

Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza

IACS Instituto Aragonés de
Ciencias de la Salud

PROYECTO DE FIN DE GRADO

COMBINACIÓN DE TERAPIAS AVANZADAS Y NANOTECNOLOGÍA CONTRA EL CÁNCER

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Autora:

Marta Lalinde Ruiz

Tutores externos:

PhD María del Pilar Martín Duque

PhD Manuel Arruebo Gordo

Tutor académico:

PhD Gerard Pujadas Anguiano

Universidad Rovira i Virgili
Tarragona, 2018

AGRADECIMIENTOS

A Pilar, por la inmensa alegría que supuso para mi tu llamada y darme la oportunidad de realizar mis prácticas de fin de carrera en esta emblemática sede de la ciencia y la investigación y más en mi ciudad natal a la que tanto aprecio. Os agradezco tanto a ti como a Manuel haber sido mis tutores y mentores, así como por guiarme con seguridad y cariño hacia la meta en esta etapa final de mi formación universitaria.

Un recuerdo entrañable para Gracia y Marimar por haber hecho de perro lazarillo en mis primeros pasos por el CIBA y otro especial para Laura por su apoyo constante durante mi paso por el laberinto del INA. A María Sancho por abrirme los ojos en los momentos de duda.

Alejandra, mi "maxi-yo madrileña", por hacer fácil, comprensible y agradable lo que por mi sola hubiera sido costoso e imposible. Tus enseñanzas y tus trucos siempre me serán de utilidad y harán que nunca te olvide.

Marcela, mi ecuatoriana favorita, que junto con Alejandra has hecho de este camino una experiencia inolvidable. Por nuestra locura compartida, risas y tontadas que jamás se podrán borrar, siempre lo recordaré.

Por último, un agradecimiento general, pero no por ello menos importante, a todas las personas que tanto en el CIBA como el INA, que han sido muchas, me han ayudado. De un modo u otro, todos vosotros habéis marcado un momento muy importante de mi vida y por ello estoy plenamente agradecida.

ÍNDICE

Entidad colaboradora	1
Acrónimos	2
Resumen	3
Introducción	4
El cáncer	4
Terapias avanzadas. Empleo en las neoplasias	5
Estrategias para dirigir los vectores específicamente a la diana	10
Vehículos de transporte a los tumores	13
Objetivos	16
Materiales y métodos	17
Cultivos celulares	17
Extracción de exosomas	17
Síntesis de las AuPEIPEGNPs	18
Síntesis de las PLGANPs	19
Transferencia de ADN	20
Transferencia de virus completo	21
Transferencia y evaluación mediante microscopía	22
Evaluación por citometría de flujo	22
Caracterización de las AuPEIPEGNPs	23
Caracterización de las PLGANPs	24
Resultados y discusión	24
Síntesis de las NPs	24
Encapsulación de virus en ambos tipos de NPs	27
Encapsulación de ADN en ambos tipos de NPs	28
Evaluación de la eficacia de transfección	30
Conclusiones	35
Bibliografía	36
Agradecimientos	40

Anexos	41
Microscopía electrónica de Transmisión	41
Microscopía electrónica de Barrido	41
Dispersión dinámica de la luz	42
Gel de Agarosa	43
Protocolo de apertura de las PLGANPs	43
Ensayo de Transfección	43

ACRÓNIMOS

Ad	Adenovirus
AuPEIPEGNPs	Nanopartículas de oro-PEI funcionalizadas con PEG
CRAds	Adenovirus replicativos condicionales
CXCR4	Receptor de quimioquina CXC tipo 4
DLS	Dispersión dinámica de la luz
EPR	Efecto de permeabilidad y retención aumentada
GFP	Proteína verde fluorescente
MSCs	Células troncales mesenquimales
MVB	Cuerpos multivesiculares
NPs	Nanopartículas
pADN	ADN plasmídico
PEG	Polietilenglicol
pEGFP	Plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente
PEI	Polietilenimina
pfu	Unidad formadora de placa
PLGA	Ácido poli (láctico-co-glicólico)
PLGANPs	Nanopartículas de PLGA
p/p	peso/peso
RMI	Resonancia Magnética de Imagen
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SFB	Suero Bovino Fetal
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
UV-Vis	Ultravioleta visible

ENTIDAD COLABORADORA

El **Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS)** es la entidad que promueve en Aragón el conocimiento en Biomedicina y Ciencias de la Salud. Es una entidad de Derecho Público adscrita al departamento responsable de Salud del Gobierno de Aragón y le dota personalidad jurídica y patrimonio propio. Su principal objetivo es facilitar la promoción de la investigación, la innovación efectiva y la toma de decisiones en los servicios de salud mediante la gestión del conocimiento.

El IACS está ubicado en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), que nace en el 2012 desde el consenso entre los departamentos de Sanidad del Gobierno de Aragón, el IACS y la Universidad de Zaragoza con el objetivo de crear un centro de excelencia de Investigación Biosanitaria. El centro está gestionado por el propio instituto. El CIBA, además de ser sede del IACS, acoge también a grupos de investigación y servicios de la Universidad de Zaragoza y a la Fundación IIS Aragón.

La parte del proyecto dedicada a la síntesis de nanomateriales se realizó en el **Instituto de Nanociencia de Aragón (INA)**. Este centro es un instituto de investigación interdisciplinar localizado en el "Campus Río Ebro" de la Universidad de Zaragoza que fue fundado en 2003 por el Gobierno de Aragón, a petición de la Universidad de Zaragoza.

El INA se dedica a la I+D en la nanociencia y la nanotecnología y dispone de siete laboratorios equipados con instrumentación de última generación. Sus actividades se basan en la fabricación y procesamiento de micro y nanoestructuras (10^{-6} m y 10^{-9} m, respectivamente) y el estudio de sus aplicaciones, en colaboración con empresas e institutos de diferentes áreas y países.

RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades con mayor mortalidad en todo el mundo. En concreto, en el año 2015, fue la segunda causa de mortalidad a nivel global, produciendo 8.8 millones de muertes. Debido a la complejidad que presentan los tumores, los tratamientos actuales que se utilizan no resultan del todo eficaces provocando graves efectos secundarios. Por esta razón, nuestro grupo decidió estudiar nuevas terapias contra el cáncer que resultasen más eficaces y menos dañinas.

Se ha llevado a cabo una aproximación multidisciplinar partiendo de los últimos avances logrados en terapia celular y nanomedicina, para intentar avanzar y profundizar en el ámbito de las nuevas terapias antineoplásicas. Mas concretamente, se ha fijado como objetivo el estudio de diversas formulaciones virales y/o no virales basadas en nanomateriales de tipo orgánico e inorgánico para su aplicación potencial en el tratamiento de tumores sólidos. Dado al contexto en el que se realiza esta investigación se consideró el trabajar en ausencia de partículas virales activas, con lo que únicamente se emplearán cápsides inactivadas o plásmidos que no pudieran producir viriones.

Palabras clave: Cáncer, terapia génica, nanobiotecnología, transfección, vector viral, vector polimérico, adenovirus oncolítico.

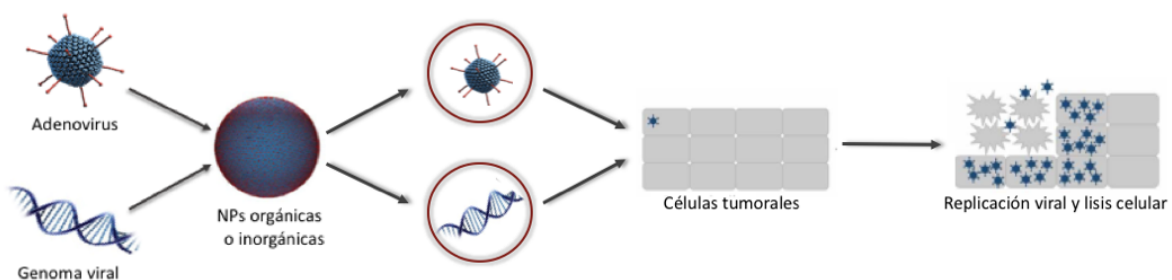


Figura 1. Esquema que refleja el objetivo final del proyecto. Síntesis de NPs de diversa naturaleza que actúen de vectores entregando virus oncolíticos y ADN viral de forma específica a las células tumorales.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

1.1 Estadísticas y estado actual

El cáncer es el resultado del crecimiento celular descontrolado de una población que ha desarrollado características anómalas, las cuales tienen la capacidad de atraer a otras células para contribuir en la transformación del tejido y con potencial para dispersarse a otras partes del organismo. Las alteraciones que sufren estas células malignas están producidas principalmente por una adquisición de modificaciones genéticas y epigenéticas inusuales. Estas modificaciones en el ADN se deben principalmente a la exposición a factores externos como la radiación UV, ciertos compuestos químicos o infecciones virales, y en un porcentaje menor, a mutaciones originadas al azar y a factores hereditarios (Vogelstein et al. 2013).

A día de hoy el cáncer continúa siendo una de las enfermedades con mayor mortalidad en todo el mundo, más concretamente, es la segunda causa de muerte a nivel global, por detrás de las enfermedades cardiovasculares, y siendo la causa de 8,8 millones de muertes en el año 2015 (OMS). Según la OMS este dato seguirá aumentando, estimando que se alcancen los 14 millones de muertes en el año 2035. Además, las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos aumentarán hasta un 70% en las próximas décadas, alcanzando los 24 millones de casos aproximadamente en el año 2035 (SEOM, 2018), (WHO Cancer Database, 2018).

1.2 Abordajes terapéuticos más empleados

Debido a la complejidad que presentan los tumores, los tratamientos convencionales que se utilizan para su eliminación no resultan de todo eficaces y provocan graves efectos secundarios, por lo que es necesario encontrar alternativas que sean más eficaces y menos dañinas.

La cirugía suele ser el tratamiento más eficaz en el caso de tumores confinados, o para tumores no tratables, y así aliviar los síntomas. Por otro lado, con la radioterapia y la quimioterapia se utilizan radiaciones de alta energía o compuestos citotóxicos que

dañan el ADN o tienen como diana, rutas moleculares comunes, con lo que los efectos secundarios son elevados y afectan gravemente a la calidad de vida del paciente. Además, aunque se administren dosis bajas para que no haya demasiada toxicidad, existe el riesgo de que sobrevivan poblaciones celulares resistentes, por lo que en la mayoría de casos es necesario continuar con la terapia para evitar la recurrencia. También hay estrategias basadas en terapia hormonal, inmunoterapia, abordajes epigenéticos, o terapia celular, aprovechando la capacidad de las células troncales mesenquimales (MSCs) para migrar a los tumores y así emplearse como vehículos de fármacos o genes terapéuticos (Lind, 2013).

2. Terapias avanzadas. Empleo en las neoplasias

Se han comenzado a desarrollar nuevos tratamientos basados en las terapias dirigidas, entre las que se incluye la nanomedicina. En este campo emergente se están haciendo grandes progresos en los tratamientos contra el cáncer, centrados principalmente en mejorar la eficacia del tratamiento además de reducir los efectos secundarios al dirigirlos específicamente a las zonas diana tumorales, aunque el conseguir una elevada acumulación del fármaco contenido en las partículas en el tumor sigue siendo muy difícil de conseguir (Wilhelm et al. 2016). Los sistemas más utilizados están basados en liposomas, nanopartículas poliméricas y nanopartículas (NPs) de oro y hierro. Además, para evitar la administración de varios anticancerígenos simultáneamente, como ocurre con los tratamientos convencionales, se puede aprovechar el hecho de que estos nanocompuestos pueden modificarse para dirigirse a varios objetivos al mismo tiempo, en lo que se denominan nanoplataformas (Markman et al. 2013).

