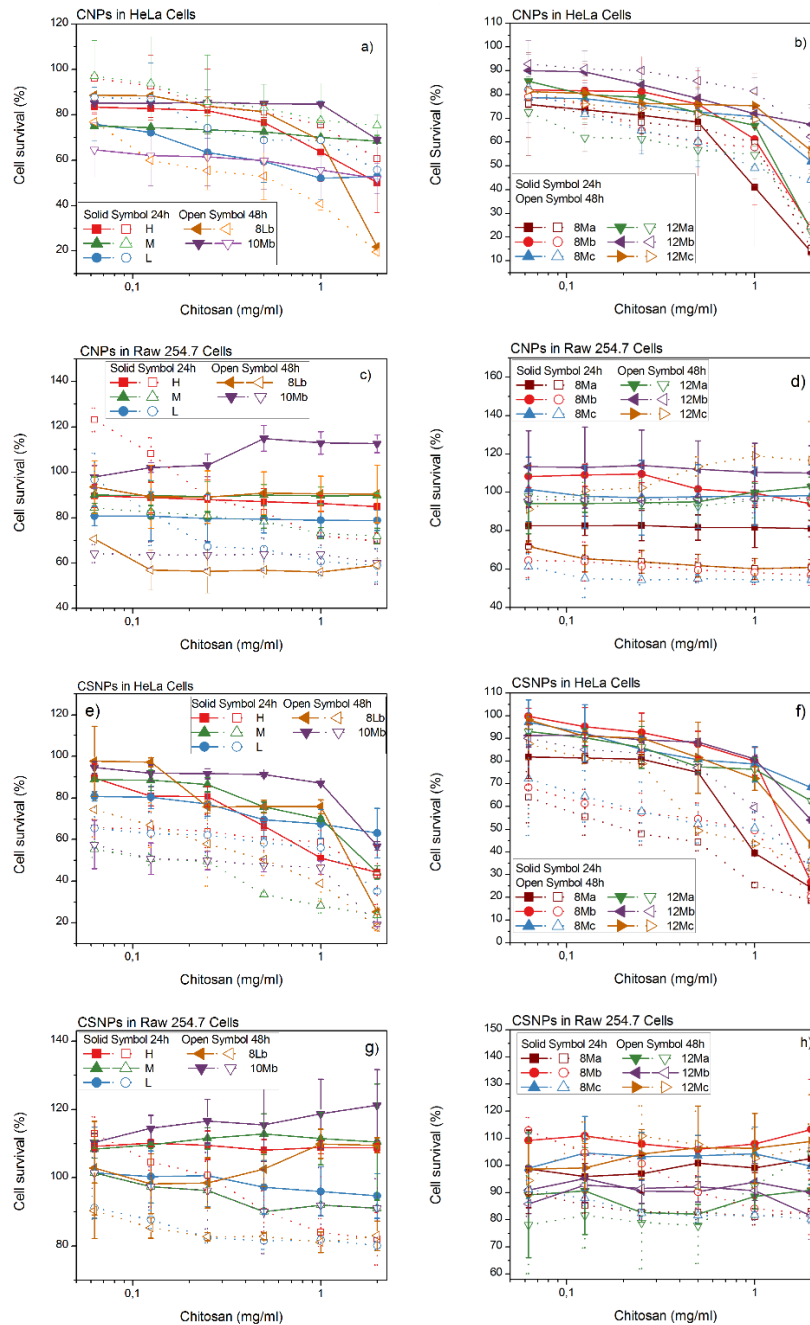


Figura 12. Tasas de supervivencia celular para CNPs [ad] y CSNPs [(ef)] en Cáncer de cuello uterino células HeLa [(a), (b), (c), (d)] y macrófagos [(c), (d), (g), (h)]. Los símbolos sólidos representaron 24 h de supervivencia celular y los símbolos abiertos 48 h. Leyenda para las figuras (a), (c), (e) y (g): peso molecular (■) Alto; (▲) Medio; (●) Bajo; (◀) 8Lb y (▼) 10Mb de nanopartículas de quitosano. Leyenda para las figuras (b), (d), (f), (h): (■) 8Ma; (●) 8Mb; (▲) 8Mc; (▼) 12Ma; (◀) 12Mb y (▶) 12Mc de nanopartículas de quitosano.

Este comportamiento puede ser consecuencia de una interacción más fuerte de este tipo de NP con membranas celulares, lo que facilita una captación celular de partículas más rápida, así como una liberación de carga ligeramente más rápida en comparación con las basadas en C8Mb y no modificadas (ver Figura 10). De hecho, ya se ha sugerido que las unidades laterales hidrófobas en nanotransportadores poliméricos pueden aumentar la eficacia de la transfección mediante la modulación de las interacciones de las nanopartículas con las células, lo que mejora su adsorción en la superficie celular y su posterior captación [58,71,72].

Además, los segmentos hidrófobos en los nanotransportadores poliméricos pueden ayudar en el desmontaje de las nanopartículas de quitosano/ADN y quitosano/siRNA para facilitar la liberación del material genético que, de lo contrario, se uniría fuertemente a través de interacciones iónicas al esqueleto polimérico. Por lo tanto, tales características favorables de las cadenas laterales hidrófobas, injertadas en quitosano, pueden explicar las eficiencias de transfección prominentes obtenidas en el trabajo actual, en comparación con el biopolímero no modificado. En este sentido, Liu et al. prepararon quitosanos alquilados y observaron que la eficacia de la transfección en una línea celular C2C12 de ratón (mioblasto muscular C3H) mejoró al aumentar la longitud de la cadena lateral sustituida hasta 8 carbonos, lo que concuerda con nuestros datos [22]. Además, Chae et al. los quitosanos modificados con ácido desoxicólico sintetizados como el componente principal de los nanotransportadores, para el suministro de ADN del plásmido pEGFP-N1, lograron una eficiencia de transfección más pronunciada en las células HEK 293, que dependió del grado de sustitución. Del mismo modo, Hu et al. injerto de ácido esteárico (SA) en el esqueleto de quitosano para transfectar el pDNA pEGFP-C1 en células A549, obteniendo mayores eficiencias de transfección con una mortalidad celular mucho menor [74].

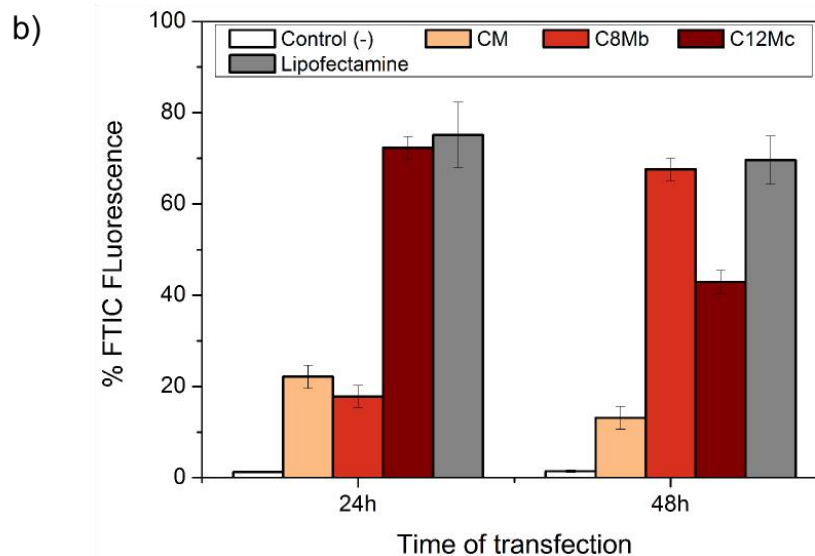
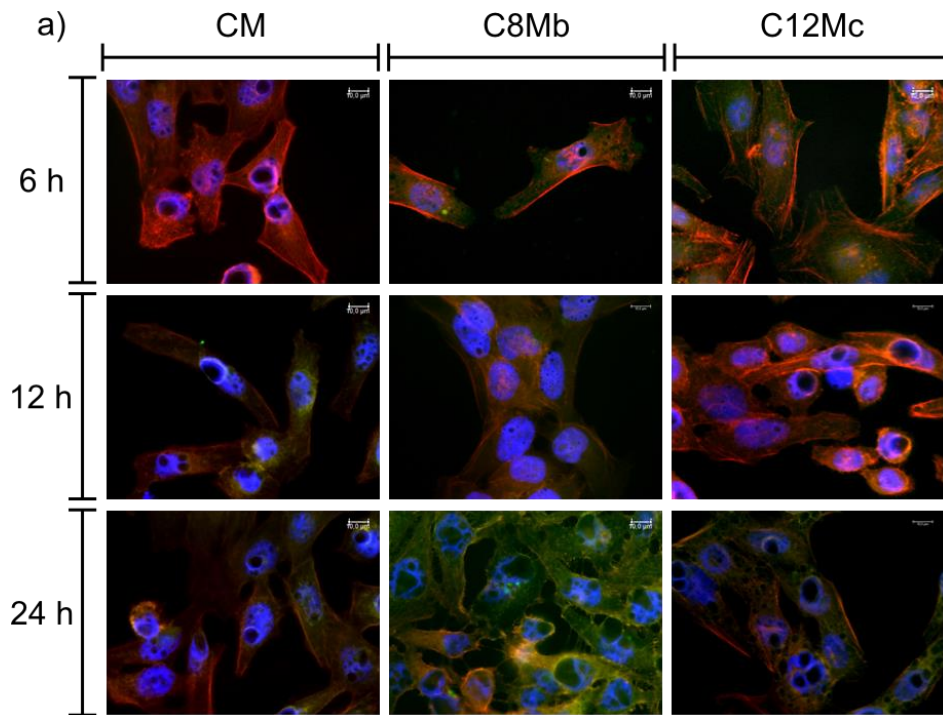


Figura 14. a) Imágenes de microscopía de fluorescencia de captación celular y distribución intracelular de FITC-siRNA (canal verde) en células HeLa durante 6 h, 12 h y 24 h. La fluorescencia azul proviene de los núcleos celulares teñidos con DAPI, y la fluorescencia roja del citoplasma celular se teñió con BODIPY-Faloidina. Las barras de escala son de 10 μm. b) Eficacia de transfección de siRNA-FTIC en células HeLa medida por citometría de flujo usando CM-, C8Mb- y C12Mc-CSNPs. Se usaron células HeLa no transfectadas como control negativo, mientras que la transfección del siRNA con Lipofectamine2000 se usó como positiva.

3.4.10 Eficiencia del silenciamiento del gen del siRNA.

Finalmente, para analizar la actividad silenciadora de los siRNA liberados a partir de las nanopartículas derivatizadas seleccionadas, monitoreamos la disminución de la intensidad de fluorescencia inducida por un siRNA específico contra la expresión de GFP en células HeLa modificadas utilizando las CSNPs fabricadas con CM, C8Mb y C12Mb por medio de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Se utilizaron células HeLa estándar como control negativo, mientras que se usaron células HeLa-GFP no transfectadas como positivas. El siRNA transfectado con Lipofectamine 2000 fue una referencia secundaria positiva para comparación.

Según el análisis cualitativo por microscopía de fluorescencia, representado en la Figura 15a, la fluorescencia intrínseca de las células se mantuvo casi después de la transfección hasta 6 h, después de lo cual su intensidad disminuyó gradualmente. No obstante, se detectó una porción significativa de fluorescente a las 24 h de la post-transfección, que podría asignarse a: i) la liberación sostenida de moléculas de siRNA dentro del citoplasma; y/o ii) un tiempo insuficiente para lograr una inhibición notable de la expresión de proteínas. La inhibición de GFP utilizando las CSNPs C8Mb y C12Mb parecía ser bastante más grande que la de las CM probablemente como consecuencia de i) una LC más baja, ii) una tasa de liberación más lenta, y iii) una interacción más fuerte de quitosano-siRNA, que puede prevenir la disociación de siRNA de las nanopartículas anteriores [72,75].

El análisis cuantitativo de la eficacia de eliminación de la expresión de la GFP se realizó adicionalmente en la misma línea celular mediante citometría de flujo utilizando CSNP con los quitosanos modificados y no modificados. Aquí, es necesario recordar que se debe lograr un equilibrio adecuado entre la protección del siRNA y la liberación eficiente del siRNA para obtener simultáneamente altos niveles de transfección y silenciamiento. La Figura 15b muestra que las CSNPs C8Mb exhibió la mayor actividad de silenciamiento génico, alrededor del 30% a las 24 y 48 h de incubación y similar a la del control positivo Lipofectamine2000. En contraste, las CSNP CM suprimieron la expresión de GFP en un 10-15%, lo que se puede racionalizar en base a sus valores de LC más bajos, velocidades de liberación lentas e inestabilidad del suero, como se comentó anteriormente.

Sorprendentemente, también se observaron silenciamientos bajos bastante similares (alrededor del 20%) para las CSNPs C12Mc a pesar de su mayor LC y mayor internalización de nanopartículas. Se podría argumentar que estas CSNPs podrían haber sufrido una mayor degradación del siRNA por las nucleasas, como lo confirmó la electroforesis en gel (Figura 9d), probablemente debido a la presencia de moléculas de siRNA en la capa más externa de sus superficies, como se planteó anteriormente como hipótesis (ver esquema 2). En este sentido, también se observaron bajas actividades de silenciamiento para las partículas preparadas por acomplejamiento simple de siRNA en nanopartículas de quitosano-TPP preformadas como consecuencia de la protección ineficiente del material genético a la degradación enzimática [10,76]. Por lo tanto, a pesar de la mayor transfección de las nanopartículas de C12Mc que de las nanopartículas de C8Mb, después de 24 h (ver Figura 14), la posible escisión del siRNA liberado de las anteriores podría haber afectado su rendimiento de silenciamiento génico.

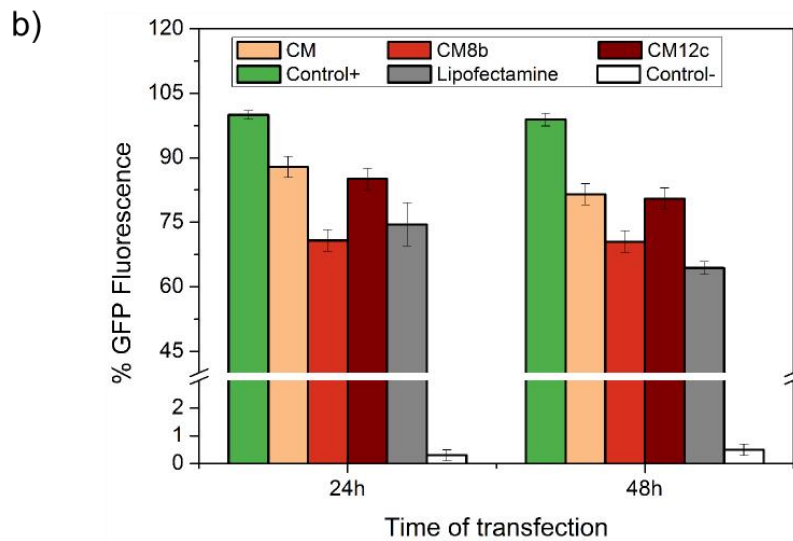
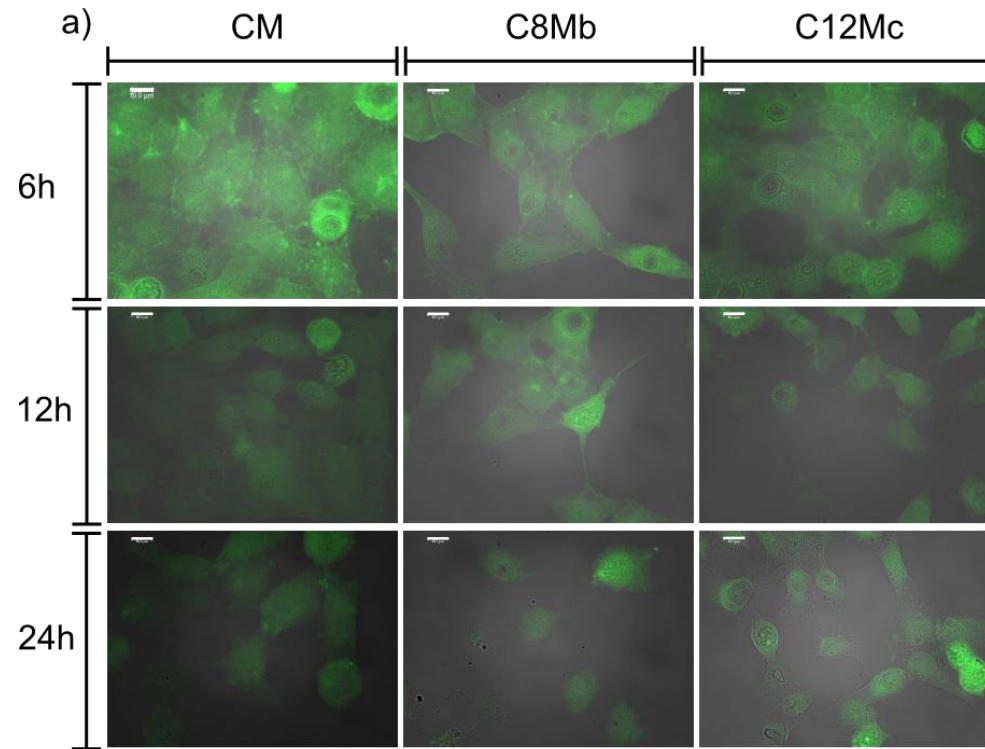


Figura 15. a) Silenciamiento de genes observado por microscopía fluorescente en células HeLa-GFP expuestas a nanopartículas basadas en quitosano cargadas con un siRNA contra GFP. Se tomaron imágenes a las 6, 12 y 24 h de incubación. Se utilizaron quitosanos CM, C8Mb y C12Mc. Se mostraron imágenes fusionadas. Las barras de escala son de 10 μ m. b) Intensidad de fluorescencia media de GFP expresada en células HeLa después de 24 y 48 h de transfección con siRNA anti-GFP utilizando CM, C8Mb, C12Mc-CSNPs y Lipofectamine 2000.

CONCLUSIONES

En resumen, este trabajo implicó la modificación hidrófoba del quitosano, antes de su uso en la producción de nanopartículas a través de la gelificación ionotrópica, para la administración del siRNA. Las modificaciones estructurales introducidas tuvieron un impacto en la capacidad de carga de siRNA y los patrones de liberación, así como en su eficacia de transfección y en la actividad de silenciamiento de genes. Esto se llevó a cabo mediante el procedimiento de alquilación, donde se injertaron cadenas laterales de 8, 10 y 12 carbonos en el esqueleto de quitosano, a diferentes grados de sustitución (5, 10 y 50%). Los datos experimentales obtenidos indicaron que la longitud de la cadena lateral jugó un papel clave en la determinación de tamaños de partículas y cargas superficiales, especialmente en altos grados de sustitución a través del control de la naturaleza y el alcance de las interacciones entre el siRNA y el esqueleto de quitosano modificado, como se indica en los datos de ITC. Del mismo modo, la incorporación del siRNA en las nanopartículas indujo cambios en sus cargas superficiales y tamaños, y haciendo las nanopartículas más pequeñas debido a la compactación de los núcleos de las nanopartículas. Además, se obtuvieron valores mejorados de EE y LC de siRNA para nanopartículas formuladas con los quitosanos modificados hidrofóticamente en comparación con sus homólogos preparados con el quitosano no modificado. Además, las imágenes TEM permitieron ver las diversas morfologías de las nanopartículas producidas, donde, por ejemplo, las CSNPs C8M mostraban una superficie lisa, mientras que las CSNPs C12M mostraban una estructura similar a cabellos. Esto puede justificar la alteración en los perfiles de liberación de siRNA entre las CSNP, con el quitosano modificado hidrofóticamente y no modificado.

Con respecto a la estabilidad frente a las nucleasas, los quitosanos de mayor grado de sustitución y/o cadenas laterales más largas (> 8 carbonos) proporcionaron una menor protección al siRNA, supuestamente porque una parte de sus cadenas laterales se desplazó a la superficie, y con algunas moléculas de siRNA expuestas hacia el exterior, haciéndolo más propenso a la degradación enzimática. No obstante, se requieren análisis adicionales para establecer esta premisa.

Por otro lado, las CSNPs modificados hidrofóticamente fueron, en general, no tóxicas para las células HeLa y RAW264.7, las primeras mostraron una respuesta dependiente de la dosis. En relación con esto, también se encontró que la toxicidad y la absorción celular son dependientes de las células. Se observó que las eficiencias de internalización celular y de transfección son mayores para las CSNP modificados hidrofóticamente, con eficiencias de eliminación de GFP ligeramente mejores, por ejemplo, para las CSNPs C8Mb en comparación con el control Lipofectamine 2000. Esta observación probablemente se originó a partir de la arquitectura particular de este tipo de nanopartículas, donde el siRNA se encontraba fuertemente empaquetado en sus núcleos. Sin embargo, en el caso de las CSNPs C12Mc, que tuvieron moléculas de siRNA adsorbido en las superficies, probablemente por efectos hidrofóuticos, impidieron su protección contra la degradación, como se corroboró por electroforesis en gel. Esta fenomenología será abordada y estudiada con mayor profundidad en trabajos futuros para elucidar por completo los mecanismos que promueven dichos comportamientos.

REFERENCIAS

- [1] Morris, K.V.; Chan, S.W.L. ; Jacobsen, S.E. ; Looney, D.J. Small Interfering RNA-Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells. *Science*. 2004, 305, 1289–1292.
- [2] Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* 2001, 411, 494–498.
- [3] Dykxhoorn, D.M.; Novina, C.D.; Sharp, P.A. Killing the Messenger: Short RNAs that Silence Gene Expression *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4, 457–467.
- [4] Leuschner P.J.F., Ameres S.L., Kueng S., Martinez J. Cleavage of the siRNA Passenger Strand during RISC Assembly in Human Cells. *EMBO Rep.* 2006, 7, 314-320.
- [5] Heidel, J.D.; Hu, S.; Liu, X.F.; Triche, T.J.; Davis, M.E. Lack of Interferon Response in Animals to Naked siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 1579–1582.
- [6] Sioud, M. On the Delivery of Small Interfering RNAs into Mammalian Cells. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2005, 2, 639–651.
- [7] Zhang, S.; Zhao, B.; Jiang, H.; Wang, B.; Ma, B. Cationic Lipids and Polymers Mediated Vectors for Delivery of siRNA. *J. Control. Release* 2007, 123, 1–10.
- [8] Kumar, L.D.; Clarke, A.R. Gene Manipulation Through the Use of Small Interfering RNA (siRNA): From In Vitro to In Vivo Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 87–100.
- [9] Liu, X.; Howard, K.A.; Dong, M.; Andersen, M.O.; Rahbek, U.L.; Johnsen, M.G.; Hansen, O.C.; Besenbacher, F.; Kjems, J. The Influence of Polymeric Properties on Chitosan/siRNA Nanoparticle Formulation and Gene Silencing. *Biomaterials* 2007, 28, 1280–1288.
- [10] Katas, H.; Alpar, H.O. Development and Characterisation of Chitosan NPs for siRNA Delivery. *J. Control. Release* 2006, 115, 216–225.

- [11] Howard, K.A.; Rahbek, U.L.; Liu, X.D.; Damgaard, C.K.; Glud, S.Z.; Andersen, M.O.; Hovgaard, M.B.; Schmitz, A.; Nyengaard, J.R.; Besenbacher, F.; Kjems. RNA Interference In Vitro and In Vivo Using a Chitosan/siRNA Nanoparticle System. *J. Mol. Ther.* 2006, 14, 476–484.
- [12] Li, L.; Hu, X.; Zhang, M.; Ma, S.; Yu, F.; Zhao, S.; Liu, N.; Wang, Z.; Wang, Y.; Guan, H.; Pan, X.; Gao, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Yang, Y.; Tang, X.; Li, M.; Liu, C.; Li, Z.; Mei, X. Dual Tumor-Targeting Nanocarrier System for siRNA Delivery Based on pRNA and Modified Chitosan. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2017, 8, 169-183.
- [13] Mao, S.; Sun, W.; Kissel, T. Chitosan-based Formulations for Delivery of DNA and siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, 62, 12-27.
- [14] Ragelle, H.; Vandermeulen, G.; Pr eat, V. Chitosan-based siRNA Delivery Systems. *J. Control. Release* 2013, 172, 207-218.
- [15] Zhang, J.; He, C.; Tang, C.; Yin, C. Ternary Polymeric Nanoparticles for Oral siRNA Delivery. *Pharm. Res.* 2013, 30, 1228-1239.
- [16] Varkouhi, A. K.; Verheul, R. J.; Schiffelers, R. M.; Lammers, T.; Storm, G.; Hennink, W. E. Gene Silencing Activity of siRNA Polyplexes Based on Thiolated N,N,N-trimethylated Chitosan. *Bioconjug. Chem.* 2010, 21, 2339-2346.
- [17] Lee, S.J.; Huh, M.S.; Lee, S.Y.; Min, S.; Lee, S.; Koo, H.; Chu, J.U.; Lee, K.E.; Jeon, H.; Choi, Y.; Choi, K.; Byun, Y.; Jeong, S.Y.; Park, K.; Kim, K.; Kwon, I.C. Tumor-homing Poly-siRNA/glycol Chitosan Self-cross-linked Nanoparticles for Systemic siRNA Delivery in Cancer Treatment. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 7203- 7207.
- [18] Malhotra, M.; Tomaro-Duchesneau, C.; Prakash, S. Synthesis of TAT Peptide-tagged PEGylated Chitosan Nanoparticles for siRNA Delivery Targeting Neurodegenerative Diseases. *Biomaterials* 2013, 34, 1270-1280.
- [19] Gu oiaia, A.; Schuster, L.; Margutti, S.; Laufer, S.; Schlosshauer, B.; Krastev R.; Stoll, D.; Hartmann, H. Fine-tuned PEGylation of Chitosan to Maintain Optimal siRNA-nanoplex Bioactivity. *Carbohydrate Polym.* 2016, 143, 25–34.

