



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

**NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-
GLICÓLICO) COMO VECTOR TERAPÉUTICO PARA EL
TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS LATERAL
AMIOTRÓFICA**

Ana García Martínez

TRABAJO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

Tarragona, 8 de junio de 2020

Tutor académico: Katihuska Paredes, Ciencias Médicas Básicas, kathiuska.paredes@urv.cat

En cooperación con: Universidad de Zaragoza

Supervisor/as: Raquel Manzano, rmanzano@unizar.es

Jo, Ana García Martínez, amb DNI 39924291V, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formaciocompetencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 8 de Juny de 2020

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a horizontal line and a small dot at the end.

INFORMACIÓN SOBRE EL CENTRO

Los resultados que se recogen en este trabajo de final de grado han sido obtenidos durante la estancia en prácticas externas que realicé en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, en el grupo de Laboratorio de genética bioquímica (Lagenbio), el cual pertenece al Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón a la Universidad de Zaragoza). El grupo se encuentra dirigido por María Pilar Zaragoza, y la principal actividad investigadora que desarrolla en las diferentes líneas de investigación, es investigar en Genética Molecular tratando aspectos básicos y aplicados a intereses de producción animal, bioindustria y sanidad.

En concreto, los resultados se obtuvieron de la línea de investigación de Teragen y Regeneragen liderado por Rosario Ostas, y donde pertenecían la Dra. Raquel Manzano y la Doctoranda Tresa López. Para la realización de este trabajo de final de grado también se colaboró con el Instituto de nanociencia de Aragón (INA) y con el centro de investigación biomédica de Aragón (CIBA).



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.....	7
2.2 FACTORES GÉNETICOS CAUSANTES DE LA ELA	8
2.2.1 IMPORTANCIA DE <i>SOD1</i>	9
2.3 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTOS	10
2.3.1 TERAPIA GÉNICA.....	11
2.4 NANOPARTÍCULAS COMO VECTOR TERAPÉUTICO	13
2.4.1 NANOPARTÍCULAS DE PLGA.....	14
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 SÍNTESIS POR TÉCNICA MICROFLUÍDICA.....	19
5.2 CONCENTRACIÓN DE LAS NPS.....	21
5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs	22
5.4 TRANSFECCIÓN.....	22
5.5 OBSERVACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA TRANSFECCIÓN	25
5.6 ESTUDIO DEL PLÁSMIDO	25
5.6.1 OBSERVACIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL PLÁSMIDO	25
5.6.2 CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE PLÁSMIDO ENCAPSULADO	26
5.7 ESTADÍSTICA	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
6.1 CONCENTRACIÓN NPs.....	27
6.2 CARACTERIZACIÓN NPs	27
6.3 TRANSFECCIÓN.....	28
6.4 ISOFORMAS DEL PLÁSMIDO.....	31
6.5 PORCENTAJE DE ENCAPSULACIÓN	32
7. PERSPECTIVAS DE FUTURO	34
8. CONCLUSIONES	35
9. BIBLIOGRAFÍA.....	36
10. AUTOEVALUACIÓN	39
11. ANEXOS.....	40

Anexo 1.....	40
Anexo 2.....	41
Anexo 3.....	42
Anexo 4.....	42
Anexo 5.....	43

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Raquel Manzano y a Rosario Ostras la oportunidad de realizar las prácticas en la universidad de Zaragoza en el grupo Lagenbio. También a Tresa López y, de nuevo, a Raquel por ayudarme con la realización de la memoria y resolver mis dudas.

Por otra parte, también me gustaría agradecer a mi tutora académica Katihuska Paredes por haberme ayudado con las revisiones de la memoria y con las dudas que me iban surgiendo acerca de ella y siempre hacerlo de manera rápida.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia y amigos haberme apoyado y ayudado durante todos los días de realización de este trabajo.

1. RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa, provocada por la degradación de neuronas motoras tanto superiores como inferiores, causando la muerte del paciente en menos de 5 años por la falta de tratamientos efectivos. Si bien las causas son multifactoriales en un porcentaje significativo de casos se han observado mutaciones en la enzima superóxido dismutasa. Por esto, se ha postulado que la terapia génica mediante la eliminación o corrección de las mutaciones podría ser un posible tratamiento. Un problema importante para conseguirlo es atravesar la barrera hematoencefálica, para ello como estrategia en este trabajo se propone el uso de nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) como vectores de plásmidos terapéuticos en neuronas motoras. El objetivo de esta memoria será evaluar la eficacia de estas nanopartículas.

Para ello, se sintetizaron nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) con dos surfactantes diferentes, alcohol polivinílico y colato de sodio, para observar cual aportaba mejores características a las nanopartículas. Se caracterizó su tamaño y potencial eléctrico, se estudió el porcentaje de encapsulación del plásmido y las diferentes isoformas que éste presentaba. Por último, se realizó un estudio para determinar la capacidad de transfección de las nanopartículas en células HeLa.

Los resultados mostraron que las nanopartículas presentaban un potencial de carga adecuado y un alto porcentaje de encapsulación, sobre todo en las que se sintetizaron utilizando alcohol polivinílico. Por lo que respecta al tamaño y a la conformación del plásmido encapsulado, es necesario continuar la optimización, ya que, no se observó la expresión del vector en el interior celular y no se encontró el plásmido en la isoforma deseada en el interior de las nanopartículas.

Se concluye, que para asegurar que las nanopartículas de PLGA sirven como vector terapéutico para la ELA se deberían realizar más estudios.

Palabras clave: Esclerosis lateral amiotrófica (ELA), Nanopartículas (NPs), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y plásmido

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la degeneración progresiva de la estructura y función del sistema nervioso central y periférico. En general, causan una pérdida progresiva de neuronas en diferentes áreas del sistema nervioso central, llevando a disfunciones cognitivas, conductuales, sensoriales y motoras. Estos desórdenes están causados generalmente por acumulación de proteínas mal plegadas, neuroinflamación, mutaciones genéticas, disminución de la actividad enzimática antioxidante, disfunción mitocondrial, envejecimiento y en algunos casos por causas desconocidas (1). El número de estas enfermedades en nuestra sociedad se ha incrementado, debido al aumento de la esperanza de vida, la cual es de 83 años, aumentando la población en riesgo (2). La incidencia de las enfermedades neurodegenerativas en España es del 2,08%, lo que implica, que alrededor de 988.000 personas se encuentran afectadas (3). Algunos ejemplos son el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, el Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

2.1 ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Es una enfermedad progresiva, paralizante caracterizada por la degradación de las neuronas motoras (NM) superiores (localizadas en la corteza motora precentral) e inferiores (localizadas en los núcleos motores del tronco y la asta anterior de la médula espinal)(4). Esto conduce al cuadro clínico que comienza con debilidad muscular focalizada progresando con atrofia de las extremidades, calambres, fasciculaciones, alteraciones emocionales, disfagia, disartria, anomalías posturales, alteraciones oculomotoras y el 50% presentan, a la vez, deterioro cognitivo y conductual (5). Esta sintomatología evoluciona en una parálisis total de los músculos incluido el diafragma causando la muerte en menos de 5 años, normalmente como consecuencia de una insuficiencia respiratoria restrictiva progresiva (4)(6).

La ELA afecta sobre todo a personas de entre 60 y 70 años con una incidencia en adultos de 1 a 3 casos por cada 100.000 habitantes y año, por esta razón, es clasificada como una enfermedad rara (6).

Dentro de la ELA se pueden distinguir dos variantes:

- ELA familiar (ELAF): afecta entre un 5-10% de los casos de ELA. En estos pacientes se han encontrado mutaciones en distintos genes, que se asocian con la degradación de las NM y que son heredados en su mayoría siguiendo un patrón de herencia autosómica dominante, aunque también se han descrito casos de herencia recesiva y ligada al sexo (4)(6).

- ELA esporádica (ELAE): corresponde al tipo más frecuente de ELA (90-95%) donde la enfermedad parece presentarse aleatoriamente, sin historia familiar previa, de éstos, un 5-10% de los casos presenta demencia asociada, que puede aparecer antes, de manera simultánea o posterior al inicio de la ELA, y hasta en más de un 50% de los casos, los pacientes muestran alteraciones de funciones ejecutivas en las evaluaciones neuropsicológicas (4)(6). Debido al desconocimiento de la causa de la enfermedad, muchos estudios se han concentrado especialmente en la ELAE, donde se han detectado factores genéticos (mutaciones), de envejecimiento y ambientales. No hay factores ambientales irrefutables asociados directamente con la ELAE, pero algunos son fumar, la actividad atlética intensa, el servicio militar, el traumatismo craneal, la exposición a productos químicos agrícolas, metales pesados, campos electromagnéticos, pesticidas, neurotoxinas y retrovirus endógenos (7)(8).

Otras causas que podrían ser relevantes en el desarrollo de la ELA son los cambios en las células de la barrera hematoencefálica, en el músculo esquelético y en las células del sistema inmune, que modulan la neuroinflamación (9).

Por lo tanto, se puede concluir que la ELA es una enfermedad multifactorial con una genética compleja, con diferentes patrones de herencia, componentes mutacionales, edad de inicio variable y múltiples vías metabólicas alteradas simultáneamente en los pacientes (10).

2.2 FACTORES GÉNETICOS CAUSANTES DE LA ELA

Como se ha dicho anteriormente, la ELA presenta un componente genético complejo, tanto en casos esporádicos, donde la mutación puede ocurrir *ex novo*, como en casos familiares, donde la mutación se hereda (11).

Las mutaciones más frecuentes causantes de la ELAF son en el 20% de los casos las del gen del superóxido dismutasa 1 (*SOD1*) y las del gen *C9ORF72* que afecta al 40% de los casos (8)(12). La mayoría de mutaciones en *SOD1* son responsables principalmente de ELAF y de un tercio de los casos de ELAE. Las mutaciones más comunes de *SOD1* son cambios puntuales en un aminoácido, aunque algunas también pueden ser de fin de transcripción, inserciones o deleciones, algunas de ellas son: *p.G37T*, *p.L38V*, *p.G41S*, *p.G41D*, *p.H43R*, *p.G85R*, *p.G93C*, *p.G93A*, *p.E100G*, *p.L106V* y *p.I113Y*, las cuales producen cambios en la proteína *SOD1*, disminuyendo la actividad enzimática (10).

El gen *C9ORF72* tiene 11 exones y la proteína para la que codifica se encuentra mayoritariamente en las neuronas, esta a su vez presenta dos isoformas; una más larga que se

sitúa en el citoplasma y otra más corta en la membrana nuclear. Su principal función conocida hasta la fecha es el tráfico vesicular celular, regulando la endocitosis y la autofagia (13).

Aunque las mutaciones en *SOD1* y *C9ORF72* son las más relevantes también encontramos otras como *p.G12R*, *p.G41S*, *p.L114F* y *p.D90A*, así como algunas que afectan al factor de crecimiento del endotelio vascular y la proteína de la hemocromatosis hereditaria (6).

2.2.1 IMPORTANCIA DE SOD1

El gen *SOD1* tiene su locus en 21q22.11, presenta una longitud de 9310 pares de bases (pb) y codifica para la enzima superóxido dismutasa (SOD1) (10). La actividad de la enzima SOD1 es catalizar la conversión de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, lo que le confiere un papel clave en la defensa antioxidante en las células con metabolismo aeróbico (6). SOD1, se ubica en el citoplasma de las células y en concreto, mediante inmunohistoquímica, se ha demostrado que se encuentra distribuida abundantemente en neuronas motoras, interneuronas y neuronas sensoriales de la médula espinal (10).