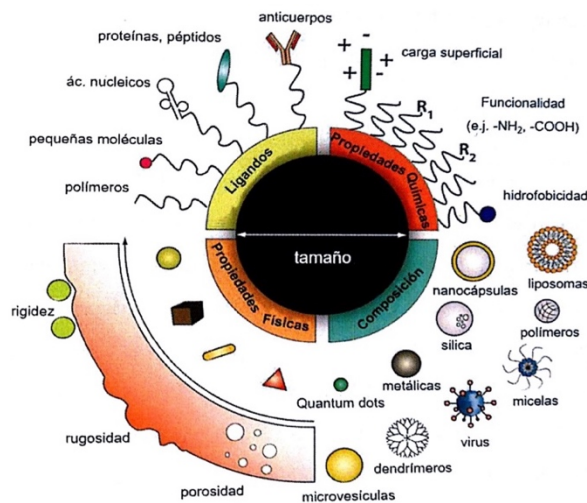


Figura 2. Diseño de una nanoplateforma. Sistema compuesto de uno o más materiales con diferentes propiedades físico-químicas y funcionalizado con diversos ligandos para abordar varios objetivos al mismo tiempo (González-Pastor 2017. Tesis doctoral).

Estas plataformas han de ser capaces de atravesar las barreras extracelulares, y una vez dentro del tumor han de ser capaces de interactuar bien de forma inespecífica o mediante receptores selectivos de la membrana de las células diana e internalizarse para liberar su carga (Blanco, Shen, y Ferrari 2015).

2.1 Terapia génica

Una de las estrategias de tratamiento más relevantes de las últimas décadas, también incorporada dentro de las terapias avanzadas, sería la terapia génica. Esta se define como la transferencia de material genético a las células o tejidos diana del paciente con la finalidad de restaurar su funcionalidad o silenciar genes defectuosos (Misra 2013).

Una de las clasificaciones más extendidas que se hace de la terapia génica se basa en la forma de aplicación de la misma, pudiendo dividirse en terapia ex vivo, en la cual se extraen las células del paciente, se modifican y se administran de vuelta al paciente; e in vivo, en la que se introduce directamente el material genético en las células del organismo (Blanco, Shen, y Ferrari 2015). Debido al amplio campo de aplicación de la terapia génica, cada año se realizan una gran cantidad de ensayos clínicos basados en el empleo de la misma, tal y como se muestra en la Figura 3.

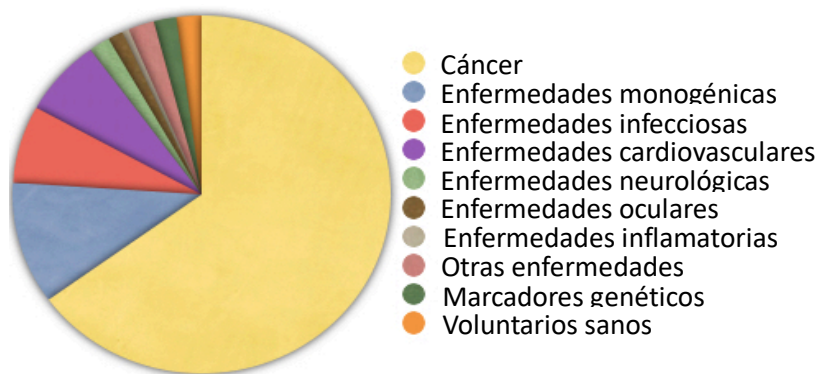


Figura 3. Estudios clínicos en terapia génica. Diagrama por enfermedades de los ensayos clínicos basados en terapia génica que se estaban llevando a cabo en 2017. Adaptado de *The Journal of Gene Medicine* (<http://www.abedia.com/wiley/indications.php>).

En la mayoría de los casos se emplean vehículos, conocidos como vectores, que protegen el material a la vez que facilitan su transporte. Se clasifican en dos grandes grupos en función al material del que provengan: virales y no virales. El vector ideal debe proporcionar una elevada eficacia de transfección en el tejido tumoral, una toxicidad baja, alteraciones fisiológicas mínimas, resultados reproducibles y debe ser sencillo de preparar y de administrar (Crespo-Barreda et al. 2016).

2.1.1 Terapia génica con vectores virales

Los virus son agentes microscópicos que contienen ADN o ARN de cadena simple o doble. Las partículas virales necesitan introducir su material genético en la célula huésped para poder utilizar su maquinaria metabólica para la transcripción y replicación viral, característica que se utiliza para introducir genes terapéuticos en las células tumorales (Das et al. 2015).

El uso de virus constituye una de las estrategias más comunes en la vehiculización de genes al interior celular, ya que presentan muchas ventajas, como los elevados perfiles de expresión del transgen, además de la facilidad de producirlos en cantidades elevadas. Entre las desventajas encontramos el elevado coste de producción, su inmunogenicidad y los efectos secundarios como la toxicidad derivada de las proteínas virales, cuando se administran en dosis altas, o el hecho de que la inmunidad del paciente disminuya considerablemente la eficacia de la terapia. Los adenovirus, los lentivirus, retrovirus y virus adenoasociados (AAVs) son algunos de los virus más utilizados en terapia génica (Misra 2013).

La versión oncolítica de los virus, en especial de los adenovirus (CRAds), representa una aproximación prometedora y novedosa para el tratamiento de los tumores, ya que aumenta el efecto citopático intrínseco de los virus hacia los tumores. Los virus oncolíticos están diseñados para que infecten y/o se repliquen de manera selectiva en células tumorales y no afecten a células normales (Figura 4).

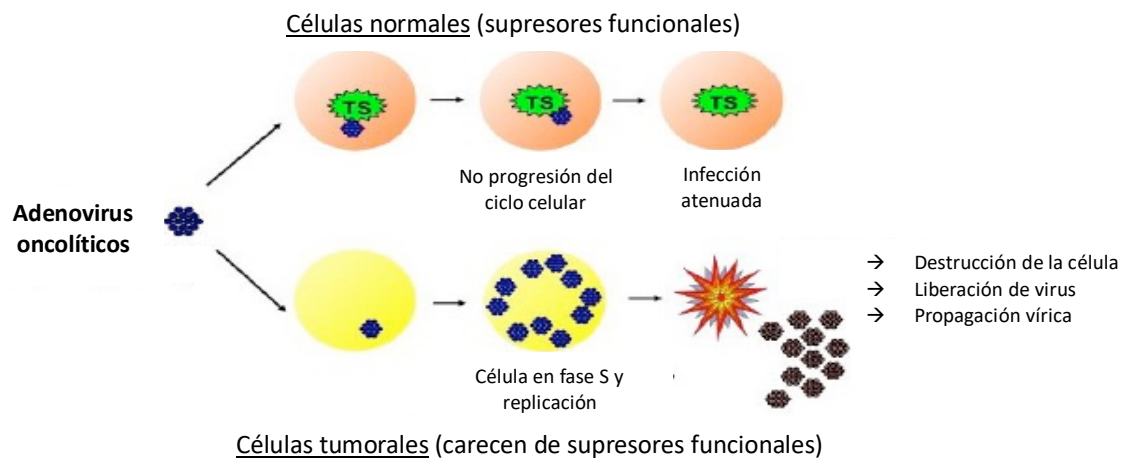


Figura 4. Diagrama del mecanismo de Ads oncolíticos. Los CRAds están diseñados para replicarse específicamente en células tumorales, minimizando el daño producido a las células normales.

Los adenovirus poseen varias características que los hacen atractivos como agentes oncolíticos, como su baja patogenicidad en pacientes inmunocompetentes, su actividad potente que produce la eliminación de la célula infectada y el conocimiento detallado de su estructura y ciclo de replicación que facilita la modificación genética para conferir potencia y selectividad. Además, su alta capacidad de replicación permite la obtención de altas cantidades y preparaciones de virus altamente concentradas para su uso en el entorno clínico (Ungerechts et al. 2016).

Pocos ensayos clínicos se han realizado por inyección sistémica de adenovirus oncolíticos. De hecho, hasta el 2010, solo dos candidatos habían sido probados por vía intravenosa, ONYX-015 y CG7870. ONYX-015 fue el primer adenovirus selectivo diseñado para ser utilizado en humanos. Este virus cuenta con la ausencia del gen E18-55K que lo hace selectivo para los tumores deficientes en p53 (Bischoff et al. 1996). Se llevaron a cabo numerosos estudios clínicos por inyección intravenosa de ONYX-015 (a veces en combinación con quimioterapia) en pacientes con tumores colorrectales, hepático, y varios tumores sólidos diseminados. Sin embargo, rara vez se detectaban signos de

eficacia antitumoral. A pesar de la falta de eficacia mostrada en los estudios clínicos, una compañía china (Sunway Biotech) está comercializando un derivado de este virus llamado H101 para el tratamiento intratumoral del cáncer de cuello. Este virus cuenta con una delección adicional, la del gen E3 que lo hace menos potente y más inmunogénico.

2.1.2 Terapia génica con vectores no virales

De forma paralela a los vectores virales se están desarrollando los vectores que no provienen de los virus y que están basados en polímeros, lípidos, proteínas recombinantes, nanopartículas inorgánicas y orgánicas. La ventaja de estos sistemas es que los pacientes no presentan inmunidad preexistente y su producción es más económica (Crespo-Barreda et al. 2016). En general, en este tipo de vectores, el material genético se une al vector mediante interacciones electrostáticas entre los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos con carga negativa y los grupos catiónicos del propio vector.

Dentro de los vectores no virales encontramos métodos físicos de transferencia génica como serían la electroporación, la inyección “jet” o la transferencia génica hidrodinámica, las cuales no han mostrado una gran eficacia y además producen daño tisular (Pahle y Walther 2016).

Entre los vectores no virales producidos por métodos químicos, podemos encontrar numerosas NPs inorgánicas (sílice, oro, hierro, etc.) y orgánicas (PLGA, quitosano, albúmina, etc.). Dentro de estas NPs orgánicas también encontraríamos nanomoléculas biológicas de tamaño nanométrico como son los exosomas. Estas NPs orgánicas presentan baja toxicidad e inmunogenicidad y son fácilmente modificables (Ebrahimian et al. 2017).

3. Estrategias para dirigir los vectores específicamente a la diana

Para conseguir que el contenido de los vectores alcance las células o tejidos diana, encontramos diversos métodos, entre los que nos encontraríamos los que empleamos en nuestro trabajo: el aprovechamiento del efecto EPR o la estrategia denominada “Caballo de Troya”.

3.1 Efecto EPR

Como se ha dicho anteriormente, numerosos estudios han descrito la capacidad de las NPs para extravasar los vasos sanguíneos de los tumores, lo que resulta en una mayor acumulación de dichas NPs en los tejidos tumorales, a través de un proceso conocido como efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR). Es decir, las NPs pueden alcanzar la región tumoral simplemente por acumulación o retención (Na et al. 2016).

Debido al rápido e irregular proceso angiogénico que tiene lugar durante el crecimiento de los tumores, la neovasculatura de los mismos resulta deteriorada y presenta fenestraciones de mayor tamaño (100-250 nm) en comparación con la de un tejido sano. Son estos poros los que aprovechan las NPs para penetrar al interior del estroma tumoral.

Sin embargo, el tamaño no es suficiente para comprender completamente el mecanismo del efecto EPR, ya que NPs de tamaños similares presentan un tropismo celular diferente en función del modelo tumoral estudiado. Se piensa que otros factores como la carga de la partícula o su área superficial, podrían estar implicados. Además, en muchas ocasiones la acumulación de NPs en el tejido tumoral resulta insuficiente para la aplicación clínica. Sumándole a estos factores la elevada presión del fluido intersticial y un aporte sanguíneo irregular, que suponen barreras a la penetración de NPs en el interior del tumor, el efecto EPR no parece ser suficiente para conseguir un efecto terapéutico completo (Huynh y Zheng 2015). Se ha llegado a demostrar que el efecto EPR sólo acumula en realidad el 0,7% del producto inyectado por vía intravenosa, siendo esta cantidad insuficiente en la mayoría de los casos (Wilhelm et al. 2016).

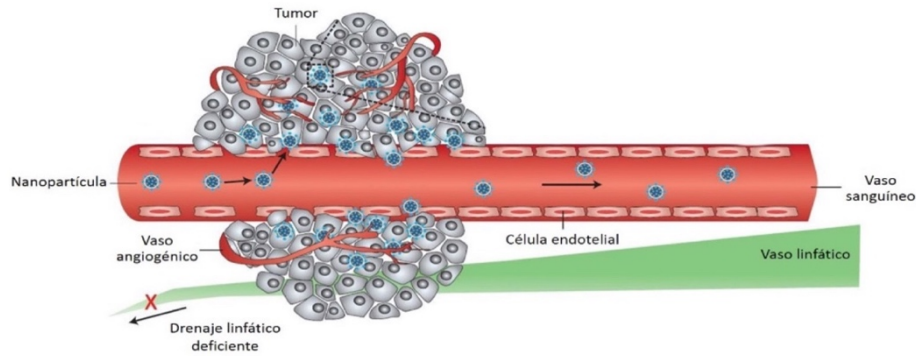


Figura 5. Representación esquemática del efecto EPR. La imagen refleja un tejido tumoral donde se puede apreciar los vasos con grandes fenestraciones por los cuales se internalizarían los vectores terapéuticos (Vazquez-duhalt 2014).