- [20] Luo, Y. ; Zhai, X.; Ma, C.; Sun, P.; Fu, Z.; Liu, W.; Xu, J. An Inhalable Beta(2)-Adrenoceptor Ligand-directed Guanidinylated Chitosan Carrier for Targeted Delivery of siRNA to Lung J. Control. Release 2012, 162, 28-36.
- [21] Liu, Z., Zhang, Z.; Zhou, C.; Jiao, Y. Hydrophobic Modifications of Cationic Polymers for Gene Delivery. Prog. Polym. Sci. 2010, 35, 1144–1162.
- [22] Liu, W.G.; Zhang, X.; Sun, S.J.; Sun, G.J.; Yao, K.D.; Liang, D.C.; Guo, G.; Zhang, J.Y. N-alkylated Chitosan as a Potential Nonviral Vector for Gene Transfection. Bioconjug. Chem. 2003, 14, 782–789.
- [23] Kuhn, P.S.; Levin, Y.; Barbosa, M.C. Charge Inversion in DNA-Amphiphile Complexes: Possible Application to Gene Therapy. Physica A 1999, 274, 8–18.
- [24] Douglas, K.L.; Piccirillo, C.A; Tabrizian, M. Cell Line-dependent Internalization Pathways and Intracellular Trafficking Determine Transfection Efficiency of Nanoparticle Vectors. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2008, 68, 676-687.
- [25] Robles, E.; Villar, E.; Alatorre-Meda, M.; Burboa, M.G.; Valdez, M.A.; Taboada, P.; Mosquera, V. Effects of the Hydrophobization on Chitosan-Insulin Nanoparticles Obtained by an Alkylation Reaction on Chitosan. J. Appl. Polym. Sci 2012, 129, 822–834.
- [26] Yalpani, M.; Hall, L. D. Some Chemical and Analytical Aspects of Polysaccharide Modifications. III. formation of Branched-Chain, Soluble Chitosan Derivatives. Macromolecules 1984, 17, 272-281.
- [27] Desbrieres, J.; Martinez, C.; Rinaudo, M. Hydrophobic derivatives of Chitosan: Charatcerization and Rheological Behavior. Int. J. Biol. Macromol. 1996, 19, 21-28.
- [28] Robles, E.; Juárez, J.; Burboa, M.; Gutiérrez, L.; Taboada, P.; Mosquera, V.; Valdez, M. Properties of Insulin–Chitosan Complexes Obtained by an Alkylation Reaction on Chitosan. J. Appl. Polym. Sci. 2014, 131, 39999.
- [29] Fernandez-Urrusuno, R.; Calvo, P.; Lopez, C. R.; Jato, J. L. V.; Alonso, M. J. Enhancement of Nasal Absorption of Insulin Using Chitosan Nanoparticles. Pharm. Res. 1999, 16, 1576-1581.

- [30] Provencher, S. W.; Stepanek, P. Global Analysis of Dynamic Light Scattering Autocorrelation Functions. Part. Syst. Charact. 1996, 13, 291-294.
- [31] Alatorre, M.; Taboada, P.; Krajewska, B.; Willemeit, M.; Deml, A.; Klosel, R.; Rodriguez, J. R. DNA-Poly(diallyldimethylammonium chloride) Complexation and Transfection Efficiency. J. Phys. Chem. B 2010, 114, 9356-9366.
- [32] Alatorre, M.; Taboada, P.; Hartl, F.; Wagner, T.; Freis, M.; Rodríguez, J. R. The Influence of Chitosan Valence on the Complexation and Transfection of DNA: The Weaker the DNA-chitosan Binding the Higher the Transfection Efficiency. Colloids Surf. B: Biointerfaces 2011, 82, 54-62.
- [33] Lv, J.S.; Jing, J.L.; Zhao, J.; Zhao, B.X.; Miao, J.Y. Highly Selective and Sensitive pH-Responsive Fluorescent Probe in Living HeLa and HUVEC Cells. Sensors Actuators B 2013, 177, 956-963.
- [34] Dou, J.; Zhang, H.; Liu, X.; Zhang, M.; Zhai, G. Preparation and Evaluation In Vitro and In Vivo of Docetaxel-loaded Mixed Micelles for Oral Administration. Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2014, 114, 20-27.
- [35] Rinaudo, M.; Le Dung, P.; Gey, C.; Milas, M. Substituent distribution on O,N-carboxymethylchitosans by ¹H and ¹³C NMR. Int. J. Biol. Macromol. 1992, 14, 122-128.
- [36] Liu X, Howard K, Kjems J. The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. Biomaterials 2007;28: 1280-8.
- [37] Vårum, K.M.; Anthonsen, M.W.; Grasdalen, H.; Smisrød, O. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy. Carbohydr. Res. 1991, 211, 17-23.
- [38] Chen, M.; Gao, S.; Dong, M.; Song, J.; Yang, C.; Howard, K.A.; Kjems, J.; Besenbacher, F. Chitosan/siRNA Nanoparticles Encapsulated in PLGA Nanofibers for siRNA Delivery. ACS Nano 2012, 6, 4835-4844.

- [39] Chen, M.; Gao, S.; Dong, M.; Song, J.; Yang, C.; Howard, K.A.; Kjems, J.; Besenbacher, F. Chitosan/siRNA Nanoparticles Encapsulated in PLGA Nanofibers for siRNA Delivery. *ACS Nano* 2012, 6, 4835–4844.
- [40] Malhotra, M.; Tomaro-Duchesneau, C.; Saha, S.; Kahouli, I.; Prakash, S. Development and Characterization of Chitosan-PEG-TAT Nanoparticles for the Intracellular Delivery of siRNA. *Int. J. Nanomed.* 2013, 8, 2041-2052.
- [41] Jean, M.; Alameh, M.; De Jesus, D.; Thibault, M.; Lavertu, M.; Darras, V.; Nelea, M.; Buschmann, M.D.; Merzouki, A. Chitosan-Based Therapeutic Nanoparticles for Combination Gene Therapy and Gene Silencing of In Vitro Cell Lines Relevant to Type 2 Diabetes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012, 45, 138–149.
- [42] Taboada, P.; Fernández, Y.; Mosquera, V. Interactions of Two Amphiphilic Penicillins with Myoglobin in Aqueous Buffered Solutions: A Thermodynamic and Spectroscopy Study. *Biomacromolecules.* 2004, 5, 2201-2211.
- [43] Castro, E.; Taboada, P.; Mosquera, V. Behavior of a Styrene Oxide-Ethylene Oxide Diblock Copolymer/Surfactant System: A Thermodynamic and Spectroscopy Study. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 5592-5599.
- [44] Dam, T.K.; Gerken, T.A.; Cavada, B.S.; Nascimento, K.S.; Moura, T.R.; Brewer, C.F. Binding Studies of α -GalNAc-Specific Lectins to the α -GalNAc (Tn-Antigen) Form of Porcine Submaxillary Mucin and its Smaller Fragments *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 28256-28263.
- [45] Zhang, J.; Chen, X.G.; Li, Y.; Liu, C.S. Self-Assembled Nanoparticles Based on Hydrophobically Modified Chitosan as Carriers for Doxorubicin. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2007, 3, 258-265;
- [46] Sonia, T.A.; Rekha, M.R.; Sharma, C.P. Bioadhesive Hydrophobic Chitosan Microparticles for Oral Delivery of Insulin: In Vitro Characterization and In vivo Uptake Studies. *J. Appl. Polym. Sci.* 2011, 119, 2902-2910.

- [47] Alatorre-Meda, M.; Taboada, P.; Sabín, J.; Krajewska, B.; Varela, L.M.; Rodríguez, J.R. DNA–Chitosan Complexation: A Dynamic Light Scattering Study. *Colloids Surf. A* 2009, 339(1–3), 145–152.
- [48] Elsayed, A.; Al-Remawi, M.; Farouk, A.; Badwan, A. Insulin-Chitosan Polyelectrolyte Nanocomplexes: Preparation, Characterization and Stabilization of Insulin. *Sudan JMS*. 2010, 5, 99-110.
- [49] Sadeghi, A.M.; Dorkoosh, F.A.; Avadi, M.R.; Saadat, P.; Rafiee-Tehrani, M.; Junginger, H.E. Preparation, Characterization and Antibacterial Activities of Chitosan, N-trimethyl Chitosan (TMC) and N-diethylmethyl Chitosan (DEMC) Nanoparticles Loaded with Insulin Using Both the Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation Methods. *Int. J. Pharm.* 2008, 355, 299-306.
- [50] Al-Qadi, S.; Alatorre-Meda, M.; Martin-Pastor, M.; Taboada, P.; Remuñán-López, C. the role of Hyaluronic Acid Inclusion on the energetics of Encapsulation and Release of a Protein Molecule from Chitosan-Based Nanoparticles. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2016, 141, 223-232.
- [51]. Zengshuan, M.; Hock-Hin, Y.; Lee-Yong, L. Formulation pH Modulates the Interaction of Insulin with Chitosan Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 2002, 91, 1396-1404.
- [52] Morris, G.A.; Castile, J.; Smith, A.; Adams, G.G.; Harding, S.E. The Effect of Prolonged Storage at Different Temperatures on the Particle Size Distribution of Tripolyphosphate (TPP)–Chitosan Nanoparticles. *Carbohydrate Polym.* 2011, 84, 1430–1434.
- [53] Ehrenberg, M.S.; Friedman, A.E.; Finkelstrin, J.N.; Oberdörster, G.; McGrath, J.L. The Influence of Protein Adsorption on Nanoparticle Association with Cultured Endothelial Cells. *Biomaterials* 2009, 30, 603-610.
- [54] Walczyk, D.; Bombelli, F.B.; Monopoli, M.P.; Lynch, I.; Dawson, K. A. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132 (16), 5761–5768.
- [55] Israelachvili, J.; Pashley, R. Protein—Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide: II. Effect of Protein Size. *J. Colloid Interface Sci* 1991, 142, 159-166.

- [56] Raja, A.G.; Katas, H.; Wen, T.J. Stability, Intracellular Delivery, and Release of siRNA from Chitosan Nanoparticles Using Different Cross-Linkers. *PLoS ONE*. 2015, 10, e0128963.
- [57] Shen, J.W.; Li, J.; Zhao, Z.; Zhang, L.; Peng G.; Liang, L. Molecular Dynamics Study on the Mechanism of Polynucleotide Encapsulation by Chitosan. *Sci. Rep.* 2017, 7, 5050.
- [58] Kim, T.-H.; Jiang, H.-L.; Jere, D.; Park, I.-K.; Cho, M.-H.; Nah, J.-W.; Choi, Y.J.; Cho, C.-S. Chemical Modification of Chitosan as A Gene Carrier In Vitro and In Vivo. *Prog. Pol. Sci.* 2007, 32, 726–753.
- [59] Yang, C.H.; Hon, M.H. The Effect of the Molecular Weight of Chitosan Nanoparticles and Its Application on Drug Delivery *J. Microchem.* 2009, 92, 87-91.
- [60] Hou, Y.; Hu, J.; Park, H.; Lee, M. Chitosan Based Nanoparticles as a Sustained Protein Release Carrier for Tissue Engineering Applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2012, 100, 939-947.
- [61] Li, F.; Liu, W.G.; Yao, K. De. Preparation of Oxidized Glucose-Crosslinked N-Alkylated Chitosan Membrane and In Vitro Studies of pH-Sensitive Drug Delivery Behaviour. *Biomaterials* 2002, 23, 343–347.
- [62] Kagan, V.E.; Tyurina, Y.Y.; Tyurin, V.A.; Konduru, N.V.; Potapovich, A.I.; Osipov, A.N.; Kisin, E.R.; Schwegler-Berry, D.; Mercer, R.; Castranova V.; Shvedova, A.A. Direct and Indirect Effects of Single Walled Carbon Nanotubes on RAW 264.7 Macrophages: Role of Iron. *Toxicol. Lett.* 2006, 165, 88-100.
- [63] Xia, T.; Kovoichich, M.; Liong, M.; Mädler, L.; Gilbert, B.; Shi, H.; Yeh, J.I.; Zink, J.I.; Nel, A.E. Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano* 2008, 2, 2121-2134.
- [64] Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhonde, R.R.; Sastry, M. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir* 2005, 21, 10644–10654 .

- [65] Shilakari Asthana, G.; Asthana, A.; Kohli, D.V.; Vyas, S. P. Mannosylated Chitosan Nanoparticles for Delivery of Antisense Oligonucleotides for Macrophage Targeting. *BioMed. Res. Int.* 2014, 2014, 1–17.
- [66] Moghimi, S. M.; Symonds, P.; Murray, J. C.; Hunter, A. C.; Debska, G.; Szewczyk, A. A Two-Stage Poly(Ethylenimine)-Mediated Cytotoxicity: Implications for Gene Transfer/Therapy. *Mol. Ther.* 2005, 11, 990–995.
- [67] Gao, S.; Chen, J.; Dong, L.; Ding, Z.; Yang, Y.; Zhang, J. Targeting Delivery of Oligonucleotide and Plasmid DNA to Hepatocyte via Galactosylated Chitosan Vector. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005, 60, 327– 334.
- [68] Sajid, M.; Ilyas, M.; Basheer, C.; Tariq, M.; Daud, M.; Baig, N.; Shehzad, F. Bisphenol A, Nonylphenols, Benzophenones, and Benzotriazoles in Soils, Groundwater, Surface Water, Sediments, and Food: A Review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015, 22, 4122-4143.
- [69] Fröhlich E. The Role of Surface Charge in Cellular Uptake and Cytotoxicity of Medical Nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 2012, 7, 5577-5591.
- [70] Lameijer, M.A.; Tang, J.; Nahrendorf, M.; Beelen, R.H.J.; Mulder, W.J.M. Monocytes and Macrophages as Nanomedicinal Targets for Improved Diagnosis and Treatment of Disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2013, 13, 567-580.
- [71] Kim, Y.K.; Jiang, H.L.; Guo, D.D.; Choi, Y.J.; Cho, M.H.; Akaike, T.; Cho, C.S. In Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics. Bruno Sarmiento Ed. Wiley & Sons 2012, Chapter 15, pp-255-273.
- [72] Kurisawa, M.; Yokoyama, M.; Okano, T. Transfection Efficiency Increases by Incorporating Hydrophobic Monomer Units into Polymeric Gene Carriers. *J. Control. Release* 2000, 68, 1–8.
- [73] Chae, S.Y.; Son, S.; Lee, M.; Jang, M.K.; Nah, J.W. Deoxycholic Acid Conjugated Chitosan Oligosaccharide Nanoparticles for Efficient Gene Carrier. *J. Control. Release* 2005, 109, 330–344.

[74] Hu, F.; Zhao, M.; Yuan, H.; You, J.; Du, Y.; Zeng, S. Novel Chitosan Oligosaccharidestearic Acid Micelles for Gene Delivery: Properties and In Vitro Transfection Studies. *Int. J. Pharm.* 2006, 315, 158–166.

[75] Nouri, F.; Sadeghpour, H.; Heidari, R.; Dehshahri, A. Preparation, Characterization, and Transfection Efficiency of Low Molecular Weight Polyethylenimine-Based Nanoparticles for Delivery of the Plasmid Encoding CD200 Gene. *Int. J. Nanomed.* 2017, 12, 5557-5569.

[76] Nunthanid, J.; Ruktanonchai, U. Chitosan-Mediated siRNA Delivery In Vitro: Effect of Polymer Molecular Weight, Concentration and Salt Forms. *AAPS PharmSciTech* 2010, 11, 64–72.

CAPÍTULO IV.

Nanopartículas de PLGA

INTRODUCCIÓN

El sistema cardiovascular es responsable de la circulación de la sangre por todo el cuerpo para proporcionarle oxígeno y nutrientes, e incluye un complejo grupo de órganos (Fig. 1) y tejidos que, con el paso del tiempo, y con la intervención de múltiples variables (físicas, químicas, medio ambientales, genéticas), puede llegar a desarrollar diversos síndromes y enfermedades. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo (Fig. 2), alcanzando alrededor de 17,1 millones de vidas al año [3]. Las ECV son un grupo de trastornos del corazón y los vasos sanguíneos que incluyen:

- Enfermedad coronaria – complicaciones de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco.
- Enfermedad cerebrovascular - complicaciones de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- La enfermedad arterial periférica - complicaciones de los vasos sanguíneos que irrigan los brazos y las piernas.
- Cardiopatía reumática - daño del músculo del corazón y de sus válvulas en casos de fiebre reumática causada por bacterias estreptococos.
- Cardiopatías congénitas – malformaciones de la estructura del corazón desde el nacimiento.
- Trombosis venosa profunda y embolia pulmonar – formación de coágulos de sangre en las venas de las piernas, que se pueden desprender y desplazar al corazón y los pulmones.

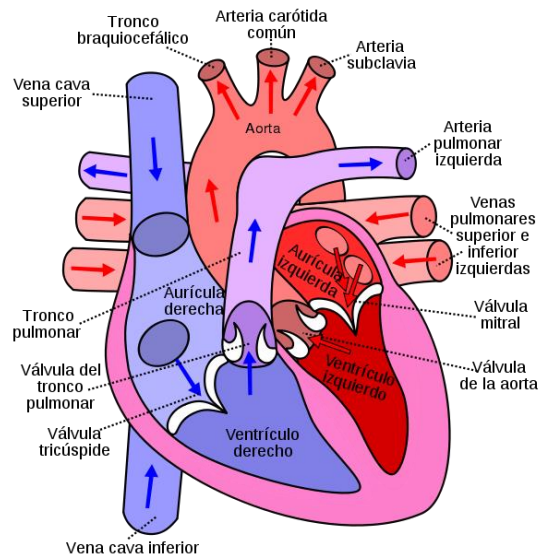


Figura 1. Esquema representativo de la anatomía del corazón humano donde se muestran las principales cámaras, válvulas, venas y arterias del mismo.

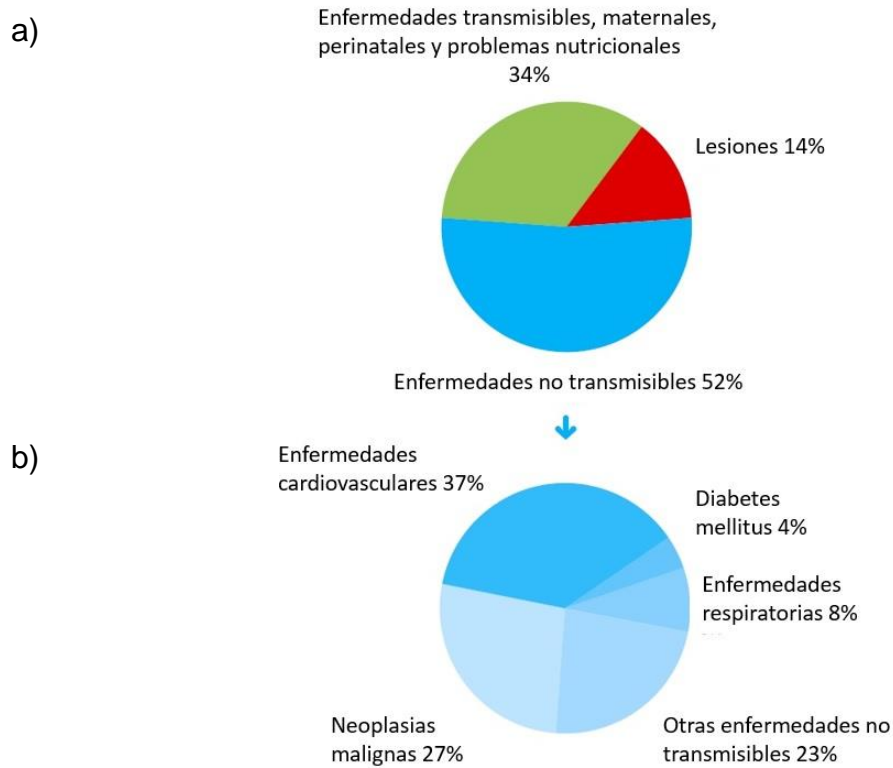


Figura 2. A) Datos estadísticos de las principales causas de muerte a nivel mundial donde se muestra que las enfermedades no transmisibles son la mayor causa de muerte. B) Desglose de las principales enfermedades no transmisibles y sus porcentajes.

México sufre también los cambios epidemiológicos actuales. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son, en su conjunto, la primera causa de muerte en nuestro país. Entre ellas, la cardiopatía isquémica, que se manifiesta sobre todo por el infarto agudo de miocardio, y cuyo impacto es mayor al de las enfermedades infecciosas y al cáncer [3], ocupa un lugar preponderante, y su prevalencia se extiende a todas las regiones y estratos sociales de la población mexicana. El infarto agudo de miocardio se define como la muerte de un segmento mayor o menor del corazón, ocasionado por un desequilibrio entre la demanda y el abastecimiento de oxígeno requerido por el músculo cardíaco como consecuencia de una obstrucción transitoria o definitiva de las arterias coronarias.

El síndrome coronario agudo comprende un conjunto de entidades nosológicas que representan distintos estadios de un proceso fisiopatológico único: la isquemia miocárdica aguda, derivada en general de la aterosclerosis coronaria, y que se puede complicar adicionalmente con fenómenos trombocíticos. Por ejemplo, una placa de ateroma, previamente formada en un vaso coronario, puede activar los procesos de adhesión, activación y agregación plaquetaria, desencadenando la cascada de la coagulación y conducir a la formación de un ateroma (Figura 3), que provocará la obstrucción del flujo sanguíneo en distintos grados [4, 5].

La aterosclerosis humana es un proceso patológico de origen multifactorial, con participación multisistémica y de extraordinaria complejidad, y que se comporta como un desorden inflamatorio crónico que involucra al sistema vascular, inmunológico, endocrino y metabólico que termina en manifestaciones locales y sistémicas.

En esencia, la aterosclerosis se compone de dos fenómenos interrelacionados:

1.- Aterosis: acumulación focal de lípidos intracelulares y extracelulares, formación de células espumosas y reacción inflamatoria.

2.- Esclerosis: endurecimiento cicatrizal de la pared arterial, caracterizado por el aumento del número de miocitos, distrofia de la matriz extracelular y, más tardíamente, calcificación, necrobiosis y mayor infiltración inflamatoria.

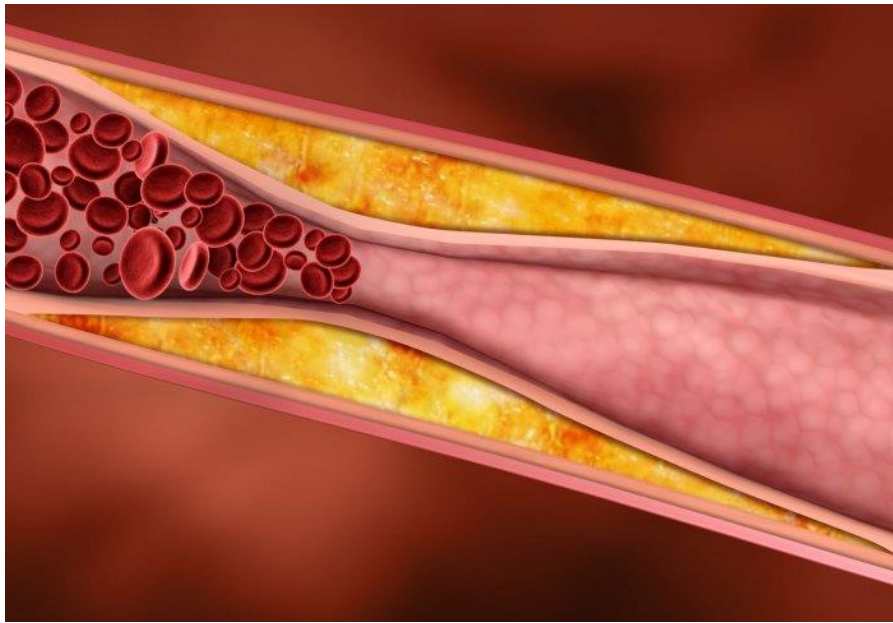


Figura 3. Representación de un ateroma.

En las primeras etapas de la aterosclerosis, se producen cambios considerables en la estructura y en la bioquímica del endotelio, dando lugar al aumento de la permeabilidad endotelial y al aumento del nivel de expresión de las moléculas de adhesión. Estos cambios inducen la acumulación de lipoproteínas de baja densidad y a la activación de los macrófagos, seguido por la infiltración y adhesión de proteínas extracelulares, células apoptóticas y la producción de radicales libres, que conducen a la formación de placas de aterosclerosis y que, posteriormente, pueden llevar a una trombosis y/o isquemia [6].

Actualmente, la aterosclerosis se diagnostica en etapas avanzadas. El diagnóstico se puede realizar directamente midiendo el grado de estenosis, o indirectamente, mediante la determinación del efecto de la estenosis arterial en la perfusión de los órganos.

La combinación de los factores antes mencionados, en su mayoría, pueden derivar en un infarto de miocardio, y los mismos pueden ser tratados con la finalidad de mejorar la calidad y expectativa de vida de los pacientes.

TRATAMIENTOS PARA INFARTOS DE MIOCARDIO

Al día de hoy, las terapias que se implementan para tratar el infarto de miocardio consisten en el restablecimiento de la perfusión sanguínea al tejido coronario que carece de sangre oxigenada. Se reconocen dos tipos de tratamientos: la reperfusión farmacológica y la reperfusión mecánica.

4.1.1 Reperfusión farmacológica.

Consiste en la administración de medicamentos trombolíticos y antitrombóticos, debido a la participación de la trombina y plaquetas. Los fármacos antitrombóticos contienen heparina no fraccionada (HNF) o heparina de bajo peso molecular (HBPM, enoxaparina) y compuestos antiplaquetarios, básicamente aspirina y clopidogrel [7].

Los medicamentos disponibles actualmente para la aterosclerosis están diseñados para aliviar la hipertensión y la hiperlipidemia, o para controlar la hemostasis previniendo complicaciones tromboticas. Sin embargo, no suprimen directamente los mecanismos que conducen a la progresión de procesos inflamatorios de la aterosclerosis [8].

4.1.2 Reperfusión mecánica.

Implica una intervención quirúrgica, conocida como angioplastia primaria (ACTP-P). El tratamiento consiste en introducir un catéter con un “balón inflable” (Stent) para dilatar la arteria ocluida y, así, restablecer el flujo sanguíneo obstruido. Actualmente, la reperfusión es, sin duda, el método estándar de elección. La tasa de éxito es elevada, la efectividad de la reperfusión se puede evaluar y determinar en el mismo procedimiento, permite conocer con exactitud la anatomía coronaria del paciente, el efecto es sostenido, y se asocia con menor isquemia residual. Sin embargo, estos beneficios conllevan también ciertas desventajas como una menor disponibilidad, es un método invasivo, y conlleva un coste bastante más elevado y la necesidad de personal médico y paramédico altamente especializado [9].

Uno de los principales problemas en el tratamiento actual de las enfermedades cardiovasculares es la incapacidad del miocardio de autoregenerarse, es decir, las terapias actuales no son capaces de restaurar la función del corazón después de un

infarto de miocardio. Por ello, con el paso del tiempo pueden sobrevenir complicaciones y nuevos infartos que comprometen el funcionamiento del corazón y derivan en un fallo sistémico y, posteriormente, la muerte.

A pesar de que los procedimientos médicos se han mejorado considerablemente en los últimos años, sus resultados terapéuticos generales no son completamente satisfactorios debido, principalmente, a que la intervención médica se lleva a cabo cuando la enfermedad ya está avanzada, o incluso después de que se ha manifestado en eventos cardiovasculares (tales como el infarto de miocardio o un ictus). Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar procedimientos de diagnóstico sensibles y, preferentemente, no invasivos que permitan la detección de estas enfermedades en su etapa temprana de desarrollo, además de la búsqueda de nuevos fármacos y métodos terapéuticos que permitan su abordaje terapéutico [10].

APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA

El avance de la nanotecnología aplicada ha impactado en diversas áreas de la actividad humana, incluyendo la medicina. La aplicación de la nanotecnología en la medicina dio lugar a la aparición de la denominada nanomedicina, que está revolucionando los campos del diagnóstico y la terapia biomédicas.

La nanomedicina utiliza materiales y dispositivos de dimensiones nanométricas, preparados mediante el control y manipulación de los materiales a nivel molecular, dichos materiales son denominados nanopartículas. Las propiedades físicas y químicas de tales nanopartículas son muy diferentes de sus parientes macroscópicos, y se pueden ajustar a necesidades específicas para un propósito determinado [11].

Las nanopartículas más populares utilizadas en la nanomedicina tienen propiedades electrónicas, ópticas, magnéticas y biológicas ajustables. Las nanopartículas pueden ser fabricadas con diversas composiciones químicas y características encunanto a su tamaño y forma. Pueden prepararse a partir de diversos materiales tales como metales, óxidos metálicos, silicio, polímeros naturales y sintéticos, materiales a base de carbono, lípidos y/o biomoléculas (Figura 4). Las estructuras de las nanopartículas pueden ser huecas,

porosas o sólidas y con diferentes morfologías tales como esferas, cilindros, tubos o plaquetas [12].

En trabajos recientes [14-37] se han desarrollado nanoplateformas susceptibles de ser empleadas potencialmente en ingeniería de tejidos basándose en dos factores clave: las células y biomateriales para la regeneración del miocardio infartado.



Figura 4. Diferentes tipos de nanopartículas utilizadas en el tratamiento de enfermedades.

El objetivo de la nanotecnología aplicada a la ingeniería de tejidos debe enfocarse en el reclutamiento de células, la remodelación celular y, finalmente, la regeneración del tejido afectado mediante la producción de músculos de corazón biocompatibles con propiedades morfológicas, mecánicas y funcionales comparables al miocardio innato.

En la actualidad, las estrategias experimentales desarrolladas para la regeneración de tejido cardíaco infartado están asociadas a cubrir cinco grandes objetivos [13]:

- 1) Cardioprotección.
- 2) Regulación de la inflamación.
- 3) Remodelación de la matriz extracelular.
- 4) Angiogénesis.
- 5) Generación de cardiomiocitos.

Para lograr tales objetivos, las estrategias de ingeniería de tejidos incluyen el desarrollo de sustitutos de tejidos cardiovasculares funcionales, el trasplante de células asistido por biomateriales para mejorar la retención y la función celular, además de implementar

estrategias acelulares para conferir soporte mecánico a la matriz extracelular para reemplazar el músculo defectuoso del corazón, y la administración de fármacos mediante el uso de nanoplataformas de cara a mejorar la auto-reparación y la inducción de regeneración tisular endógena.

ANTECEDENTES

4.2.1 Enfoque con factores de crecimiento para enfermedades cardiovasculares.

Formiga y colaboradores demostraron la eficacia terapéutica de la administración de factores de crecimiento para promover la regeneración del tejido cardiaco mediante el uso de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF1) y neuregulina (NRG1) encapsulados en micropartículas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

Mediante esta metodología se logró incrementar la función miocárdica global del tejido isquémico y tejido remodelado post-infarto, promoviendo la angiogénesis, arteriogénesis, y la proliferación de miocarditos y el reclutamiento de células madre de médula ósea para la regeneración de lesiones de infarto de miocardio [14].

Por otra parte, Simón-Yarza y colaboradores lograron encapsular el factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF) en micropartículas de PLGA recubiertas con polietilén glicol (PEG), provocando la reducción de la fagocitosis de las partículas por parte de los macrófagos, una de las principales barreras biológicas a las que hay que hacer frente cuando se administra por vía intravenosa nanopartículas, células madre y/o agentes terapéuticos.

De acuerdo a los resultados presentados por estos investigadores, la funcionalización de las partículas de PLGA con PEG incrementa la capacidad de encapsulación, reduce el tamaño de las partículas y su potencial z, característica deseada para una mejor interacción entre las partículas y las células endoteliales. De igual manera, el proceso de fabricación y funcionalización de las partículas mantiene intacta la actividad terapéutica del VEGF, permitiendo la angiogénesis y reduciendo la remodelación ventricular, que impide el correcto funcionamiento del tejido cardiaco [15].

En un estudio similar, Chang y colaboradores diseñaron un nanovector a base de PLGA para la administración del factor de crecimiento insulínico (IGF-1). La liberación del agente bioactivo desde el nanovector se mantuvo por un periodo prolongado, lo que es crucial para regular la función del miocardio. Adicionalmente, el IGF-1 tiene la capacidad de inducir la fosforilación Akt, preservar la función de los cardiomiocitos, prevenir la remodelación ventricular, y reducir el tamaño del área de infarto [16].

4.2.2 Enfoque con hidrogeles de alginato para enfermedades cardiovasculares.

Las propiedades físicas, químicas y biológicas del alginato, biomaterial extraído de las algas marinas, permite su potencial uso en la ingeniería de tejido cardíaco para la regeneración de tejido dañado. Las características más atractivas del alginato incluyen su biocompatibilidad, las condiciones sencillas de gelificación y la facilidad de generar modificaciones químicas para preparar derivados de alginato con propiedades novedosas.

Los biomateriales a base de alginato ya han sido utilizados previamente para aplicaciones biomédicas, tales como la entrega de células madre en tejidos, diseño de soportes celulares, así como también para la formación de tejido cardíaco funcional y diseño bio-inspirado de sistemas para la liberación controlada de moléculas bioactivas.

Por ejemplo, Banquete y colaboradores desarrollaron microcápsulas de albúmina y alginato para la encapsulación y liberación controlada del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La actividad de las microcápsulas se determinó en un modelo de rata a las que se indujo un infarto de miocardio, y a las que inmediatamente después de este se les administró una inyección intramiocárdica de las microcápsulas cargadas. Estos factores estimulan la angiogénesis y la arteriogénesis, previniendo la hipertrofia y fibrosis cardíaca como se determinó por inmunohistoquímica. Los resultados demostraron que la perfusión cardíaca mejoró, disminuyendo la remodelación cardíaca adversa, y restableciendo la función ventricular izquierda después de 3 meses de la administración del tratamiento [17].

El polímero de alginato no es biodegradable en los mamíferos [18]. Sin embargo, los hidrogeles de alginato reticulados con calcio con el tiempo se erosionan fácilmente debido al intercambio de iones de calcio por iones de sodio en el medio fisiológico, lo que conduce a la disolución de los hidrogeles de alginato [19]. Por lo tanto, para aplicaciones terapéuticas de materiales compuestos por alginato, es importante considerar que el tamaño del peso molecular del alginato a emplear sea inferior a 50 kDa, que corresponde al umbral de tamaño para la depuración renal eficiente.

Así, Hao y colaboradores utilizaron hidrogeles de alginato parcialmente oxidado, con las características antes mencionadas, para la administración secuencial del factor de

crecimiento vasculo-endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) en el miocardio infartado. Los factores de crecimiento adsorbidos en la matriz de alginato son liberados de manera secuencial gracias a las diferentes tasas de degradación de los alginatos parcialmente oxidados que constituyen el hidrogel. Posteriormente, se indujo el infarto en ratas de laboratorio; y después de una semana, se inyectaron los hidrogeles de alginato cargados con VEGF y PDGF-BB en el tejido cardíaco a lo largo de la frontera del infarto. Cuatro semanas después de la inyección, la liberación de ambos factores de crecimiento condujo a una mayor formación de los vasos α -SMA-positivos (maduros) [20].

Por otra parte, Ruvinov y colaboradores desarrollaron una plataforma a base de alginatos para la administración de los factores de crecimiento IGF-1 (para favorecer la supervivencia celular), SDF-1 (para promover la migración celular), y el factor VEGF (para promover la angiogénesis). Estos factores en conjunción con células cardíacas se emplearon para la fabricación de parches pre-vascularizados e implantables en tejido cicatrizal de ratones con infarto cardíaco. Cuatro semanas después de la implantación, los parches se encontraban completamente integrados en el tejido miocárdico del huésped y mostraban cicatrices de menor tamaño que las observadas en ratones con tejido miocárdico sin tratar. Así mismo, el tejido con los implantes de parches de alginato mostraba una mayor amplitud de señal eléctrica en el área de la cicatriz, en comparación con los tejidos infartados no tratados, lo que indicaba una mejor excitabilidad y/o conectividad eléctrica entre el tejido cicatrizal y el miocardio sano. Adicionalmente, se observó que los parches de alginato preservaban la función cardíaca y prevenían la dilatación ventricular y la remodelación ventricular [22].

En una aproximación con finalidades terapéuticas, Gomez-Mauricio y colaboradores desarrollaron microcápsulas de alginato semipermeables cargadas con óxido de hierro súperparamagnético (SPION), que proporcionan una protección mecánica e inmunológica a células madres derivadas de tejido adiposo (ASC's), al mismo tiempo que mantiene el microambiente celular para que las células desarrollen su capacidad terapéutica como son: i) el restablecimiento de la función cardíaca (atribuida a la liberación de factores parácrinos), ii) la mejora de la neovascularización, iii) el

remodelado ventricular, y iv) la proliferación celular. Adicionalmente, las SPIONs permiten rastrear la migración de las células inyectadas en experimentos *in vivo* mediante imágenes de resonancia magnética nuclear (MRI). Después de 21 días de la inyección de las cápsulas magnéticas de alginato aún se podía observar la señal de MRI proveniente de las SPIONs, lo que demostraba una mejora en la captación celular y la retención celular en el miocardio [23].

4.2.3 Enfoque con óxidos de hierro súperparamagnéticos para enfermedades cardiovasculares.

Los agentes de contraste a base de óxidos de hierro súperparamagnéticos (SPIONs) pueden proporcionar información importante para el diagnóstico y evaluación de las enfermedades inflamatorias cardíacas.

Shevtsov y colaboradores analizaron nanopartículas conjugadas con proteína de choque térmico recombinante de 70 kDa (Hsp70-SPION) para la detección del infarto agudo de miocardio mediante resonancia magnética. Los experimentos celulares demostraron un aumento de la captación mediada de Hsp70-SPIONs por receptores de CD40 en comparación con SPIONs no conjugadas. Después de la inducción de un infarto agudo en ratas, mediante ligadura de la arteria descendente anterior izquierda, las SPIONs no conjugadas y conjugadas (Hsp70-SPION) se inyectaron por vía intravenosa 4 días después. Los animales se sometieron a MRI secuencial, que mostró la presencia de las nanopartículas en la zona infartada. Los análisis de la biodistribución de los conjugados Hsp70-SPION se hicieron con el método a la respuesta magnética no lineal, que indicó la acumulación preferencial de los mismos en el tejido del corazón, de acuerdo con los análisis histológicos. Este estudio demostró que un infarto agudo puede ser monitorizado, pues, por MRI usando conjugados de SPIONs funcionalizados-Hsp70 [24].

Por otra parte, se ha demostrado el potencial terapéutico de los trasplantes de células madres embrionarias (ESC) en modelo animal con infarto de miocardio de forma consistente. El desarrollo del marcaje con SPIONs y la imagen por MRI se han utilizado cada vez más para realizar un seguimiento de la migración de las células trasplantadas

in vivo. Sin embargo, el impacto del marcaje con SPIONs en el fenotipo celular y capacidad de diferenciación cardíaca de células madre embrionarias no está claro.

Au y colaboradores demostraron que las células madre embrionarias marcadas con SPIONs, en comparación con sus homólogos no marcados, tenían una capacidad cardiogénica similar, mientras que el marcaje con SPIONs no afectó a la regulación de los iones de calcio de los cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias. Además, el trasplante de células madre embrionarias marcadas con SPIONs a través de su inyección directa en el tejido con infarto de miocardio resultó en una mejora significativa en la función del tejido cardíaco.

Estos resultados demostraron, pues, la viabilidad de la monitorización utilizando el etiquetado con SPIONs de células madre de embriones *in vivo* y la resonancia magnética cardíaca, sin afectar el potencial de diferenciación cardíaca y las propiedades funcionales de las células madre embrionarias con la finalidad de reparar el tejido miocárdico dañado [25].

4.2.4 Direccionamiento de nanopartículas mediante el uso de péptidos y anticuerpos.

La modificación de partículas de óxido de hierro con diversos ligandos moleculares puede aumentar la especificidad y el potencial de diagnóstico de los conjugados de los que forman parte. Diversos estudios han demostrado que la funcionalización de las nanopartículas con diferentes ligandos, incluyendo péptidos dirigidos hacia la molécula adhesión vascular celular (VCAM), fragmentos del anticuerpo de selectina E humana, y los anticuerpos monoclonales anti-P-selectina, por ejemplo, hacen más eficiente la detección de patologías cardiovasculares debido a la sobre expresión de la proteína selectina en las células formadoras de la placa aterosclerótica [26].

La dirección de fármacos a través del endotelio vascular mediante el uso de nanopartículas funcionalizadas con la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) es una estrategia que se está empleando actualmente para su acumulación eficaz con fines terapéuticos en tejidos inflamados, así como agentes de contraste en la formación de

imágenes por resonancia magnética o imágenes de infrarrojo cercano tanto en cultivos celulares como en modelos animales [27].

Así, por ejemplo, Lee y colaboradores fabricaron nanopartículas de ácido hialurónico como potenciales transportadores de agentes de contraste para MRI y agentes terapéuticos para el tratamiento de la aterosclerosis. Los ensayos *in vitro* de captación celular revelaron que las nanopartículas fueron adsorbidas de manera selectiva por las células que sobreexpresaban receptores de estabilina 2 y CD44.

Cuando se utilizaron nanopartículas marcadas con el fluoróforo Cy5.5 en ratones deficientes en apolipoproteína E (ApoE) se observaron fuertes señales fluorescentes en la lesión aterosclerótica, lugar donde se sobreexpresan los marcadores de estabilina 2 y CD44. Estos resultados confirman que las funcionalizaciones que pueden llevarse a cabo en materiales nanoestructurados para un direccionamiento eficaz y altamente específico mediante el uso de receptores de membrana y anticuerpos [28].

4.2.5 Enfoque con nanopartículas de polímeros cargadas con fármacos para enfermedades cardiovasculares.

Actualmente, para el tratamiento farmacológico de enfermedades cardiovasculares se distinguen dos grupos de fármacos: Los fármacos anti-trombolíticos, que son utilizados para prevenir la formación de coágulos o para disolver los ya existentes, y los fármacos anti-proliferativos, que se usan para prevenir la migración y proliferación anómala de células del músculo liso vascular.

Los fármacos anti-proliferativos han recibido una mayor atención para su liberación controlada y localizada encontrándose, entre ellos, una variedad de agentes antiinflamatorios (simvastatina, dexometasona) y anticancerígenos (zotarolimus, paclitaxel, everolimus) [29].

Estudios recientes han analizado el papel de nanovehículos poliméricos para mejorar el efecto terapéutico de múltiples fármacos en el tratamiento de la arterioesclerosis. Un sistema prometedor es el NK911, que está compuesto de copolímeros auto ensamblados de polietilenglicol (PEG) y doxorubicina (DOX) conjugados con ácido poliaspártico, produciendo nanovehículos que rondan los 40 nm de diámetro. El sistema NK911 ha

sido investigado para su uso como vector sanguíneo con buenos resultados iniciales para su acumulación en tumores [29].

Además, las nanopartículas NK911 se han propuesto como una alternativa en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, NK911 inhibió efectivamente la proliferación de células de músculo liso vascular y el estrechamiento de los vasos sanguíneos sin incrementar la apoptosis celular en un modelo murino con lesión de balón [30].

El éxito del sistema NK911 se debe en gran medida por la acumulación pasiva de las nanopartículas gracias al efecto del aumento de la permeabilidad y retención mejorada (EPR, de sus siglas en inglés). Resultados como estos resaltan pues el potencial de las nanopartículas poliméricas para direccionar de manera pasiva la liberación de fármacos a un área específica dañada por accidentes vasculares y ateroscleróticos.

Por otra parte, Chan y colaboradores conjugaron paclitaxel (PTX) con ácido poli-láctico, lípidos de membrana y poli-etilén glicol para formar nanopartículas, que posteriormente se funcionalizaron con un péptido de reconocimiento de células vasculares dañadas. Estos investigadores demostraron en un modelo murino que las nanopartículas cargadas con paclitaxel funcionaron mejor que la administración del paclitaxel libre, favoreciendo una disminución del estrechamiento de los vasos sanguíneos incluso después de 2 semanas de su aplicación, y mostrando un 50% de mejora comparado con el grupo control [31].

En otro trabajo, Panyam y colaboradores analizaron la eficacia terapéutica del encapsulamiento del fármaco dexametasona en nanopartículas de PLGA. Este estudio demostró que la encapsulación de este fármaco mejora su disponibilidad en el interior de las células en comparación con la aplicación del fármaco libre de manera directa. Así mismo, las nanopartículas cargadas con el fármaco mostraron una mayor inhibición de la proliferación celular y una reducción de la migración de células del músculo liso vascular [32].

4.2.6 Enfoque con nanopartículas colectoras de lipoproteínas de baja densidad para enfermedades cardiovasculares.

Es ampliamente reconocido que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son los principales vehículos de transporte del colesterol en el torrente sanguíneo. Los altos niveles de LDL en la sangre son un indicativo de la potencial formación de placas de aterosclerosis con el tiempo [33]. En la mayoría de los pacientes que muestran signos de hipercolesterolemia existen tratamientos que pueden regular los niveles de colesterol mediante la dieta o con la administración de fármacos antilipídicos. Sin embargo, existen pacientes que presentan resistencia a la terapia farmacológica o exhiben un componente genético que provocan esos niveles altos de colesterol más que una alimentación inadecuada. En estos casos, la aféresis, procedimiento mecánico por el cual se separan los componentes de la sangre, es la terapia más frecuente para reducir la hiperlipidemia y los niveles altos de LDL [34].

Con el desarrollo de nuevas técnicas de aféresis de LDL, resulta de vital importancia la búsqueda de nuevos materiales de purificación de la sangre que posean propiedades ajustables para el mejoramiento de la hemoperfusión. Así, Nikitina y colaboradores analizaron la utilización de un sistema compuesto por micelas de fosfatidilcolina polinsaturada y glicósidos derivados de la raíz del regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) como receptores del colesterol con la finalidad de reducir su captación celular. Así, estos investigadores comprobaron que a una concentración micelar de 100 $\mu\text{g/ml}$ se reduce completamente la acumulación intracelular de colesterol en células cultivadas con suero aterogénico [35].

Por otra parte, Li y colaboradores emplearon la afinidad de la heparina por las lipoproteínas de baja densidad desarrollando un sistema de nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano y funcionalizadas con heparina para su aplicación en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Este sistema fue evaluado para separar las LDL del plasma sanguíneo mediante el uso de campos magnéticos para recuperar las nanopartículas. Posteriormente, se separaron las LDL de la heparina utilizando una disolución 2.5 M de NaCl, permitiendo la

reutilización de las nanopartículas. Las nanopartículas mostraron un porcentaje de eliminación del LDL entre el 60% y el 70% después de 8 ciclos de captura magnética y posterior lavado [36].

Yu y colaboradores fabricaron esferas de polivinil alcohol funcionalizadas con ligandos de colesterol, ácido sulfónico y dextrano como propuesta para unir las LDL y triglicéridos. Estos autores observaron que la relación de colesterol/ácido sulfónico determina la eficiencia de adsorción y la selectividad hacia el LDL. Los resultados obtenidos mostraron eficiencias de adsorción en sangre del 68 % para el LDL y el 42.5% para los triglicéridos, respectivamente, y solo del 10% para el HDL, lo cual es de gran importancia para su posible aplicación en terapias de aféresis [37].

4.2.7 Enfoque con nanopartículas para diagnóstico e imagen médica.

Existe una necesidad de detectar lesiones en los vasos sanguíneos, su estrechamiento y/o la formación de ateromas en una etapa temprana mediante la formación de imágenes de alta resolución, y que ayuden en la aplicación precisa y segura de los tratamientos terapéuticos consiguientes. Así mismo, el diagnóstico y la imagen médica deben de ser no invasivos y deben permitir la monitorización en tiempo real de la eficacia del tratamiento para poder re-adaptarlo en caso de necesidad.

Comparados con los agentes de contraste de imagen actuales, los materiales de contraste nanoestructurados conjugados a moléculas pequeñas con propiedades de contraste ofrecen una retención prolongada en los tejidos y en la circulación sanguínea, además de ser fácilmente modificables y funcionalizables para dirigirlos a sus sitios específicos de acción [38].

Por ejemplo, Marrache y Dhar fabricaron nanopartículas dirigidas a sitios apoptóticos, utilizando puntos cuánticos como agentes de contraste y mimetizando lipoproteínas de alta densidad. Las nanopartículas se diseñaron de tal forma que presentaban un núcleo biodegradable de PLGA, y recubiertas por oleato de colesterol y un fosfolípido, y se funcionalizaron con cationes de trifenilfosfonio que direccionan la partícula hacia las membranas colapsadas de mitocondrias, fenómeno asociado a la apoptosis celular. Además, se incorporó a las nanopartículas puntos cuánticos para imagen óptica. Los

resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* indicaron el potencial de este tipo de nanopartículas para el diagnóstico y el tratamiento temprano de ateromas mediante el transporte inverso del colesterol [39].

Como parte de su trabajo, Park y colaboradores desarrollaron una nueva sonda para bioimagen de lesiones ateroscleróticas mediante la conjugación de nanopartículas de quitosano modificado hidrofólicamente con cadenas de glicol (HGC), a las que conjugaron el péptido de direccionamiento de placa aterosclerótica (AP-peptide), que se une selectivamente a las lesiones derivadas de la aterosclerosis. Las nanopartículas fueron además marcadas con el fluoróforo de infrarrojo cercano Cy5.5 para su detección posterior mediante tomografía óptica de fluorescencia [40]. Los estudios *in vitro* mostraron que las nanopartículas de HGC-AP se unen de manera completamente selectiva a las células endoteliales de aorta bovina (BAEC) activadas con el factor apoptótico TNF- α , y en mucha mayor cantidad que a las células no activadas. Los análisis mediante microscopía confocal demostraron que las nanopartículas de HGC-AP se localizaban en la membrana de las células inflamadas. Estos resultados se corroboraron en un modelo animal de ratones *LDLr*^{-/-}, concluyendo que las nanopartículas pueden ser utilizadas como sondas para la detección de lesiones ateroscleróticas [40].

En otro trabajo, Hwang y colaboradores analizaron la capacidad de radionúclidos como potenciales elementos para imagen y terapia angiogénica guiada para el tratamiento de isquemia miocárdica mediante el uso de la tomografía computarizada de emisión de fotón único empleando nanogeles de quitosano (de un tamaño entre los 100 y 150 nm de diámetro) cargados con el factor de crecimiento VEGF y péptidos asociados a ese factor disminuyen los defectos de perfusión sanguínea e incrementan la densidad vascular en un modelo murino de isquemia miocárdica [41].

JUSTIFICACIÓN

Las estrategias preventivas enfocadas al control de los factores de riesgo en enfermedades cardíacas tales como el fumar, la tensión arterial, los niveles de glucosa o los de colesterol han demostrado tener cierto éxito; no obstante, todavía existen riesgos subyacentes elevados, aunque los objetivos del tratamiento prescrito sean completamente alcanzados.

A pesar de la identificación de los procesos de eliminación del colesterol, y de los mecanismos inflamatorios y las cascadas de señalización subyacentes a los procesos de progresión de la placa aterosclerótica y su desestabilización, la aplicación de las terapias de inhibición sistémica tienen un potencial limitado debido a que sus dianas moleculares juegan también un papel primordial en el sistema inmune del cuerpo humano.

La identificación de eventos ateroscleróticos tempranos, sitios de placa vulnerable junto con el desarrollo de nuevas terapias localizadas y eficientes son desafíos extraordinarios en el tratamiento de la aterosclerosis que deben de evitar la ocurrencia de eventos clínicos agudos como el infarto de miocardio o el ictus. Por ello, las estrategias de carácter local, restringidas y combinadas, basadas en la nanomedicina deben de permitir la consecución de nuevas plataformas con mejores resultados a nivel diagnóstico y terapéutico.

Por ello, en el presente proyecto se presente explorar el potencial terapéutico de nanopartículas híbridas a base de polímeros sintéticos y naturales

En particular, se diseñarán dos tipos de nanosistemas: i) El primero, formado por nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), con tamaños entre 160-200 nm encapsulando el fármaco atorvastatina y funcionalizadas con quitosano el cual se acomplejará con un miRNA biomimético antiinflamatorio (miR-124a, ([5'→3'] UAAGGCACGCGGUGAAUGCC)). ii) El segundo de los sistemas se basará en la co-incorporación del fármaco atorvastatina en el interior de una nanopartícula formada por el polímero PLGA y quitosano. La superficie de la misma se funcionalizará con un miRNA biomimético antiinflamatorio (miR-124a, ([5'→3'] UAAGGCACGCGGUGAAUGCC)) y ligandos que se sobreexpresan en las células endoteliales inflamadas del tejido arterial

esclerótico (en particular, VCAM). El tamaño de la nanoplataforma híbrida no excederá los 200 nm.

4.3 Comparado con las tecnologías existentes, el presente proyecto ofrece:

1. La versatilidad de los sistemas basados en nanopartículas permite una modificación a la carta de sus propiedades físico-químicas para diseñar nanosistemas multifuncionales con las propiedades deseadas (acomodación de varios agentes terapéuticos, diversas funcionalizaciones superficiales, etc.).

2. La aplicación de la acción terapéutica combinada de carácter celular, genético y/o químico en un solo nanodispositivo para el tratamiento de la aterosclerosis, no desarrollada hasta el momento. Esta aproximación está basada en la naturaleza compleja de la aterosclerosis y apoyada en estudios preliminares *in vitro* e *in vivo*, donde la combinación de las terapias génicas basadas en miRNA (que permite “atacar”/alterar varias rutas de acción en paralelo en contraste con los siRNA, que sólo actúan contra un gen/proteína específico) junto con agentes quimioterapéuticos han mostrado una mayor eficacia en el tratamiento del cáncer.

3. La combinación de materiales y nanosondas sensibles a estímulos permitirá la realización de experimentos pioneros en el campo de la bioimagen y terapias combinadas en el tratamiento de la arterioesclerosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ácido Poli (D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) de peso molecular 35-45 kDa con una proporción de 50:50, Pluronic F127, se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Se adquirió quitosano de bajo peso molecular (LMW-chitosan, MW = 111 kDa) de Fluka (St. Louis, MO, EE. UU.). El suero fetal bovino (FBS) se adquirió de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EE. UU.). El reactivo antifade ProLong® Gold con DAPI y el medio de cultivo DMEM, L-glutamina, penicilina/estreptomicina, piruvato de sodio y aminoácidos no esenciales MEM (NEAA) se compraron de Invitrogen (Carlsbad, EE. UU.). Todos los demás productos químicos y disolventes fueron de grado reactivo (comprados en Sigma-Aldrich).