Cuando el gen *SOD1* muta, provoca un plegamiento incorrecto de la proteína y la formación de agregados que no pueden ser eliminados provocando su acumulación. Esto junto a otros factores como el envejecimiento, inducen a una respuesta de estrés celular. Estas proteínas mal plegadas se acumulan en el sistema nervioso central causando toxicidad y muerte neuronal. Curiosamente, estas proteínas también se pueden encontrar en casos de ELAE, ya que como se ha comprobado, aun no estando mutada, si se dan otros factores de estrés se pueden generar proteínas mal plegadas, llevando a mayores niveles de estrés celular (3)(14).

A nivel patogénico, recientemente se ha descrito que las proteínas mal plegadas pueden ser excretadas al medio extracelular y ser endocitadas por células vecinas, las cuales, empiezan a sintetizar la proteína superóxido dismutasa mal plegada, aumentando el número de neuronas afectadas y provocando el avance de la enfermedad. Este mecanismo es similar al de proteínas priónicas en enfermedades como la encefalopatía espongiforme transmisible, por lo que se denomina *prion-like*. Sin embargo, la relevancia epidemiológica de este mecanismo es todavía controvertida ya que la ELA no se considera actualmente una enfermedad transmisible (15).

Aunque aún están en estudio los mecanismos de la toxicidad de SOD1 mutada, se ha visto que la eliminación de la proteína mal plegada tiene beneficios terapéuticos. Es el caso de un estudio donde se administró siARN (*small interfering ARN*) dirigido a *SOD1*, utilizando como vector un adenovirus asociado, a ratones con SOD1 mutada justo después de su nacimiento. Los resultados mostraron efectos estadísticamente significativos como la prolongación de la vida media de los ratones tratados en un 39% de los casos, y la ralentización del inicio y la progresión

de la enfermedad, lo que ha convertido, este gen en objetivo de estudio, para terapias de silenciamiento génico(13)(14).

2.3 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTOS

Actualmente no existe una prueba específica para el diagnóstico de la ELA, ya que no se han determinado biomarcadores específicos. El diagnóstico se realiza en base a los síntomas que muestran los pacientes en las primeras fases de la enfermedad, como son debilidad muscular e insensibilidad además de estudios para observar la degradación de las NM.

Sin embargo, la diversidad de síntomas que pueden mostrar los pacientes, que, a su vez, pueden ser causados por otras enfermedades, complica el diagnóstico diferencial, retrasa el diagnóstico y promueve el progreso de la enfermedad surgiendo más afectaciones. Esto junto a otros factores, conlleva que el diagnóstico pueda tardar hasta 12 meses después del primer síntoma (8)(16).

Hoy en día, no existe tratamiento definitivo para la ELA. Los medicamentos incluyen el uso del riluzol, un inhibidor de la liberación de glutamato que interfiere con las respuestas mediadas por el receptor de N-metil-D-aspartato y estabiliza el estado inactivado de los canales de sodio dependientes de voltaje, ralentizando la enfermedad y aumentando la esperanza de vida de los pacientes con ELA (8)(14)(16).

La edaravona ya utilizada para problemas cerebrovasculares en Japón, está aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), pero no en Europa (14). Este fármaco es un antioxidante que actúa eliminando los radicales libres, reduciendo la sintomatología de la ELA y que puede ser usado en combinación con el riluzol. Sin embargo, faltan estudios que demuestren el aumento de la esperanza de vida, además de ajustar las dosis y la vía de administración (8)(14).

Por esta razón, se presta especial atención al manejo paliativo de la enfermedad (figura 1), mediante evaluaciones cognitivas y conductuales, utilizando fármacos como el dextrometorfano y la quinidina para controlar el efecto pseudobulbar (16). A su vez, se utilizan dispositivos para mantener la independencia funcional como aparatos ortopédicos de pie y tobillo, andadores, sillas de ruedas, alimentación nasogástrica, soporte ventilatorio, y otros (14).

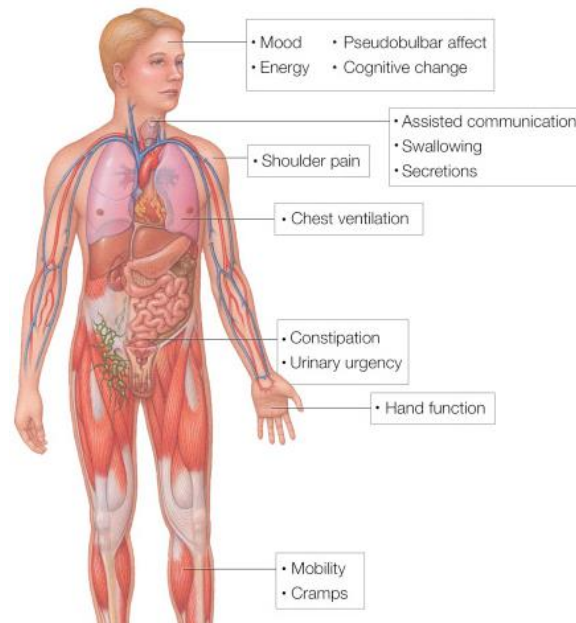


Figura 1: Sintomatología tratable del ELA (8).

Además, en los pacientes con ELA es muy importante mantener una correcta nutrición, debido a la gran atrofia muscular y pérdida de peso. Se ha observado que una dieta personalizada altamente calórica es beneficiosa en estos pacientes (14).

Existen actualmente tratamientos en fase experimental con otros agentes como el masitinib, un inhibidor de la tirosina quinasa que disminuye la proliferación de células gliales controlando la neuroinflamación. Aunque se necesitan más estudios para su aprobación (17).

Otras técnicas en estudio son el tratamiento con células madre, la terapia génica y la inmunización contra la proteína SOD1 mutada, la cual consiste en la inyección de antígenos (inmunización activa) o anticuerpos (inmunización pasiva) específicos para las formas mal plegadas de SOD1. Los resultados obtenidos en modelos animales han demostrado un aumento de la esperanza de vida, al disminuir la toxicidad. Sin embargo, se deben realizar más estudios para asegurar que no se genere toxicidad en los pacientes (18).

2.3.1 TERAPIA GÉNICA

Actualmente, la terapia génica se centra en las mutaciones de *SOD1*. mediante el reemplazo de los genes mutados, la eliminación, la adición de nuevos genes terapéuticos o la edición de la mutación (13)(14).

Dos puntos muy importantes que pueden variar el efecto de la terapia génica, son, por una parte, el material genético utilizado y, por otra, la vía de administración. En cuanto al material genético encontramos siRNA (*small interfering RNA*), ASOs (oligonucleótidos antisentido) y CRISPRcas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). El siRNA se sintetiza a

partir de un ARN de doble cadena cortado por la enzima Dicer dando lugar a los siRNA. Se caracterizan por poder unirse complementariamente al ARNm específico provocando la degradación del mismo y el silenciamiento transcripcional.

ASOs son cadenas de oligonucleótidos que actúan uniéndose a su ARNm complementario, inhibiendo su unión al ribosoma o siendo degradados, lo cual impide que pueda ser traducido a proteínas.

Mientras que CRISPR corresponden a cadenas cortas de ADN palindrómico utilizadas por los procariotas como defensa antiviral, que junto a otras tres moléculas que son cas9 (una nucleasa para romper el ADN bicatenario, ARN que sirve de guía para la diana y el ADN utilizado como terapéutico), son capaces de modificar el material genético provocando la inactivación de genes, la sustitución y la integración de ADN con la ventaja de que las ediciones realizadas se mantienen en las sucesivas divisiones celulares a diferencia de siRNA o ASOs (2).

En cuanto al método de administración, puede ser *ex vivo*, mediante modificación genética por ejemplo de células y su posterior implantación en el organismo a tratar, o *in vivo*, modificando el gen en la célula diana dentro del individuo, mediante la inyección del material genético “desnudo” o mediante vectores que lo encapsulen y transporten hasta el interior de la célula.

TERAPIA GÉNICA SIN VECTORES

Una de las terapias génicas en estudio es la administración directa de siRNA para la disminución de la expresión del gen de *SOD1*, disminuyendo la acumulación de ARN y proteína mal plegada. Esta técnica ya ha sido probada en ratones a los que se administró siRNA dirigido al ARNm mutado de *SOD1* en el nervio óptico, con resultados positivos, por lo cual se continúa investigando su administración y posible toxicidad (13).

Otra técnica, son los nucleótidos antisentido dirigidos a *SOD1*, que producen una disminución de los niveles de ARNm de *SOD1* mediante su silenciamiento. Estudios realizados con esta técnica han mostrado resultados prometedores al disminuir la cantidad de proteínas mal plegadas tanto en ratones, como en primates y humanos. Sin embargo, al ser inoculados libremente fueron rápidamente degradados por las nucleasas del organismo, y la mayoría, no llegaron al órgano diana ni a ser internalizados por las células, por esta razón, se estudian diferentes métodos de terapia génica mediante vectores para mejorar este problema (14).

TERAPIA GÉNICA CON VECTORES

Uno de los principales problemas de la administración es la dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica que protege el sistema nervioso central (SNC), evitando la entrada de sustancias tóxicas y manteniendo la homeostasis del cerebro, así como la dificultad de hacer llegar el material genético a las células diana y la poca estabilidad del material genético libre que puede ser eliminado por endonucleasas (especialmente *in vivo*) (2). Por estas razones, se ha optado por encapsular el material genético dentro de vectores para ser administrado. Algunos de los más utilizados son virus como los lentivirus y los virus adeno-asociados (AAV) que han demostrado su eficacia en la transducción de neuronas (13).

Un ejemplo, es un estudio donde se utilizó como vector AAV que expresaba Cas9, derivado de *Staphylococcus aureus*, y ARN de una sola guía dirigido al exón 2 de *SOD1*. Se observó que la expresión de *SOD1* se interrumpió significativamente en ratones con *SOD1* mutada, lo cual tuvo efectos beneficiosos, sin embargo, indujo un aumento de 7 a 14 veces en la expresión del gen de *SOD1* humano en las neuronas motoras lumbares o torácicas, lo cual muestra la necesidad de continuar los estudios en humanos. Todavía faltan avances en la especificidad del objetivo y la inmunogenicidad que deben desarrollarse para garantizar una transducción segura en humanos (13).

Si bien los vectores virales han mostrado buenos resultados presentan desventajas como la inmunogenicidad, la limitación en el tamaño del material a transportar, la inserción errónea del material genético en el genoma, el potencial tumoral, etc. Por esto se proponen otros vectores como las nanopartículas (NPs) de materiales no tóxicos y biodegradables (13).

2.4 NANOPARTÍCULAS COMO VECTOR TERAPÉUTICO

Diversas técnicas han sido utilizadas para traspasar la barrera hematoencefálica como las cirugías invasivas, las microburbujas o los ultrasonidos que aumentan la permeabilidad de la barrera, pero con la desventaja de una liberación no controlada donde además pueden entrar componentes tóxicos, patógenos, o liberarse proteínas de membrana indispensables para el correcto funcionamiento de las células (19).

Estas son algunas de las razones por las que las NPs cada vez adquieren más importancia, ya que, únicamente se permite su entrada sin modificar la permeabilidad de la membrana. Estas estructuras sólidas y esféricas están formadas por polímeros naturales o sintéticos que presentan tamaños de 1-1000nm (17)(19). Desde la primera vez que las NPs fueron utilizadas para la administración intracraneal del hexapéptido salargin, en 1995, su uso ha aumentado en los últimos años como vectores para el transporte de una amplia variedad de fármacos a través

de la barrera hematoencefálica o dirigida a otros órganos o células específicas (19). Por ejemplo, las NPs de poli (ácido láctico-co- glicólico) (PLGA) son utilizadas para la inmunoterapia contra el cáncer, presentando antígenos exógenos a través de los complejos MHC 1 a las células CD8+, estimulando que las células T adquieran un fenotipo citotóxico en el control de enfermedades tumorales e infecciosas. Por otra parte, también son utilizadas para la administración de hormonas como la calcitonina, para el tratamiento de la osteoporosis (20).