3.2 Caballos de Troya o vectores dirigidos

Otra estrategia en desarrollo consiste en emplear un sistema que actúe como “caballo de Troya”, es decir, que esconda el material genético (carga) y que migre y se integre en los sitios de inflamación o daño, como es el caso de los tumores. Hasta el momento se han utilizado diferentes sistemas como “caballo de Troya”, entre ellos podríamos destacar las células dendríticas (Marcos-Campos et al. 2011), los linfocitos T y los macrófagos entre otros (Choi et al. 2012). El interés en utilizar dicho “caballo de Troya” radica en evitar el reconocimiento por parte del sistema inmune (sistema fagocítico mononuclear) como ocurre en el caso de las nanopartículas. Dichos materiales son reconocidos pese a ser funcionalizados con distintas moléculas que evitan o retardan dicho reconocimiento (e.g., PEG, polietilenglicol). Al esconder el fármaco, gen, o molécula terapéutica o de señalización dentro de una célula del propio hospedador la posibilidad de reconocimiento queda disminuida.

En la actualidad, se están empleando también células MSCs como vectores de terapias debido a su carácter inmunomodulador y su capacidad de tropismo innato a los tumores. En nuestro grupo se han utilizado las MSCs de diferentes orígenes como transportadores de distintos elementos terapéuticos (Belmar-Lopez et al. 2013) (M. del M. Encabo-Berzosa et al. 2017). Se ha hipotetizado que la razón de esta migración está basada en un gradiente de factores quimioatrayentes por parte del tumor y de la expresión de un conjunto de receptores de quimioquinas y citoquinas en la superficie celular de las MSCs (Belmar-Lopez et al. 2013).

Los tumores son fuente de producción de moléculas quimioatrayentes inflamatorias que sirven de ligando a los receptores que expresan las MSCs facilitando su migración hacia el microambiente tumoral. Las quimioquinas y citoquinas inflamatorias son liberadas tras ocurrir el daño y permiten la activación de las MSCs necesaria para la migración. Podría destacarse como responsable de la migración, la pareja receptor-ligando CXCR4/CXCL12 o las moléculas de adhesión o integrinas (β -1 y β -2) (Belmar-Lopez 2013. Tesis doctoral).

Dado que, tanto los receptores CXCR como las integrinas están situados en la membrana de la célula y puesto que algunos autores están empleando los exosomas celulares como transportadores de quimioterapia a los tumores (Azmi, Bao, y Sarkar 2013) pensamos que las microvesículas secretadas por las MSCs podrían servirnos por igual como vectores transportadores de nuestras terapias.

Los exosomas se originan en los cuerpos multivesiculares (MVBs) por invaginación de la membrana de un endosoma tardío, siendo posteriormente liberados al espacio extracelular, tras la fusión de los MVBs con la membrana plasmática (Marbán 2018). Inicialmente, estas nanopartículas biológicas, se consideraron vesículas colectoras de desechos, subestimándose su potencial terapéutico. Sin embargo, actualmente, es ampliamente conocido su papel en diferentes procesos fisiológicos de comunicación intercelular a corta y larga distancia, tanto en células normales como malignas.

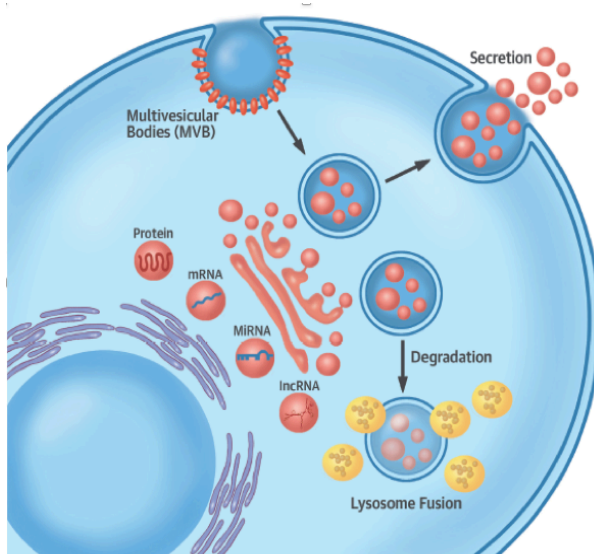


Figura 6. Esquema de la biogénesis de exosomas. Los exosomas surgen de la fusión de invaginaciones de la membrana superficial (cuerpos multivesiculares) y los productos del aparato de Golgi. Las vesículas resultantes son degradadas por los lisosomas o secretadas como exosomas (Marbán 2018).

4. Vehículos de transporte de los virus o los plásmidos a los tumores

4.1 Combinación de NPs con la terapia génica

Como se ha comentado anteriormente, los vectores pueden clasificarse en virales y no virales. Los nanomateriales se incluyen dentro de los no virales y pueden clasificarse en orgánicos e inorgánicos. Dentro de los orgánicos empleados como vectores de transfección se encontrarían los liposomas catiónicos, dendrímeros, NPs de PLGA o las NPs de quitosano. Las NPs metálicas de oro, hierro, sílice o los nanotubos de carbono son algunos de los nanomateriales que se han estudiado como posibles vectores de ácidos nucleicos con aplicación en terapia génica (Sun et al. 2014). Las NPs de hierro se han utilizado como vectores génicos en magnetotransfección, en la cual aplicando un campo magnético externo facilita y acelera la sedimentación de las NPs acopladas a ácidos nucleicos (Kim et al. 2017).

Existen diversas estrategias que mejoran la eficacia en el transporte de ácidos nucleicos, incrementando el escape endosomal y protegiendo los oligonucleótidos frente a la degradación intra y extracelular. El uso de PEI (Polietilenimina) y PEG (Polietilenglicol) como agentes de transfección ha sido previamente planteado en combinación con NPs magnéticas, ya que la conjugación con PEG facilita la sedimentación del ADN y la internalización, mejorando el proceso de transfección. En este sentido, Stephen et al. 2016) recubrieron la superficie de las NPs de hierro basadas en PEI con PEG, consiguiendo una alta eficacia de transfección a la vez que se reducía notablemente la citotoxicidad de los vectores. El PEI actúa como polielectrolito catiónico con un exceso de carga positiva capaz de acoplar ADN plasmídico y a su vez interaccionar con la pared celular.

Muchas estrategias de protección con PEG se han aplicado para favorecer la liberación del plásmido, como por ejemplo, la unión de PEG y PEI a la superficie de nanotubos de carbono (Taghavi et al. 2016) y grafeno (Wang et al. 2016) con el objetivo de silenciar la expresión génica utilizando ARN de interferencia. Otros estudios con NPs son los realizados por los grupos de Xiong y Agirre quienes llevaron a cabo estudios con

nanoestructuras como vectores en viroterapia, encapsulando adenovirus oncolíticos en liposomas (Xiong et al. 2015) (Agirre et al. 2015).

Dado que se conoce desde hace tiempo que la modificación del ADN viral para poder expresar genes terapéuticos y mejorar los adenovirus (Ads) oncolíticos para terapias antitumorales, presenta alguna limitación como consecuencia de la acción de los anticuerpos (Ac) neutralizantes, se planteó la estrategia de entregar el genoma oncolítico viral mediante el uso de liposomas catiónicos, pudiendo superar, de este modo, estas limitaciones en su aplicación clínica (Kwon et al. 2011).

Continuando con esta estrategia, también se ha probado a encapsular Ads completos en NPs con diferentes composiciones. Tresilwised et al. 2012 observaron que las limitaciones de infectividad de los Ads pueden superarse por la asociación con NPs magnéticas. El tamaño, recubrimiento y las propiedades magnéticas son atributos clave que se pueden ajustar y optimizar para producir composiciones que confieran protección al virus contra efectos inhibidores del suero o contra los Acs neutralizantes. De esta manera, podrían ser utilizados como vectores inteligentes que combinen las funciones de entrega de virus dirigidos para terapia y la posibilidad de monitorizar la distribución "*in vivo*" por Resonancia Magnética de Imagen (RMI) (Tresilwised et al. 2012).

4.2 Combinación de terapia génica viral con células o elementos derivados de ellas (exosomas)

También se ha explorado el uso de células de diferentes orígenes como vectores para llevar Ad oncolíticos. En el caso de Ramirez et al. 2015 , evaluaron la capacidad de usar las células MSCs como "caballos de Troya" cargados con virus de replicación selectiva (CRAds), describiendo que además de una buena capacidad migratoria, también contribuían en la modulación del sistema inmunitario, afectando a células del sistema innato y adaptativo.

Pese a no existir todavía ningún trabajo de exosomas como transportadores de virus, si que existen evidencias de que pueden llevar otras terapias como las NPs para hipertermia. Los exosomas derivados de MSCs conservan algunas de las propiedades de

las células de las que se originan, como la ausencia de MHCII o la presencia de moléculas de adhesión (Yu, Zhang, y Li 2014). Este sistema puede ser muy útil como terapia dirigida también ya que, tal y como demostraron Altanerova et al. 2017 las NPs magnéticas empaquetadas en exosomas derivados de MSCs fueron eficazmente endocitadas por las células tumorales, facilitando la ablación de estas células malignas mediante hipertermia magnética.

Además, entre los posibles beneficios del uso de exosomas se encuentra la conservación de las propiedades reguladoras sobre diferenciación, activación y función de los linfocitos T que poseen las MSCs de las que se originan, sugiriendo que podrían utilizarse también como agentes inmunomoduladores en el tratamiento de enfermedades inmunológicas (Blazquez et al. 2014). Varios estudios llevados a cabo con NPs y exosomas mostraron que frente a las limitaciones del empleo de NPs como transportadores de fármacos, los exosomas podían actuar como vectores terapéuticos sin causar respuesta inmunitaria (Srivastava et al. 2016). En vista de las excelentes propiedades que aportan los exosomas y las NPs, es necesario llevar a cabo un mayor número de estudios en este sentido.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Una vez en contexto y expuestas las bases de partida del trabajo, se define el **objetivo general** como *el estudio de diferentes formulaciones virales y/o no virales basadas en nanomateriales de tipo orgánico e inorgánico para su aplicación en el tratamiento potencial de tumores sólidos.*

En base a la hipótesis de que algunos elementos de carácter orgánico o inorgánico podrían servir para transportar adenovirus replicativos (en su forma viral completa o solo mediante su genoma) a los tumores, se plantea el siguiente esquema de trabajo con los **objetivos específicos** indicados a continuación:

1. Combinación de virus y ADN con NPs inorgánicas

- Síntesis y caracterización de las NPs
- Análisis de la transfección o infección

2. Encapsulación de virus y ADN en NPs orgánicas

- Síntesis y caracterización de las NPs
- Análisis de la transfección o infección

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron mantenidas en medio DMEM con 4,5g/l de glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos antimicóticos y 200mM de L-glutamina en el incubador al 5% CO₂ y a 37°C. Las células utilizadas son una línea de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa) obtenida del servicio de cultivos celulares de Cancer Research UK (Reino Unido). Para el segundo ensayo de transfección se utilizaron células 293T (Cancer Research UK, Reino Unido).