4.4.1 Fabricación de nanopartículas de PLGA.

Las nanopartículas de PLGA se sintetizaron mediante un proceso de nanoprecipitación, utilizando acetona como disolvente orgánico y Pluronic F127 como agente estabilizador. Brevemente, en una preparación típica, se disolvieron 25 mg de PLGA en 2,5 ml de acetona. Cuando correspondía, se añadió una cantidad adecuada de Atorvastatina. Esta solución orgánica se añadió gota a gota a 0.166 ml / min hasta 50 ml de F127 al 1% (p / v) en agua a 10 ° C y agitación moderada a 250 rpm. La emulsión se homogeneizó con una punta de sonicación a 100 W en un baño de hielo durante 15 min. La acetona, la atorvastatina no encapsulada y el exceso de estabilizador se eliminaron por agitación durante 4 h y la posterior centrifugación dos veces a 9000 rpm durante 30 min. La concentración de atorvastatina en el sobrenadante se midió por HPLC utilizando una curva de calibración de fármaco obtenida previamente. El sedimento final se dispersó en 25 ml de agua mediante agitación en vórtex durante 30 segundos y se filtró a través de filtros de 0,45 µm (Merck Millipore, EE. UU.).

El quitosano se acomplejó con las nanopartículas de Atorvastatina@PLGA (Atv@PLGA) mediante interacciones electrostáticas con quitosano de bajo peso molecular cargado positivamente (LMW-chitosan). Primero, se mezclaron 5 mL de la suspensión de nanopartículas de Atv@PLGA con 0,25 mL de 1% (w) de LMW-chitosan previamente disuelto en ácido acético al 1% (v/v). Después de agitar durante 4 h, las nanopartículas

de Atv@PLGA se centrifugaron dos veces a 9000 rpm durante 30 minutos para eliminar el quitosano libre y sin adsorber. Luego, la muestra se lavó por centrifugación tres veces a 9000 rpm durante 30 minutos a 20 °C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el sedimento con nanopartículas Atv @ PLGA-Quitosano unidas electrostáticamente se redispersó en 5 mL de agua.

4.4.2 Funcionalización de las nanopartículas con anticuerpo VCAM.

Se incubó una cantidad determinada de anticuerpo con periodato de sodio (NaIO₄) usando un exceso de NaIO₄ (1500 respecto del anticuerpo) en 1 mL de buffer fosfato de sodio (Na-P) 10 mM pH 7 en un tubo eppendorf y se dejó incubar a 4 ° C durante 2 horas protegido de la luz. Posteriormente se pasó a través de una columna de intercambio PD-10 (5000Da) con buffer Na-P pH8 10 mM para lavar el exceso del reactivo.

Se cuantificó la cantidad de anticuerpo después de recuperarse de la columna de intercambio. La concentración de anticuerpo se determinó mediante el ensayo de Bradford.

Se incubaron 10 mg de nanopartículas de PLGA@Quitosano aminados con 1 mL de Anticuerpo 100 µg/ml en Na-P pH 8 10 mM durante 2 horas a 37 ° C. Luego se agregaron 375 unidades (respeto al anticuerpo) de NaCNBH₃ en NaOH 0.1 M para reducir el enlace covalente durante 30 minutos a 37 °C. Se lavó con 10 mM MES pH 6 y finalmente se incubó con 1% de BSA.

CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.

4.5.1 Medición del tamaño de las nanopartículas.

El tamaño promedio de las nanopartículas obtenidas fue determinado por dispersión dinámica de luz usando un Nano ZS (Nanoseries, Malvern Instruments, UK). Las nanopartículas fueron suspendidas en agua y se midieron a 25°C. Se realizaron tres mediciones independientes y los resultados se muestran como la media ± desviación estándar. El radio hidrodinámico, R_H , se obtuvo para muestras diluidas a partir de mediciones de DLS a un ángulo de incidencia de 90 ° mediante el análisis de los datos de DLS utilizando el algoritmo CONTIN y aplicando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_H = kT/6\pi\eta D$$

(1a)

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad de la solución y D el coeficiente de difusión de las partículas en solución diluida. Las mediciones se realizaron por triplicado con un tiempo de muestreo de 120 segundos cada una y se promediaron.

4.5.2 Medición de potencial zeta de las nanopartículas.

El potencial zeta de las nanopartículas preparadas fue determinado por velocimetría Doppler usando un Nano ZS (Nanoseries, Malvern Instruments, UK). Las nanopartículas fueron suspendidas en agua ($\text{pH} \approx 6$) y las mediciones se llevaron a cabo a 25°C . Se realizaron tres mediciones independientes y los resultados son mostrados como la media \pm desviación estándar. El instrumento midió la movilidad electroforética de las partículas y la convirtió al potencial Z utilizando la expresión clásica de Smoluchowski:

$$\alpha = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}$$

(1b)

donde α , ε , ζ y η denotan la movilidad electroforética, la permitividad del medio, el potencial Z de las partículas y la viscosidad del disolvente, respectivamente. Las nanopartículas se suspendieron en agua ($\text{pH} = 6$) y en tampón de fosfato ($\text{pH} = 7,4$) y se introdujeron en una célula zeta desechable, transparente, capilar y plegada. Las medidas se iniciaron después de alcanzar automáticamente el tiempo determinado por el software para el equilibrado de las muestras.

4.5.3 Espectroscopia de Infrarrojo.

Los espectros de infrarrojo de las nanopartículas de PLGA y PLGA-quitosano fueron obtenidos en un instrumento Perkin-Elmer® modelo Spectrum GX. Cada espectro es el promedio de 16 medidas mediante la detección de la transmitancia en el rango de $400\text{-}4,000\text{ cm}^{-1}$ con una resolución espectral de 4 cm^{-1} . Los espectros resultantes fueron

analizados con el software Spectrum v.10. Las muestras de nanopartículas se midieron en pastillade KBr.

4.5.4 Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Las imágenes de las nanopartículas se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión Phillips (CM-12, Phillips, Holanda) usando el modo campo claro (BF) con un voltaje de aceleración de 120 kV. Se depositaron 200 μ l de la muestra con nanopartículas en una rejilla Formvar® recubierta de cobre, se dejó secar al aire y, posteriormente, se agregaron 5 μ L de ácido fosfotúngstico al 2% (w/v), se dejó secar al aire nuevamente, y se procedió a la observación de las rejillas.

4.5.5 Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Se obtuvieron micrografías de las nanopartículas de PLGA utilizando un microscopio electrónico de barrido FESEM (Ultra Plus, Zeiss, Alemania) en el modo de alto vacío (HV) con un voltaje de aceleración de 30 kV. Se depositaron 200 μ L de muestra en un sustrato de silicio utilizando la técnica de spin coating; posteriormente, se secó la muestra en una estufa de vacío (VO 200, Memmert, Alemania) a 50 °C a una presión de 100 mbar por espacio de una hora.

ENSAYOS CON CULTIVOS CELULARES.

4.6.1 Condiciones estándar de cultivo.

Se utilizaron las líneas celulares RAW 264.7. y HUVEC. Las células fueron mantenidas en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (v/v), 100 U/ml de penicilina, 200 μ g/ml de estreptomina y 2.5 μ g/ml de estreptomina. Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C, 5 % de CO₂ y una humedad del 90 %.

4.6.2 Ensayos de citotoxicidad.

El efecto citotóxico de las nanopartículas de PLGA en sus distintas configuraciones fue determinado por medio del test de supervivencia CCK8. Para ello, se inocularon 100 μ l de una suspensión celular (10000 células/mL) en cada pozo de una placa de 96 pozos. Después de 24 h de incubación se agregaron 50 μ l de una suspensión de nanopartículas (suspendidas en agua desionizada). Las concentraciones resultantes de nanopartículas fueron desde 2·10¹⁰ NP/mL hasta 10¹¹ NP/mL. La citotoxicidad fue medida después de 24 y 48 h de incubación agregando 10 μ l del reactivo CCK8 (1 mg/mL) a cada pozo, las

placas fueron incubadas por 1 h y transcurrido este tiempo la densidad óptica fue medida a 450 nm. La viabilidad celular relativa fue determinada por la cantidad de CCK8 metabolizado a formazan y calculada como porcentaje de viabilidad comparada con el control (solo agua desionizada). La viabilidad celular fue calculada de la siguiente manera:

$$C.V (\%) = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100 \quad (2)$$

donde, la *absorbancia de la muestra* es la absorbancia a 450 nm de las muestras con nanopartículas y *absorbancia del blanco* es la absorbancia a 450 nm de las células sin nanopartículas.

4.6.3 Análisis cuantitativo del miRNA.

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (LC) de las nanopartículas de PLGA-quitosano, estas fueron centrifugadas a 15000 rpm a 20 °C por 20 minutos. El contenido de siRNA en el sobrenadante fue medido por espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia. Previamente se creó una curva de calibración con siRNA disuelto en agua libre de RNAsas a 37 °C. Las gráficas de UV-Vis fueron obtenidas a 260 nm substrayendo las potenciales contribuciones de los residuos de las proteínas a 280 nm. Las curvas estándar de fluorescencia fueron fijadas a una longitud de onda de excitación de 494 nm y recolectadas a una longitud de onda de emisión de 519 nm. Los espectros de UV-Vis fueron medidos con el espectrofotómetro Cary Bio 100 UV-Vis (Agilent Technologies, USA) mientras que el espectro de fluorescencia fue monitorizado con un espectrofotómetro Cary Eclipse (Agilent Technologies, USA). Cada muestra fue medida por triplicado de 3 diferentes lotes y promediado. La EE y la LC fueron calculadas mediante las siguientes expresiones:

$$E.E. (\%) = \frac{\text{Cantidad total de siRNA agregado} - \text{siRNA en sobrenadante}}{\text{Cantidad total de siRNA agregado}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{L.C. (\%)} = \frac{\text{Cantidad total de siRNA agregado} - \text{siRNA en sobrenadante}}{\text{Cantidad total de siRNA agregado}} \times 100 \quad (4)$$

4.6.4 Ensayos ELISA (ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas).

Se utilizó el kit ELISA de IL-6 de ratón *in vitro* para la medición cuantitativa de IL-6 en células RAW 264.7 tratadas con LPS y nanopartículas de Atv@PLGA-quitosano-miRNA con el objetivo de medir la capacidad de nuestro nanovector de silenciar el gen que expresa la proteína IL-6. Se cultivaron en una placa de 96 pozos 10,000 células por pozo, después de 24 horas un grupo células fueron tratadas con LPS y otras se dejaron sin tratamiento alguno, transcurridas 24 horas, la mitad del grupo estimulado con LPS fue tratado con nanopartículas durante 48 y 72 horas. Al finalizar este lapso de tiempo se colectaron los sobrenadantes y se procedió a realizar el ensayo ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se obtuvieron leyendo la placa de 96 pozos en un lector de placas BioRad.

4.6.5 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Se utilizó el kit de ensayo de ROS celular (abcam pcl. UK). El kit de ensayo de especies reactivas de oxígeno utiliza el reactivo de permeabilidad celular 2', 7'- di-acetato de diclorofluoresceína (DCFDA, también conocido como H₂DCFDA), un tinte fluorogénico que mide la actividad dentro de la célula de las especies de hidroxilo, peroxilo y otras especies reactivas del oxígeno. Después de la difusión en la célula, el DCFDA se desacetila por esterasas celulares a un compuesto no fluorescente, que luego se oxida por las ROS en 2', 7' -di-clorofluoresceína (DCF). El DCF es un compuesto altamente fluorescente que se puede detectar por espectroscopía de fluorescencia con excitación/emisión a 495 nm y 529 nm respectivamente. Así, se procedió a sembrar una placa de 96 pozos con 25,000 células por pozo. Después de 24 horas de incubación un grupo de células fue tratado con LPS y otras se dejaron sin tratamiento; transcurridas 24 horas, a la mitad del grupo tratado con LPS se incubó con nanopartículas durante 24 horas. Al finalizar este período de tratamiento se procedió a utilizar el kit siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se mediante un lector de fluorescencia FLUOstar Omega (BMG Labtech).

IMÁGENES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

4.7.1 Internalización de nanopartículas con siRNA.

Como prueba de concepto se utilizó un siRNA no codificante marcado con una sonda fluorescente para probar la capacidad de nuestros nanosistemas para internalizar material genético en las células. Se cultivaron células RAW 264.7 en cristales de cultivo recubiertos con poli-L-lisina (12x12 mm²) colocados dentro de placas de 6 pocillos (3 ml, 1x10⁵ células por pocillo) durante 24 horas en condiciones de cultivo estándar. A continuación, se descartó el medio de cultivo, se redispersaron 300 µl de nanopartículas PLGA-quitosano-siRNA en medio de cultivo celular con FBS al 10% (v/v) para obtener una concentración final de 2·10¹⁰ NP/mL y se agregaron a cada pozo. Después de 6 h de incubación, las células que contenían nanopartículas y las células de control sin tratamiento se lavaron tres veces con PBS pH 7,4; a continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4% (w/v) durante 10 min, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con 0,2% (w/v) de Triton X-100, y se tiñeron finalmente con BODIPY- Phalloidin durante 30 minutos. Pasado este tiempo las células se lavaron tres veces con PBS, el cubreobjetos se montó en un portaobjetos de vidrio, se agregó una gota de resina de montaje con DAPI, se colocó un cubreobjetos y se dejó curar la resina durante 24 horas a -20 °C antes de observarlas al microscopio de epifluorescencia Leica DMI6000B con un sistema modular Leica AF6000 y equipado con una cámara DFC3665FX (Leica Microsystems GmbH, Alemania).

4.7.2 Cambio de morfología.

Se evaluó el cambio en la morfología de las células RAW 264.7 debido a la estimulación con LPS y el efecto de nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-quitosano-miRNA para revertir dicha estimulación. Para ello, se cultivaron células RAW 264.7 en cristal de cultivo recubierto con poli-L-lisina (12x12 mm²) colocados dentro de placas de 6 pocillos (3 ml, 1x10⁵ células por pocillo) durante 24 horas en condiciones de cultivo estándar. A continuación, se descartó el medio de cultivo, se redispersaron 300 µl de nanopartículas Atv@PLGA-quitosano-miRNA en medio de cultivo celular con FBS al 10% (v/v) para obtener una concentración final de 2·10¹⁰ NP/mL y se agregaron a cada pozo. Después de 24 horas, un grupo células fueron tratadas con LPS y otras se dejaron sin tratamiento alguno. Transcurridas 24 horas, a la mitad del grupo tratado con LPS se le añadieron las

nanopartículas y se incubaron adicionalmente durante 72 horas. Después de pasado ese periodo de tiempo, las células que contenían nanopartículas y las células de control sin tratamiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 y se procesaron para su observación al microscopio de fluorescencia.

4.7.3 Internalización de Ox-LDL.

Se evaluó el cambio en la internalización de la lipoproteína de baja densidad oxidada (Ox-LDL) en las células RAW 264.7 en presencia de la estimulación con LPS y evaluándose el efecto inhibitor de la nanoplateforma Atv@PLGA-quitosano-miRNA para disminuir la internalización debido a la estimulación. Para ello, se cultivaron células RAW 264.7 en cristal de cultivo recubierto con poli-L-lisina (12x12 mm²) colocados dentro de placas de 6 pocillos (3 ml, 1x10⁵ células por pocillo) durante 24 horas con medio DMEM deficiente en FBS y en condiciones de cultivo estándar. Un grupo células fueron tratadas con LPS y otras se dejaron sin tratamiento alguno. Transcurridas 24 horas, a la mitad del grupo tratado con LPS se le administraron las nanopartículas, y se incubaron durante 24 horas. Pasado este tiempo se retiró el medio de cultivo sin FBS y se sustituyó con medio DMEM con 10% (v/v) de FBS, se utilizó la lipoproteína oxidada (Ox-LDL) acoplada a la sonda fluorescente Dil (tinte catiónico lipofílico de indocarbocianina) y se incubó por 4 horas siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de ese periodo de tiempo, las células que contenían nanopartículas, las células estimuladas con LPS y las células de control sin tratamiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.4. Después de pasado ese periodo de tiempo, las células que contenían nanopartículas y las células de control sin tratamiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 y se procesaron para su observación al microscopio de fluorescencia.

4.7.4 Expresión de los receptores VCAM e ICAM-1.

Se evaluó el aumento en la expresión de los receptores transmembrana VCAM e ICAM-1 de las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) provocada por la estimulación con LPS y el impacto de nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-quitosano-miRNA funcionalizadas con el anticuerpo Anti-VCAM para atenuar el efecto de dicha estimulación. Se cultivaron células HUVEC en cristal de cultivo recubierto con poli-L-lisina (12x12 mm²) colocados dentro de placas de 6 pocillos (3 ml, 1x10⁵ células por pocillo) durante 24 horas en condiciones de cultivo estándar. Un grupo células fueron

tratadas con LPS y otras se dejaron sin tratamiento alguno. Transcurridas 24 horas, a la mitad del grupo tratado con LPS se le añadió nanopartículas y se incubaron durante 24 horas. Después de este tiempo se sustituyó el medio de cultivo con medio fresco; a continuación, se agregaron los anticuerpos anti-CD106-PE (anti-VCAM) y anti-CD54-FITC (anti-ICAM-1) marcados cada uno con una sonda fluorescente de distinto color (inmunomarcaje) siguiendo las instrucciones del fabricante para la observación de las muestras en el microscopio de fluorescencia. Se incubaron las células por 4 horas en condiciones estándares de cultivo y en completa oscuridad. Después de ese periodo de tiempo, las células que contenían nanopartículas, las células estimuladas con LPS y las células de control sin tratamiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.4. Después de pasado ese periodo de tiempo, las células que contenían nanopartículas y las células de control sin tratamiento se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 y se procesaron para su observación al microscopio de fluorescencia.

ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO

4.8.1 Captación celular de Ox-LDL.

Se evaluó el cambio en la internalización de la lipoproteína de baja densidad oxidada (Ox-LDL) en las células RAW 264.7 y HUVEC debido a la estimulación con LPS y al efecto de la nanoplateforma Atv@PLGA-quitosano-miRNA para disminuir su internalización debido a la estimulación. Para ello, se cultivaron células RAW 264.7 en placas de 6 pocillos (3 ml, 5×10^5 células por pocillo) con medio DMEM deficiente en FBS durante 24 horas en condiciones de cultivo estándar. Un grupo células fueron tratadas con LPS y otras se dejaron sin tratamiento alguno. Transcurridas 24 horas, a la mitad del grupo tratado con LPS se le administraron nanopartículas y se incubaron 24 horas. Pasado este tiempo se retiró el medio de cultivo sin FBS y se sustituyó con medio DMEM con 10% (v/v) de FBS, se añadió la lipoproteína oxidada (Ox-LDL) acoplada a la sonda fluorescente Dil (tinte catiónico lipofílico de indocarbocianina) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó durante 4 horas siguiendo las indicaciones del fabricante. Los macrófagos se lavaron con PBS tres veces para eliminar el exceso de lipoproteína, y se digirieron con tripsina al 0,25% (v/v) durante 8 minutos. Pasado este tiempo, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 4 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet

se lavó con PBS tres veces para eliminar los restos de tripsina. Las células se resuspendieron en 200 ml de PBS y, a continuación, se midió la fluorescencia de las células mediante citometría de flujo utilizando un equipo Guava easyCyte (Millipore, USA), y los resultados fueron analizados mediante el software del equipo.

RESULTADOS

4.9.1 Caracterización de las nanopartículas de PLGA.

El tamaño promedio de las nanopartículas de PLGA en sus distintas configuraciones suspendidas en agua desionizada se muestra de manera resumida en la Tabla 1. También se muestran algunas graficas representativas de las distribuciones de tamaño de las mismas (Figuras 6,7 y 8).

Tabla 1. Tamaño promedio de las nanopartículas de PLGA suspendidas en agua desionizada. Promedio de múltiples mediciones independientes.

Nanopartículas	Tamaño (nm)	PDI
PLGA	164 ± 7	0.11
PLGA@quitosano	194 ± 9	0.18
Atv@PLGA-quitosano-miRNA	209 ± 9	0.19

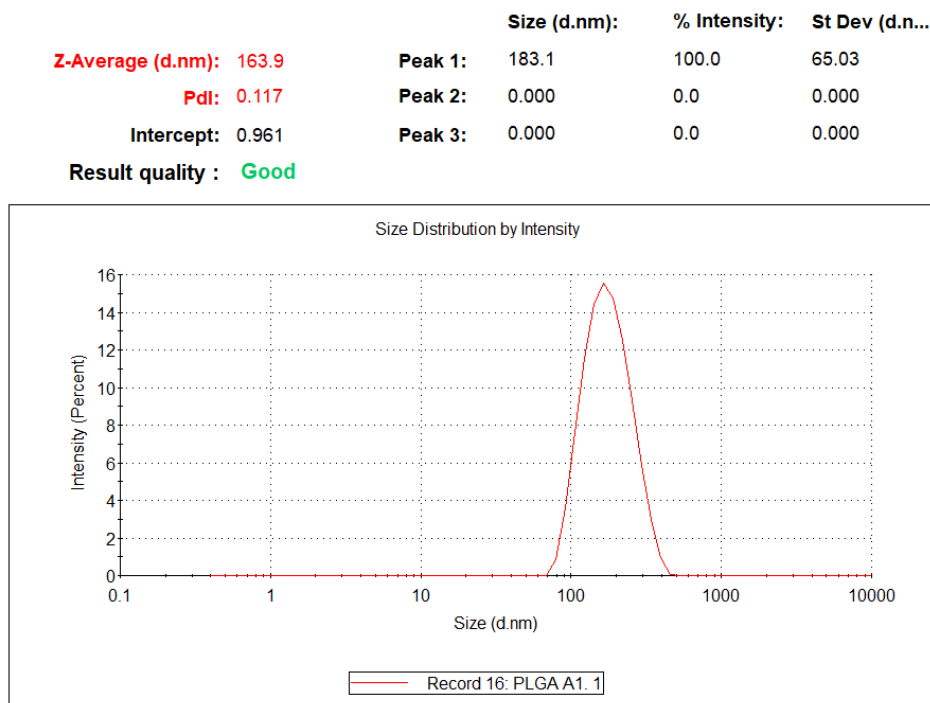


Figura 6. Gráfica de la distribución de tamaño de nanopartículas de PLGA.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 194.4	Peak 1: 203.6	98.0	65.31
Pdl: 0.181	Peak 2: 5066	2.0	569.7
Intercept: 0.943	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good

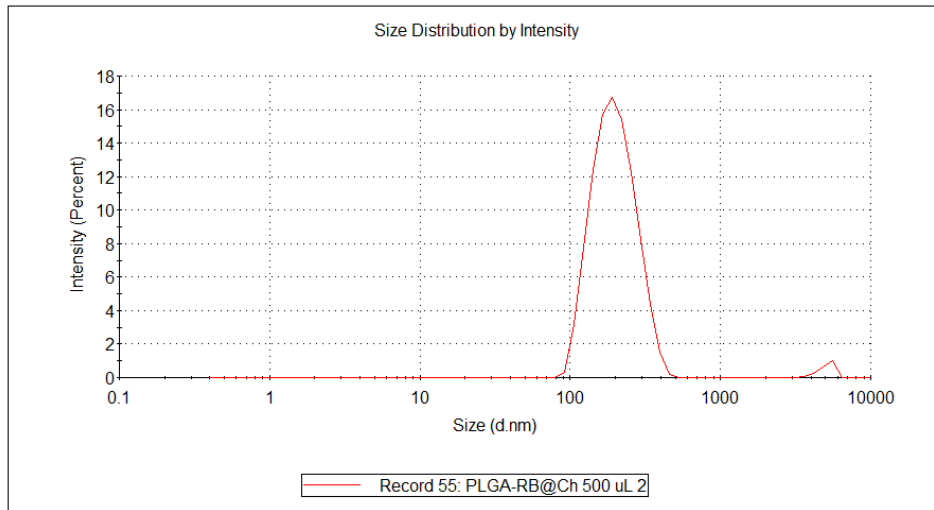


Figura 7. Gráfica de la distribución de tamaño de nanopartículas de PLGA-quitosano.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 208.8	Peak 1: 201.0	100.0	51.37
Pdl: 0.198	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.935	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good

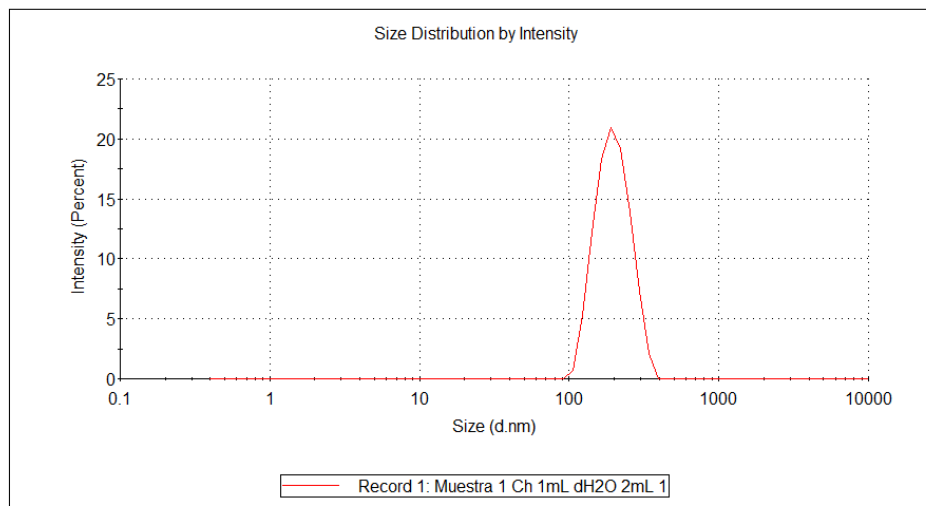


Figura 8. Gráfica de la distribución de tamaño de nanopartículas de Atv@PLGA-quitosano-miRNA.

4.9.2 Potencial zeta.

Los resultados del potencial zeta son los mostrados en la Tabla 2. Se observa que el potencial zeta de las nanopartículas de PLGA se invierte cuando se añade el quitosano debido a la presencia de los grupos NH₂ en su estructura molecular, lo que confirma su recubrimiento satisfactorio y tiene una ligera disminución al funcionalizar las nanopartículas con el miRNA.

Tabla 2. Potencial zeta promedio de las nanopartículas de PLGA suspendidas en agua desionizada. Promedio de múltiples mediciones independientes.