Entre otras virtudes, las NPs pueden ser sintetizadas con polímeros biodegradables, administrarse sistémicamente mediante métodos no invasivos además de permitir un gran control de la carga interior y su liberación.

No obstante, presentan algunas desventajas que deben ser estudiadas previamente para cada aplicación, como los efectos amiloidogénicos a largo plazo, las interacciones proteína-NPs y la posible toxicidad (19).

Existen diferentes mecanismos a partir de los cuales las NPs pueden traspasar la barrera hematoencefálica, entre estos encontramos rutas activas y pasivas (19). La capacidad de las NPs para atravesar esta barrera dependerá esencialmente de su tamaño (el cual se espera que sea de 50-200nm), carga (la cual debe ser mayor de 30mV) y la capacidad de interacción con los receptores de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. Como es el caso de la transferrina que se ha utilizado asociada a las NPs para facilitar su paso a través de la barrera hematoencefálica, debido a la alta afinidad que presenta por su receptor el cual se encuentra más expresado en la barrera hematoencefálica (19).

Hay diferentes tipos de nanopartículas que sirven como vectores, desde las más tradicionales sintetizadas a partir de poli (butilcianoacrilato), PLGA, poli (ácido láctico), liposomas y sistemas inorgánicos, hasta las más recientes, resaltando entre estas, los puntos cuánticos de carbono (CD), aplicados en la administración de medicamentos, como la doxorubicina un fármaco con propiedades anticancerígenas (19).

2.4.1 NANOPARTÍCULAS DE PLGA

El PLGA es un copolímero sintetizado a partir de monómeros de ácido láctico (AL) y ácido glicólico (AG). Se utiliza en medicina desde la década de los 70, como suturas absorbibles y monofilamentos. Además, el PLGA está aprobado tanto por la FDA de EE.UU. como por la Agencia Europea del Medicamento, para aplicaciones terapéuticas en dispositivos biomédicos, quirúrgicos y la administración de medicamentos, por su capacidad de liberación controlada y biodisponibilidad finita ya que al degradarse producen monómeros metabólicos como el AL y el AG, los cuales son metabolizados mediante el ciclo de Krebs, minimizando la toxicidad. Debido

a sus numerosas ventajas también, se utiliza en otros campos como la nanomedicina, la nanobiología, la nanobiotecnología, la nanoterapéutica y la nanomecánica (20)(21).

PROPIEDADES

- Cinética de degradación alta, gracias a la síntesis de PLGA a una relación de 50:50 de AL:AG, ya que esta tasa de degradación se ve disminuida cuando la cantidad de AL aumenta respecto la de AG. La degradación varía de 1 a 2 meses.
- Normalmente, presenta una temperatura de transición vítrea de 45°C a 55°C, esto depende de las proporciones por las que este sintetizado, y determinan la rigidez de la estructura.
- La relación entre el volumen-superficie del dispositivo influye en la degradación del material.
- La medida de las NPs, se debe tener en cuenta para una correcta internalización en el órgano o célula diana, esto dependerá de cada objetivo.
- Son solubles en diferentes tipos de disolventes como diclorometano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, cloroformo, hexafluoroisopropanol, acetona y alcohol bencílico.
- El grado de cristalinidad, es importante a la hora de la generación del material ya que influye en la resistencia mecánica, la biodegradación y el hinchamiento. Se ha visto que la baja cristalinidad influye en una degradación más rápida del contenido de la NP.
- El potencial Z, la carga de las NPs, debe ser preferiblemente positiva, ya que presentan una mejor internalización en las membranas plasmáticas cargadas negativamente (20). También debe de ser superior a 30mV para asegurar una buena estabilidad de suspensión, lo cual impide la agregación entre partículas (22).
- Biodisponibilidad finita.

Todas estas propiedades deben de ser consideradas a la hora de sintetizar el material y la NPs para una correcta degradación y liberación del contenido. Además, no solo se deben controlar las cantidades de AL y AG de la síntesis y el resto de características, también es importante el pH. Un microambiente ácido puede desestabilizar y liberar deficientemente el contenido de las NPs de PLGA, lo cual se puede optimizar mediante la encapsulación en las NPs de componentes básicos (21).

INCONVENIENTES PLGA

A pesar de todo lo visto, las NPs sintetizadas mediante PLGA presentan limitaciones como la interacción con proteínas, que lleva a un despliegue de la NP y la agregación de proteínas,

debido a la superficie hidrófoba que presentan. A su vez se han reportado dificultades para controlar la velocidad y cantidad de la liberación del contenido (21).

EJEMPLOS DE NPS DE PLGA COMO VECTOR TERAPÉUTICO EN ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Estudios demuestran que las nanopartículas de PLGA modificadas con tensioactivos, como el colato de sodio (CoNa) o el alcohol polivinílico (PVA) son de gran utilidad para traspasar la barrera hematoencefálica, ya que el recubrimiento mejora la penetración de las NPs y prolonga el tiempo de circulación (19). En 2012, Tahara y cols., estudiaron estas NPs en enfermedades del SNC, inyectándolas vía intravenosa (i.v.), en ratas, y observaron que las NPs eran capaces de liberar una molécula fluorescente, en este caso cumarina 6, de manera efectiva al SNC (21).

En 2015, Saucier-Sawyer y cols., prepararon NPs de PLGA con ligandos distintos para determinar la capacidad de penetración posterior a su administración i.v., en ratones, y se observó, que éstos tenían la capacidad de circular un tiempo más prolongado respecto otros vectores utilizados, mejorando la absorción de las NPs y los fármacos asociados a través de la barrera hematoencefálica y la llegada a las células diana (17).

SÍNTESIS

Los métodos empleados para sintetizar NPs de PLGA, son similares a los utilizados en otras NPs, con modificaciones como la adición de tensioactivos. Normalmente, en cualquiera de estas técnicas cambiando las relaciones entre la velocidad de agitación, la fase dispersa y mediante sonicación y homogenización, se puede conseguir que las partículas tengan la morfología y el tamaño adecuado para cada objetivo.

Entre estas técnicas encontramos, la emulsión simple, utilizada generalmente para la creación de NPs sólidas para el uso con fármacos hidrofóbicos y la técnica de emulsión doble o múltiple, que sirve para la encapsulación de fármacos hidrofílicos. En ambos casos, tras la emulsión es necesaria la evaporación del solvente orgánico del polímero. El inconveniente de estos procedimientos es que para la generación de las emulsiones se utilizan homogeneizadores o sonicadores que pueden dañar el contenido a encapsular (22).

Otro método es la síntesis a partir de la emulsión espontánea, que consiste en el uso de solventes orgánicos, pero no son aconsejables por una posible toxicidad y el impacto medioambiental (22).

Por estas razones, se utilizan otras técnicas como la microfluídica, la cual, no utiliza sonicador, ni homogeneizador y, por lo tanto, no genera un *shear stress* en el ADN y no daña el

plásmido. Permite generar emulsiones simples como múltiples, que destacan por tener la capacidad de sintetizar partículas con poca variación de tamaños entre ellas, además, de con una mayor relación superficie volumen, mejorando la transfección. Al mismo tiempo al necesitar pequeños volúmenes se reducen los costes y permite un mayor control de reacciones rápidas que con reactores tradicionales (22).

3. HIPÓTESIS

Es posible sintetizar nanopartículas de tamaño y carga superficial idónea para atravesar la barrera hematoencefálica, capaces de encapsular un plásmido para posteriormente transfectar células HeLa, con el fin de evaluar la utilidad de las nanopartículas de PLGA como vectores en terapia génica para el tratamiento de la ELA.

4. OBJETIVOS

El principal objetivo es determinar si las nanopartículas de PLGA son útiles como vectores terapéuticos en el tratamiento de la ELA.

Los objetivos secundarios son:

- Sintetizar NPs de PLGA con una carga y tamaño adecuado para atravesar la barrera hematoencefálica.
- Comprobar que es posible encapsular un plásmido de ADN circular en las NPs de PLGA.
- Comprobar si PVA presenta mayor protección del plásmido que CoNa.
- Evaluar si el plásmido encapsulado en las NPs es capaz de expresarse en la línea celular HeLa.
- Optimizar un control positivo de la transfección mediante lipofectamina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 SÍNTESIS POR TÉCNICA MICROFLUÍDICA

Las NPs se sintetizan mediante una síntesis microfluídica de flujo focalizado (figura 2). Esta consiste en que una fase fluye a través de un capilar y otras dos fases son bombeadas a través de capilares laterales, que confluyen. Las fases externas (F1 y F2) romperán el flujo de la fase interna (F3), generando gotas esféricas y dando lugar a las NPs con el plásmido en su interior (23). Para reducir la tensión superficial se utilizaron dos surfactantes, CoNa y PVA. El protocolo se diseñó a partir del trabajo de Ane Larrea y cols. (2017) con algunas modificaciones para optimizar la estabilidad del plásmido (24).

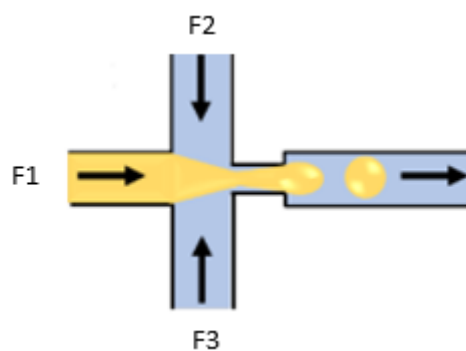


Figura 2: Flujo y canales utilizados en la técnica microfluídica de flujo focalizado. (22)

Materiales

Para la síntesis utilizando CoNa como surfactante:

- F1 (fase acuosa): 9 ml de agua milliQ con 30 μ g plásmido + 1 ml de colato 0,1%
- F2(fase orgánica): 50 mg de PLGA Resomer 503H en 20 ml de diclorometano (DCM)
- F3: colato 1% (p/v) respecto la cantidad de muestra en agua milliQ (50 ml)
- F4: colato 0,3% (p/v) respecto la cantidad de muestra en agua milliQ (50ml)

Para la síntesis con PVA como surfactante:

- F1 (fase acuosa): 9 ml de agua milliQ con 30 μ g plásmido + 1 ml de agua
- F2(fase orgánica): 50 mg de PLGA Resomer 503H en 20 ml de DCM
- F3: PVA 1% (p/v) respecto la cantidad de muestra en agua milliQ (50 ml)
- F4: PVA 1% (p/v) respecto la cantidad de muestra en agua milliQ (50ml)

Además, se utilizaron tres microbombas donde se añadió cada fase con un caudal específico, y dos microreactores que mezclaban dichas fases, dando lugar a las nanopartículas, figura 3:

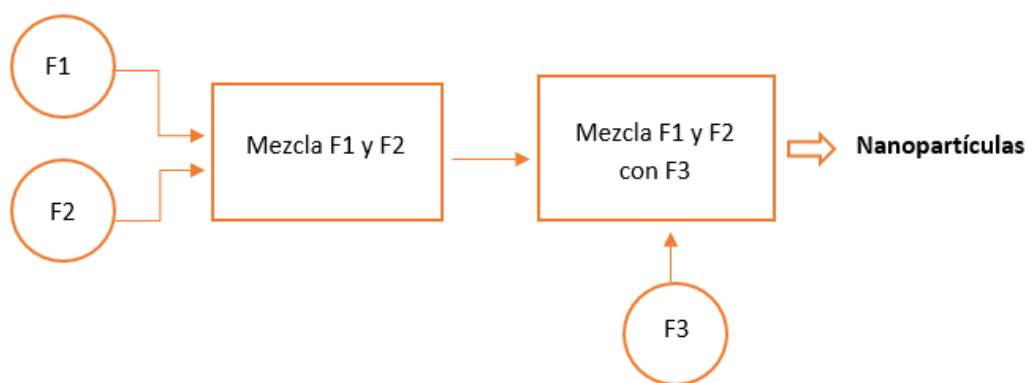


Figura 3: Posicionamiento de las microbombas (círculos), la fase en cada una de ellas, los microreactores (rectángulos) y mezclas producida en cada uno, dando lugar a las nanopartículas.