2. Extracción de exosomas

Para la extracción de exosomas se siguió el protocolo descrito por (Colombo, Raposo, y Théry 2014) basado en centrifugación diferencial. Las líneas celulares se cultivan en frascos de 175 cm² hasta alcanzar una confluencia del 60%. Las placas se lavaron dos veces con PBS y se añadió medio DMEM suplementado con SFB sin exosomas. Los exosomas presentes en el suero fueron previamente eliminados mediante ultracentrifugación a 100.000 g durante 1 hora. El medio condicionado se retiró a las 24h y se centrifugó a 500 g y 4°C durante 5 minutos para eliminar las células muertas. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 2.000 g y 4°C durante 10 minutos para descartar los restos celulares y a 10.000 g y 4°C durante 30 minutos para aislar las microvesículas de los exosomas. Los exosomas se sedimentaron mediante ultracentrifugación del medio condicionado a 100.000 g y 4°C durante 60 minutos, seguido de un lavado en PBS. La cantidad de exosomas obtenida se determinó mediante el método BCA utilizando *BCA protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

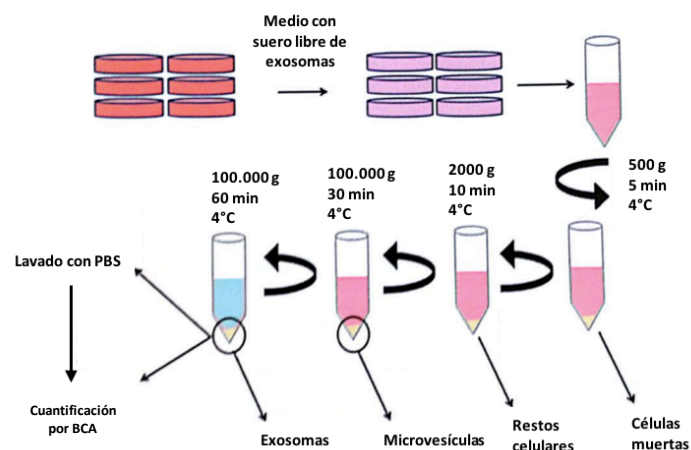


Figura 7. Esquema del proceso llevado a cabo para la purificación de exosomas a partir de células en cultivo. La separación se lleva a cabo por un gradiente de densidad. (Encabo-Berzosa 2017. Tesis doctoral).

3. Síntesis de las AuPEIPEGNPs

Para realizar la síntesis de NPs de oro recubiertas con PEI nos basamos en el protocolo descrito por Encabo-Berzosa et al. 2017. Dicho protocolo se fundamenta en la acción de polietilenimina (PEI) como reductor y estabilizador del ácido cloroaúrico (HAuCl_4) generando nanopartículas de oro recubiertas de dicho polímero en una primera fase. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y se comenzó preparando una solución 0.1M de HAuCl_4 . Se continuó añadiendo 28 μL de la solución anterior a 19 mL de agua destilada.

Por otro lado, se preparó la solución de PEI en agua destilada. Posteriormente se añadió la disolución de PEI a la disolución de oro y se dejó en agitación durante media hora a temperatura ambiente. Observándose un cambio de color amarillo a anaranjado, indicativo de la formación de las NPs (Figura 8).

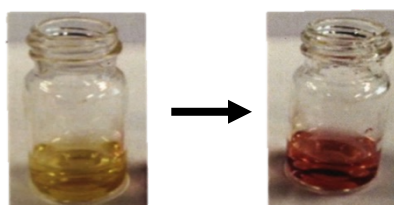


Figura 8. Imagen que muestra la variación de color de la dispersión de NPs durante la síntesis. Cambio de color tras la adición de la disolución de PEI a la disolución de HAuCl_4 , indicativo de la formación de AuPEINPs.

Las NPs resultantes se sometieron a diálisis para eliminar el exceso de PEI que hubiera podido quedar sin reaccionar. Una vez sintetizadas las AuPEINPs se procedió a su funcionalización con PEG (SH-PEG monofuncional de 1 KDa), para ello se partió de una disolución de PEG, en agua con una relación en peso de 1:1 con respecto a la masa de las NPs a funcionalizar y se fue añadiendo PEG gota a gota sobre la dispersión de NPs bajo agitación magnética durante media hora. Para eliminar el exceso de PEG no unido a la superficie de las NPs, se dializó durante dos días frente a agua destilada. Una vez finalizada la síntesis, las dispersiones de NPs se concentraron evaporando parte del agua de la dispersión y se procedió al cálculo de la concentración de NPs con el uso de una balanza de precisión. Las NPs obtenidas se caracterizaron por diversas técnicas comentadas más adelante.

4. Síntesis de las PLGANPs

La síntesis de estas NPs se llevó a cabo por emulsión doble. Se utilizó PLGA RG 504, más detalladamente, se disolvió 50 mg de PLGA en 3 mL de disolvente y posteriormente se añadió 1mL de fase acuosa. La fase acuosa es la región donde se metería el virus o el plásmido que se desee encapsular junto con el surfactante si se requiere protección del virus. Seguidamente se puso al dedo sonicador al 40% de amplitud durante 20 segundos, con lo que se completó la primera emulsión. Para realizar la segunda emulsión se añadió 8 mL de Colato de Sodio al 1% y se puso a sonicar durante 40 segundos. Una vez finalizada, se añadieron 12mL de Colato de Sodio al 0.3% y se agitó a 600rpm durante 3 horas.

Finalizado este periodo de tiempo, se llevó a cabo un lavado mediante centrifugación a 7500 rpm, una vez recogido, se eliminó el sobrenadante y se diluyó el pellet en agua para realizar el segundo lavado, pero esta vez a 9000 rpm. Tras realizar los lavados por centrifugación, se prepararon tres pocillos por muestra, que hubieron de ser pesados previamente en balanza analítica, para saber su peso inicial. Posteriormente se pusieron 50 μ L y se introdujeron en la estufa a 80°C. Pasadas unas horas se recogieron y se pesaron de nuevo para obtener los pesos finales y calcular la diferencia y con ello la concentración de cada muestra.

5. Transferencia de ADN

Para evaluar la utilidad de las NPs y los exosomas como vectores válidos para la transfección se utilizó un plásmido pGFP. El plásmido pEGFP (156.8 ng/ μ L) tiene un tamaño de 4,7kb y codifica para a proteína verde fluorescente bajo el promotor de citomegalovirus (CMV). La eficacia de transfección del plásmido se evaluó por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. A continuación, la metodología de la formación de los complejos NPs-pGFP.

5.1 Formación de los complejos de ácidos nucleicos

5.1.1 Combinación de exosomas celulares y plásmido EGFP

Una vez extraídos y cuantificados los exosomas, para llevar a cabo el ensayo de transfección, se pusieron en contacto 10 μ g de exosomas (1.21 μ g/ μ L) con Lipofectamina® 3000 siguiendo el protocolo de la casa comercial (Thermo Fisher Scientific).

5.1.2 Complejos AuPEIPEG-pEGFP

Previo al estudio de transfección, se evaluaron tres ratios NPs/ADN, 30:1, 15:1 y 5:1 (p/p). Para ello, se pusieron en contacto 2.78 μ L, 8.33 μ L y 16.67 μ L, de la dispersión de NPs, con 1.6 μ L de pEGFP (156.8 ng/ μ L) en un volumen final de 200 μ L, respectivamente. Para que se formasen los complejos se dejaron en incubación media hora.

5.1.3 Encapsulación de pEGFP en PLGANPs

Para realizar la encapsulación del plásmido en las nanopartículas se siguió el protocolo de síntesis descrito anteriormente en el apartado 4 (Síntesis de las PLGANPs). La diferencia radica en que la fase interna o acuosa estaría formada por 900 μ L de plásmido GFP y 100 μ L de Colato de Sodio 0.6%.

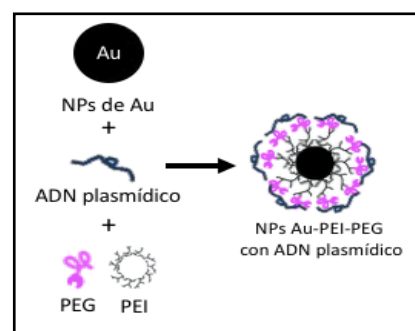


Figura 9. Complejo formado por las AuPEIPEGNPs y el plásmido GFP. El ADN plasmídico se une a la superficie gracias a la interacción con PEG.

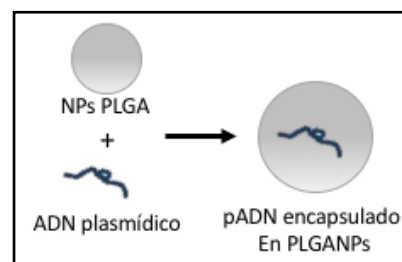


Figura 10. Esquema representativo de la encapsulación del pADN en PLGANPs.

6. Transferencia de virus completo

Esta parte se va a realizar en colaboración con el Centro de Investigación Médica Aplicada de Pamplona (CIMA), con el grupo del Dr. Rubén Hernández Alcoceba, gran profesional en el campo de los Ads oncolíticos. Se realizaría allí porque cuentan con todas las instalaciones necesarias para poder trabajar con virus activos.

Este ensayo se realizará siguiendo el mismo esquema y protocolo que en el caso de la transferencia de ADN vírico. A continuación, se indica la metodología de la formación de los complejos NPs-AdGFP, que se analizaron posteriormente por TEM y/o DLS.

6.1 Formación de los complejos virales

6.1.1 Complejos AuPEIPEGNPs-AdGFP

Para la formación de los complejos AuPEIPEG-virus, se pusieron en contacto 15 μg de AuPEIPEGNPs con 50×10^7 pfu de AdGFP se dejó media hora en agitación a temperatura ambiente y se preparó una rejilla de TEM (como se muestra en la Fig.3 en Anexos) para visualizar si se habían conjugado correctamente.

6.1.2 Encapsulación de AdGFP en PLGANPs

Se reprodujo el protocolo de síntesis introduciendo en la fase interna 30 μL de virus GFP (procedente del CIMA, Pamplona), que correspondería con 3×10^7 pfu y 970 μL de Colato de Sodio 0.6%.

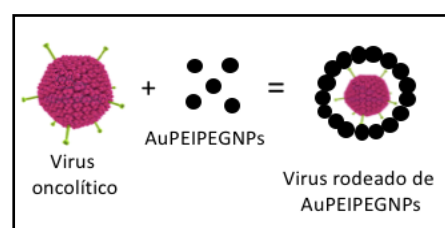


Figura 11. Representación esquemática del complejo formado por las AuPEIPEGNPs y el virus oncolítico inactivo.

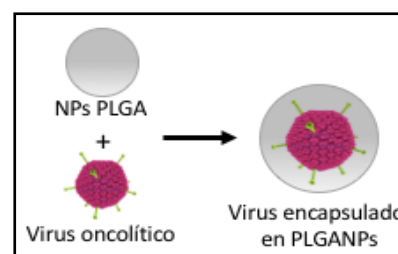


Figura 12. Esquema aclarativo de la encapsulación del virus oncolítico en PLGANPs.

7. Transfección y evaluación mediante microscopía de fluorescencia

En el primer ensayo de transfección, se utilizaron células HeLa y se sembraron tres placas multiwell de 6 pocillos a una densidad de 4×10^5 células/pocillo. Se ensayó una cantidad de ADN por pocillo (0.25 μg) de pEGFP. Para ello, previamente a la adición del ADN en los pocillos, se llevó a cabo la unión de las NPs al mismo (excepto en el caso de las PLGANPs que ya está el plásmido encapsulado en su interior). Se ensayaron las

siguientes condiciones: AuPEIPEGNPs/ADN a tres ratios diferentes (5:1, 15:1 y 30:1), PLGANPs/ADN (5 µg, 15 µg y 30 µg), Lipofectamina®/ADN (en cantidades de 5, 7.5 y 10 µL) y FuGENE®/ADN (en ratios 2:1, 4:1 y 6:1) como controles positivos, exosomas (1.21 µg/µL) con Lipofectamina® (10µg de exosomas con las condiciones anteriores de Lipofectamina®) y células sin tratar como control negativo.

En este primer ensayo de transfección las placas alcanzaron una confluencia mucho mayor a la esperada y al comenzar a levantarse las células, se decidió repetir el experimento, pero esta vez sembrando 4×10^4 células y ajustando las condiciones y ratios estudiados a los que mejor resultado habían ofrecido de las tres placas. En esta ocasión se experimentó con la línea celular 293T, la cuales son más transfectables. Las condiciones estudiadas fueron: AuPEIPEGNPs/ADN (30:1), PLGANPs/ADN (100 µg), Lipofectamina®/ADN (15 µL) como control positivo, exosomas con Lipofectamina® (10 µg de exosomas con la condición anterior de Lipofectamina®) y células sin tratar como control negativo. En lugar de FuGENE®, esta vez probamos a poner 400 µL de PLGA, que correspondería a 100 µg de pEGFP, para comprobar si resulta dosis tóxica o por el contrario mejora la transfección al contar con mayor cantidad de ADN en comparación a la otra condición estudiada de PLGA.