Nanopartículas	Potencial Zeta (mV)
PLGA	-26.50 ± 6.60
PLGA@Quitosano	18.80 ± 4.10
Atv@PLGA-Quitosano-miRNA	14.20 ± 6.44

También se muestran algunas graficas representativas de los potenciales zeta de las nanopartículas obtenidas (Figuras 9,10 y 11).

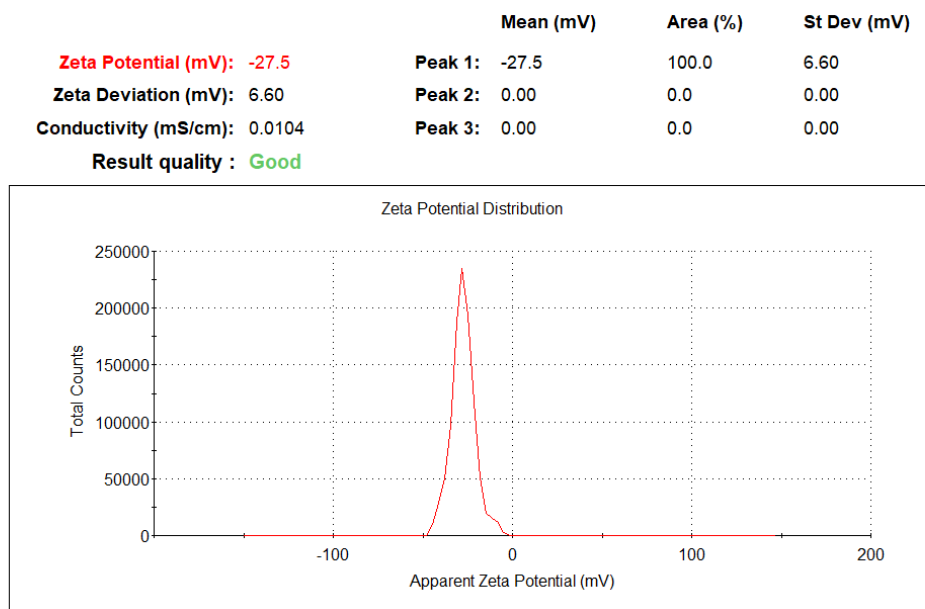


Figura 9. Gráfica de potencial zeta de las nanopartículas de PLGA.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 19.8	Peak 1: 19.8	100.0	4.10
Zeta Deviation (mV): 4.10	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.00704	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			

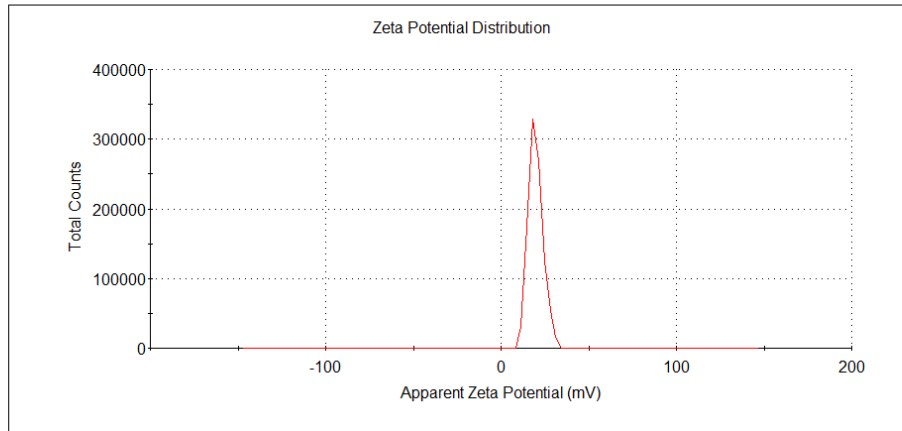


Figura 10. Gráfica de potencial zeta de las nanopartículas de PLGA-quitosano.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 15.2	Peak 1: 15.2	100.0	6.44
Zeta Deviation (mV): 6.44	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.00397	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			

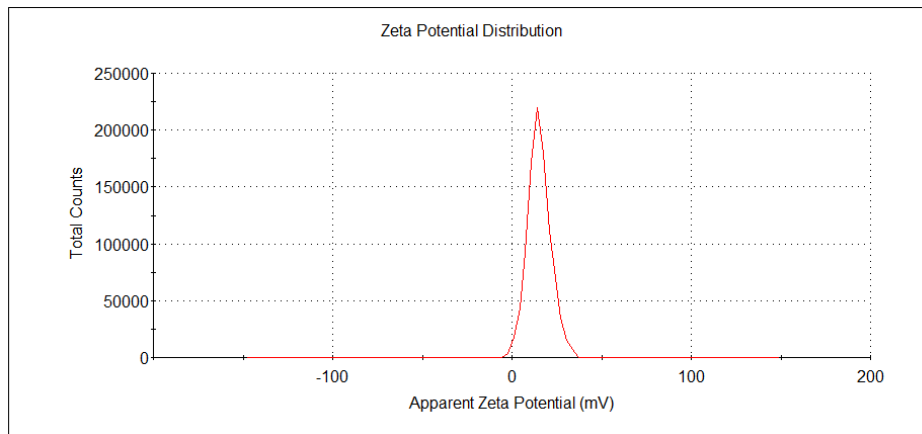


Figura 11. Gráfica de potencial zeta de las nanopartículas de Atv@PLGA-quitosano-VCAM.

4.9.3 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

En la figura 12 se muestran las micrografías TEM de las nanopartículas de PLGA “desnudas” y recubiertas con quitosano. Estas muestran una morfología cuasi-esférica y un tamaño algo inferior al observado mediante las medidas de DLS, como consecuencia del proceso de secado implícito en la metodología experimental de TEM, que provoca una contracción de las cadenas poliméricas que forman las NPs, por tanto, disminuyendo ligeramente su tamaño.

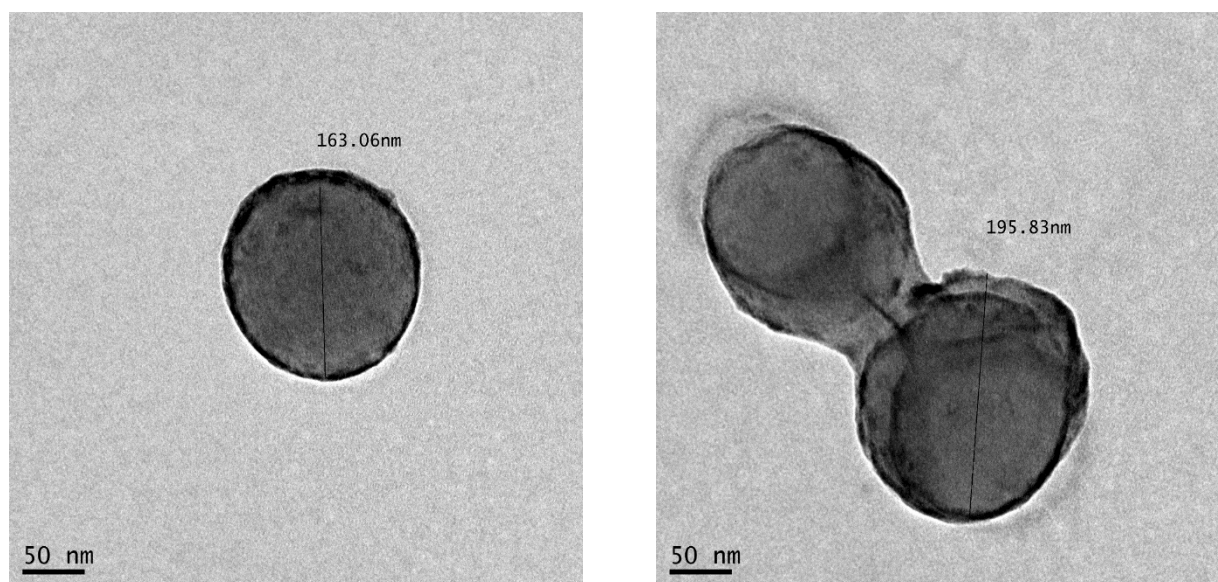


Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de PLGA (Izquierda) y de PLGA recubiertas de quitosano (Derecha).

4.9.4 Imágenes de microscopía electrónica de barrido.

En las figuras 15, 16 y 17 se muestran las micrografías de las nanopartículas de PLGA, para las distintas configuraciones. Al igual que sucede en TEM, las nanopartículas poliméricas muestran una morfología cuasi-esférica con un rango de tamaños muy similar al determinado previamente mediante las demás técnicas experimentales, así como una superficie regular sin protuberancias.

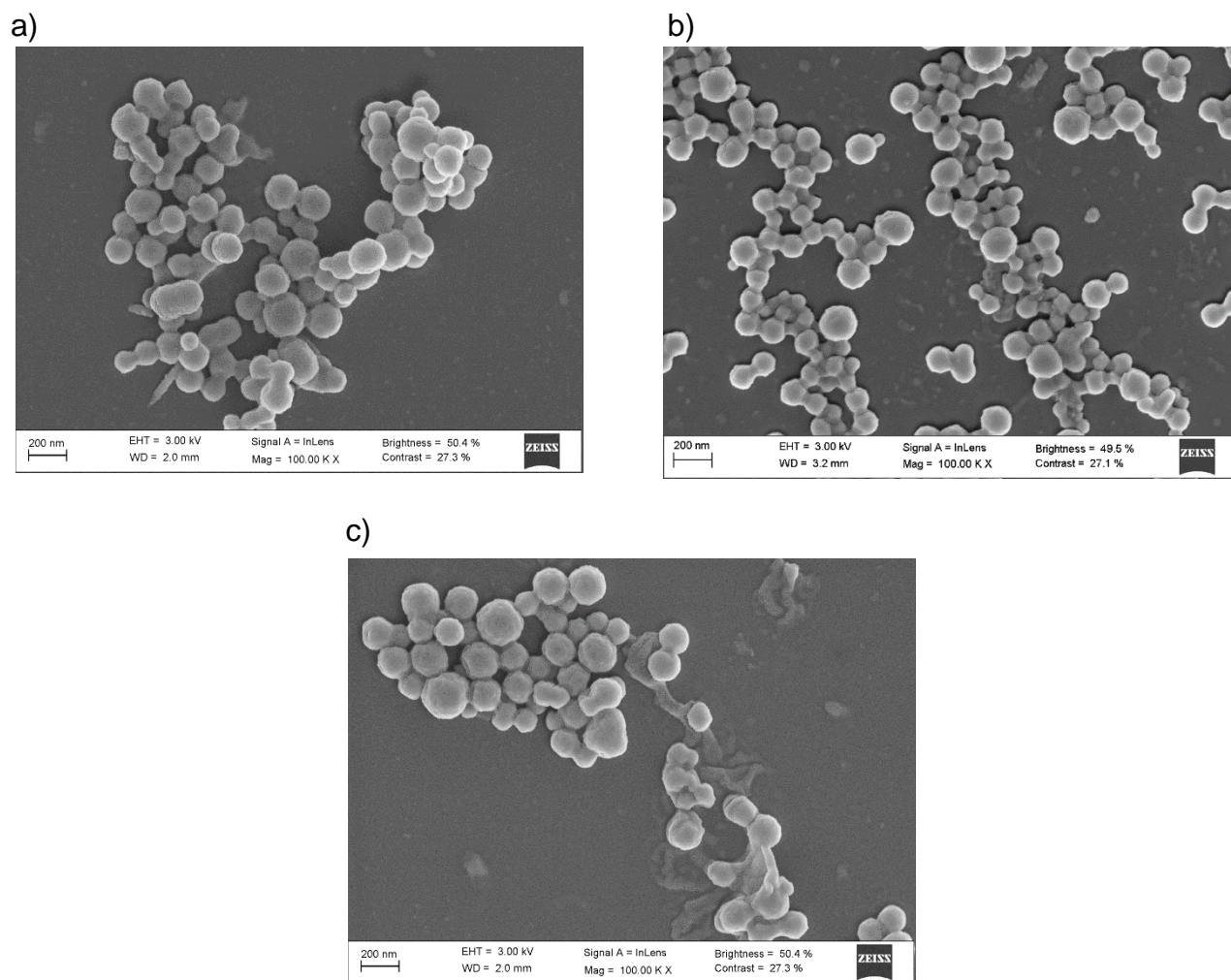


Figura 13. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de a) nanopartículas de PLGA, b) nanopartículas de PLGA@quitosano y c) nanopartículas de Atv@PLGA-quitosano.

4.9.5 Espectros de FTIR.

Los espectros FTIR se utilizaron para comprobar la exitosa funcionalización de la superficie de las NPs de PLGA con las cadenas de quitosano. En el espectro FTIR los picos asignados al estiramiento de $-OH$ se observaron a 3400 cm^{-1} . Los picos correspondientes a los enlaces de $-CH-$, $-CH_2$ y $-CH_3$ se encontraron en el rango de $2897\text{--}2986\text{ cm}^{-1}$ [42]. Es importante destacar que las vibraciones de amida I y II se observaron a 1667 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} , respectivamente. Los enlaces entre 916 cm^{-1} y 1187 cm^{-1} se asignaron a la vibración de estiramiento N-H. En el espectro FTIR de las

nanopartículas de PLGA, los enlaces que se atribuyen a las vibraciones de estiramiento de carbonilo (-C=O) y C-O-C se observaron a 1713 cm^{-1} y 1094 cm^{-1} , respectivamente [43].

Por el contrario, el espectro de las nanopartículas de PLGA-quitosano en ausencia del fármaco (Fig. 14) mostró todas las bandas características correspondientes a las cadenas de quitosano y PLGA: estiramiento -OH (3400 cm^{-1}), estiramientos -CH , -CH_2 y -CH_3 ($2773\text{-}2995\text{ cm}^{-1}$), vibración de estiramiento del grupo carbonilo -C=O (1708 cm^{-1}), vibración de la banda amida II (1531 cm^{-1}), y estiramiento del grupo C-O-C (1094 cm^{-1}).

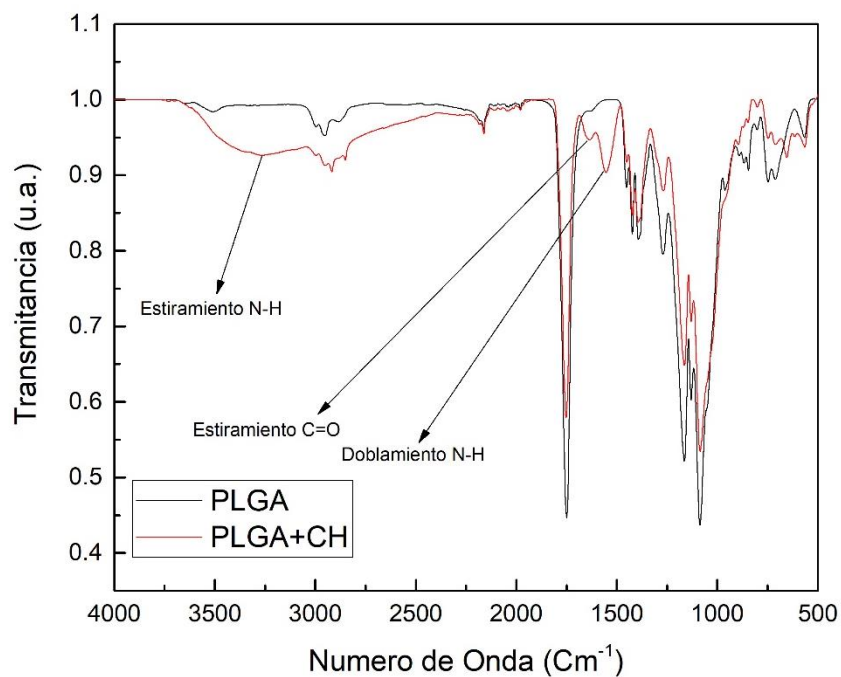


Figura 14. Espectro de FTIR de las nanopartículas de PLGA y PLGA-quitosano en el que se confirma la funcionalización de las nanopartículas.

ENSAYOS CON CULTIVOS CELULARES.

4.10.1 Ensayos de citotoxicidad.

Se evaluó la viabilidad celular de la plataforma $\text{Atv@PLGA-quitosano}$ utilizando distintas concentraciones de nanopartículas desde $2 \cdot 10^{10}$ NP/mL hasta 10^{11} NP/mL, mediante el estudio de viabilidad celular CCK8 a 24 y 48 horas de incubación. Como se puede observar en la Figura 15 no se encontró que las partículas de $\text{Atv@PLGA-quitosano}$

resultaran tóxicas para las células RAW 264.7. para que un compuesto o molécula se considere tóxico debe exhibir una mortalidad celular en las placas de cultivo superior al 25% (FDA, 2015).

Además, se analizó la viabilidad de los macrófagos tras su estimulación con lipopolisacáridos de la bacteria *Escherichia coli* (LPS) para provocar una reacción de inflamación en estas células RAW 264.7. Para ello, se realizó un barrido de concentraciones desde 10 ng/mL hasta los 100 ng/mL, observándose un aumento en la viabilidad de las células a medida que aumentaba la concentración de LPS (Figura 15).

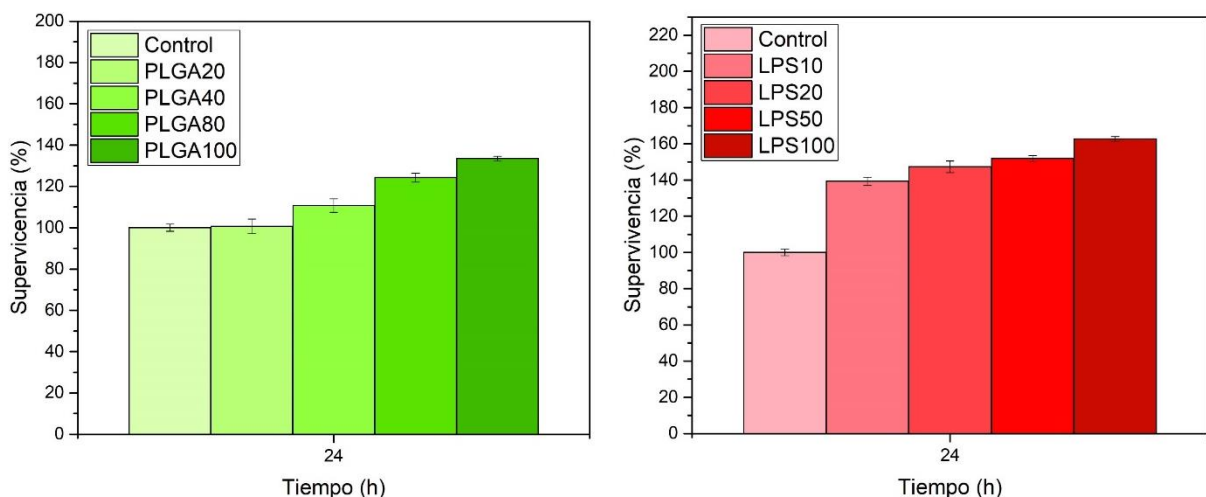


Figura 15. a) Efecto citotóxico en células RAW 264.7 de las nanopartículas Atv@PLGA-quitosano en el rango de concentraciones comprendido entre $2 \cdot 10^{10}$ - 10^{11} NP/mL durante 24 h de incubación. b) Efecto citotóxico en células RAW 264.7 del lipopolisacárido de *Escherichia coli* en el rango de concentraciones comprendido entre 10 ng/mL hasta 100 ng/mL.

Se evaluó la viabilidad de las nanopartículas de PLGA en sus diferentes configuraciones utilizando una concentración $2 \cdot 10^{10}$ NP/mL para elucidar un posible efecto tóxico del recubrimiento con quitosano y el acomplejamiento con el miRNA. Como se puede observar en la Figura 16, la funcionalización no le confiere a las nanopartículas un efecto tóxico que pueda afectar a la viabilidad de las células RAW. 264.7

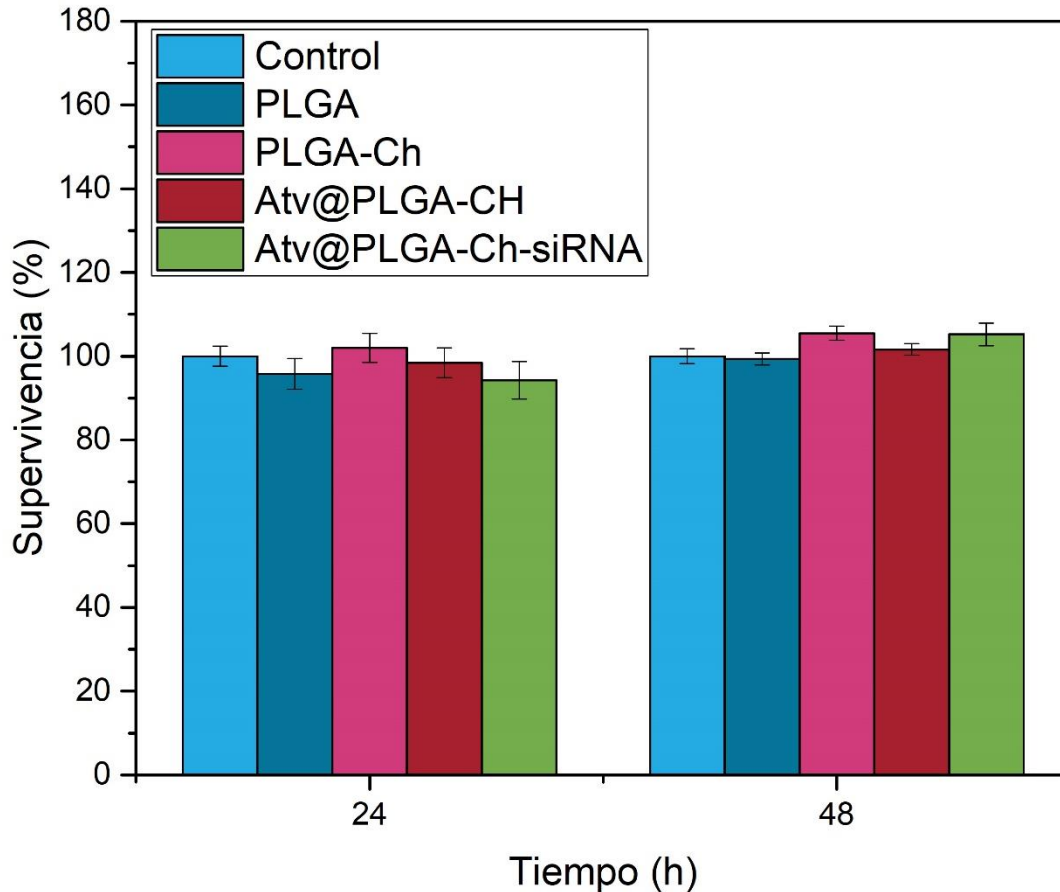


Figura 16. Efecto citotóxico en células RAW 264.7 de las nanopartículas de PLGA, PLGA-quitosano, Atv@PLGA-quitosano y Atv@PLGA-quitosano-siRNA.

Sin embargo, para el barrido de concentraciones de nanopartículas se puede observar un aumento en la viabilidad de las células RAW 264.7, dicho aumento se debe a la naturaleza de las células, ya que al ser macrófagos proliferan en presencia de biomoléculas o agentes xenobióticos como método de defensa para el reconocimiento, marcaje y posterior eliminación de los mismos [44].

En resumen, hemos utilizado esta línea celular como modelo de inflamación y de formación de células espumosas de etapa temprana en la formación de placa aterosclerótica. Realizando los ensayos de viabilidad y estableciendo los parámetros para futuros ensayos decidimos utilizar la concentración de $2 \cdot 10^{10}$ NP/mL de Atv@PLGA-quitosano y 100 ng/mL de LPS.

4.10.2 Ensayos ELISA.

La interleucina 6 (IL-6) es una proteína multifuncional de 26 kD descubierta originalmente en el medio de las células fibroblastoides estimuladas con ARN. La IL-6 está directamente involucrada en las respuestas que ocurren después de la infección y la lesión celular, y es producida por fibroblastos, células T activadas, monocitos o macrófagos activados y células endoteliales. Además, junto con la IL-1 y el TNF- α son las encargadas de regular generalmente la respuesta inflamatoria en fase aguda [45].

La IL-6 actúa sobre una variedad de células que incluyen células progenitoras mieloides, células T, células B y hepatocitos. Además, la IL-6 parece interactuar con la IL-2 en la proliferación de linfocitos T [46], y potencia el efecto proliferativo de la IL-3 sobre los progenitores hematopoyéticos multipotenciales. Además, esta citoquina desempeña un papel crítico en la diferenciación de las células B a células plasmáticas, es un factor de crecimiento potente para el plasmacitoma y el mieloma, y un suplemento de cultivo muy útil para la generación de un gran número de hibridomas productores de anticuerpos.

Producida principalmente en sitios de inflamación aguda y crónica, la IL-6 se secreta en el suero e induce una respuesta inflamatoria transcripcional a través del receptor de interleucina 6 alfa [47]. El funcionamiento de la IL-6 está implicado en una amplia variedad de estados de enfermedad asociados con la inflamación, incluida la diabetes mellitus, la artritis reumatoide juvenil sistémica, así como en diversas enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares [45-47].

Así, en este trabajo procedimos, pues, a evaluar el potencial de nuestra nanoplataforma Atv@PLGA-quitosano-miRNA para silenciar el ARN mensajero que codifica la IL-6 en macrófagos de ratón utilizando, para ello, la línea celular RAW.264.7. Se utilizó un kit de inmunoensayo ELISA para medir la concentración de IL-6 en medio de cultivo celular siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, un grupo de células fue tratado previamente con LPS para promover la activación de la IL-6. De igual manera, otro grupo de células previamente tratadas con LPS fueron tratadas con nuestra plataforma para comprobar el efecto de inhibición del miRNA y la disminución de la concentración de IL-6 en el medio de cultivo. Se evaluó, así, la eficacia de 3 concentraciones distintas de miRNA (10, 50 y 100 pmoles/mL). Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado en las mismas condiciones de cultivo después de 24 y 48 horas de incubación,

y se usó un grupo de células sin estimulación como control negativo. La medida del inmunoensayo se llevó a cabo al momento.