Protocolo

Posteriormente a la preparación de las 4 fases, se puso en cada microbomba la fase pertinente mediante una jeringa, y se programó el caudal, el cual se basó en el tamaño de partícula requerida a partir de experiencias previas del grupo de investigación (tabla 1).

Tabla 1: Condiciones del montaje de las microbombas.

Fases (F)	Volumen de la Jeringa (ml)	Velocidad del caudal en cada microbomba (ml/min)	Volumen cargado en cada microbomba (ml)
1	10	4,5	3
2	20	13,5	20
3	60	36	50

A continuación, se encendieron las 3 microbombas a la vez. Los primeros 10s de emulsión fueron descartados, pero posteriormente se cogió la muestra hasta que el reactivo limitante (F1) se agotó y las tres microbombas fueron detenidas a la vez. Al volumen recogido se le añadió la misma cantidad de F4 y el recipiente se dejó evaporando 3h a temperatura ambiente a 600 rpm en la centrifuga, para eliminar el solvente orgánico. Después, la suspensión de NPs se centrifugó a 15 min a 8.500 rpm, el sobrenadante fue guardado para estudios posteriores, mientras que el precipitado fue suspendido con 400 µl de agua milliQ.

Se realizó el mismo procedimiento de síntesis para ambos surfactantes.

A continuación, se muestra un esquema con el flujo de trabajo realizado a partir de las muestras obtenidas en la síntesis de NPs (figura 4).

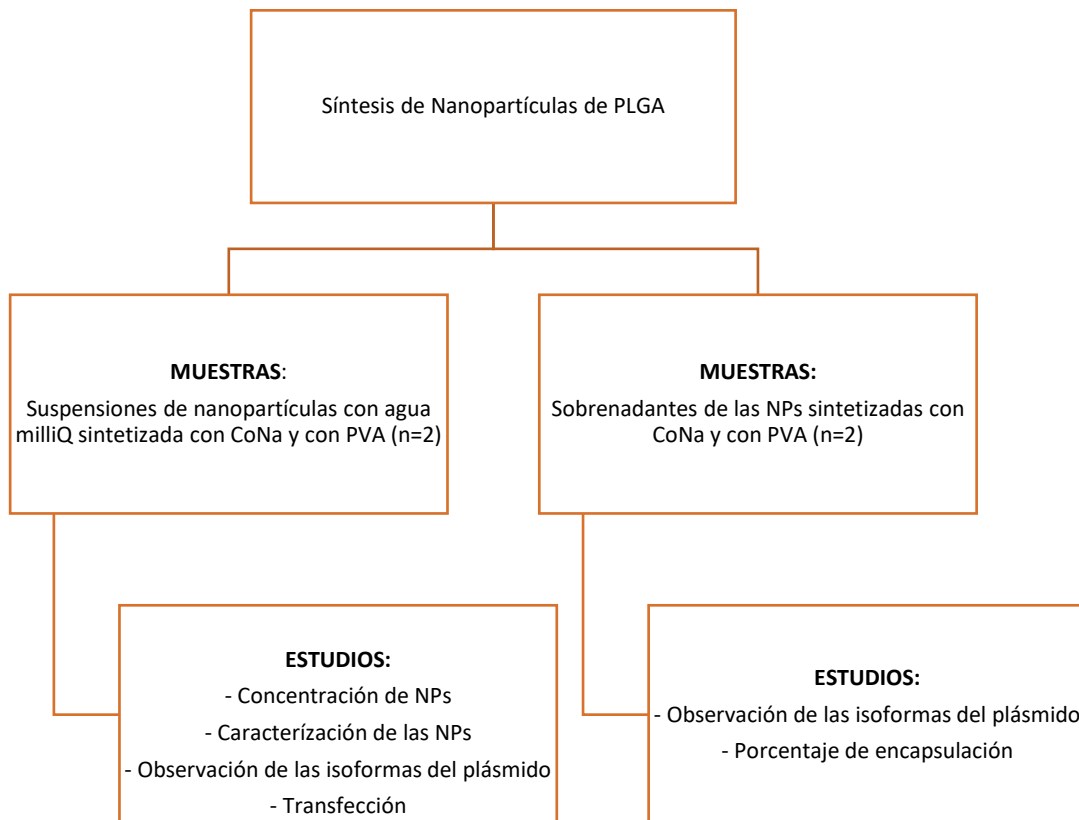


Figura 4: Flujo de trabajo a partir de la síntesis de NPs de PLGA.

A partir de la suspensión con NPs:

5.2 CONCENTRACIÓN DE LAS NPS

Para calcular la concentración de NPs obtenidas, se pesaron 25-30 μl de la suspensión con las NPs por triplicado en una microbalanza. Se dejaron evaporar en una estufa (80°C) y se volvieron a pesar. A partir de la diferencia de pesos, el volumen cargado y la siguiente fórmula, se calculó la concentración. Este mismo proceso se realizó tanto para la suspensión de NPs con CoNa como aquellas sintetizadas con PVA.

$$\frac{P_{final} - P_{inicial}}{V} = \text{Concentración NPs} \left(\frac{mg}{\mu l} \right)$$

Donde:

P_{final} = Peso final

$P_{inicial}$ = Peso inicial

V= Volumen añadido de la suspensión de NPs

5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs

Se caracterizó el diámetro hidrodinámico, que corresponde al de la partícula en suspensión, debido a lo cual se crea a su alrededor una capa eléctrica dipolar, que también es considerada en la medición. Idealmente debe de ser de entre 100-120 nm para favorecer la internalización de las partículas en las células y una mayor rapidez de circulación. Por otra parte, también se caracterizó el potencial Z como indicador de su carga superficial y predictor de su estabilidad en suspensión (22).

Protocolo

Para la determinación de estas características se utilizó el analizador Brookhaven Particle Size Analyzer que utiliza la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), a partir de la cual se pudieron evaluar estas dos propiedades.

El diámetro dinámico se obtuvo mediante el programa “BIC Particle Sizing Software”. Previamente se diluyó una gota de cada suspensión de NPs (CoNa y PVA) con agua destilada en un tubo de cristal de fondo curvo hasta 2/3 de éste y se introdujo en el analizador para su medición. A continuación, en el programa se fijaron los parámetros para la determinación del diámetro, como el líquido en el cual se encontraban diluidas las NPs (H₂O) y el índice de refracción real de las NPs (1,550), entre otros. Finalmente se inició la lectura y se recogieron los resultados.

Para obtener el potencial Z de la NPs se utilizó el programa “BIC PALS Zeta Potencial Analyzer”. La muestra anteriormente preparada se introdujo al analizador en una cubeta con un electrodo. Después, se fijaron los parámetros correspondientes en el programa: el tamaño de las partículas obtenido en el anterior análisis, la concentración aproximada de las NPs, el pH de la solución y el líquido en el que se encontraban suspendidas las NPs (H₂O). Se inició la lectura y se recogieron los resultados.

5.4 TRANSFECCIÓN

Consiste en la introducción de material genético externo en una célula, en este caso se evaluó la capacidad de las NPs de PLGA con el plásmido DC-RFP-SH01 para transfectar las células HeLa. Este protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del estudio realizado por Encabo-Berzoza y cols. (2017) con algunas modificaciones (25).

Cultivos celulares

Se preparó un cultivo de células HeLa (prestadas por el grupo NFP del instituto de nanociencia de Aragón) y cada 48h aproximadamente se hicieron cambios de medio DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y penicilina/estreptomicina 1% (P/S). Se realizaron pases cuando la confluencia celular era alta, para ello se despegaban las células de la placa de cultivo mediante Tripsina-EDTA siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂ en la incubadora Nüve CO₂ EC160.

Protocolo de transfección

La transfección se realizó en una microplaca de 96 pocillos, para ello previamente se tripsinizó el cultivo celular preparado y se realizó el recuento mediante cámara de Neubauer, para así sembrar 8 pocillos con 5.000 células HeLa/pocillo (figura 5).

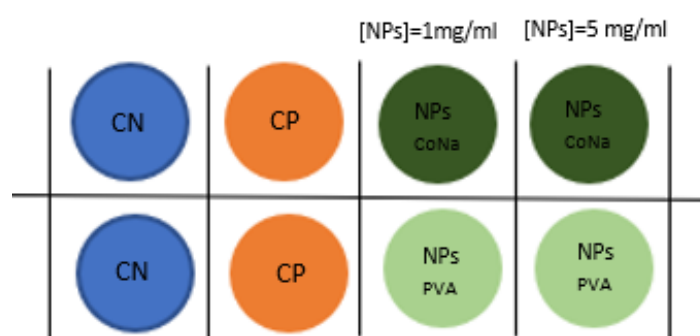


Figura 5: Los círculos simbolizan los 8 pocillos sembrados. Los azules corresponden al control negativo (CN), los naranjas al control positivo (CP), los verdes oscuros son para las NPs sintetizadas con CoNa y las verdes claro, para las NPs con PVA, dos en cada caso ya que se utilizaron concentraciones de NPs distintas (1mg/ml y 5mg/ml).

Tratamiento con NPs

La transfección con las NPs se realizó inmediatamente después de la síntesis, para evitar la pérdida de plásmido por difusión desde el interior o superficie de la nanopartícula.

El volumen de suspensión de NPs para cada pocillo fue calculado según el anexo 1. Se utilizaron 3,33µl y 16,7 µl de cada muestra, a los cuales se añadieron 196,77 µl y 183,3 µl de medio DMEM al 10% de FBS y 1% P/S respectivamente, para completar los 200µl necesarios en cada pocillo. Se incubó la microplaca durante 72h (24h para la captación de las NPs y 48 h para la expresión del plásmido), en las mismas condiciones que el cultivo celular

Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se añadieron 100 µl de formaldehído para su fijación, se dejó la placa en la nevera durante 10 min, se retiró el formaldehído y se hicieron dos lavados con PBS, finalmente se añadieron 100µl de PBS y se guardó la placa en la nevera.

Control positivo

El control positivo, se realizó por duplicado, 18 horas después del tratamiento con las NPs. En este caso, se utilizó lipofectamina como vector del plásmido, ya que se ha visto en estudios anteriores un elevado porcentaje de transfección tras 48h de incubación (26).

Para ello, se preparó en un tubo una mezcla de plásmido más Opti-MEM, el cual es un medio ideal para la transfección, debido a que se ha reducido la concentración de FBS y de esta manera, las células se encuentran en la situación óptima para ser transfectadas. En otro tubo se preparó una mezcla de Opti-MEM más lipofectamina, y se dejó reposar durante 5 min. Las cantidades exactas que se añaden en este caso en las mezclas se observan en la tabla 2, y dependen en cada caso del número de células sembradas y del tipo de pocillo utilizado, tal y como se observa en el protocolo Lipofectamine 2000 Reagent (Anexo 2). A continuación, se mezclaron ambas soluciones en un mismo tubo y se dejaron reposar durante 20 min. Se añadieron 100µl de mezcla a cada pocillo y pasadas 6 horas se cambió el medio por DMEM con 10% de FBS y se incubaron durante 48 h. Finalmente, las células se fijaron con formaldehído de la misma manera que los pocillos tratados con las NPs.