Estos complejos se formaron por incubación durante media hora y se añadieron a los pocillos gota a gota dejándolos en contacto con las células durante tres días. A los tiempos de interés (24h, 48h y 72h) la fluorescencia verde provocada por la proteína GFP se visualizó en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX81.

8. Evaluación por citometría de flujo

La evaluación de la eficacia de la transfección se analizó usando un citómetro de flujo separador FACSAria (BD) bajo la excitación con el láser de 488nm. Las muestras se recogieron de las placas multiwell incubadas durante 72h.

9. Caracterización de las AuPEIPEGNPs

9.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para la visualización del tamaño y de la forma de las NPs se utilizó un microscopio T20-FEI con una fuente de electrones LaB6 unida a una lente con un objetivo "SuperTwin®" que permite una resolución de 2.4 Å.

Para poder observar la presencia de PEI, la funcionalización con PEG, así como los virus unidos a la superficie, se llevó a cabo una tinción con ácido fosfotungsténico (30mg/mL). Todas las muestras se prepararon en rejillas de cobre para TEM con recubrimiento de carbono/Formvar, según se indica en anexos.

Para medir el tamaño intrínseco de las NPs, se midieron los diámetros de hasta 200 NPs a partir de microfotografías de TEM con el programa informático ImageJ®.

9.2 Espectrofotometría UV-VIS

El patrón de absorbancia de las NPs se midió con un espectrofotómetro UV-Vis Jasco V670 en el rango entre 300 y 800 nm. La medida se realizó tomando como línea base la absorbancia del agua destilada en ese mismo rango de longitudes de onda.

9.3 Medida de la carga superficial y tamaño de partícula por DLS

La carga superficial de las NPs se evaluó mediante la medida del potencial Z usando la técnica de análisis de fase de la dispersión de la luz, a pH=7, en una disolución de KCl 1mM. Para llevar a cabo las medidas se utilizó un equipo Brookhaven 90 plus con el software ZetaPALS® (Brookhaven Instruments Co.). La medida de la distribución de tamaños se realizó en el mismo equipo, utilizando un índice de refracción imaginario de 0.119 y un índice de refracción real de 3.338. Para obtener la medida se realizaron cinco ciclos de tres minutos.

10. Caracterización de las PLGANPs

10.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para poder visualizar el tamaño y de la forma de las NPs de PLGA se utilizó el mismo microscopio T20-FEI que con las otras NPs. En este caso como no se requiere funcionalización con PEG ni tienen presencia de PEI, solo se llevó a cabo la tinción con ácido fosfotungsténico (30mg/mL) cuando se encapsularon los virus inactivados, para poder visualizarlos en las imágenes. Las muestras se prepararon en rejillas de cobre para TEM con recubrimiento de carbono/Formvar.

Del mismo modo que con las AuPEIPEGNPs, para medir el tamaño intrínseco de las NPs, se midieron los diámetros de hasta 200 NPs a partir de microfotografías de TEM con el programa informático ImageJ®.

10.2 Medida del tamaño de partícula por DLS

La medida de la distribución de tamaños se realizó en el equipo Brookhaven 90 plus, con el software BLC Particle Sizing® utilizando un índice de refracción imaginario de 0.1 y un índice de refracción real de 1.55. Para obtener la medida se realizaron cinco ciclos de tres minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Síntesis de las NPs

1.1 Síntesis de las AuPEIPEGNPs

Las NPs obtenidas a partir de la reducción y estabilización del HAuCl_4 con PEI resultaron ser esferas macizas de unos 5nm de diámetro, como puede observarse en la microfotografía de TEM (Figura 13). La dispersión coloidal de NPs mostró un máximo de absorbancia alrededor de los 520 nm. Esta absorción es característica del plasmón de resonancia de superficie de nanocristales esféricos de oro.

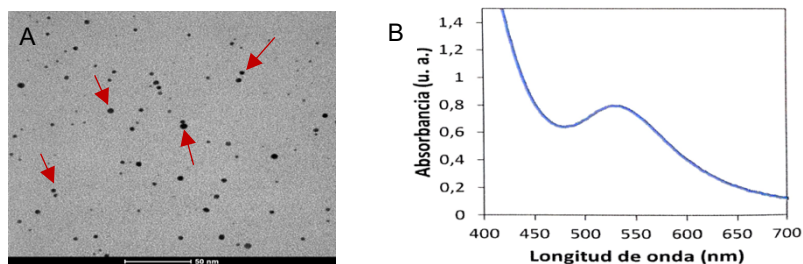


Figura 13. Síntesis y caracterización de las AuPEINPs. A) Fotografía de TEM de las AuPEINPs. B) Patrón de absorbanza por espectrofotometría UV-visible.

Una vez funcionalizadas las AuPEIPEGNPs, se comprobó que la carga superficial era positiva gracias al uso del programa *Zeta Potential Analyzer* del DLS. El potencial zeta es un parámetro fundamental que describe la carga de la capa superficial de las nanopartículas y es necesario que sea positivo para que las NPs interactúen con el material genético, que posee carga negativa. Esta medida está influenciada por la composición, pH y el medio en el que se dispersan las NPs y como se muestra en la Figura 14, las AuPEIPEGNPs contaban con un potencial zeta mayor a +30mV, lo que nos indica que son estables en tamaño y carga.

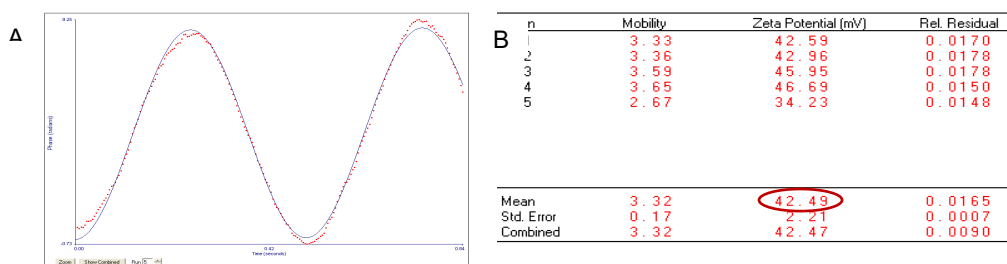


Figura 14. Caracterización AuPEIPEGNPs. A) Gráfica obtenida de la medición de la carga de las AuPEIPEGNPs. B) Resultados numéricos obtenidos de la medición del potencial zeta de las NPs en el DLS (+42,49 mV).

1.2 Síntesis de las PLGANPs

El protocolo de síntesis de este tipo de NPs se tuvo que poner a punto para poder conseguir NPs con un tamaño mayor a 80 nm en las que pudiesen internalizar los adenovirus GFP. Para ello, primeramente, se probaron a poner en contacto diversos disolventes con el virus para observar los efectos sobre éste. Tal como se muestra en la Figura 15, el Diclorometano (DCM) y el Cloroformo fueron los que mejor resultado ofrecieron, ya que el Acetato de Etilo era el más dañino y provocaba la pérdida de viabilidad de los virus. Entre estos dos disolventes que presentaban resultados similares, se decidió trabajar con DCM debido al cuidado extremo que hay que tener al trabajar con Cloroformo.

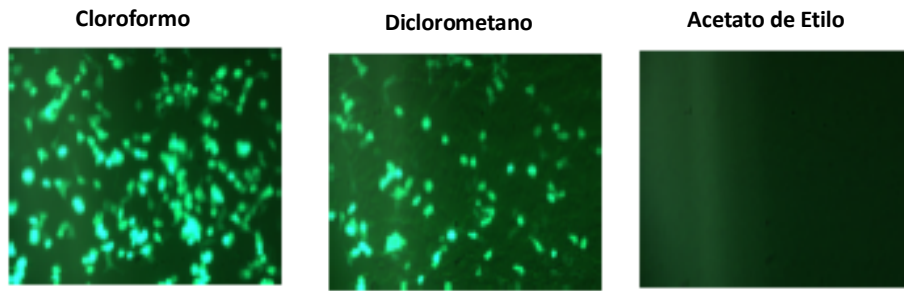
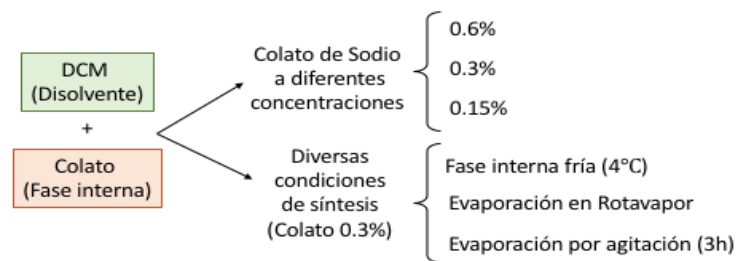


Figura 15. Adenovirus expresando GFP en tres medios con diferentes disolventes. En la primera y segunda imagen se puede observar adenovirus viables en comparación con el Acetato de Etilo que resulta ser el más dañino.

Posteriormente se probaron diferentes surfactantes en la fase interna (Alcohol polivinílico o PVA y Colato de Sodio) para aumentar la protección del virus en el interior de las nanoestructuras. Como con PVA no obtuvimos NPs mayores de 53.8 nm, elegimos el Colato de Sodio (122.8 nm), pero se llevaron a cabo pruebas paralelas con diferentes concentraciones de Colato y a diferentes condiciones para comparar resultados. Se evaluaron seis condiciones de síntesis diferentes porque aun no se alcanzaba la emulsión deseada, tal y como se muestra en el esquema inferior.



Todas las NPs que se sintetizaron se caracterizaron por DLS y se prepararon rejillas de SEM para contrastar los resultados obtenidos con el programa ImageJ® y comprobar cual era la condición que ofrecía mejor resultado.

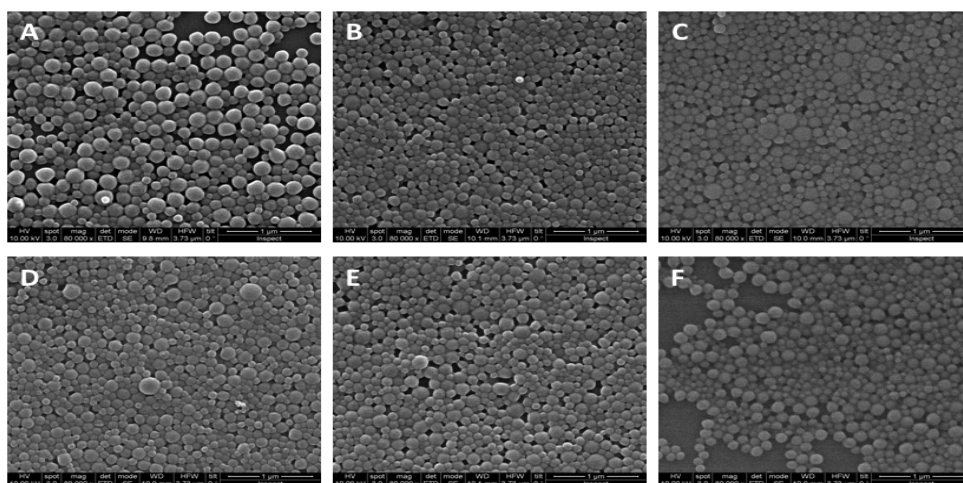


Figura 17. Imágenes de SEM de las NPs de PLGA. A) Colato de Sodio al 0.6%. B) Colato de Sodio al 0.3%. C) Colato de Sodio al 0.15%. D) Síntesis de PLGANPs con fase interna en frío (4°C). E) Evaporación por agitación. F) Evaporación en Rotavapor.

Tabla 1. Tabla resumen de los resultados de medida mediante DLS e ImageJ de tamaño de las NPs de PLGA sintetizadas a diferentes condiciones.