Así, se observó que a las 24 post-estimulación con LPS, las células tuvieron 12.61 pg/mL de IL-6, el doble de concentración con respecto a las células control, las cuales arrojaron una lectura de 6.27 pg/mL. Las células que fueron tratadas con las distintas concentraciones de miRNA, 10, 50 y 100 pmoles/mL mostraron una disminución en la concentración de IL-6 en el medio celular a 10.08, 9.72 y 7.36 pg/mL respectivamente. Se realizó también una medición a las 48 horas posteriores a la estimulación con LPS, encontrando un aumento considerable en las células tratadas con LPS con respecto al control, llegando a aumentar 5 veces el nivel de las células control, 5.18 pg/ml para las células control y 26.12 para las células tratadas con LPS. En el caso de las células tratadas con distintas concentraciones de miRNA, nuevamente la concentración de IL-6 tiende a disminuir conforme aumenta la concentración de miRNA como se muestra en la Tabla 3. La tendencia se hace evidente al comparar gráficamente las concentraciones para ambos tiempos, 24 y 48 horas (Fig. 16). Este efecto es esperado y deseado a la hora de utilizar nuestras nanopartículas como un vehículo de transporte del material genético de interferencia para inhibir la expresión de la IL-6, una de las principales señales de inflamación celular, que desencadena una serie de reacciones metabólicas al interior de las células, que pueden derivar en un daño celular y la formación de células “espumosas” durante la formación de la placa aterosclerótica [48].

Tabla 3. Concentración de IL-6 medida mediante ELISA en medio celular de las nanopartículas de PLGA con distintas concentraciones de miRNA. Promedio de múltiples mediciones independientes.

	Control	LPS	PLGA10	PLGA50	PLGA100
24 horas	6.27 ± 0.709	12.61 ± 1.539	10.08 ± 1.069	9.72 ± 0.731	7.36 ± 1.026
48 horas	5.18 ± 1.215	26.12 ± 1.301	20.85 ± 1.013	17.1 ± 1.818	10.08 ± 1.161

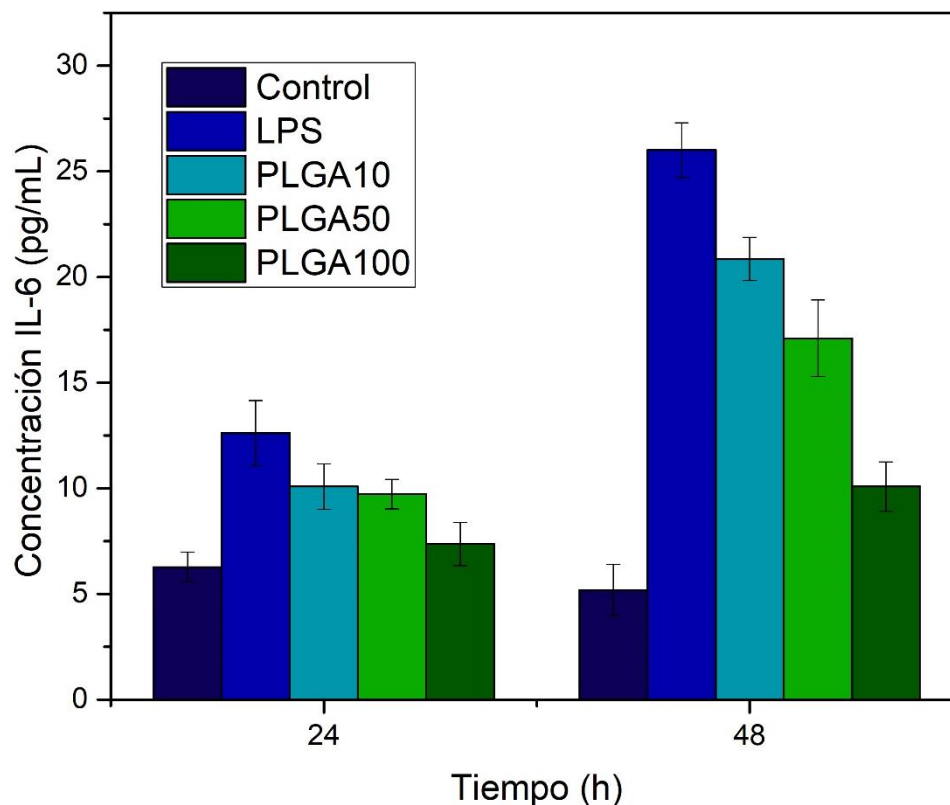


Figura 17. Determinación de las concentraciones de IL-6 en medio celular medida mediante ensayo ELISA tras 24 y 48 horas de incubación en presencia de las nanopartículas de PLGA con distintas concentraciones de miRNA. Los datos son el promedio de tres medidas independientes.

4.10.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Un radical libre se define como una molécula reactiva con uno o más electrones no apareados que podrían existir independientemente. Especies reactivas de oxígeno (ROS) es un término colectivo que incluye radicales de oxígeno, como los radicales hidroxilo (HO), peroxilo (ROO) y superóxido (O_2), y agentes oxidantes no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [49]. Durante el proceso del metabolismo humano se pueden formar ROS. Cuando están presentes en exceso, las ROS pueden causar el daño oxidativo de biomacromoléculas como los lípidos, las proteínas y el ADN, lo que puede llevar al desarrollo de varias patologías como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y el envejecimiento [50].

La inflamación, como respuesta a una lesión o infección tisular, es vital para el cuerpo cuando se enfrenta a microbios invasores, xenobióticos o enfermedades. La respuesta inflamatoria está regulada principalmente por las citoquinas, los eicosanoides y el óxido nítrico (NO) liberados por las células lesionadas o infectadas, y desempeña un papel importante en la progresión de la inflamación.

La aterosclerosis es el resultado de una respuesta inflamatoria iniciada por la retención intracelular de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B, ricas en colesterol, en áreas susceptibles de la vasculatura arterial [51]. Las lipoproteínas que están secuestradas en la pared arterial son susceptibles a diversas modificaciones (como la oxidación, la escisión enzimática y no enzimática y la agregación), que hacen que estas partículas sean proinflamatorias y que induzcan la activación del endotelio suprayacente. La respuesta inmune resultante está mediada por el reclutamiento de células derivadas de monocitos en el espacio subendotelial, donde estas células se diferencian en fagocitos mononucleares que ingieren las lipoproteínas normales y modificadas acumuladas, que las transforman en células de espuma cargadas de colesterol.

Las células espumosas, típicamente clasificadas como un tipo de macrófago, persisten en las placas, lo que promueve la progresión de la enfermedad. Aunque el aclaramiento de las lipoproteínas por los macrófagos es probable que sea beneficioso al comienzo de esta respuesta inmunitaria, hay poca retroalimentación negativa después de la captación y, por lo tanto, estas células se llenan de lípidos. La desregulación resultante del metabolismo de los lípidos altera el fenotipo de los macrófagos y compromete funciones inmunitarias cruciales.

En particular, los macrófagos que se acumulan en las placas ateroscleróticas parecen tener una capacidad disminuida para migrar, lo que contribuye a su incapacidad para resolver la inflamación y a la potenciación de la progresión de estas lesiones a placas complejas más avanzadas en las que participan otros subconjuntos de células inmunitarias y células vasculares del músculo liso en el proceso inflamatorio [52]. En estas placas avanzadas, los macrófagos continúan siendo los principales contribuyentes a la respuesta inflamatoria a través de la secreción por su parte de mediadores proinflamatorios (incluidas las quimiocinas, citoquinas y especies reactivas de oxígeno y

nitrógeno) [53] y proteasas degradadoras de la matriz, hasta su muerte final por necrosis o apoptosis.

Los macrófagos moribundos liberan sus contenidos lipídicos y factores tisulares, lo que conduce a la formación de un núcleo necrótico pro-trombótico. Este núcleo necrótico es un componente clave de las placas inestables, y contribuye a su ruptura y al coágulo de sangre intravascular resultante que subyace al infarto de miocardio y al derrame cerebral. Dado que los macrófagos de la placa son cruciales en la aterogénesis, los principales mecanismos relacionados con la actividad de los macrófagos, incluyendo la inflamación, el estrés oxidativo, el metabolismo de los lípidos y la proliferación, se consideran posibles dianas terapéuticas [54]. Es, por ello, que la producción de ROS juega un papel determinante en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

En la actualidad, se utilizan una amplia gama de fármacos para reducir la formación de la placa aterosclerótica, entre los principales fármacos están las estatinas, utilizadas para la reducción del colesterol sanguíneo inhibiendo la enzima HMG-CoA reductasa, que controla la velocidad de la vía del mevalonato, encargada de la producción de colesterol. Se ha logrado encapsular estatinas [55] para su liberación controlada y aumentar su efecto preventivo en la formación de la aterosclerosis, mediante el mecanismo arriba mencionado. Así mismo, se ha comprobado el efecto de las estatinas en la disminución de la producción de las especies reactivas de oxígeno [55]. Por lo tanto, realizamos una serie de ensayos *in vitro* para evaluar el efecto de nuestra nanoplataforma en la producción de ROS en macrófagos.

Se procedió a medir la producción de ROS después de 24 horas mediante el kit DCFDA en un grupo células sin ninguna modificación que actuaron como control negativo (-), un grupo de células estimuladas con el reactivo incluido en el kit, las cuales actuaron como control positivo (+), un grupo de células tratadas con LPS a 100 ng/mL y otro a 500 ng/mL, tres grupos de células estimuladas con 100 ng/mL de LPS y a las que se le agregaron distintas concentraciones de nanopartículas de PLGA, correspondientes a $1 \cdot 10^{10}$, $2 \cdot 10^{10}$ y $4 \cdot 10^{10}$ NP/mL se dejaron sin tratamiento alguno, transcurridas 24 horas, la mitad del grupo tratado con LPS fue tratado con nanopartículas durante 24 horas. Al finalizar este periodo de tratamiento se procedió a utilizar el kit siguiendo las indicaciones

del fabricante. Los resultados se obtuvieron al leer la placa de 96 pozos en un lector de fluorescencia FLUOstar Omega (BMG Labtech).

Como se muestra en la figura 18, la producción de ROS aumentó en las células RAW 264.7 estimuladas por LPS, mientras que con el tratamiento de las nanopartículas Atv@PLGA-Quitosano-miRNA, la sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno se suprimió significativamente de una manera independientemente de la dosis aplicada.

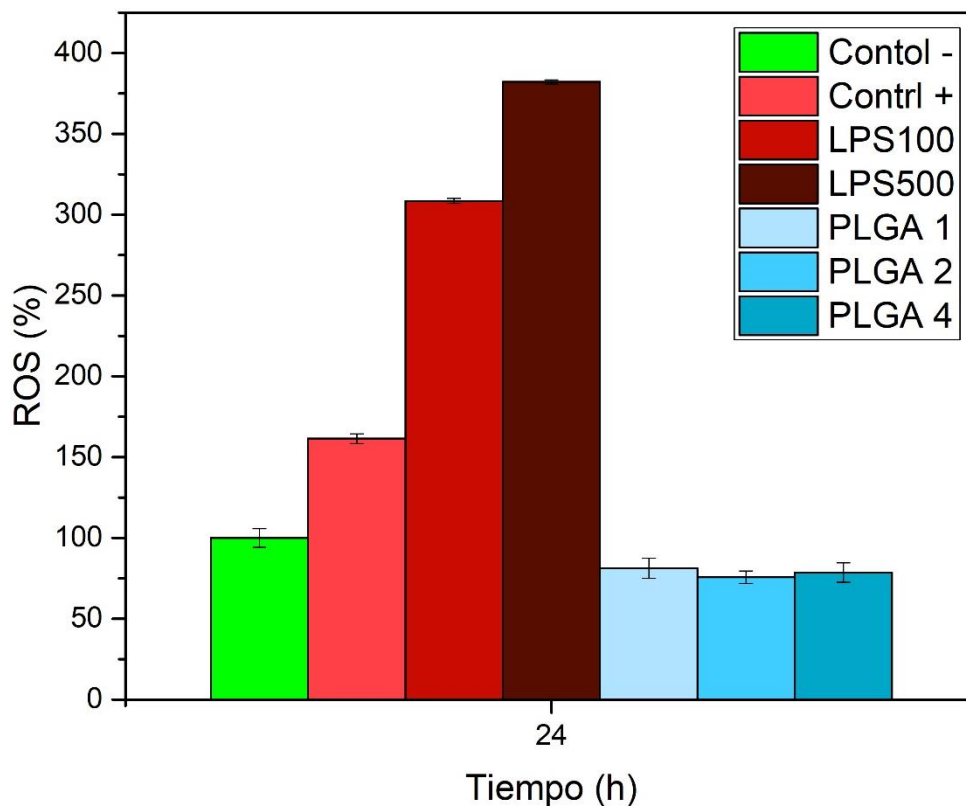


Figura 18. Producción de especies reactivas de oxígeno en células RAW 264.7 medida a 24 horas después de la estimulación con LPS y tratadas con distintas concentraciones de nanopartículas de Atv@PLGA-quitosano-miRNA. Promedio de múltiples mediciones independientes.

4.10.4 Internalización de nanopartículas con siRNA.

Como primera prueba de concepto, nuestra nanoplataforma fue funcionalizada con un siRNA acoplado a una sonda fluorescente de isotiocianato de fluoresceína (FTIC) para analizar la capacidad de internalización de la misma dentro de la célula. Se hicieron varios ensayos donde se tomaba como control negativo células sin nanopartículas ni

siRNA, como control positivo células con siRNA administrado libre a una concentración equivalente al material genético de las nanopartículas y, por último, nuestra nanoplataforma PLGA-quitosano-siRNA. Como se muestra en la Figura 19, las células control no muestran ninguna fluorescencia en el canal verde como es esperable.

El efecto específico de silenciamiento génico de los miRNA los convierte en herramientas útiles para la identificación y validación de objetivos en el descubrimiento y desarrollo de fármacos [57, 58].

Dado que los miRNA tienen múltiples dianas de mRNA y la alteración de sus funciones contribuye al desarrollo de muchas enfermedades, incluidos los cánceres, los trastornos neurodegenerativos y las enfermedades cardiovasculares, su uso clínico como biomarcadores y en el diagnóstico se está desarrollando rápidamente [59].

Además, tanto los siRNA como los miRNA tienen un enorme potencial como agentes terapéuticos. Pueden superar la limitación principal de las moléculas de fármacos pequeños tradicionales, que solo pueden dirigirse a ciertas clases de proteínas. Incluso para los medicamentos basados en proteínas, incluidos los anticuerpos monoclonales que son altamente específicos, sus objetivos se limitan principalmente a los receptores de la superficie celular o las proteínas circulantes.

Por el contrario, los siRNA y miRNA pueden regular negativamente la expresión de prácticamente todos los genes y sus transcripciones de mRNA. Dado que muchas enfermedades resultan de la expresión de genes no deseados o mutados, o de la sobreexpresión de ciertos genes normales, el descubrimiento de siRNA y miRNA abre un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades al identificar genes que están involucrados causalmente en el proceso patológico [60]. Se han investigado diversas estrategias, como la encapsulación o acomplejamiento con polímeros biocompatibles para mejorar su estabilidad en sistemas biológicos [65,66].

Considerando el papel que desempeñan los miRNA en los procesos de expresión de genes y la traducción a proteínas, en particular de la proteína interleucina 6 (IL-6) una de las promotoras de los procesos de inflamación celular y uno de los principales indicadores de formación de placa aterosclerótica, decidimos evaluar la capacidad de nuestra nanoplataforma de transportar material genético de interferencia, puntualmente miRNA, para silenciar la expresión del gen de la IL-6.

En la figura 19 se muestran también las imágenes de las células RAW 264.7 tratadas con 100 nmoles de siRNA fluorescente libre. En las imágenes podemos ver sitios donde hay una fluorescencia muy tenue en el canal verde, que implica una muy pequeña incorporación del siRNA, al interior celular como consecuencia de la gran degradación que sufre por las nucleasas plasmáticas y citoplasmáticas. La corta duración de los efectos silenciadores de los genes inhibidos por siRNA y miRNA libres junto con su mala estabilidad en los sistemas biológicos es uno de los principales obstáculos para su aplicación directa como agentes terapéuticos [61,62]. El siRNA/miRNA se degrada rápidamente por endo y exonucleasas y se elimina rápidamente por filtración renal debido a su masa molecular baja (~ 13 kDa) [63,64], por lo cual estos resultados eran esperados. Por otro lado, podemos observar que las células tratadas con nuestra nanoplataforma PLGA-quitosano-siRNA muestran un incremento en la fluorescencia con respecto a las células tratadas únicamente con siRNA libre gracias a la protección ofrecida por la nanopartícula y la liberación controlada y sostenida del agente génico en el tiempo dentro de las células.

Se ha demostrado que las nanopartículas poliméricas alteran y mejoran las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de varias moléculas bioactivas. Las propiedades mencionadas anteriormente de las nanopartículas poliméricas se pueden aplicar para superar algunas de las limitaciones de los enfoques de administración de fármacos tradicionales [66]. Las nanopartículas poliméricas se han utilizado *in vivo* para proteger el fármaco en la circulación sistémica y para administrar el fármaco a un ritmo controlado en el sitio de acción, al tiempo que minimiza los efectos secundarios indeseables [68]. Las nanopartículas basadas en polímeros son utilizadas, en múltiples ensayos, para la administración conjunta de siRNA y agentes terapéuticos. Las nanopartículas de PLGA han demostrado ser biocompatibles y no tóxicas en varios estudios [69,70].

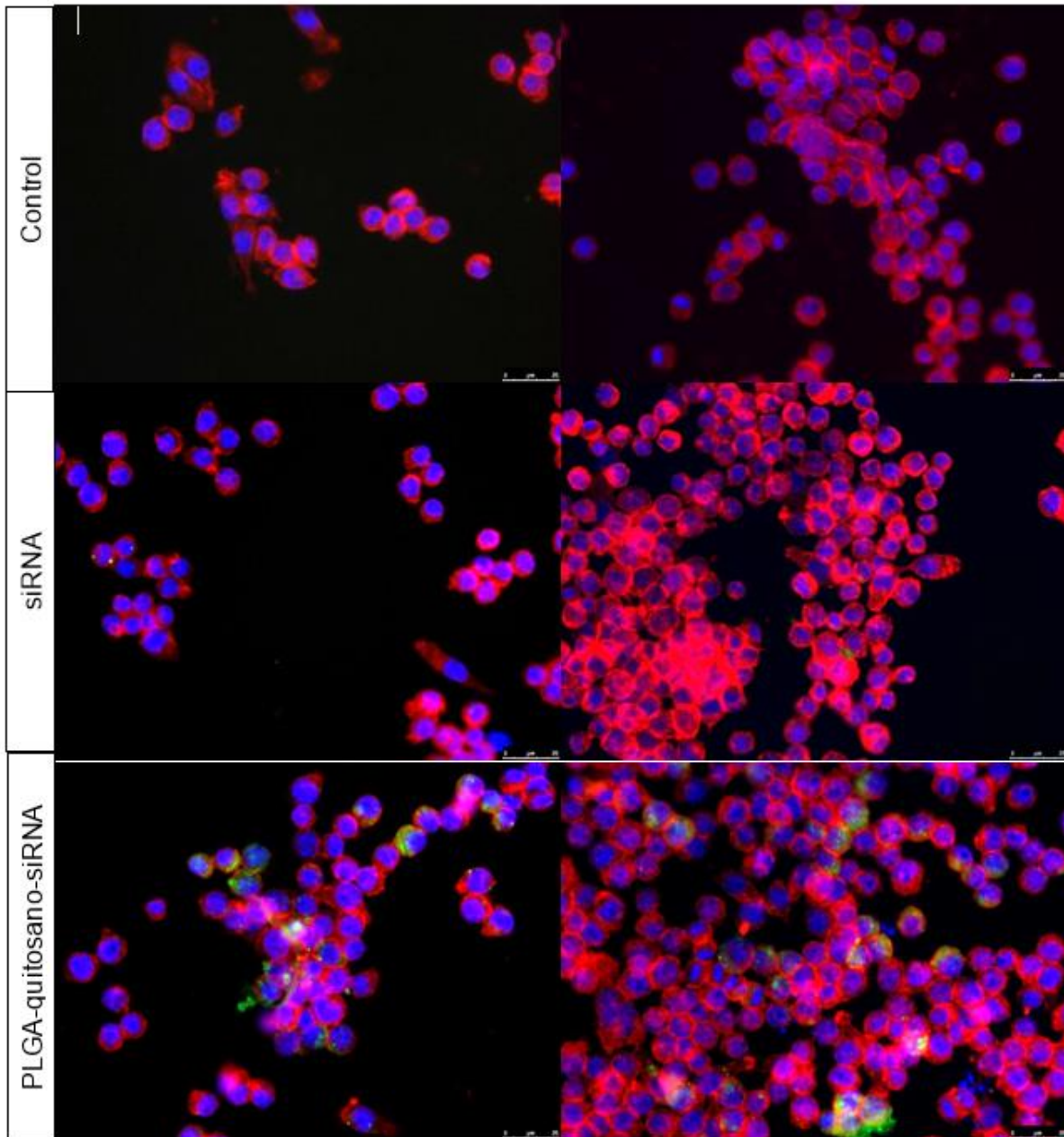


Figura 19. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la internalización de siRNA en células RAW 264.7 como control negativo de la internalización de miRNA. Los núcleos se tiñeron con DAPI (canal azul), membranas celulares con Bodipy-faloidina (canal rojo), mientras que el siRNA se modificó con una sonda FITC (canal verde).

4.10.5 Cambio de morfología.

Los macrófagos son críticos tanto para la respuesta inmune innata como para la adaptativa, debiendo desarrollarse y responder a cambios rápidos en el microambiente. La inflamación resultante de patógenos o daño tisular activa los macrófagos residentes para iniciar o aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores inflamatorios [71]. Sin embargo, los macrófagos son igualmente críticos en la resolución de la inflamación al producir citoquinas y quimiocinas antiinflamatorias y al aumentar la actividad fagocítica.

Sobre la base de los conceptos de polarización Th1/Th2 [72], los macrófagos fenotípicamente polarizados se denominan generalmente pro-inflamatorios M1 o que se activan de forma clásica, y antiinflamatorios M2 o alternativamente activados [73,74].

Experimentalmente, los macrófagos *in vitro* son polarizados al estado M1 mediante un tratamiento con IFN-g e inductores de TNF- α , como el lipopolisacárido (LPS) u otros productos bacterianos [75]. Los macrófagos M1 inducen la síntesis y regulación positiva de varias citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, entre las que se encuentran TNF- α , IL-12, IL-6, CCL2 e IL-1 β , así como una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno [76].

Las estatinas, como inhibidores de la reductasa de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), se usan ampliamente como fármacos reductores de los niveles de lípidos en sangre. En los últimos años, a las estatinas además se les han atribuido efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios, y se están utilizando en el tratamiento de enfermedades inmunológicas y cardiovasculares, como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la aterosclerosis [77,78,79].

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, a continuación, se procedió a evaluar la efectividad de nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-quitosano-miRNA para revertir el efecto de polarización de los macrófagos de ratón RAW 264.7.

Como se muestra en la Figura 20, las células control muestran una morfología esférica en las imágenes de microscopía de fluorescencia, sin cambio en su morfología y, por tanto, con un estado compatible a la ausencia de cualquier proceso inflamatorio.

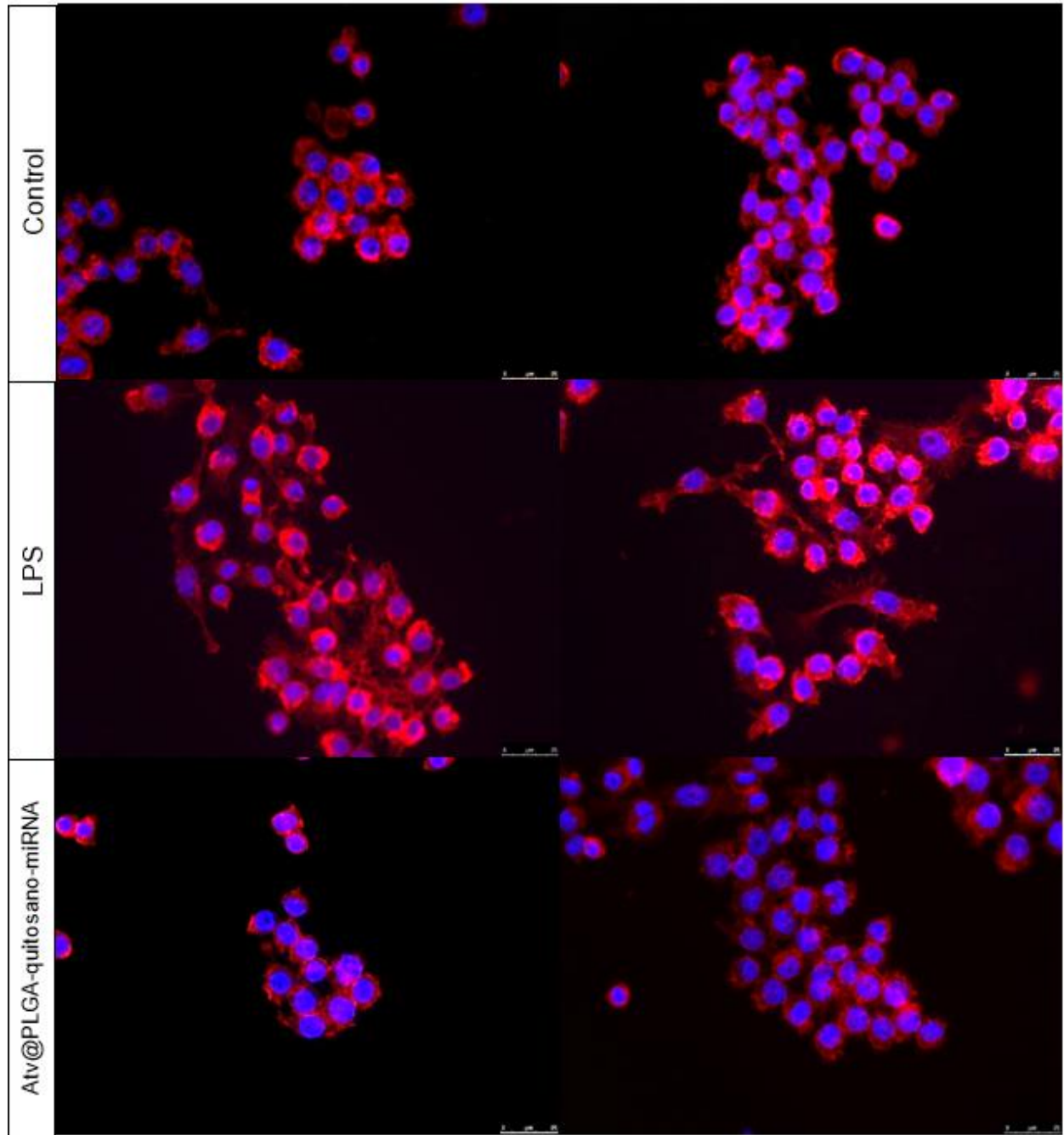


Figura 20. Imágenes de microscopía de fluorescencia del cambio en la morfología de células RAW 264.7. Los núcleos se tiñeron con DAPI (canal azul), membranas celulares con Bodipy-faloidina (canal rojo).

En la figura 20 se muestran las células estimuladas con LPS como control positivo, las cuales muestran una morfología polarizada, esto es, con ramificaciones en el citoesqueleto características del estado M2, proceso posterior a la reacción inflamatoria desencadenada por la liberación de TNF- α e IL-6.