Tabla 2: Cantidades de Opti-MEM, plásmido y lipofectamina agragadas a cada tubo, obtenidas a partir del protocolo Lipofectamina 2000 Reagent (Anexo 2).

	Opti-MEM + plásmido	Opti-MEM + Lipofectamina
Opti-MEM (µl)	50	50
Plásmido (µl)	0,16	-
Lipofectamina (µl)	-	0,75

Como se detallará posteriormente se obtuvo un porcentaje bajo de transfección con lipofectamina, por esto, se hizo una optimización del control positivo modificando las concentraciones de algunos componentes (anexo 2 y anexo 3) y cambiando las microplacas utilizadas con pocillos de fondo redondeado donde las células tienden a agruparse en el centro, perdiendo su morfología, por otras de fondo plano donde las células se mantienen más dispersas, conservando su forma, lo cual podría afectar a la transfección. El resto del protocolo se realizó siguiendo los pasos anteriormente descritos.

Control negativo

Se sembraron las células en los pocillos y, no se realizó ningún tipo de tratamiento. Únicamente, se hicieron cambios de medio para mantener las células en su estado óptimo con

medio DMEM y 10% de FBS. Las células se fijaron con formaldehído, de la misma manera que en las tratadas con las NPs.

5.5 OBSERVACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA TRANSFECCIÓN

Las células tratadas, fueron mantenidas en cámara húmeda. A continuación, fueron teñidas con 200µL de una solución de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindo) (1,2 ml de PBS + 1,2 µl de DAPI), para marcar los núcleos.

Las células se observaron mediante un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX81) donde las células transfectadas con el plásmido, emiten fluorescencia verde por el gen *GFP* (*green fluorescence protein*) y fluorescencia roja por el gen *RFP* (*red fluorescence protein*).

5.6 ESTUDIO DEL PLÁSMIDO

El plásmido utilizado fue el DC-RFP-SH01, tiene 10kb y codifica para dos proteínas fluorescentes una de color verde (GFP) y otra de color rojo (RFP), a su vez, contiene un gen que aporta resistencia a la ampicilina (Anexo 4). Este plásmido fue obtenido a partir de otro grupo de investigación el cual había realizado estudios anteriores.

Se cuantificó el porcentaje de plásmido encapsulado para determinar la eficacia de la encapsulación en las nanopartículas. También, se observaron las diferentes conformaciones que presenta el plásmido mediante una electroforesis en gel de agarosa.

5.6.1 OBSERVACIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL PLÁSMIDO

La técnica de electroforesis fue utilizada para determinar si el plásmido presentaba isoformas o agrupaciones que podrían dificultar la transfección a las células. El plásmido puede presentar diversas isoformas entre ellas la lineal, la circular relajada y la superenrollada. Se pueden diferenciar unas y otras mediante la electroforesis debido a que ocupan volúmenes diferentes y migran a diferentes velocidades en el gel, en el caso de la superenrollada esta ocupa un volumen menor y migra más rápido a través de los poros convirtiéndola en ideal para que el plásmido se internalice de manera adecuada en las células, contrariamente a otras conformaciones que podrían hacer que el plásmido perdiera la capacidad de internalizarse y expresarse en las células.

Protocolo

Se preparó un gel de agarosa de 30 ml al 1% (p/v) con TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X y 3 µl de SYBR green.

Se utilizó 1 ml de cada muestra, utilizando como control positivo plásmido purificado diluido 1:100 con agua MilliQ. Estas muestras fueron centrifugadas durante 45 min a 20.000 g, a continuación, se cogieron 20 µl de cada una de las 5 muestras y se les añadió 5µl de buffer de carga, formado por glicerol y azul de bromofenol. Posteriormente, se cargaron las muestras en el gel y se realizó la electroforesis a 60V. Los geles se revelaron para obtener los resultados.

A partir del sobrenadante de las NPs:

5.6.2 CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE PLÁSMIDO ENCAPSULADO

Para este experimento se utilizó 1 ml de sobrenadante de cada preparación. Las muestras fueron centrifugadas durante 45 min a 20.000 g, para que el PLGA precipitara y no interfiriera en la cuantificación del plásmido. A continuación, se suspendió 1µl de cada muestra en 199µl de la solución Qubit™ 1X *dsDNA High Sensitivity Working Solution*, el cual, se une de manera específica al ADN de doble cadena, posteriormente los tubos fueron incubados en oscuridad durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se introdujeron en el medidor Qubit™ 4 Fluorometer, que mediante la fluorescencia emitida por el reactivo al unirse con el ADN permite la cuantificación del plásmido. Las mediciones se realizaron por triplicado utilizando como blanco muestras sintetizadas con CoNa 0,3% y PVA 1%. Con la formula siguiente y las medidas hechas se obtuvo el porcentaje de encapsulación:

$$\frac{\mu g \text{ de plásmido inicial} \\ \text{añadido a la reacción} - \mu g \text{ de plásmido final} \\ \text{en el sobrenadante}}{\mu g \text{ de plásmido inicial}} \times 100 = \% \text{ de plásmido encapsulado}$$

OBSERVACIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL PLÁSMIDO

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 5.6.1 utilizando 1 muestra de cada sobrenadante, obtenido del precipitado de las NPs sintetizadas (CoNa y PVA).

5.7 ESTADÍSTICA

En todos los resultados se calculó la desviación estándar del promedio mediante Excel. Para observar si había diferencias significativas, entre los grupos se realizó el test T de student con 2 colas, asumiendo como significativo un valor de *P* inferior a 0,05.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CONCENTRACIÓN NPs

Los promedios y las desviaciones estándar de las concentraciones finales se encuentran en la tabla 3 y fueron obtenidas a partir de la fórmula que se encuentra en la sección de la concentración de NPs en materiales y métodos (5.2).

Tabla 3: Peso inicial y final de las NPs de CoNa y PVA para la determinación de concentraciones.

NP + Surfactante	Peso inicial (mg) ($x \pm DS$)	Peso final (mg) ($x \pm DS$)	Concentración (mg/ml) ($x \pm DS$)
NP + CoNa (n=3)	33,656 \pm 0,075	34,181 \pm 0,079	21,00 \pm 2,06
NP + PVA (n=3)	34,611 \pm 0,154	35,329 \pm 0,183	28,73 \pm 1,31

Como se puede observar se obtuvo una concentración mayor con la síntesis con PVA utilizando las mismas cantidades de ambos.

6.2 CARACTERIZACIÓN NPs

Tabla 4: Diámetro hidrodinámico (nm) y potencial Z (mV) de las NPs con CoNa y con PVA.

NP + Surfactante	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV)
NPs CoNa (n=1)	640	33,7
NPs PVA (n=1)	2300	-47,2

Tal y como se muestra en la tabla 4, el diámetro hidrodinámico de las NPs mostró un resultado superior al esperado. Algunos autores han señalado que la medida óptima de las NPs es entre 50 y 200nm, permitiendo que estén más tiempo en circulación, y sean capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. En cambio, aquellas menores de 30nm son propensas a la filtración renal mientras que aquellas con un diámetro superior a 250 nm, a la fagocitosis (19)(27). En concreto, se esperaba un tamaño de entre 100 y 120 nm similares a las NPs vacías previamente estudiadas y caracterizadas, en el grupo de investigación, observando que eran captadas por las neuronas de manera rápida y eficiente y no eran tóxicas en grandes concentraciones.

En este caso, se observó un diámetro demasiado grande en ambos casos, siendo superior en las partículas de PVA, esto se puede deber a que las NPs hayan precipitado o formado aglomeraciones entre ellas y por esto de un diámetro superior al esperado. Debido a que las NPs

tienden a agruparse, lo cual depende en gran parte de su potencial Z como se verá posteriormente. Las NPs presentan un rango de fuerzas de superficie más grande que el radio de la propia NPs, por esto la facilidad de agruparse entre ellas (28).

También puede ser, que en sí mismas las NPs presentaran un radio superior al esperado, esto puede variar según la cantidad de PVA y PLGA añadida, otros estudios han demostrado que a una cantidad superior de uno de estos dos componentes el diámetro de la partícula también es superior (27).

Hay que añadir que a mayor concentración de NPs aumenta la tendencia a agruparse entre ellas, y en este caso, como se había mostrado en el apartado anterior, ambos tipos de NPs presentan una concentración elevada, lo que puede aumentar esta tendencia. Además, durante el proceso de la técnica DLS las NPs tienden a precipitar complicándose la medida de su diámetro hidrodinámico.

El estudio del diámetro mediante DLS puede ser complementado con imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), proceso que no pudo ser evaluado debido a las circunstancias actuales. Con los resultados de TEM se podrán complementar los resultados obtenidos con el DLS, el cual nos informa del diámetro hidrodinámico, la polidispersidad y la presencia de agregados y de su tamaño.

El potencial Z es la diferencia entre el potencial eléctrico del medio de dispersión y la capa estacionaria del fluido unida a la partícula, y muestra la estabilidad de la partícula en suspensión. Si el potencial es bajo significa que las partículas tenderán a agregarse y si es alto significa que serán estables en la suspensión (22). Además, el potencial Z también influye en la incorporación de las NPs en la célula, porque la membrana citoplásmica tiene una carga negativa y se favorecerán las interacciones electrostáticas con NPs cargadas positivamente.

En concreto, en los resultados obtenidos de ambas NPs con CoNa y PVA, el potencial Z era superior a 30 mV por lo tanto, ambas deberían mostrar una buena estabilidad de suspensión siendo aptas para proseguir estudios (22).

6.3 TRANSFECCIÓN

Los resultados obtenidos de la primera transfección realizada con las NPs con CoNa, y PVA, utilizando lipofectamina como control positivo fueron negativos, no se obtuvo transfección en ninguno de los pocillos. Por esta razón, no se realizaron fotografías de los resultados ya que se observaban tan solo 1 o 2 células transfectadas.

Considerando que no se vio transfección en el control positivo, nos hizo sospechar de problemas técnicos durante el experimento o necesidad de optimización para la línea celular HeLa, como insuficientes células sembradas, insuficiente plásmido o demasiada lipofectamina, lo que puede causar toxicidad.

Por esta razón, se hicieron distintas pruebas con el objetivo de optimizar el control positivo para futuros ensayos utilizando diferentes cantidades de células sembradas, concentraciones de plásmido y lipofectamina (Anexo 3). A continuación, se muestran los resultados donde se obtuvo mayor transfección (figuras 6 y 7), en este caso se sembraron 15.000 cel/pocillo, se utilizaron 2,5µl de lipofectamina y diferentes cantidades de plásmido: 0,1 µg, 0,25 µg, 0,5 µg y 1 µg.

Como se puede observar en estas condiciones se obtuvo aproximadamente un 20% de células transfectadas. En este sentido, existen también fuertes discrepancias entre autores de otros estudios con resultados que van desde un 52% de transfección hasta un 18,5 % en esta misma línea celular (26)(29).