<i>Condiciones</i>	<i>Medida tamaño DLS</i>	<i>Medida tamaño ImageJ®</i>
<i>Colato de Sodio 0.6%</i>	47.7 nm	160.5 nm ± 43.2
<i>Colato de Sodio 0.3%</i>	149.8 nm	121.1 nm ± 27.7
<i>Colato de Sodio 0.15%</i>	73.3 nm	139.6 nm ± 41.7
<i>Colato de Sodio 0.3% Frío</i>	86.7 nm	139.6 nm ± 28.0
<i>Evaporación por rotavapor</i>	72.3 nm	137.9 nm ± 39.1
<i>Evaporación por agitación</i>	93.5 nm	142.5 nm ± 30.5

El Colato de Sodio al 0.6% fue el que permitió formar NPs de un tamaño entorno a 160nm y con buena morfología. En la Tabla 1 se pueden observar las condiciones estudiadas y las medidas resultantes del DLS así como las obtenidas con ImageJ® a partir de microfotografías de SEM. Como se puede comprobar, la diferencia de las medidas tomadas con el DLS y la herramienta ImageJ® son significativamente diferentes, pero basándonos en las imágenes obtenidas del SEM decidimos confiar en la medida obtenida partir de las microfotografías.

Dado que el Colato de Sodio 0.3% frío mejoraba el protocolo, concluimos que las mejores condiciones de síntesis fueron obtenidas con DCM como disolvente y Colato de Sodio al 0.6% frío (4°C) como surfactante en la fase interna. El paso de evaporación resultó mejor por agitación durante 3h que en el rotavapor. Una vez se consiguieron las condiciones experimentales perfectas se sintetizaron las NPs encapsulando el virus y el genoma para poder continuar con los ensayos de transfección.

2. Encapsulación de virus en ambos tipos de NPs

2.1 Formación de complejos AuPEIPEGNPs-AdGFP

Como se puede observar en la Figura 18, los complejos se formaron correctamente y se puede diferenciar con claridad diversos viriones rodeados de múltiples NPs de oro, que corresponderían a las zonas más oscuras de la imagen.

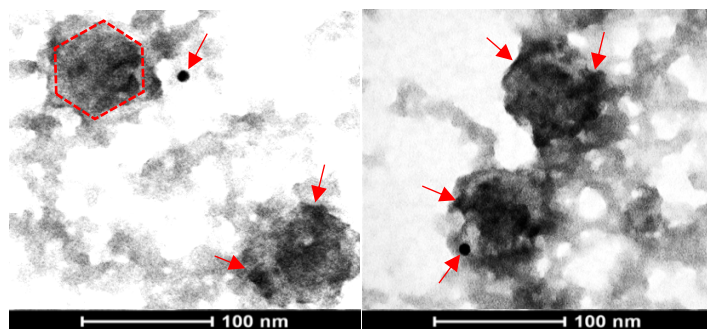


Figura 18. Fotografías de TEM de AuPEIPEGNPs recubriendo los virus GFP. Marcadas con flechas se distinguen las zonas oscuras que corresponden a las AuPEIPEGNPs que envuelven los virus inactivos.

2.2 Encapsulación del AdGFP en PLGANPs

En ambos casos, tanto para las NPs de oro como las de PLGA, se intentó caracterizar la formación de los complejos por DLS pero no se pudo obtener la medida, se piensa que los parámetros reales e imaginarios podían no ser los correctos, pero no se pudo repetir la medida por falta de muestra.

Las fotografías del TEM (Figura 19) permitieron observar el virus encapsulado en el interior de las NPs con gran calidad. La mancha de color oscura que se aprecia en el interior de la NP corresponde con el tamaño del virus 80-90 nm.

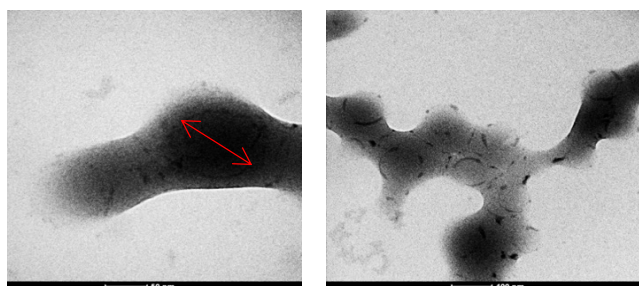


Figura 19. Fotografías de TEM. En las dos imágenes se muestran PLGANPs con el virus encapsulado en su interior. La mancha más oscura corresponde con el tamaño del virus (90nm).

3. Encapsulación de ADN en ambos tipos de NPs

3.1 Formación de complejos AuPEIPEGNPs-pEGFP

La puesta a punto de esta reacción ha sido previamente publicada por nuestro grupo y directamente procedimos a utilizarlo como control en las transfecciones. Los datos del DLS y del TEM ya han sido publicados por otros miembros del grupo como muestra el trabajo de Encabo Berzosa y col. (M. M. Encabo-Berzosa et al. 2017).

3.2 Encapsulación de pEGFP en PLGANPs

Durante la síntesis de las NPs con el pEGFP (156.8 ng/ μ L) se observó que la doble emulsión no se había formado correctamente, impidiéndonos medir el tamaño de las NPs en el DLS. Por otro lado, se obtuvieron imágenes del TEM (datos no mostrados) y con ellas pudimos concluir que lo que había ocurrido es que se habían formado aglomerados de NPs, no se encontraban dispersas, lo que puede resultar en una transfección errónea. Por ello, decidimos preparar un gel de Agarosa 1% (apartado 4 de Anexos) para comprobar si había plásmido que no se había encapsulado, si estaba degradado o si se había internalizado todo y entonces encontraríamos la señal enmascarada.

Para poder cuantificar el plásmido encapsulado, se decidió cargar también los sobrenadantes de las centrifugaciones que se realizaron durante la síntesis de las NPs de PLGA, de forma que, indirectamente, sabiendo cuánto plásmido había utilizado inicialmente, podríamos saber la cantidad de plásmido encapsulado.

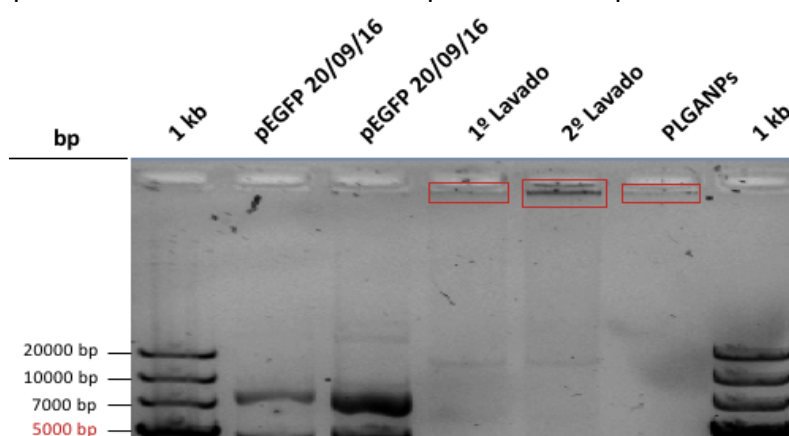


Figura 20. Gel de Agarosa 1%. Se cargó 1 μ g de muestra (NPs de PLGA y los dos sobrenadantes de los lavados por centrifugación), un plásmido de referencia con una concentración de 156.8 ng/ μ L y el marcador de 1kb con una concentración de 0.1 μ g/ μ L.

Como se puede observar en la figura superior del gel, en el carril del primer y segundo lavado se aprecia una banda que correspondería al ADN plasmídico no encapsulado que se va eliminando con los lavados por centrifugación. Por otro lado, en los dos sobrenadantes y en el carril de las PLGANPs finales observamos tres bandas retenidas en el pocillo que corresponderían al ADN que se encuentra asociado a las NPs (ensayo de retención de gel).

Se puede concluir que, a pesar de que se observa ADN acoplado a las NPs que habría quedado en la superficie de éstas, al hacer los cálculos (Tabla 2) se comprueba que hay presencia de ADN encapsulado en las NPs (144.88 µg) aunque no se ha podido determinar todavía.

Para ello se propone, en el futuro, abrir las nanopartículas mediante la incubación con Acetonitrilo y Metanol (siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5 de Anexos) para ver si hay ADN fragmentado o degradado en el interior de las PLGANPs.

Tabla 2. Tabla resumen del cálculo indirecto de la cantidad de plásmido que se ha encapsulado en las NPs de PLGA.

	Cantidad plásmido (µg)
<i>Plásmido perdido 1er lavado</i>	71,36
<i>Plásmido perdido 2o lavado</i>	11,45
<i>Plásmido inicial</i>	227,70
<i>Plásmido encapsulado</i>	144,89

4. Evaluación de la eficacia de transfección

4.1 Microscopía de fluorescencia

Los resultados de microscopía de fluorescencia del primer ensayo realizado revelaron que la expresión de GFP parecía estar cualitativamente aumentada en los pocillos incubados con Exosomas/Lipofectamina y AuPEIPEGNPs/ADN al ratio ensayado 30:1 (p/p) en comparación con los pocillos tratados con PLGANPs/ADN en los que no encontramos nada de fluorescencia. Aunque encontramos mayor expresión en los pocillos tratados con los controles positivos FuGENE® y Lipofectamina®, tampoco reflejan los grandes resultados esperados, es decir, al ser es formulaciones comerciales se pensaba obtener mayor diferencia en el nivel de fluorescencia en comparación con los complejos estudiados. Al no haber llegado a realizar citometría de flujo no se conoce con exactitud el porcentaje de transfección de cada cultivo, pero como ya se comentó previamente, al pensar que no daría buen resultado al estar los pocillos tan confluentes no se obtendrían valores que reflejasen la realidad y completamente fiables.

Por otro lado, en el segundo ensayo de transfección realizado con células 293T, si que se puede observar que la expresión de GFP es mucho superior en los pocillos incubados con AuPEIPEGNPs/ADN al ratio ensayado, 30:1 (p/p), en comparación con el resto de condiciones estudiadas, incluyendo la formulación liposomal comercial, tal y como se describió en M. M. Encabo-Berzosa et al. 2017 . En esta línea, también cabe destacar la leve aparición de fluorescencia en la condición de PLGANPs/NPs en la cantidad estudiada de 400µL, que correspondería a 100 µg de ADN. En la otra condición de PLGA/ADN no aparece expresión de GFP debido a la poca cantidad de ADN encapsulado.

Además, las imágenes de campo claro mostraron que la morfología celular no se veía afectada por la presencia de las NPs a excepción del pocillo tratado con 400 µL de PLGANPs, donde, aunque 100 µg debería haber sido suficiente para transfectar, debido a la alta toxicidad de las NPs, las células mostraron señales iniciales de muerte celular con lo que la transfección no resultó lo exitosa que se esperaba. Es decir, que pese a que se observan inicios de transfección (ya que se visualizó una leve fluorescencia), la toxicidad hizo que no resultase tan exitosa la transfección. Por ello, se considera necesario el estudio de nuevos ratios que no resulten tóxicos para las células.

Las Figuras 21 y 22 recogen los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia tras la transfección con las diferentes NPs estudiadas (oro, PLGA y exosomas). Como control negativo se utilizaron células no sometidas a transfección, mientras que como control positivo se transfectó con Lipofectamina® 3000 acompañada con pEGFP en la proporción aconsejada por el fabricante. Cabe recordar que todos los pocillos se trataron con la misma cantidad de pADN (0.25µg). Todas las imágenes se adquirieron con el objetivo de 10X.