De igual manera, se muestran las células estimuladas con LPS y posteriormente tratadas con nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-quitosano-miRNA. Estas células muestran una morfología cuasi-esférica, sin ramificaciones muy pronunciadas o evidentes en el citoesqueleto. Nuestro sistema tiene está funcionalizado con miR-124a, encargado de la inhibición de la expresión de los genes precursores de IL-6, uno de los principales afectores junto al TNF- α de la reacción de inflamación. Las imágenes son una evidencia de que nuestro sistema es capaz de detener el proceso inflamatorio inhibiendo la expresión de IL-6 y evitando la polarización de las células RAW 264.7. El proceso de polarización desencadena mediante procesos metabólicos posteriores la adhesión de los macrófagos a las células endoteliales y una posterior formación del ateroma.

Estos resultados nos indican que el tratamiento de las células con nuestro sistema Atv@PLGA-quitosano-miRNA no solo suprime la activación de la IL-6 estimulada por LPS, sino que también puede inhibir la polarización de las células RAW 264.7. Estos resultados concuerdan con resultados previamente obtenidos, por ejemplo, en células BV2 de microglia de ratón tratadas con simvastatina, otro fármaco de la familia de las estatinas. Los hallazgos de este estudio indicaron que el tratamiento previo de las células BV2 con simvastatina no solo suprime la activación de la vía de señalización de Notch (regulación de la expresión de Notch1, Jagged-1 y Hes1), sino que también puede inhibir la producción/secreción de marcadores de polarización M1 (IL-12T, TNF- α , iNOS y CD16/32) inducidos por LPS o la proteína Jagged/FC, mientras que regulan al alza los marcadores M2 (IL-10, Arg-1 y CD206) [80].

4.10.6 Internalización de Ox-LDL.

La aterosclerosis, que es reconocida mundialmente como una causa importante de enfermedad cardiovascular, es el resultado de una acumulación pasiva de colesterol en la pared arterial, como se comentó con anterioridad. Existe un creciente cuerpo de evidencia que respalda una asociación íntima de activación inmune y aterogénesis [81-84]. En los pasos iniciales de la aterogénesis, los monocitos se adhieren a la monocapa endotelial, migran a la capa íntima durante la disfunción endotelial y maduran a macrófagos, que captan activamente lipoproteínas de baja densidad (LDL) y/o LDL modificada, como LDL oxidada (Ox-LDL). La captación de Ox-LDL a través de receptores de eliminación (Scavenging Receptors, SR) conduce a la formación de macrófagos cargados de lípidos maduros, que se denominan células espumosas [84-86].

Los trastornos del metabolismo lipídico y las respuestas inflamatorias son las características patológicas más importantes en la progresión de la aterosclerosis. El aumento de la captación de Ox-LDL dio lugar a la acumulación de colesterol esterificado en macrófagos, promoviendo la formación de células espumosas y facilitando la progresión de la aterosclerosis [87, 88].

Por lo tanto, la aterosclerosis se considera un trastorno inflamatorio crónico y muchas investigaciones recientes demostraron el papel esencial de las quimiocinas, incluidas la interleucina-1 β (IL-1 β), la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en la progresión de la aterosclerosis. [81, 83, 85].

Dado que el evitar la polarización e inflamación de los macrófagos es de vital importancia para la formación de las células esponjosas y su posterior internalización en el tejido endotelial, se ha evaluado la eficacia de nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-quitosano-miRNA en la disminución o prevención de la internalización de Ox-LDL en células RAW 264.7.

Como se observa en la Figura 21, las células control muestran una internalización regular de Ox-LDL en las imágenes de microscopía de fluorescencia, las células control no muestran ningún proceso inflamatorio.

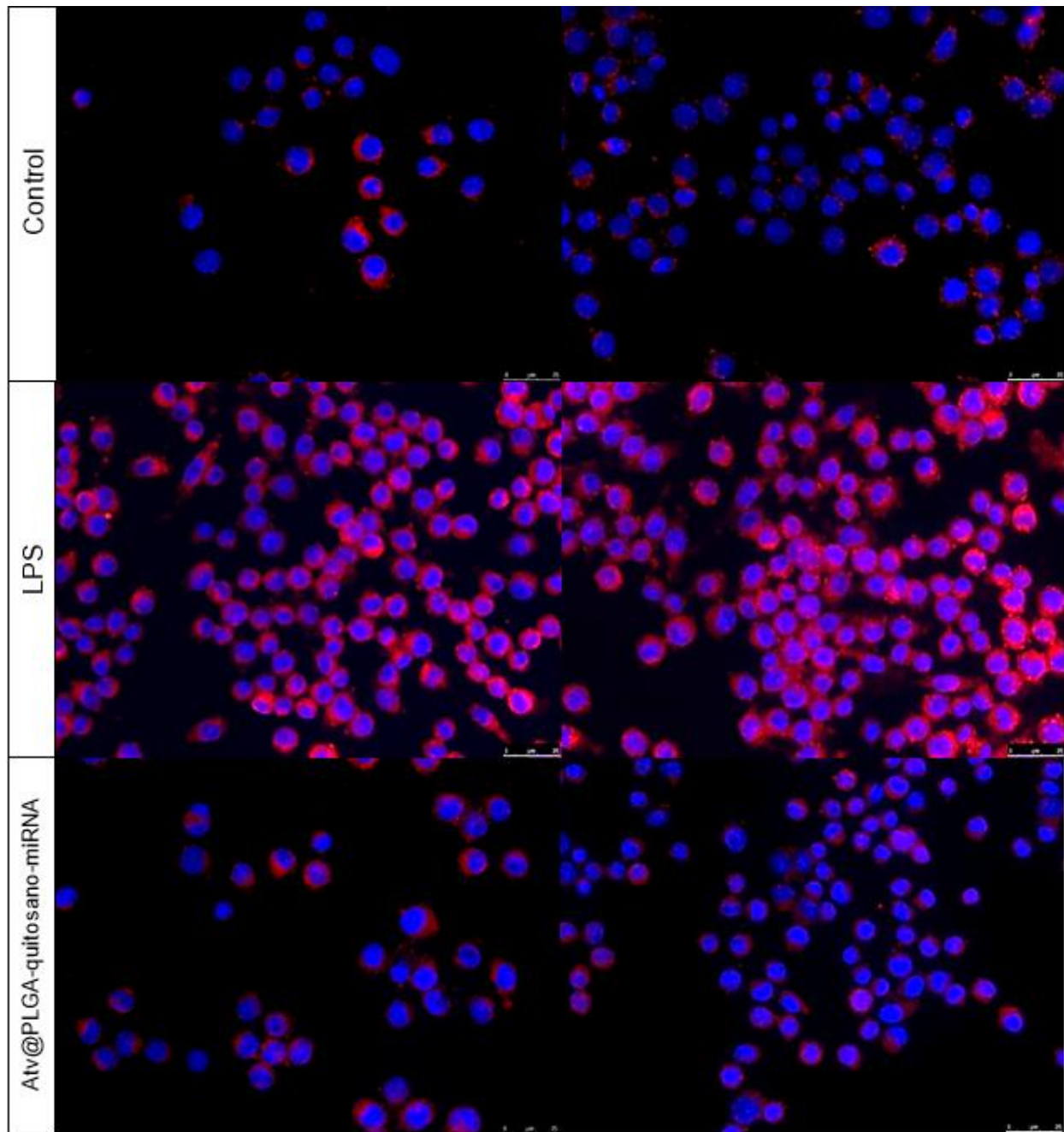


Figura 21. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la internalización de Ox-LDL en células RAW 264.7 En rojo se muestra la Dil Ox-LDL y en azul el núcleo celular teñido con DAPI.

En la figura 21 podemos ver las células control positivo estimuladas con LPS. Estas muestran una mayor internalización de Ox-LDL evidenciado por el aumento de la fluorescencia en el canal rojo de las imágenes del microscopio. Como se mencionó anteriormente, la estimulación con LPS desencadena una serie de eventos a nivel celular que promueven la inflamación con señales químicas mediadas por el TNF- α y la IL-6. Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos previamente en un estudio que demostró el aumento de la captación de Ox-LDL debido a la estimulación por LPS regulada por el receptor LOX-1 (Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) [89].

La proliferación y migración de las células musculares lisas, así como de los macrófagos de la monocapa endotelial a la capa íntima es fundamental para la progresión aterosclerótica. Normalmente, estas células están inactivas, rodeadas e incrustadas en un andamio de matriz extracelular (ECM), en el caso de las células musculares lisas, que actúa como una barrera para su migración y su proliferación y en el flujo sanguíneo en el caso de los macrófagos [90].

Durante el proceso de aterosclerosis, promovido por estímulos ambientales como la Ox-LDL, las células musculares lisas secretaron varias proteinasas que degradan la ECM y, a su vez, facilitan la proliferación y migración de las mismas [91].

Las células estimuladas con LPS y posteriormente tratadas con nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-quitosano-miRNA muestran unos niveles de internalización de Ox-LDL similares al de las células control. Ello es debido gracias a que nuestro sistema tiene encapsulado el fármaco atorvastatina, encargado de la inhibición de la reductasa de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), enzima fundamental en el metabolismo de lípidos y en específico de colesterol al interior de las células. Las imágenes son una evidencia de la capacidad de nuestro sistema para detener el proceso de internalización de Ox-LDL en las células RAW 264.7. y tiene, pues, un gran potencial como tratamiento para la prevención y tratamiento de la aterosclerosis.

4.10.7 Expresión de los receptores VCAM e ICAM-1.

Durante la inflamación, la presencia de células T activadas que producen citoquinas proinflamatorias induce la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas que permiten el reclutamiento de células inmunes, responsables del daño tisular [92,93]. Se sabe que las moléculas de adhesión desempeñan un papel importante en el reclutamiento de células T activas y específicas y otros leucocitos en el tejido inflamatorio [94].

Entre muchos de los receptores de la superficie de las células endoteliales, la molécula de adhesión endotelial constitutiva transmembrana de tipo I (ICAM-1 o CD54) es un buen candidato para lograr este fin [95]. La ICAM-1 i) está expuesta a la sangre principalmente por las células endoteliales y fácilmente accesible a la circulación, ii) es regulada por factores patológicos y iii) está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades, incluida la inflamación, isquemia-reperfusión, aterosclerosis, trombosis y estrés oxidativo [96-99]. Debido al último factor, el bloqueo de la interacción de los leucocitos con ICAM-1 proporciona efectos antiinflamatorios beneficiosos [100, 101].

VCAM-1 e ICAM-1 son dos moléculas de adhesión principales de la familia de las integrinas. En trabajos previos se ha encontrado que su expresión aumenta en las células del epitelio pigmentario de la retina vascular endotelial y retiniana en el ojo humano durante la inflamación intraocular [102-104]. En ratones, la implicación de VCAM-1 e ICAM-1 en la migración de linfocitos T a través de monocapas de células endoteliales hacia la capa íntima se confirmó mediante estudios *in vitro* [105-107].

La aterosclerosis es una enfermedad focal que afecta a regiones discretas de la vasculatura, como curvaturas de vasos y bifurcaciones [108]. Estas regiones se caracterizan por un flujo oscilatorio perturbado [109] que induce moléculas de adhesión proinflamatorias como la ICAM-1 y la VCAM-1 [110]. Así, el aumento de la expresión de las moléculas de adhesión por el endotelio activado es una característica crítica de la aterosclerosis. La primera evidencia provino de datos que muestran que la expresión de VCAM-1 es inducida por células endoteliales arteriales en respuesta a la acumulación de colesterol dentro de la íntima de las aortas [111].

La regulación al alza de la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 endotelial en células HUVEC estimuladas con TNF- α y la posterior adhesión elevada de monocitos a HUVEC por

aldosa reductasa es otro mecanismo posible de la regulación de la expresión de moléculas de adhesión [112]. Más evidencias de que la expresión de VCAM-1 está regulada por factores pro-aterogénicos provienen de un estudio que demostró la regulación positiva inducida por Ox-LDL de VCAM-1 [113].

Por estas razones, se procedió a evaluar la capacidad de regulación de la expresión de receptores VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales de tejido vascular (HUVEC) “inflamadas” de nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-quitosano-miRNA funcionalizadas con el anticuerpo Anti-VCAM.

Podemos observar en la Figura 22 que las células HUVEC normales, esto no expuestas a LPS, no expresan los receptores de ICAM-1 ni VCAM como consecuencia a no haber sido estimuladas ni sujetas a procesos de inflamación. Por ello, únicamente los núcelos teñidos en azul son visibles.

En la Figura 22 se muestran las células HUVEC estimuladas con LPS para la inducción de una reacción inflamatoria. Así, podemos ver la sobreexpresión de los receptores antes mencionados, en rojo los receptores de VCAM y en verde los receptores de ICAM-1, respectivamente. Como se mencionó previamente, la sobreexpresión de estos receptores se ve muy incrementada por los afectores de la inflamación como son TNF- α e IL-6. También en la misma figura se pueden observar zonas de color naranja, que indican zonas de co-localización de ambos receptores (el color naranja es el resultante de la superposición de las señales del canal verde y el canal rojo del microscopio).

Las integrinas, como ICAM-1 y VCAM, median las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular y la interacción célula-patógeno. Así mismo, regulan la huida de leucocitos, organizan la sinapsis inmunológica, participan en la co-estimulación, la migración y la fagocitosis. Las integrinas cambian rápidamente la conformación de su estructura de dominio extracelular (señalización interna) [114] y pueden agruparse en respuesta a la activación [115], como se observa en este trabajo.

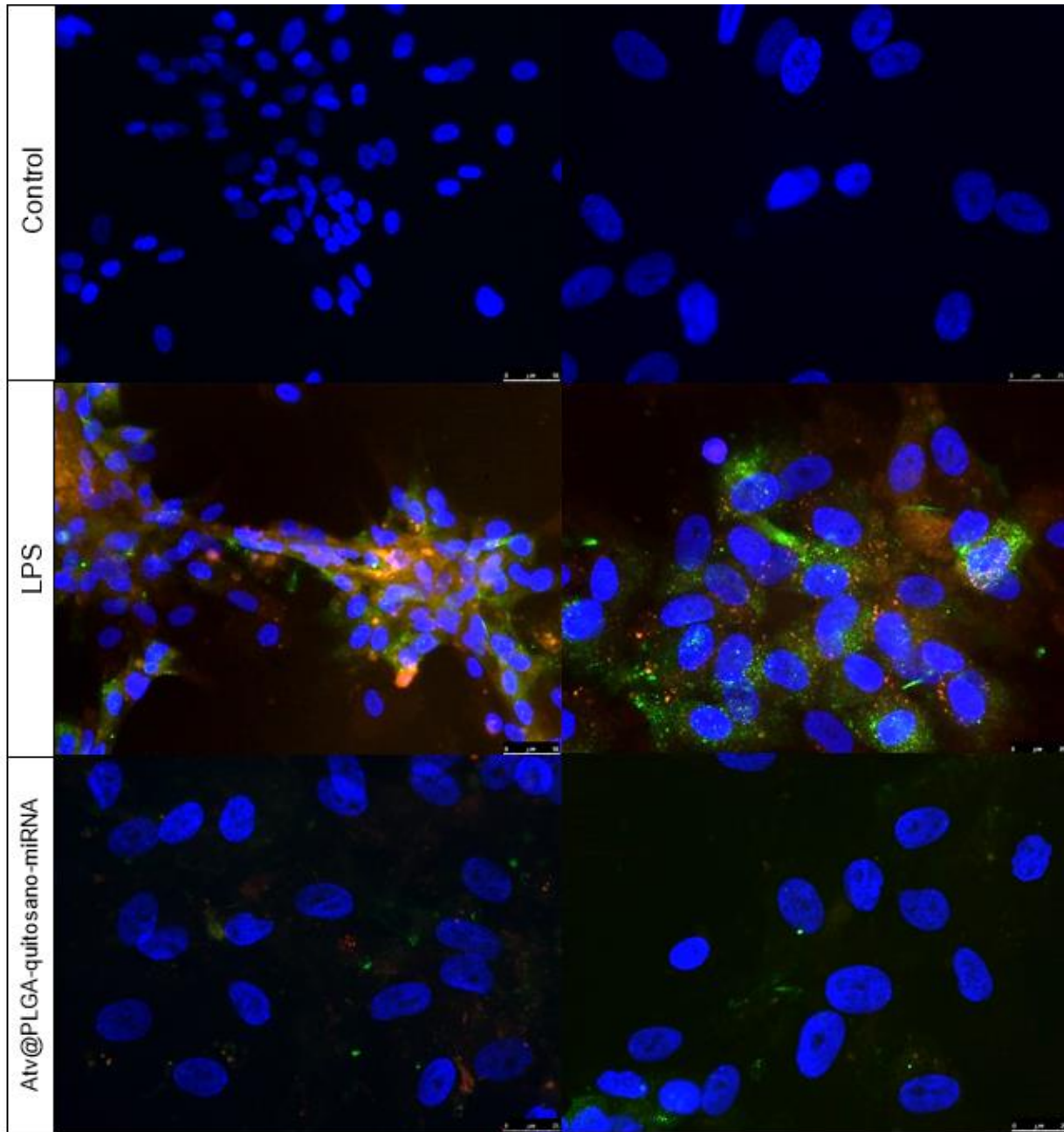


Figura 22. Imágenes de microscopía de fluorescencia de la expresión de los receptores de ICAM-1 y VCAM. En azul se muestra el núcleo celular.

Merece la pena destacar que en un trabajo previo se encontró que, el tratamiento de las células musculares lisas con TNF- α provoca un aumento tanto en el mRNA de VCAM-1 como en la expresión en la superficie celular del VCAM-1, lo que sugiere una expresión dependiente de citoquinas de VCAM-1 en la arteria aorta, [116] y evidencia el papel fundamental que tienen estas integrinas en el desarrollo de la aterosclerosis.

También se puede observar que las células HUVEC estimuladas con LPS y tratadas con nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-quitosano-miRNA, favorecen la disminución de la expresión de los receptores ICAM-1 y VCAM. Por tanto, nuestro sistema de nanopartículas fue capaz de disminuir la reacción inflamatoria provocada por el lipopolisacárido inhibiendo la síntesis de IL-6 y, por ende, evitando la propagación del proceso inflamatorio.

ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO

4.11.1 Análisis FACS de la captación celular de Ox-LDL por células RAW 264.7 y HUVEC.

La aterosclerosis es la principal causa de enfermedades cardiovasculares y es la causa número uno de mortalidad en todo el mundo [117]. La inflamación arterial se inicia por la retención subendotelial de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en plasma, y se ve reforzada por la modificación oxidativa de estas lipoproteínas, que desencadena una afluencia de monocitos, como se comentó con anterioridad [118].

En particular, las placas ateroscleróticas que causan eventos clínicos se caracterizan por la persistencia de macrófagos engordados por el colesterol en las placas arteriales. Aunque la acumulación de macrófagos en la pared arterial se ha considerado durante mucho tiempo un inductor importante de la inflamación crónica, el mecanismo que regula la formación de células espumosas de macrófagos y su retención dentro del ateroma sigue siendo en gran medida desconocido.

En la etapa temprana de la placa o cuando cede la aterosclerosis, los macrófagos poseen la capacidad activa de migrar. Mientras que a medida que avanza la aterosclerosis, se forman células espumosas y pierden la capacidad de migración. Varios estudios confirmaron que el equilibrio entre la retención y las señales de migración contribuye a

la acumulación de macrófagos en las placas, que es un factor importante de la patogénesis de la aterosclerosis [119,120].

La lipoproteína de baja densidad (LDL) es un factor de riesgo conocido para la aterosclerosis [121,122]. Las LDL circulantes se pueden modificar, generando LDL oxidadas (Ox-LDL), LDL mínimamente modificadas (mmLDL) y otras formas biológicamente activas que inician procesos inflamatorios [123-125]. Aunque los mecanismos de oxidación de LDL no se comprenden completamente, la mieloperoxidasa, la ceruloplasmina, la 15-lipoxigenasa, el óxido nítrico sintasa, la NAD (P) H y la xantina oxidasa se han implicado en la generación de Ox-LDL [126]. El Ox-LDL en circulación, y especialmente el Ox-LDL que se encuentra en el tejido [127], afecta el estado inflamatorio del endotelio. Ox-LDL y mmLDL, pero no las LDL nativas inducen la expresión de P-selectina y la adhesión de monocitos al endotelio activado [128,129].

Dada la importancia que tiene la Ox-LDL y el papel que desempeña en la progresión de la aterosclerosis y el reclutamiento de nuevos macrófagos para la construcción de la placa aterosclerótica, se realizó un análisis cuantitativo mediante FACS de la internalización de Ox-LDL en células RAW 264.7 y HUVEC para completar los estudios cualitativos realizados por imágenes de microscopia de fluorescencia.

En la figura 23 se observa un cambio en la intensidad de la fluorescencia de la sonda Dil-Ox-LDL en las células RAW 264.7, se muestran las células sin estimulación, las células estimuladas con LPS y las células estimuladas con LPS y tratadas con nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-Quitano-miRNA.

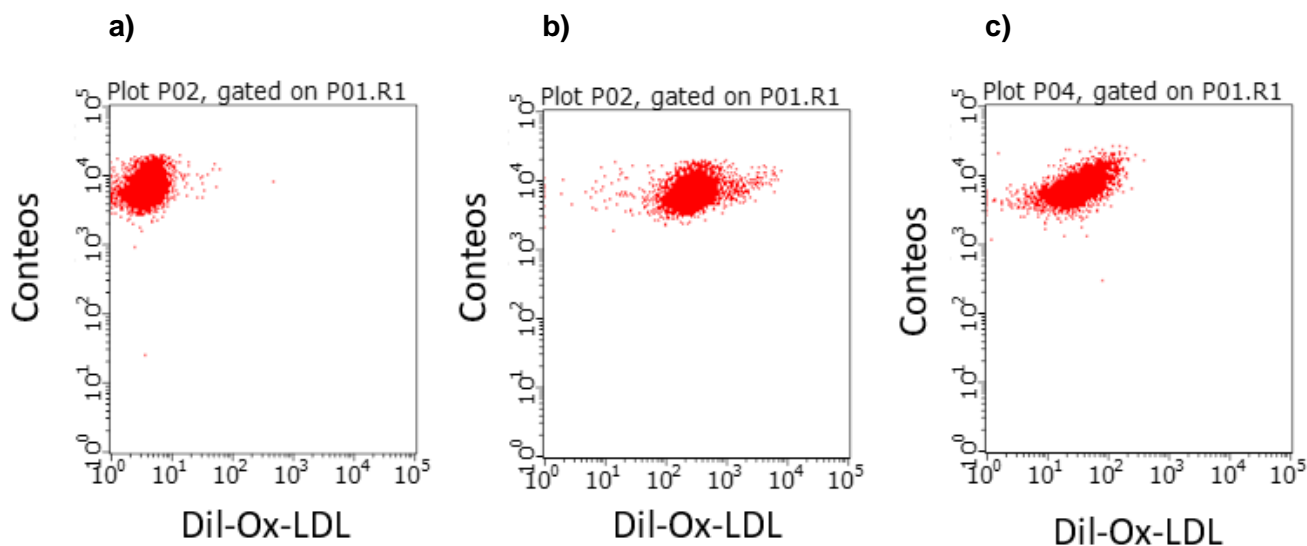


Figura 23. Gráficas de FACS donde se muestran la intensidad de la fluorescencia de la Dil-Ox-LDL de: a) células RAW 264.7, b) células RAW 264.7 estimuladas con LPS, y c) células RAW 264.7 estimuladas con LPS y tratadas con nanopartículas de Atv@PLGA-quitosano-miRNA.

Se hace evidente la disminución en la intensidad que concuerda con las imágenes de microscopia de fluorescencia, la acción del mRNA de las nanopartículas de inhibir la producción de IL-6 y el efecto del fármaco atorvastatina para bloquear la síntesis de colesterol y las rutas metabólicas de lípidos ayuda a disminuir la internalización de la Ox-LDL en las células RAW 264.7.

Para el caso de las células HUVEC, podemos observar en la Figura 24 las gráficas del cambio en la intensidad de la fluorescencia de la Dil-OxLDL medida mediante FACS. Se midieron células HUVEC como blanco negativo, células HUVEC estimuladas con LPS como blanco positivo y células HUVEC estimuladas con LPS y tratadas con nuestro sistema de nanopartículas Atv@PLGA-Quitosano-miRNA.

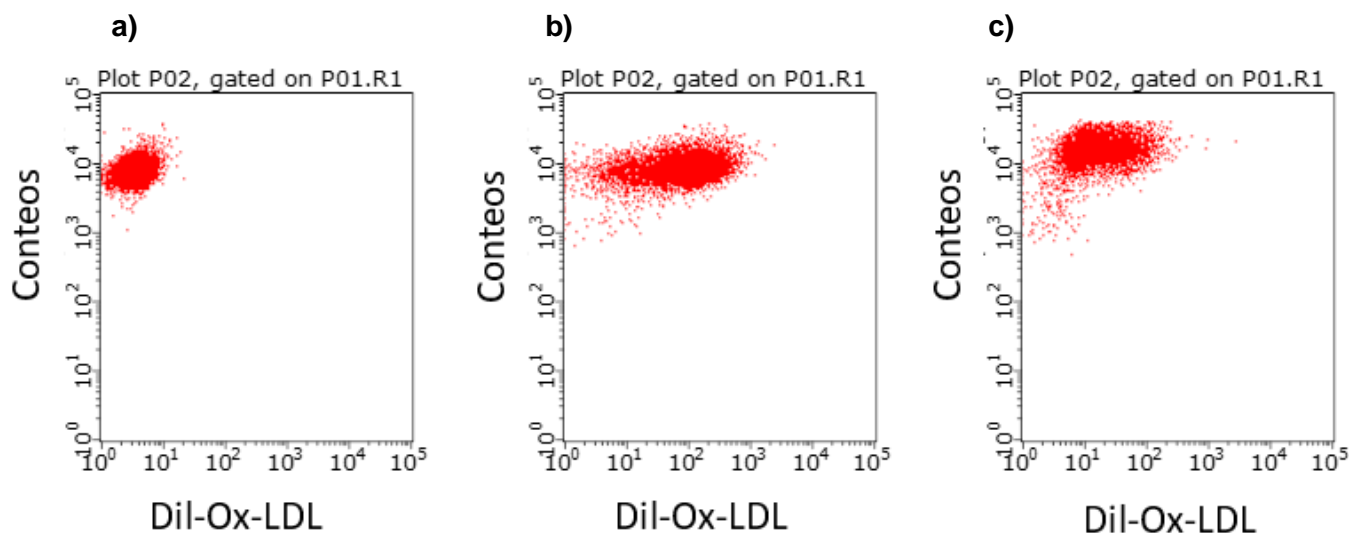


Figura 24. Gráficas de FACS donde se muestran la intensidad de la fluorescencia de Dil-Ox-LDL de a) células HUVEC, b) células HUVEC estimuladas con LPS y c) células HUVEC estimuladas con LPS y tratadas con nanopartículas Atv@PLGA-Quitosano-miRNA.