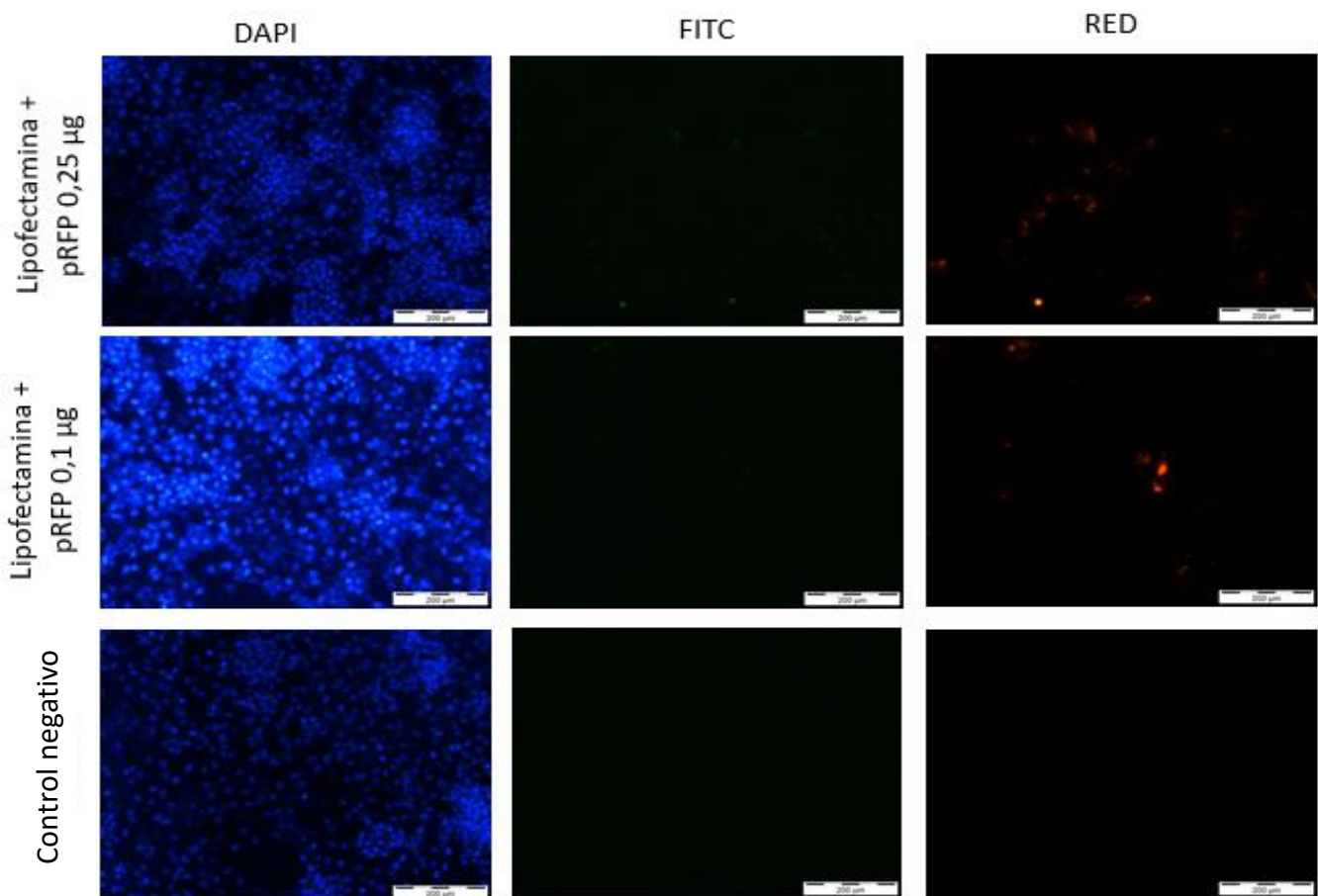


Figura 6: Resultados obtenidos a partir del microscopio óptico invertido y de la fluorescencia emitida por la tinción DAPI realizada a los núcleos, y por los genes GFP (FITC) y RFP (RED) del plásmido cuando se integra. Se muestran además los resultados con diferentes cantidades de plásmido, 0,25µg y 0,1µg, y el control negativo. Aumento 100x.

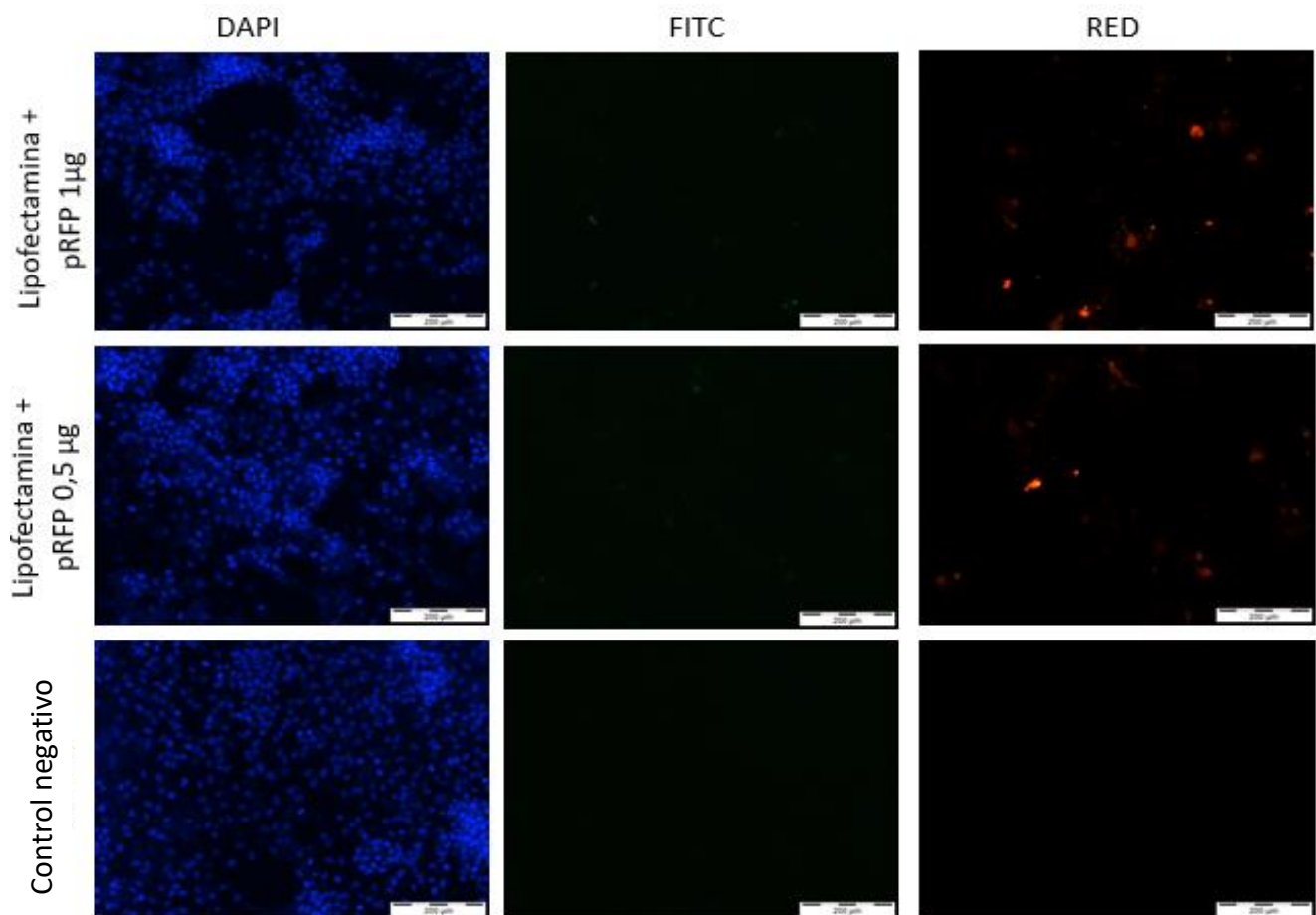


Figura 7: Resultados obtenidos a partir del microscopio óptico invertido y de la fluorescencia emitida por la tinción DAPI realizada a los núcleos, y por la fluorescencia emitida por los genes GFP (FITC) y RFP (RED) del plásmido cuando se integra. Se muestran además los resultados con diferentes cantidades de plásmido, 0,5 μ g y 1 μ g, y la situación de control negativo. Aumento 100x.

Los porcentajes de transfección varían según el número de células sembradas, ya que en este ensayo se obtuvo una mayor transfección, y mejor calidad de las células en los pocillos sembrados con 15.000 cel/pocillo mientras que un número menor de células no produjo transfección y un número más elevado produjo muerte celular debido a la confluencia (figura 8).

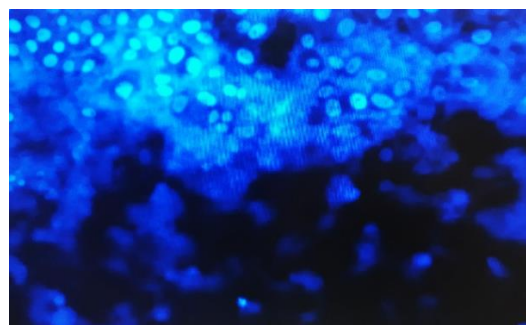


Figura 8: Células HeLa teñidas con DAPI observadas mediante el microscopio de fluorescencia invertido y donde se observa el material genético disperso en las células. Aumento 100x

Otra posibilidad para optimizar la transfección era incrementar la cantidad de plásmido, sin embargo, como se muestra en los resultados no se obtuvo un mayor porcentaje de transfección al aumentar la cantidad de plásmido, tan solo se observó un aumento de transfección al variar la cantidad de plásmido de 0,1 μg a 0,25 μg de plásmido. A partir de 0,25 μg el porcentaje de transfección se mantiene constante, por esta razón, en posteriores estudios se debería de utilizar esta cantidad de plásmido porque es la menor cantidad a la que se obtiene una mayor transfección.

Con estos resultados descartamos además la posibilidad de que la lipofectamina fuese tóxica, ya que, al observar las células en el microscopio los días posteriores a la transfección se observó que las células se encontraban en buenas condiciones, adheridas y con la habitual morfología poligonal.

Otra posibilidad que surge es que la transfección esté dificultada por el gran tamaño del plásmido (10kb), como se describió en un estudio realizado por Kreiss y cols., en 1999 (30), en otros estudios se observó que normalmente utilizaban un tamaño de plásmido de 5 a 6 kb y así obtenían una mejor transfección. (26)

Por esta razón y para seguir optimizando el proceso de transfección, nos planteamos hacer un estudio comparativo utilizando plásmidos de distinta longitud.

6.4 ISOFORMAS DEL PLÁSMIDO

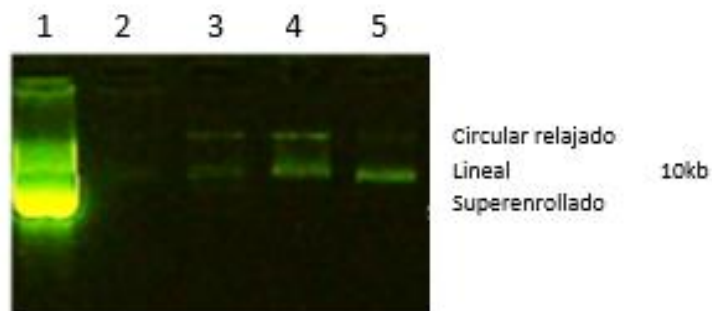


Figura 9: Resultados de la electroforesis, para la observación de las diferentes conformaciones del plásmido. 1: Plásmido inicial que actúa como control (10kb), 2: NPs con CoNA, 3: NPs con PVA, 4: Sobrenadante NPs con CoNA y 5: NPs con PVA.

Tal y como se ha mencionado, entre las diferentes conformaciones, la ideal es la superenrollada, mientras que la lineal y circular relajada son las formas desplegadas del plásmido no deseadas. Si se observaran bandas por debajo de la correspondiente al plásmido superenrollado significaría que el plásmido se encuentra degradado en fragmentos más pequeños. Como se puede observar en el control, el plásmido purificado, presenta una alta

concentración en la banda de plásmido superenrollado funcional, lo cual sirve de guía para el resto de resultados.