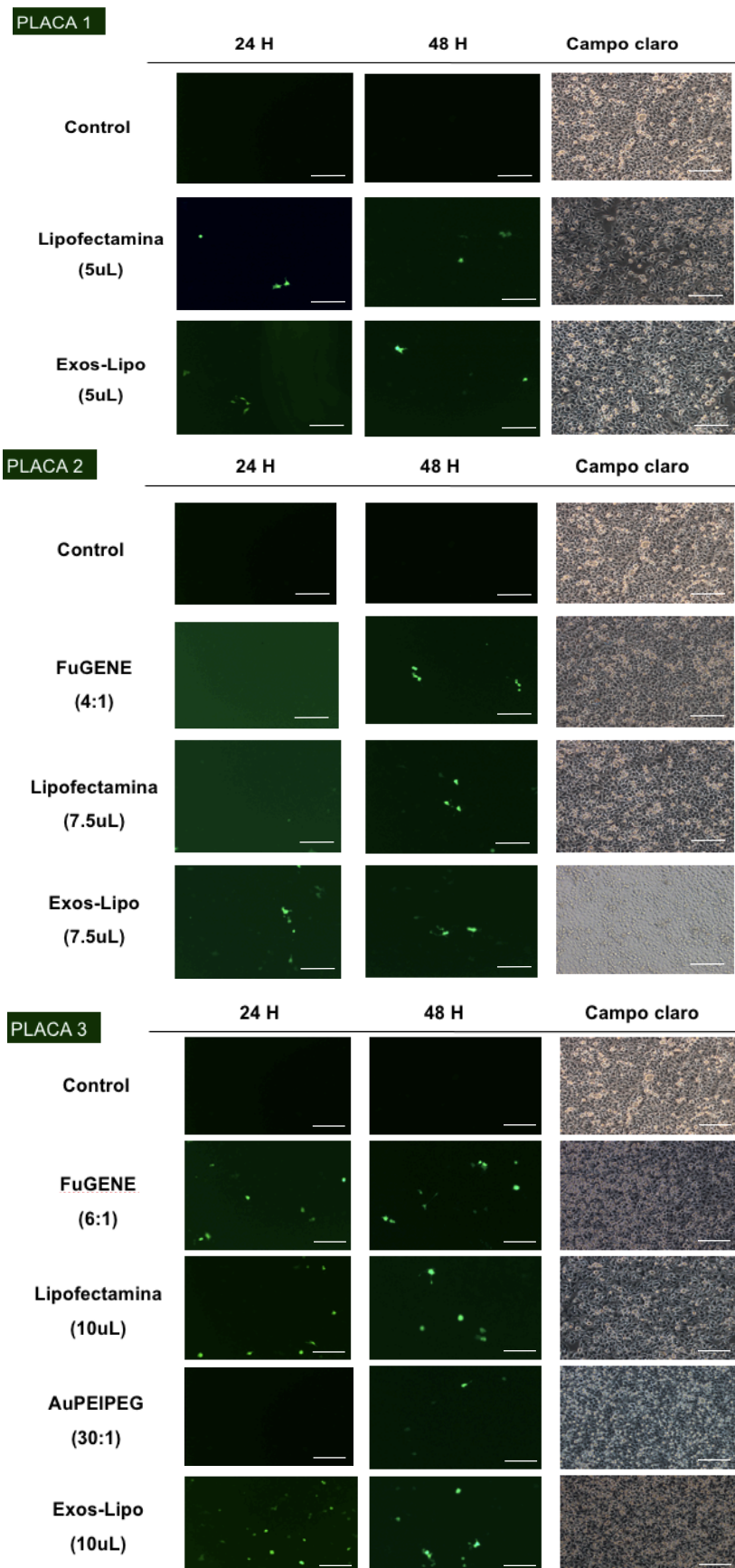


Figura 21. Evaluación de la primera transfección alcanzada en las tres placas con las NPs de oro, PLGA y los exosomas frente a dos controles positivos (FuGENE® y Lipofectamina®) y uno negativo. Las zonas fluorescentes corresponderían a las células y al lado se encuentran las zonas en campo claro correspondientes a la morfología intacta de las células. La barra de escala se corresponde con 200µm.

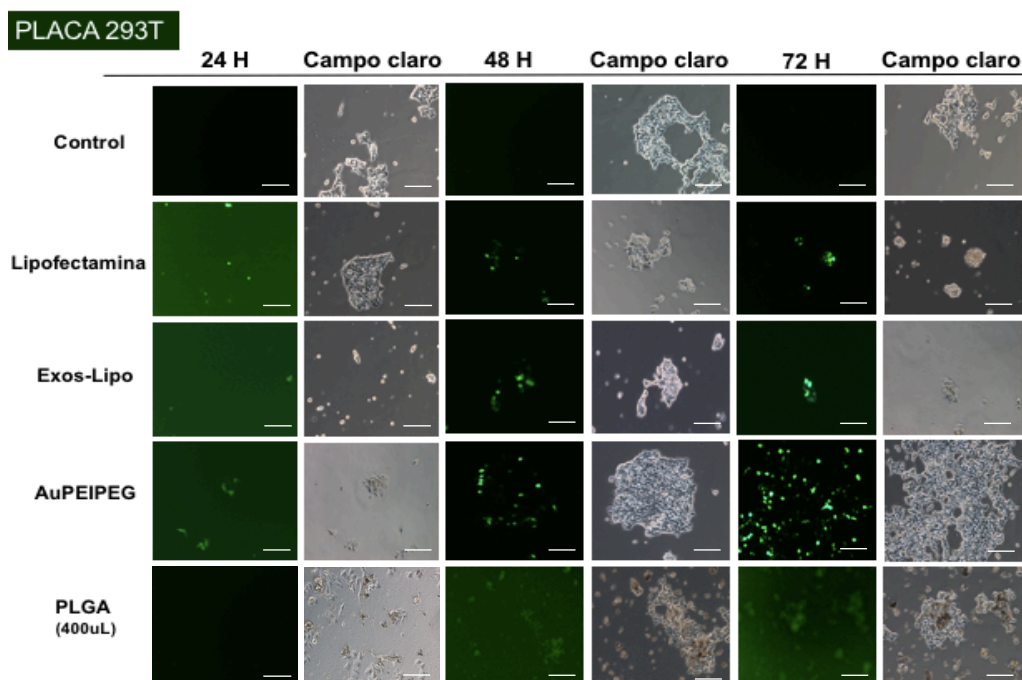


Figura 22. Evaluación de la transfección alcanzada con las NPs de oro, PLGA y los exosomas frente al uso de Lipofectamina comercial y un control negativo. En la imagen se pueden ver las zonas fluorescentes correspondientes a las células mientras que al lado se encuentran las zonas en campo claro correspondiente a la morfología intacta de las células. La barra de escala se corresponde con 200 μ m.

4.2 Citometría de flujo

Se evaluó cuantitativamente mediante citometría de flujo la fluorescencia debida a la expresión de GFP en las células 293T transfectadas con AuPEIPEGNPs, PLGANPs, Exosomas y Lipofectamina® 3000. Pasadas las 72 h tras la adición de los complejos, cabe resaltar la intensidad de fluorescencia verde que resultó ser mucho mayor en las células que habían sido incubadas con AuPEIPEGNPs en comparación con las tratadas con el control positivo (Lipofectamina® 3000), como se había descrito previamente.

Por otro lado, también es destacable el bajo porcentaje de transfección obtenido en la condición de PLGANPs, ya que, habiendo obtenido fluorescencia por microscopía se esperaba obtener mayor transfección al hacer la citometría. Posiblemente sea porque el umbral de detección del citómetro es bastante más elevado que la señal de las células por lo que la señal se ha perdido en la detección por citómetro.

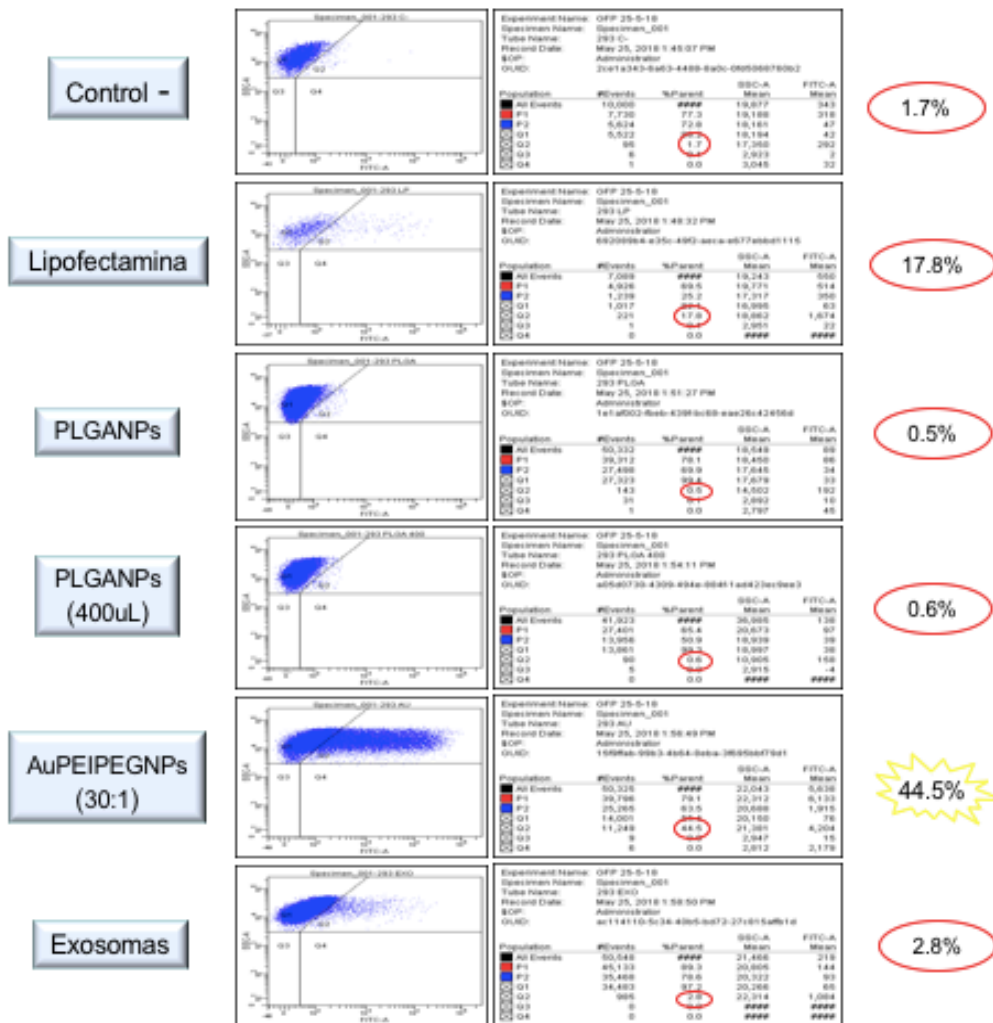


Figura 23. Cuantificación de la fluorescencia debida a GFP por citometría de flujo en células 293T. Las gráficas de citometría muestran los resultados de células GFP positivas 72h después de la adición de los complejos.