La extravasación de leucocitos a través de la barrera endotelial es un requisito fundamental en una amplia variedad de escenarios fisiológicos y patológicos, que incluyen inmunidad e inflamación. Este fenómeno es un proceso activo y en varias etapas que requiere cambios morfológicos drásticos que involucran la agrupación de receptores de adhesión citoesqueléticos en los leucocitos y las células endoteliales [130]. Entre los receptores de adhesión, las integrinas $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) y $\alpha_L\beta_2$ (LFA 1) desempeñan un papel importante en la adherencia estrecha de los leucocitos al endotelio [131]. Sus ligandos principales en el endotelio son la molécula de adhesión celular vascular VCAM y la molécula de adhesión intercelular ICAM-1, respectivamente [132, 133]. La ICAM-1, pero no la VCAM, se expresa básicamente en las células en reposo, y ambas moléculas se inducen tras la activación de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- α [134]. Gracias a esto, nuestro sistema es capaz de reducir la captación de Ox-LDL y reducir la inflamación tanto en los macrófagos (células RAW 264.7) como en las células endoteliales inflamadas (células HUVEC), controlando el proceso inflamatorio y evitando la internalización de los macrófagos hacia la zona íntima del tejido endotelial.

CONCLUSIONES

Como una segunda revolución industrial la nanotecnología ofrece infinidad de herramientas a desarrollar en los próximos años con un potencial impacto en las ciencias ambientales, la electrónica, las ciencias de materiales y las ciencias biológicas. En este último reviste un gran interés el campo de la biomedicina, en el cual son muchos y diversos los nuevos tratamientos que surgen como alternativas para la detección, marcaje, imagenología, tratamiento y terapia de enfermedades de impacto mundial, como lo son el cáncer, las enfermedades infecto-contagiosas y enfermedades cardiovasculares a base de plataformas nanotecnológicas.

La prevalencia de las enfermedades cardiovasculares (ECV) como la principal causa de muerte a nivel mundial es un tema a tener en consideración, de ahí la importancia de crear nuevos métodos terapéuticos de bajo costo, de fácil aplicación y de un prolongado efecto. La simplificación y el abaratamiento de cosas es una de las directrices fundamentales a la hora de fabricar nanodispositivos con fines terapéuticos puesto que, pese a lo que podría creerse, las ECV afectan principalmente a países del tercer mundo.

En nuestro trabajo, fue posible la formación de partículas de PLGA en escala nanométrica, recubrirlas con el polímero natural quitosano y acomplejar material genético (miRNA) a la superficie de las partículas. Una vez realizadas las pruebas de caracterización de potencial zeta y dispersión dinámica de luz se demostró que nuestras nanopartículas poseen una morfología esférica homogénea y estable.

Logramos encapsular el fármaco Atorvastatina en las nanopartículas de PLGA. Fue posible acomplejar por interacciones electrostáticas moléculas de Quitosano en la superficie de nuestras nanopartículas de PLGA y utilizar los grupos NH_3 del quitosano para anclar el anticuerpo Anti-VCAM, que sirve tiene la función de direccionamiento de nuestras nanopartículas hacia las células esponjosas involucradas en el proceso de formación de la placa de ateroma.

Nuestras nanopartículas no resultaron ser tóxicas después de realizados los estudios de viabilidad celular en células RAW 264.7 e incluso mostraron una reversión en el daño ocasionado por los lipopolisacáridos. Se investigó la capacidad de nuestras

nanopartículas recubiertas para internalizarse a las células, administrar la carga y silenciar la expresión del gen de interés mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Los datos obtenidos indicaron que las nanopartículas son capaces de ingresar a las células sin requerir agentes de transfección adicionales y una vez dentro, pueden liberar el miRNA. Esto fue corroborado por la disminución de la cantidad de IL-6 en el medio de cultivo de las células tratadas con nuestro sistema de nanopartículas, medido mediante ensayos ELISA.

De igual manera se evaluó la capacidad de nuestro nanosistema de inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células RAW 264.7 obteniendo resultados positivos, ya que la utilización de un fármaco con capacidades antiinflamatorias y el uso de miRNA contra IL-6, (principal efector de proceso inflamatorio el cual desencadena la producción de ROS) inhibición la producción de dichos subproductos.

Todo lo anterior refuerza el planteamiento de que nuestro sistema de nanopartículas de terapia dual tiene potencial para su uso en el tratamiento de la aterosclerosis.

REFERENCIAS

- [1] Anderson RH, Loukas M. The importance of attitudinally appropriate description of cardiac anatomy. *Clin Anat* 2009; 22: 47e51.
- [2] Loukas M, Groat C, Khangura R, Owens DG, Anderson RH. The normal and abnormal anatomy of the coronary arteries. *Clin Anat* 2009; 22: 114e28.
- [3] World Health Organization, Cardiovascular Diseases (CVDs), 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (accessed 09.08.16).
- [4] Xu, Y.; Arai, H.; Murayama, T.; Kita, T.; Yokode, M. Hypercholesterolemia Contributes to the Development of Atherosclerosis and Vascular Remodeling by Recruiting Bone Marrow-Derived Cells in Cuff-Induced Vascular Injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 363, 782–7.
- [5] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011;17:1410-22.
- [6] Boyle, J. J. Macrophage Activation in Atherosclerosis: Pathogenesis and Pharmacology of Plaque Rupture. *Curr Vasc. Pharmacol.* 2005, 3, 63–8.
- [7] Van de Werf F, Bax J, Betriu A. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST segment elevation: the Task Force on the Management of ST segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2008;29:2909-45.
- [8] Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro Jh. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary síndromes (part I). *N Engl J Med.* 1992;326:242-50, 3108.
- [9] ACCESS Investigators. Management of acute coronary syndromes in developing countries: acute coronary events-a multinational survey of current management strategies. *Am Heart J.* 2011 Nov; 162(5):852-9.
- [10] G. Vunjak-Novakovic, K.O. Lui, N. Tandon, K.R. Chien, Bioengineering heartmuscle: a paradigm for regenerative medicine, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 13 (2011) 245–267.
- [11] Bhushan M, editor. Springer handbook of nanotechnology. 3rd ed., Berlin: Springer-Verlag; 2010.
- [12] Barros ALB, Soares DCF. Theranostic nanoparticles: imaging and therapy combined. *J Mol Pharm Org Process Res* 2014;2:e113.
- [13] E. Ruvinov, Y. Sapir, S. Cohen, *Cardiac Tissue Engineering: Principles, Materials, and Applications*, Morgan & Claypool Publishers, 2012.
- [14] Formiga FR. et al. Controlled delivery of fibroblast growth factor-1 and neuregulin 1 from biodegradable microparticles promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model through activation of endogenous regeneration. *Journal of Controlled Release* 173 (2014) 132–139.

- [15] T. Simón-Yarza, F.R. Formiga, E. Tamayo, B. Pelacho, F. Prosper, M.J. Blanco-Prieto, PEGylated-PLGA microspheres containing VEGF for long term drug delivery, *Int. J. Pharm.* 440 (1) (2013) 13–18.
- [16] Chang MY, Yang YJ, Stayton PS. Functionalized nanoparticles provide early cardioprotection after acute myocardial infarction *Journal of Controlled Release* 170 (2013) 287–294.
- [17] Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Lévy F, Henry J P, Cao R, Schapman D, Dautreux B, Lallemand F et al (2011) Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation* 124:1059–1069.
- [18] Alsberg, E., Anderson, K., Albeiruti, A., Franceschi, R., Mooney, D., 2001. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J. Dent. Res.* 80, 2025–2029.
- [19] M.C. Peters, B.C. Isenberg, J.A. Rowley, D.J. Mooney, Release from alginate enhances the biological activity of vascular endothelial growth factor, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9 (1998) 1267–1278.
- [20] X. Hao, E.A. Silva, A. Månsson-Broberg, K.H. Grinnemo, A.J. Siddiqui, G. Dellgren, E. Wårdell, L.A. Brodin, D.J. Mooney, C. Sylvén, Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction, *Cardiovasc. Res.* 75 (2007) 178–185.
- [21] J. Yu, K.T. Du, Q. Fang, Y. Gu, S.S. Mihardja, R.E. Sievers, J.C. Wu, R.J. Lee, The use of human mesenchymal stem cells encapsulated in RGD modified alginate microspheres in the repair of myocardial infarction in the rat, *Biomaterials* 31 (2010) 7012–7020.
- [22] E. Ruvinov, J. Leor, S. Cohen, The effects of controlled HGF delivery from an affinitybinding alginate biomaterial on angiogenesis and blood perfusion in a hindlimb ischemia model, *Biomaterials* 31 (2010) 4573–4582.
- [23] R. G. Gomez-Mauricio, A. Acarregui, F. M. Sánchez-Margallo et al., “A preliminary approach to the repair of myocardial infarction using adipose tissue-derived stem cells encapsulated in magnetic resonance-labelled alginate microspheres in a porcine model,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 84, no. 1, pp. 29–39, 2013.
- [24] Shevtsov MA, Nikolaev BP, Ryzhov VA. Detection of experimental myocardium infarction in rats by MRI using heat shock protein 70 conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12 (2016) 611–621.
- [25] Au KW, Liao SY, Lai WH. Effects of iron oxide nanoparticles on cardiac differentiation of embryonic stem cells/ *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379 (2009) 898–903.

- [26] Broide DH, Sullivan S, Gifford T, Sriramarao P. Inhibition of pulmonary eosinophilia in P-selectin and ICAM-1-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;18:218-225.
- [27] Bhowmick T, Berk E, Cui X, Muzykantov VR. Effect of flow on endothelial endocytosis of nanocarriers targeted to ICAM-1. *Journal of Controlled Release* 157 (2012) 485–492.
- [28] Lee GY, Kim JH, Choi KY, Yoon HY. Hyaluronic acid nanoparticles for active targeting atherosclerosis. *Biomaterials* 53 (2015) 341e348.
- [29] Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, Suzuki M, Matsumura Y, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J Controlled Release* 2001;74:295–302.
- [30] Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsumoto Y, Hattori T, Oi K, Matsuda T, Kataoka K, Takeshita A. Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats. *Circ Res* 2003;92:e62–9.
- [31] Chan JM, Rhee JW, Drum CL, Bronson RT, Golomb G, Langer R, Farokhzad OC. In vivo prevention of arterial restenosis with paclitaxel-encapsulated targeted lipid-polymeric nanoparticles. *Proc Nat Acad Sci USA* 2011;108:19347–52.
- [32] Panyam J, Labhasetwar V. Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles. *Mol Pharm* 2004;1:77–84.
- [33] Hehir S, Plour NM, Gu L, Poree DE, Welsh WJ, Moghe PV, Uhrich KE. Carbohydrate composition of amphiphilic macromolecules influences physicochemical properties and binding to atherogenic scavenger receptor A. *Acta Biomater* 2012;8:3956–62.
- [34] Hou X, Zhang T, Cao A. Preparation of new amphiphilic macroporous nonwoven polymeric adsorbents aimed for selective removal of low-density lipoprotein from plasma. *J Biomed Mater Res Part B* 2015;103:52–61.
- [35] Nikitina NA, Khalilov EM, Torkhovskaya TI, Tertov VV, Orekhov AN. Polyunsaturated phosphatidylcholine micelle-induced decrease of atherogenicity of the serum in vitro. *Bull Exp Biol Med* 1995;119:480–3.
- [36] Li J, Hou Y, Chen X, Ding X, Liu Y, Shen X, Cai K. Recyclable heparin and chitosan conjugated magnetic nanocomposites for selective removal of low-density lipoprotein from plasma. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25:1055–64.
- [37] Yu YT, Zhu H, Wang S. Amphiphilic polyvinyl alcohol adsorbent for the removal of low-density lipoprotein. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2015;43:117–23.
- [38] Tang J, Sheng Y, Hu H, Shen Y. Macromolecular MRI contrast agents: structures, properties and applications. *Prog Polym Sci* 2013;38:462–502.
- [39] Marrache S, Dhar S. Biodegradable synthetic high-density lipoprotein nanoparticles for atherosclerosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 2013;110:9445–50.

- [40] Park K, Hong HY, Moon HJ, Lee BH, Kim IS, Kwon IC, Rhee K. A new atherosclerotic lesion probe based on hydrophobically modified chitosan nanoparticles functionalized by the atherosclerotic plaque targeted peptides. *J Controlled Release* 2008;128:217–23.
- [41] Hwang H, Kwon J, Oh PS, Lee TK, Na KS, Lee CM, Jeong HS, Lim ST, Sohn MH, Jeong HJ. Peptide-loaded nanoparticles and radionuclide imaging for individualized treatment of myocardial ischemia. *Radiology* 2014;273:160–7.
- [42] V. Kvande, P. Kiekens, Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR, *Carbohydr. Polym.* 58 (2004) 409–416.
- [43] P.N. Thanki, D. Edith, J.L. Six, Surface characteristics of PLA and PLGA films, *Appl. Surf. Sci.* 253 (2006) 2758–2764.
- [44] Lundberg, A.M. & Hansson, G.K. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin. Immunol.* 134, 5–24 (2010).
- [45] Jean Gaschignard et. al. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 59(2), undefined (2014) 4-25.
- [46] Coker, R.K., Laurent, G.J., 1998. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur. Respir. J.* 11, 1218–1221.
- [47] Kanno, S.I., Shouji, A., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Ujibe, M., Obara, Y., Nakahata, N., Ishikawa, M., 2006. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 78, 673–681.
- [48] Adamson, S. & Leitinger, N. Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. *Curr. Opin. Lipidol.* 22, 335–342 (2011).
- [49] Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33, S498–S501.
- [50] Stohs, S. J. (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 6, 205–228.
- [51] Moore, K. J. & Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341–355 (2011).
- [52] Randolph, G. J. Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 462–468 (2008).
- [53] Huang, D. J., Ou, B. X., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. Highthroughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4437–4444. (2002).

- [54] R.L. Tiwari, V. Singh, M.K. Barthwal, Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis, *Med. Res. Rev.* 28 483–544 (2008).
- [55] R. Duivenvoorden, J. Tang, D.P. Cormode, A.J. Mieszawska, D. Izquierdo-Garcia, C.Ozcan, et al., A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation, *Nat. Commun.* 5 3065 (2014).
- [56] A. Alaarg et al. Multiple pathway assessment to predict anti-atherogenic efficacy of drugs targeting macrophages in atherosclerotic plaques, *Vascular Pharmacology* 82 51–59 (2016).
- [57] Perwitasari, O, Bakre, A, Tompkins, SM and Tripp, RA. siRNA Genome Screening Approaches to Therapeutic Drug Repositioning. *Pharmaceuticals (Basel)* 6: 124–160 (2013).
- [58] Drosopoulos, K and Linardopoulos, S. Integration of RNAi and small molecule screens to identify targets for drug development. *Methods Mol Biol* 986: 97–104 (2013).
- [59] Hayes, J, Peruzzi, PP and Lawler, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med* 20: 460–469 (2014).
- [60] Jenny KW Lam, Michael YT Chow, Yu Zhang, Susan WS Leung, siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy—Nucleic Acids* 4, e252 (2015).
- [61] S. Gao, F. Dagnaes-Hansen, E.J. Nielsen, J. Wengel, F. Besenbacher, K.A. Howard, J. Kjems, The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice, *Mol. Ther.* 17 1225–1233 (2009).
- [62] E. Fattal, A. Bochot, State of the art and perspectives for the delivery of antisense oligonucleotides and siRNA by polymeric nanocarriers, *Int. J. Pharm.* 364 237 248 (2008).
- [63] S. Akhtar, I.F. Benter, Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo, *J. Clin. Invest.* 117 3623–3632 (2007).
- [64] S. Weinstein, D. Peer, RNAi nanomedicines: challenges and opportunities within the immune system, *Nanotechnology* 21 232001 (2010).
- [65] N.R. de Franca, D. Mesquita Junior, A.B. Lima, F.V. Pucci, L.E. Andrade, N.P. Silva, RNA interference: a new alternative for rheumatic diseases therapy, *Rev. Bras. Reumatol.* 50 695–702 (2010).
- [66] S. Gao, F. Dagnaes-Hansen, E.J. Nielsen, J. Wengel, F. Besenbacher, K.A. Howard, J. Kjems, The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice, *Mol. Ther.* 17 1225–1233 (2009).
- [67] F.R. Wurm, C.K. Weiss, Nanoparticles from renewable polymers, *Front. Chem.* 2 49 (2014).

- [68] C.Z. Wang, Y.C. Fu, S.C. Jian, Y.H. Wang, P.L. Liu, M.L. Ho, C.K. Wang, Synthesis and characterization of cationic polymeric nanoparticles as simvastatin carriers for enhancing the osteogenesis of bonemarrow mesenchymal stemcells, *J. Colloid Interface Sci.* 432 190–199 (2014).
- [69] J. Panyam, J. Lof, E. O'Leary, V. Labhasetwar, Efficiency of Dispatch and Infiltrator cardiac infusion catheters in arterial localization of nanoparticles in a porcine coronary model of restenosis, *J. Drug Target.* 10 515–523 (2002).
- [70] J. Panyam, S.K. Sahoo, S. Prabha, T. Bargar, V. Labhasetwar, Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D, L-lactide-coglycolide) nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 262 1–11(2003).
- [71] Pablo Pelegrin and Annmarie Surprenant, Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1b release through pyrophosphates, *The EMBO Journal* (2009) 28, 2114–2127.
- [72] Romagnani S., T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*, (2000) 85: 9–18.
- [73] Gordon S., Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* (2003) 3: 23-35.
- [74] Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M, Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, (2008) 13: 453–461.
- [75] Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, Drenkow J, Shi S, Gingeras TR, Gaasterland T, Schoolnik G, Nathan C, Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferongamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med*, (2001) 194: 1123–1140.
- [76] Martinez, F.O., Gordon, S., The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* (2014) 6, 13.
- [77] Sorensen, P.S., Lycke, J., Eralinna, J.P., Edland, A., Wu, X., Frederiksen, J.L., et al.. Simvastatin as add-on therapy to interferon beta-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (SIMCOMBIN study): a placebo-controlled randomised phase 4 trial. *Lancet Neurol.* (2011) 10, 691–701.
- [78] Palaga, T., Buranaruk, C., Rengpipat, S., Fauq, A.H., Golde, T.E., Kaufmann, S.H., et al., Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur. J. Immunol.* (2008) 38, 174–183.
- [79] Shimizu, K., Aikawa, M., Takayama, K., Libby, P., Mitchell, R.N., Direct anti-inflammatory mechanisms contribute to attenuation of experimental allograft arteriosclerosis by statins. *Circulation* (2003) 108, 2113–2120.
- [80] Fei, W., Tao, L., Yuanwu, M., Huan, L., Jihua, D., Yuan, F., Jun, P., Yuanjin, G., Simvastatin alters M1/M2 polarization of murine BV2 microglia via Notch signaling. *Journal of Neuroimmunology* (2018) 316, 56–64.

- [81] Taghavi-Moghadam PL, Butcher MJ, Galkina EV. The dynamic lives of macrophage and dendritic cell subsets in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* (2014) 19:19–37.
- [82] Tabas I., Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* (2010) 10:36–46.
- [83] Libby P, Lichtman AH, Hansson GK, Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity* (2013) 38:1092–1104.
- [84] Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* (2011) 473:317–325.
- [85] Goyal T, Mitr S, Khaidakov M, Wang X, Singla S, Ding Z, Liu S, Mehta JL, Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* (2012) 14:150–159.
- [86] Martín-Fuentes P, Civeira F, Recalde D, García-Otín AL, Jarauta E, Marzo I, Cenarro A, Individual variation of scavenger receptor expression in human macrophages with oxidized lowdensity lipoprotein is associated with a differential inflammatory response. *J Immunol* (2007) 179:3242–3248.
- [87] Rader, D.J., Daugherty, A., Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* (2008) 451, 904–913.
- [88] Weber, C., Noels, H., Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* (2011) 17, 1410–1422.
- [89] Ekhtear, H., Akinobu, O., Sivasundaram, K., Miyuki, T., Shahnewaj, B., Hiroyuki, K., Yoshitaka, H., Lipopolysaccharide augments the uptake of oxidized LDL by up-regulating lectin-like oxidized LDL receptor-1 in macrophages. *Mol Cell Biochem* (2015) 400:29–40.
- [90] Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* (2000) 190:300–9.
- [91] Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* (2007) 6:480–98.
- [92] Crane, I.J., Liversidge, J., Mechanisms of leukocyte migration across the blood retina barrier. *Semin. Immunopathol.* (2008) 30, 165e177.
- [93] Xu, H., Dawson, R., Crane, I.J., Liversidge, J., Leukocyte diapedesis in vivo induces transient loss of tight junction protein at the blood-retina barrier. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2005) 46, 2487e2494.
- [94] La Heij, E., Kuijpers, R.W., Baarsma, S.G., Kijlstra, A., van derWeiden, M., Mooy, C.M., Adhesion Molecules in Iris Biopsy Specimens from Patients with Uveitis, 1998.

- [95] Molema G., Tumor vasculature directed drug targeting: applying new technologies and knowledge to the development of clinically relevant therapies. *Pharm Res (NY)* (2002) 19:1251–1258.
- [96] Muzykantov V., Targeting drugs to pulmonary endothelium. *Expert Opin Drug Deliv* (2005) 2:909–926.
- [97] Marlin SD and Springer TA., Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* (1987) 51:813–819.
- [98] Jevnikar AM, Wuthrich RP, Takei F, Xu HW, Brennan DC, Glimcher LH, and Rubin-Kelley VE., Differing regulation and function of ICAM-1 and class II antigens on renal tubular cells. *Kidney Int* (1990) 38:417–425.
- [99] Muro S and Muzykantov VR., Targeting of antioxidant and anti-thrombotic drugs to endothelial cell adhesion molecules. *Curr Pharm Des* (2005) 11:2383–2401.
- [100] Hallahan DE and Virudachalam S., Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94:6432–6437.
- [101] Hopkins AM, Baird AW, and Nusrat A., ICAM-1: targeted docking for exogenous as well as endogenous ligands. *Adv Drug Deliv Rev* (2004) 56:763–778.
- [102] Kuppner, M.C., Liversidge, J., McKillop-Smith, S., Lumsden, L., Forrester, J.V., Adhesion molecule expression in acute and fibrotic sympathetic ophthalmia. *Curr. Eye Res.* (1993) 12, 923e934.
- [103] Liversidge, J., Sewell, H.F., Forrester, J.V., Interactions between lymphocytes and cells of the blood-retina barrier: mechanisms of T lymphocyte adhesion to human retinal capillary endothelial cells and retinal pigment epithelial cells in vitro. *Immunology* (1990) 71, 390e396.
- [104] Whitcup, S.M., Chan, C.C., Li, Q., Nussenblatt, R.B., Expression of cell adhesion molecules in posterior uveitis. *Arch. Ophthalmol.* (1992) 110, 662e666.
- [105] Bharadwaj, A.S., Schewitz-Bowers, L.P., Wei, L., Lee, R.W.J., Smith, J.R., Intercellular adhesion molecule 1 mediates migration of Th1 and th17 cells across human retinal vascular endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2013) 54, 6917e6925.
- [106] Devine, L., Lightman, S.L., Greenwood, J., Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1 in lymphocyte migration across retinal pigment epithelial monolayers in vitro. *Immunology* (1996) 88, 456e462.
- [107] Greenwood, J., Calder, V.L., Lymphocyte migration through cultured endothelial cell monolayers derived from the blood-retinal barrier. *Immunology* (1993) 80, 401e406.
- [108] Garin G, Berk BC. Flow-mediated signaling modulates endothelial cell phenotype. *Endothelium.* (2006) 13:375–384.

- [109] VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2004) 24:12–22.
- [110] Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics.* (2002) 9:27–41.
- [111] Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* (1991) 251:788–791.
- [112] Ramana KV, Bhatnagar A, Srivastava SK. Inhibition of aldose reductase attenuates TNF- α -induced expression of adhesion molecules in endothelial cells. *FASEB J.* (2004) 18:1209–1218.
- [113] Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* (1995) 95:1262–1270.
- [114] Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* (2007) 25:619–647.
- [115] Hogg N, Henderson R, Leitinger B, McDowall A, Porter J, Stanley P. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol Rev.* (2002) 186:164–171.
- [116] Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C, Lamaziere JM, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* (1994) 74: 225–234.
- [117] A.T.A.Z. MALLAT, Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways, *Physiol. Rev.* 86 (2006) 515e581.
- [118] J.M. van Gils, M.C. Derby, L.R. Fernandes, B. Ramkhalawon, T.D. Ray, K.J. Rayner, S. Parathath, E. Distel, J.L. Feig, J.I. Alvarez-Leite, A.J. Rayner, T.O. McDonald, K.D. O'Brien, L.M. Stuart, E.A. Fisher, A. Lacy-Hulbert, K.J. Moore, The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques, *Nat. Immunol.* 13 (2012) 136e143.
- [119] J. Li, K. Ley, Lymphocyte migration into atherosclerotic plaque, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (2015) 40e49.
- [120] S.G. Rockson, Lymphangiogenesis, the CCR7 receptor, and human atherosclerosis, *Lymphatic Res. Biol.* 12 (2014) 215.
- [121] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med.* (1999) 340:115-126.

- [122] Brown MS, Goldstein JL. Biomedicine. Lowering LDL—not only how low, but how long? *Science*. (2006) 311:1721–1723.
- [123] Gleissner CA, Leitinger N, Ley K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension*. (2007) 50:276–283.
- [124] Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. (2003) 14:421–430.
- [125] Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res*. (2006) 45:466–486.
- [126] Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1716–1723.
- [127] Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002;417:750–754.
- [128] Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. Transforming growth factor-beta(1) modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules: role of LOX-1. *Circ Res*. 2001;89:1155–1160.
- [129] Gebuhrer V, Murphy JF, Bordet JC, Reck MP, McGregor JL. Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin (GMP140/ PADGEM/CD62) on human endothelial cells. *Biochem J*. 1995;306(Pt 1): 293–298.
- [130] Butcher, E.C.. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. (1991) 67:1033–1036.
- [131] González-Amaro, R., and F. Sánchez-Madrid. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol* (1999) 19:389–429.
- [132] Elices, M.J., L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M.E. Hemler, and R.R. Lobb. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*. (1990) 60:577–584.
- [133] Marlin, S.D., and T.A. Springer. Purified inter-cellular adhesion molecule (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte-associated antigen 1 (LFA1). *Cell*. (1987) 51: 813–819.
- [134] Carlos, T.M., and J.M. Harlan. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. (1994) 84:2068–2101.

ANEXO: Artículos