El plásmido que se encuentra desplegado o desnaturalizado no presenta una adecuada funcionalidad y puede ser que pierda su capacidad de expresarse en las células.

En este caso, la isoforma que se encuentra en mayor cantidad en el sobrenadante de CoNa y de PVA es la del plásmido lineal, seguido por el plásmido circular relajado, pero no se observa plásmido superenrollado (figura 9).

Por otra parte, en las NPs con CoNa todas las bandas se muestran débiles, lo cual se correlaciona con el bajo porcentaje de encapsulación del plásmido, por lo tanto, la concentración de plásmido también lo es en todas las isoformas. También puede deberse a que el CoNa interfiera en la visualización de las bandas.

En las NPs con PVA se observa más concentración de plásmido en la forma lineal y circular relajado, ambas en mayor concentración que en el caso de las NPs con CoNa, como era de esperar ya que el porcentaje de encapsulación es superior. Pero tampoco se observan unas bandas claras, quizás es debido a que al encontrarse el plásmido en las NPs le cuesta más ser teñido por el sybr green, y por esta razón, en ambas NPs se observa una concentración inferior que en el sobrenadante.

Otro de los objetivos de sintetizar NPs con PVA y otras con CoNa, era determinar si el PVA mostraba más efecto protector del plásmido respecto a CoNa, como se ha observado anteriormente (31). Pero en este caso no hay diferencias en las conformaciones del plásmido obtenidas utilizando colato de sodio o PVA, por lo tanto, no muestra un mayor efecto protector, ya que en ninguno de los dos casos hay isoforma superenrollada. Por esto, en futuros estudios sería recomendable evaluar otros tensioactivos inorgánicos junto al PVA, para mejorar este efecto protector (31).

6.5 PORCENTAJE DE ENCAPSULACIÓN

La eficiencia de encapsulación se calcula a partir de la fórmula que se encuentra en el apartado cuantificación del porcentaje de encapsulación (5.6.2) en materiales y métodos, teniendo en cuenta los resultados de la concentración (tabla 5), el volumen de sobrenadante en las NPs de CoNa que fue de 44,700 μ l y de sobrenadante en las NPs de PVA que fue de 34,000 μ l y sabiendo que inicialmente habían 30 μ g de plásmido (anexo 5).

Tabla 5: Promedio de la concentración de plásmido, en el sobrenadante de las NPs con CoNa y con PVA, y porcentaje de encapsulación de cada uno de ellos.

Sobrenadantes	Concentración de plásmido ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ($x \pm DS$)	Porcentaje de encapsulación de las NPs ($x \pm DS$)
PVA (n=3)	$0,635 \pm 0,001$	$67,36 \pm 0,000$
CoNa (n=3)	$0,736 \pm 0,002$	$24,9 \pm 0,270$

Como se puede observar en la tabla 5, el porcentaje de encapsulación fue muy superior en las NPs que se realizaron utilizando PVA como tensioactivo, mostrando una diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a aquellas sintetizadas con CoNa, lo cual ya se ha observado en otros ensayos (29).

El hecho que presente mayor porcentaje de encapsulación sería otra característica positiva que presentaría el PVA para su uso.

En otros estudios se observó un porcentaje de encapsulación en nanopartículas de PLGA con PVA del 27,7%, utilizando el método de emulsión-evaporación, en este proyecto por técnica microfluídica se ha obtenido un porcentaje muy superior (31). Por lo tanto, respaldando otros estudios que muestran que el método de microfluídica es más eficiente que el de emulsión-evaporación (22).

Además, el porcentaje de encapsulación en las nanopartículas de PLGA dependen mucho del tamaño de estas, del plásmido y de los tensioactivos u otras soluciones que se utilicen para su síntesis, lo que queda demostrado también observando un mayor porcentaje de encapsulación en aquellas que se sintetizaron con PVA (32)(33). Además, las partículas generadas a partir de PVA también presentaron un mayor tamaño, si recordamos los resultados obtenidos en la caracterización, siendo quizás otra razón por la que se observa un mayor porcentaje de encapsulación.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Entre los experimentos pendientes de este trabajo están la microscopía TEM para determinar el diámetro de las NPs de PLGA. Así mismo, debido a que el PVA no mostró la protección del plásmido esperada, sería necesario utilizar otros tensioactivos, además de evaluar otros protocolos, para mejorar la estabilidad del plásmido. Posteriormente, cuando la NP se encontrará optimizada, se repetirían las transfecciones con la suspensión de las nanopartículas siguiendo el nuevo protocolo con el control positivo de lipofectamina.

A largo plazo, si se hubiera comprobado que las NPs son capaces de transfectar las células HeLa de manera correcta, el siguiente paso sería probarlo en células neuronales como la línea celular NSC-34, para así aproximar los estudios a la futura utilidad de estas NPs, encapsulando plásmidos portadores de material genético como las secuencias de Cas9 y el siRNA y realizar la transfección en células modelo para analizar su capacidad para corregir la mutación de *SOD1*.

8. CONCLUSIONES

1. La utilización de PVA o CoNa como agentes tensioactivos influye en la concentración de las nanopartículas de PLGA, obteniendo una mayor concentración en aquellas sintetizadas con PVA.

2. El diámetro de las nanopartículas, obtenido mediante la técnica DLS, es superior al esperado de 640 nm con las NPs sintetizadas con CoNa y de 2300 nm con las NPs sintetizadas con PVA, el cual no sería adecuado para traspasar la barrera hematoencefálica, pero esta técnica únicamente da un valor aproximado, por eso, de manera complementaria se debería determinar el diámetro mediante microscopía TEM para asegurar el diámetro exacto de las NPs.

3. El potencial Z aporta una buena estabilidad en suspensión a las NPs y favorece la interacción con la membrana citoplásmica facilitando la internalización celular.

4. Las NPs de PLGA son capaces de internalizar el plásmido, y el porcentaje de encapsulación es mayor utilizando PVA respecto a CoNa, lo que lo hace de elección para futuros estudios.

5. PVA no muestra mayor protección del plásmido respecto CoNa, en ambos tipos de nanopartículas el plásmido se encuentra desplegado, lo cual no favorece la internalización de las células ni su funcionalidad. Sería apropiado probar otros tipos de surfactantes en estudios posteriores para aumentar el efecto protector sobre el plásmido.

6. No se observó expresión del plásmido en las células HeLa tratadas con ninguna de las NPs, por lo tanto, no se puede concluir que las NPs de PLGA sean útiles como vectores terapéuticos en el tratamiento de la ELA. Por lo que sería necesario repetir el experimento con las nuevas condiciones de concentración celular y cantidad de plásmido optimizadas para el control positivo, y encontrar una técnica que mantuviese intacta la estructura del plásmido, para maximizar las opciones de transfección y expresión celular de éste.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Rakotoarisoa M, Angelova A. Amphiphilic Nanocarrier systems for curcumin delivery in neurodegenerative disorders. *Medicines*. 2018;5:126.
2. Pena SA, Iyengar R, Eshraghi RS, Bencie N, Mittal J, Aljohani A, et al. Gene therapy for neurological disorders: challenges and recent advancements. *J Drug Target*. 2020;28:111–28.
3. Garcés M. Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social. Universidad Complutense. Madrid. Alianza de Enfermedades Neurodegenerativas. 2016:180.
4. Camacho A, Esteban J, Paradas C. Report by the spanish foundation for the brain on the social impact of amyotrophic lateral sclerosis and other neuromuscular disorders. *Neurologia*. Spanish Society of Neurology. 2018;33:35–46.
5. Glugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. Mesenchymal stem cells: a potential therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis? *Stem Cells Int*. 2019;2019:1-16
6. Riancho J, Gonzalo I, Ruiz-Soto M, Berciano J. Why do motor neurons degenerate? Actualization in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia*. Spanish Society of Neurology; 2019;34:27–37.
7. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;377:162–72.
8. Oskarsson B, Gendron TF, Staff NP. Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2018. *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd; 2018;93:1617–28.
9. Gomes C, Moreira RG, Castell-Perez E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. *J Food Sci*. 2011;76
10. Cervantes-Aragón I, Ramírez-García SA, Baltazar-Rodríguez LM, García-Cruz D, Castañeda-Cisneros G. Aproximación genética en la esclerosis lateral amiotrófica. *Gac Med Mex*. 2019;155:513–21.
11. Ferrara D, Pasetto L, Bonetto V, Basso M. Role of extracellular vesicles in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2018;12:1-9
12. Kruminis-Kaszkiel E, Juranek J, Maksymowicz W, Wojtkiewicz J. CRISPR/Cas9 technology as an emerging tool for targeting amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018;19:1-13

13. Cappella M, Ciotti C, Cohen-Tannoudji M, Biferi MG. Gene therapy for ALS-A perspective. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019;20:1-21
14. Dorst J, Ludolph AC, Huebers A. Disease-modifying and symptomatic treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. SAGE Publications Ltd; 2018;11:1–16.
15. Peters OM, Ghasemi M, Brown RH. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2015;125:1767–79.
16. Miller RG, Appel SH. Introduction to supplement: the current status of treatment for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2017;18:1–4.
17. Trias E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Babdor J, Maciel TT, Guillo M, et al. Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2016;13:177.
18. Gros-Louis F, Soucy G, Larivière R, Julien JP. Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *J Neurochem*. 2010;113:1188–99.
19. Zhou Y, Peng Z, Seven ES, Leblanc RM. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Release*. 2018;270:290–303.
20. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J Control Release*. 2012;161:505–22.
21. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: A unique polymer for drug delivery. *Ther Deliv*. 2015;6:41–58.
22. Ib a nez AL. Dise o, desarrollo y producci n de nanomateriales mediante tecnolog a microflu dica para aplicaciones biom dicas y cat lisis heterog nea. Univ Zaragoza, Zaragoza, Espa a. 2020;382.
23. Zhao CX. Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65:1420–46.
24. Larrea A, Clemente A, Luque-Michel E, Sebastian V. Efficient production of hybrid bio-nanomaterials by continuous microchannel emulsification: Dye-doped SiO₂ and Au-PLGA nanoparticles. *Chem Eng J*. 2017;316:663–72.

25. Encabo-Berzosa MM, Sancho-Albero M, Sebastian V, Irusta S, Arruebo M, Santamaria J, et al. Polymer functionalized gold nanoparticles as nonviral gene delivery reagents. *J Gene Med.* 2017;19:6–7.
26. Sokolova V, Rojas-Sánchez L, Biatas N, Schulze N, Epple M. Calcium phosphate nanoparticle-mediated transfection in 2D and 3D mono- and co-culture cell models. *Acta Biomater.* 2019;84:391–401.
27. Madani F, Esnaashari SS, Mujokoro B, Dorkoosh F, Khosravani M, Adabi M. Investigation of effective parameters on size of paclitaxel loaded PLGA nanoparticles. *Adv Pharm Bull.* 2018;8:77–84.
28. Kovalchuk NM, Johnson D, Sobolev V, Hilal N, Starov V. Interactions between nanoparticles in nanosuspension. *Adv Colloid Interface Sci.* 2019;272:102020.
29. Giupponi E, Visone R, Occhetta P, Colombo F, Rasponi M, Candiani G. Development of a microfluidic platform for high-throughput screening of non-viral gene delivery vectors. *Biotechnol Bioeng.* 2018;115:775–84.
30. Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charriol O, Airiau M, et al. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:3792–8.
31. Doolaanea AA, Fahmi A, Ismail H, Mansor NI, Hafizah N, Nor M, et al. Effect of surfactants on plasmid dna stability and release from poly (d , l-lactide-co-glycolide) microspheres. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2015;14:1769–78.
32. Albisa A, Piacentini E, Sebastian V, Arruebo M, Santamaria J, Giorno L. Preparation of drug-loaded plga-peg nanoparticles by membrane-assisted nanoprecipitation. *Pharm Res.* 2017;34:1296–308.
33. Liu Y, Zhao G, Xu CF, Luo YL, Lu ZD, Wang J. Systemic delivery of CRISPR/Cas9 with PEG-PLGA nanoparticles for chronic myeloid leukemia targeted therapy. *Biomater Sci.* 2018;6:1592–603.

10. AUTOEVALUACIÓN

Al empezar las prácticas el principal objetivo era observar la transfección de las NPs en las células HeLa, pero al no obtener transfección se debió reorganizar el estudio y optimizar primero el control positivo con lipofectamina. Esto hizo que todo se retrasara, pero aun así si hubiera continuado las prácticas el tiempo que previamente estaba establecido hubiera podido seguir con el proyecto y obtener unos resultados más concretos y esclarecedores.

A partir de esta memoria he podido aprender y mejorar tres ámbitos, por una parte, las técnicas de laboratorio realizadas, por otra, mis conocimientos y, por último, la mejora en la realización de un trabajo de manera individual.

En relación a las tareas de laboratorio, he aprendido a desarrollar tareas de cultivos celulares, sobre todo a hacer un seguimiento de una línea celular y ser capaz de distinguir cuándo se debía hacer un cambio de medio o un pase. También he aprendido a trabajar en el campo de la nanotecnología, ya que, en general, en ninguna práctica había realizado metodologías relacionadas con estas, por lo tanto, aprendí como se realiza su síntesis y a utilizar el aparato Brookhaven para la caracterización. Además, también aprendí a utilizar el Qubit y hacer un estudio sobre el porcentaje y las isoformas que mostraba el plásmido. En general, aprendí a desenvolverme mejor y de manera independiente en un laboratorio.

Por lo que respecta a los conocimientos, he aprendido mucho más sobre la ELA y lo relevante que es encontrar un tratamiento para esta trágica enfermedad. Además, como ya he dicho no había tratado antes con NPs no solo a nivel de técnicas sino también de conocimientos, y he aprendido mucho sobre sus características y la cantidad de utilidades que presentan tanto actualmente, como presentarán en el ámbito de la biomedicina en un futuro.

He mejorado mi capacidad de realizar un trabajo de manera individual ya que durante la carrera la mayoría los realicé en grupo, lo cual, me ayudará en la realización de futuros informes y proyectos en el mundo laboral. También, he aprendido a discutir de manera crítica unos resultados, lo que a su vez me ayudó a entender con más profundidad los procedimientos que estaba realizando.

Por último, he aprendido a organizarme mucho más, ya que, el TFG era algo que debía de hacer de manera independiente durante un periodo largo de tiempo, y debido a la situación que hemos vivido este año, era una tarea que exigía responsabilidad y organización.

11. ANEXOS

Anexo 1

Cálculos para la obtención del volumen que hay que añadir a las células de la suspensión de NPs para la transfección:

- Inicialmente se tienen 30µg de plásmido, se supone una eficiencia de encapsulación del 20%:

$$30\mu g \cdot 0,2 = 6\mu g \text{ de plásmido encapsulado}$$

- Esta cantidad de plásmido se encuentra en 2 ml de suspensión, por lo tanto, teníamos 3µg/ml de plásmido, si se querían 250ng en cada pocillo:

$$\frac{250 \text{ ng}}{3.000 \text{ ng}} = 83\mu l \text{ de NPs}$$

- Si suponíamos una concentración de NPs de 12 mg/ml y se ponían 83µl de NPs en cada pocillo y en cada pocillo habían 200µl totales, la concentración final de NPs por pocillo era de 5mg/ml.
- Pero la cantidad de 83µl era demasiado volumen y para evitar que se formaran agregados que dificultarán la suspensión, se decidió suspender las NPs en un volumen inferior de 400µl, por lo tanto, en un volumen 5 veces menor que el que se tenía inicialmente. Por lo tanto, en este caso únicamente se debían coger 16,6µl (83/5=16,6) de suspensión de nanopartículas, para conseguir que en un pocillo de 200 µl hubiese 5 mg/ml de NPs pero añadiendo un volumen inferior.
- Debido a que quizás seguía siendo demasiado volumen, se puso otro pocillo con menor concentración (1 mg/ml), por lo tanto, se reduce la concentración del pocillo anterior 5 veces. Se divide de nuevo el volumen añadido anteriormente entre 5 para saber la cantidad que se debía añadir (16,6/5) dando como resultado que se debían añadir 3,3µl de NPs.

Anexo 2

Protocol Pub. No. MAND007824 Rev 1.0

Lipofectamine® 2000 Reagent [Learn More](#)

Package Contents

Catalog Number	Size
• 11668-030 Buy Now	0.3 mL vial
• 11668-027 Buy Now	0.75 mL vial
• 11668-019 Buy Now	1.5 mL vial
• 11668-500 Buy Now	15 mL vial

Storage Conditions
Store at 4°C (do not freeze).

Required Materials

- Plasmid DNA (0.5–5 µg/µL stock)
- Opti-MEM® Reduced Serum Medium
- Eppendorf tubes

Timing

Preparation: 10 minutes
Incubation: 5 minutes
Final Incubation: 1–3 days

Selection Guide
[Lipofectamine® Reagents](#)
Go online to view related products.

Product Description


- Lipofectamine® 2000 Reagent is a proprietary formulation for transfecting nucleic acids into a wide range of eukaryotic cells.
- DNA-Lipofectamine® 2000 complexes must be made in serum-free medium such as Opti-MEM® Reduced Serum Medium and can be added directly to cells in culture medium, in the presence or absence of serum/antibiotic.
- It is not necessary to remove complexes or change/add medium after transfection.
- The amount of Lipofectamine® 2000 Reagent required for successful transfection varies depending on the cell type and passage number. Start any new transfection by testing the recommended four concentrations of Lipofectamine® 2000 Reagent to determine an optimum amount.

Important Guidelines

Visit our [product page](#) for additional information and protocols. For support, visit www.lifetechnologies.com/support.

Online Resources

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



Protocol Outline

- Plate cells so they will be 70–90% confluent at the time of transfection.
- Prepare plasmid DNA-lipid complexes.
- Add DNA-lipid complexes to cells.

Lipofectamine® 2000 DNA Transfection Reagent Protocol

See page 2 to view a typical DNA transfection procedure.

Component	96-well	24-well	6-well
Final DNA per well	100 ng	500 ng	2500 ng
Final Lipofectamine® 2000 Reagent per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL

Co-Transfection of Plasmid DNA and siRNA

Transfect plasmid DNA and siRNA at the same time using Lipofectamine® 2000 Reagent by adding 30 pmol (~0.6 µg) of siRNA per 1 µg of DNA.

mRNA Transfection

mRNA can be transfected in a 24-well plate using Lipofectamine® 2000 Reagent by adding 0.5–1 µg of mRNA per well.

- Photograph of Expected Results
- Scaling Up or Down Transfections
- Limited Product Warranty and Disclaimer Details




Figura 10: Protocolo para la transfección de células mediante lipofectamina utilizado como control positivo en los experimentos. Parte 1.

Lipofectamine® 2000 DNA Transfection Reagent Protocol

Transfect cells according to the following chart. Volumes are given on a per-well basis. Each reaction mix is sufficient for triplicate (96-well), duplicate (24-well), and single well (6-well) transfections, and accounts for pipetting variations. Adjust the amounts of components according to your tissue culture format. For additional information on scaling your transfection reaction, see page 1.

Timeline		Steps	Procedure Details			
Day 0	1	Seed cells to be 70–90% confluent at transfection	Component	96-well	24-well	6-well
	2	Dilute four amounts of Lipofectamine® Reagent in Opti-MEM® Medium	Adherent cells	1–4 × 10 ⁴	0.5–2 × 10 ⁵	0.25–1 × 10 ⁶
	3	Dilute DNA in Opti-MEM® Medium	Opti-MEM® Medium	25 µL × 4	50 µL × 4	150 µL × 4
Day 1	4	Add diluted DNA to diluted Lipofectamine® 2000 Reagent (1:1 ratio)	Lipofectamine® 2000 Reagent	1, 1.5, 2, 2.5 µL	2, 3, 4, 5 µL	6, 9, 12, 15 µL
	5	Incubate	Opti-MEM® Medium	125 µL	250 µL	700 µL
	6	Add DNA-lipid complex to cells	DNA (0.5–5 µg/µL)	2.5 µg	5 µg	14 µg
Day 2–4	7	Visualize/analyze transfected cells	Diluted DNA Total	25 µL	50 µL	150 µL
			Diluted Lipofectamine® 2000 Reagent	25 µL	50 µL	150 µL
			Incubate for 5 minutes at room temperature.			
			Component	96-well	24-well	6-well
			DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL
			Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng
			Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL
			Incubate cells for 1–3 days at 37°C. Then analyze transfected cells.			

Figura 11: Protocolo para la transfección de células mediante lipofectamina utilizado como control positivo en los experimentos. Parte 2.

Anexo 3

Diferentes condiciones comprobadas para la optimización del protocolo de lipofectamina basándonos en el protocolo del Anexo 2.

Tabla 6: Condiciones de los diferentes ensayos para optimizar el control positivo con Lipofectamina de la transfección.

Estudios	Nº de células sembradas	Cantidad de plásmido (µl)	Cantidad de Lipofectamina (µl)	Porcentaje de transfección obtenido (%)
1	5.000 (pocillos de 96)	1,6	0,75	1
2	15.000 (pocillos de 96)	0,3	2,5	20
3	800.000 (pocillos de 6) / 160.000(pocillos de 4)	4,45	10	0
4	300.000 (pocillos de 6) / 60.000(pocillos de 4)	2,78 en el pocillo de 6, 0,67 en el pocillo de 24	10 en el pocillo de 6, 5 en el pocillo de 24	0

Anexo 4

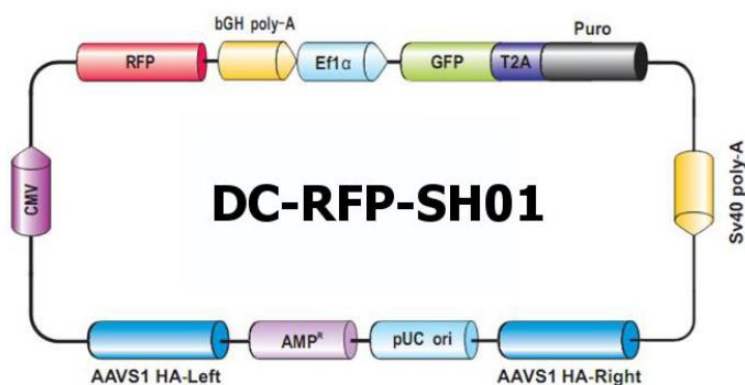


Figura 12: Plásmido DC-RFP-SH01 obtenido de GeneCopoeiaTM. En su secuencia se incluyen los genes que codifican las proteínas fluorescentes GFP y RFP y también el gen de la resistencia a la ampicilina, para la selección de las bacterias transformadas y la purificación del plásmido.

Anexo 5

Cálculos para la obtención del plásmido encapsulado de las NPs con CoNa a partir de los resultados obtenidos de la tabla 5:

$$(0,736 - 0,232) \cdot 44,7 \mu l = 22,53 \mu g \text{ de plásmido en el sobrenadante}$$

$$\frac{30 - 22,53}{30} \times 100 = 24,9 \% \text{ de plásmido encapsulado}$$