CONCLUSIONES

1. Se han encontrado las condiciones óptimas de síntesis para llevar a cabo la encapsulación de virus en NPs de PLGA, aunque habrá que mejorar la de ADN para encapsular mayores concentraciones en su interior.
2. Las AuNPs sintetizadas usando PEI como agente reductor y estabilizador del HAuCl_4 y funcionalizadas con PEG, pueden ser usadas como vectores no virales aplicables en terapia génica, al ser capaces de transfectar líneas celulares.
3. Las PLGANPs son capaces de transfectar cultivos celulares 293T, aunque todavía se tendría que establecer un ratio en el cual no resultasen tóxicas y no causasen muerte celular para poder utilizarlos como vectores no virales aplicables en terapia génica.
4. Los exosomas son vectores potenciales de mediar una transfección celular eficaz, por lo que en caso de mejorar el ratio de transfección, podrían ser utilizados como vectores no virales aplicables en terapia.
5. Tanto las AuPEIPEGNPs como las PLGANPs son capaces de encapsular o unirse a adenovirus oncolíticos y su ADN. El objetivo sería protegerlos de la degradación y del sistema inmunitario y haciéndolos posibles candidatos para futuras terapias antitumorales.
6. Las AuPEIPEGNPs han resultado ser las más eficaces en la transfección celular, obteniendo más de un 44% de eficiencia en células 293T a las 72h después de haber unido el vector no viral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agirre, Mireia, Jon Zarate, Edilberto Ojeda, Gustavo Puras, Luis A. Rojas, Ramón Alemany, y José L. Pedraz. 2015. «Delivery of an adenovirus vector plasmid by ultrapure oligochitosan based polyplexes». *International Journal of Pharmaceutics* 479 (2): 312-19. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.062.
2. Altanerova, U., M. Babincova, P. Babinec, K. Benejova, J. Jakubecova, V. Altanerova, M. Zdurienkova, V. Repiska, y C. Altaner. 2017. «Human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes allow targeted ablation of tumor cells via magnetic hyperthermia». *International Journal of Nanomedicine* 12: 7923-36. doi:10.2147/IJN.S145096.
3. Azmi, Asfar S., Bin Bao, y Fazlul H. Sarkar. 2013. «Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review». *Cancer and Metastasis Reviews*. doi:10.1007/s10555-013-9441-9.
4. Belmar-Lopez, Carolina, Gracia Mendoza, Daniel Oberg, Jerome Burnet, Carlos Simon, Irene Cervello, Maite Iglesias, et al. 2013. «Tissue-derived mesenchymal stromal cells used as vehicles for anti-tumor therapy exert different in vivo effects on migration capacity and tumor growth». *BMC Medicine* 11 (1). doi:10.1186/1741-7015-11-139.
5. Bischoff, James R., David H. Kirn, Angelica Williams, Carla Heise, Sharon Horn, Mike Muna, Lelia Ng, et al. 1996. «An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells». *Science* 274 (5286): 373-76. doi:10.1126/science.274.5286.373.
6. Blanco, Elvin, Haifa Shen, y Mauro Ferrari. 2015. «Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery». *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/nbt.3330.
7. Blazquez, Rebeca, Francisco Miguel Sanchez-Margallo, Olga de la Rosa, Wilfried Dalemans, Verónica Álvarez, Raquel Tarazona, y Javier G. Casado. 2014. «Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells». *Frontiers in Immunology* 5 (NOV). doi:10.3389/fimmu.2014.00556.
8. Choi, Jinhyang, Hye Yeong Kim, Eun Jin Ju, Joohee Jung, Jaesook Park, Hye Kyung Chung, Jin Seong Lee, et al. 2012. «Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors». *Biomaterials* 33 (16): 4195-4203. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.022.
9. Colombo, Marina, Graça Raposo, y Clotilde Théry. 2014. «Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (1): 255-89. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
10. Crespo-Barreda, A., M.M. Encabo-Berzosa, R. González-Pastor, P. Ortiz-Teba, M. Iglesias, J.L. Serrano, y P. Martin-Duque. 2016. «Viral and Nonviral Vectors for In Vivo and Ex Vivo Gene Therapies». En *Translating Regenerative Medicine to the Clinic*, 155-77. doi:10.1016/b978-0-12-800548-4.00011-5.

11. Das, Swadesh K, Mitchell E Menezes, Shilpa Bhatia, Xiang-Yang Wang, Luni Emdad, Devanand Sarkar, y Paul B Fisher. 2015. «Gene Therapies for Cancer: Strategies, Challenges and Successes.» *Journal of cellular physiology* 230 (2): 259-71. doi:10.1002/jcp.24791.
12. Ebrahimian, Mahboubeh, Sahar Taghavi, Ahad Mokhtarzadeh, Mohammad Ramezani, y Maryam Hashemi. 2017. «Co-delivery of Doxorubicin Encapsulated PLGA Nanoparticles and Bcl-xL shRNA Using Alkyl-Modified PEI into Breast Cancer Cells». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 183 (1): 126-36. doi:10.1007/s12010-017-2434-3.
13. Encabo-Berzosa, M. Mar, Maria Sancho-Albero, Victor Sebastian, Silvia Irusta, Manuel Arruebo, Jesus Santamaria, y Pilar Martín Duque. 2017. «Polymer functionalized gold nanoparticles as nonviral gene delivery reagents». *The Journal of Gene Medicine* 19 (6-7): e2964. doi:10.1002/jgm.2964.
14. Encabo-Berzosa, Maria del Mar, Maria Sancho-Albero, Alejandra Crespo, Vanesa Andreu, Victor Sebastian, Silvia Irusta, Manuel Arruebo, Pilar Martín-Duque, y Jesus Santamaria. 2017. «The effect of PEGylated hollow gold nanoparticles on stem cell migration: potential application in tissue regeneration». *Nanoscale* 9 (28): 9848-58. doi:10.1039/C7NR01853C.
15. Gonzalez-Pastor, Rebeca. 2017. «Estudio de Dendrímeros y Nanopartículas de Oro para su empleo en Tratamientos Antitumorales» (Tesis doctoral). Universidad de Zaragoza, Zaragoza.
16. Huynh, Elizabeth, y Gang Zheng. 2015. «Cancer nanomedicine: addressing the dark side of the enhanced permeability and retention effect». *Nanomedicine* 10 (13): 1993-95. doi:10.2217/nnm.15.86.
17. Kim, Min Cheol, Meng Meng Lin, Youngjoo Sohn, Jwa Jin Kim, Bo Sun Kang, y Do Kyung Kim. 2017. «Polyethyleneimine-associated polycaprolactone—Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a gene delivery vector». *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 105 (1): 145-54. doi:10.1002/jbm.b.33519.
18. Kwon, Oh Joon, Eunah Kang, Sungwan Kim, y Chae Ok Yun. 2011. «Viral genome DNA/lipoplexes elicit in situ oncolytic viral replication and potent antitumor efficacy via systemic delivery». En *Journal of Controlled Release*, 155:317-25. doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.014.
19. Lind M.J. 2013. Recent Advances in Cancer Treatment. In: Hanna M., Zyllicz Z. (eds) *Cancer Pain*. Springer, London.
20. Liu, Qian, Jixi Zhang, Wei Sun, Qian Reuben Xie, Weiliang Xia, y Hongchen Gu. 2012. «Delivering hydrophilic and hydrophobic chemotherapeutics simultaneously by magnetic mesoporous silica nanoparticles to inhibit cancer cells». *International Journal of Nanomedicine* 7: 999-1013. doi:10.2147/IJN.S28088.
21. Marbán, Eduardo. 2018. «The Secret Life of Exosomes». *Journal of the American College of Cardiology* 71 (2): 193-200. doi:10.1016/j.jacc.2017.11.013.
22. Marcos-Campos, I., L. Asín, T. E. Torres, C. Marquina, A. Tres, M. R. Ibarra, y G. F. Goya. 2011. «Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells». *Nanotechnology* 22 (20). doi:10.1088/0957-4484/22/20/205101.

23. Markman, Janet L., Arthur Rekechenetskiy, Eggehard Holler, y Julia Y. Ljubimova. 2013. «Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance». *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2013.09.019.
24. Misra, Sanjukta. 2013. «Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution.» *The Journal of the Association of Physicians of India*.
25. Na, Jin Hee, Heebeom Koo, Sangmin Lee, Seung Jin Han, Kyung Eun Lee, Sunjin Kim, Haeshin Lee, et al. 2016. «Precise Targeting of Liver Tumor Using Glycol Chitosan Nanoparticles: Mechanisms, Key Factors, and Their Implications». *Molecular Pharmaceutics* 13 (11): 3700-3711. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00507.
26. Pahle, Jessica, y Wolfgang Walther. 2016. «Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy». *Expert Opinion on Biological Therapy* 16 (4): 443-61. doi:10.1517/14712598.2016.1134480.
27. Ramirez, Manuel, Javier Garcia-Castro, Gustavo Melen, Africa Gonzalez-Murillo, y Lidia FRANCO. 2015. «Patient-derived mesenchymal stem cells as delivery vehicles for oncolytic virotherapy: novel state-of-the-art technology». *Oncolytic Virotherapy*, 149. doi:10.2147/OV.S66010.
28. Ronchera, C.L., J.Ma. Gonzalez. 2012. «Terapia Genica». *Farmacia Hospitalaria*, 9.
29. Sociedad Española de Oncología Médica, S.E., Las Cifras del Cáncer en España. SEOM, 2018.
30. Srivastava, Akhil, Narsireddy Amreddy, Anish Babu, Janani Panneerselvam, Meghna Mehta, Ranganayaki Muralidharan, Allshine Chen, et al. 2016. «Nanosomes carrying doxorubicin exhibit potent anticancer activity against human lung cancer cells». *Scientific Reports* 6. doi:10.1038/srep38541.
31. Stephen, Zachary R., Christopher J. Dayringer, Josh J. Lim, Richard A. Revia, Mackenzie V. Halbert, Mike Jeon, Arvind Bakthavatsalam, Richard G. Ellenbogen, y Miqin Zhang. 2016. «Approach to Rapid Synthesis and Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles for High Gene Transfection». *ACS Applied Materials & Interfaces* 8 (10): 6320-28. doi:10.1021/acsami.5b10883.
32. Sun, Nian feng, Zhan ao Liu, Wen bai Huang, Ai ling Tian, y San yuan Hu. 2014. «The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy». *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.10.006.
33. Taghavi, Sahar, Azadeh HashemNia, Fatemeh Mosaffa, Saeedeh Askarian, Khalil Abnous, y Mohammad Ramezani. 2016. «Preparation and evaluation of polyethylenimine-functionalized carbon nanotubes tagged with 5TR1 aptamer for targeted delivery of Bcl-xL shRNA into breast cancer cells». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 140: 28-39. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.12.021.
34. Tresilwised, Nittaya, Pimolpan Pithayanukul, Per Sonne Holm, Ulrike Schillinger, Christian Plank, y Olga Mykhaylyk. 2012. «Effects of nanoparticle coatings on the activity of oncolytic adenovirus-magnetic nanoparticle complexes». *Biomaterials* 33 (1): 256-69. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.028.

35. Ungerechts, Guy, Sascha Bossow, Barbara Leuchs, Per S. Holm, Jean Rommelaere, Matt Coffey, Rob Coffin, John Bell, y Dirk M. Nettelbeck. 2016. «Moving oncolytic viruses into the clinic: clinical-grade production, purification, and characterization of diverse oncolytic viruses». *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. doi:10.1038/mtm.2016.18.
36. Vazquez-duhalt, Rafael. 2014. «Cápsides virales como nanoacarreadores enzimáticos para quimioterapia». *Revista digital universitaria*. 15: 1-19.
37. Vogelstein, Bert, Nickolas Papadopoulos, Victor E. Velculescu, Shibin Zhou, Luis A. Diaz, y Kenneth W. Kinzler. 2013. «Cancer genome landscapes». *Science*. doi:10.1126/science.1235122.
38. Wang, Chunyang, Xiaoqin Wang, Tong Lu, Fangshi Liu, Baofeng Guo, Naiyan Wen, Yanwei Du, Hang Lin, Jun Tang, y Ling Zhang. 2016. «Multi-functionalized graphene oxide complex as a plasmid delivery system for targeting hepatocellular carcinoma therapy». *RSC Adv*. 6 (27): 22461-68. doi:10.1039/C5RA21475K.
39. WHO Cancer Database. Accesible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
40. Wilhelm, Stefan, Anthony J. Tavares, Qin Dai, Seiichi Ohta, Julie Audet, Harold F. Dvorak, y Warren C.W. Chan. 2016. «Analysis of nanoparticle delivery to tumours». *Nature Reviews Materials*. doi:10.1038/natrevmats.2016.14.
41. Xiong, Dan, Zhongbing Liu, Tierong Bian, Juan Li, Wenjun Huang, Pei Jing, Li Liu, Yunlong Wang, y Zhirong Zhong. 2015. «GX1-mediated anionic liposomes carrying adenoviral vectors for enhanced inhibition of gastric cancer vascular endothelial cells». *International Journal of Pharmaceutics* 496 (2): 699-708. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.019.
42. Yu, Bo, Xiaomin Zhang, y Xiaorong Li. 2014. «Exosomes derived from mesenchymal stem cells». *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms15034142.

ANEXOS

1. Microscopía electrónica de Transmisión

Para la visualización del tamaño y la forma se utiliza un microscopio T20-FEI con un objetivo "SuperTwin®" que permite una resolución de 2,4Å. Se llevó a cabo una tinción con ácido fosfotungsténico para observar la presencia de PEI y la funcionalización con PEG en las diversas muestras. Todas las muestras se prepararon en rejillas de cobre para TEM con recubrimiento de carbono/Formvar, según se explica en la Fig. 3A.

Para calcular el tamaño intrínseco de las NPs, se midieron los diámetros de las NPs a partir de microfotografías de TEM con un programa informático ImageJ®.

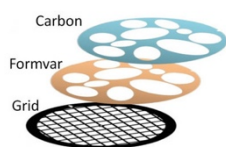


Figura 1. Estructura de la rejilla de cobre para TEM.



Figura 2. Caja de almacenamiento de rejillas TEM.

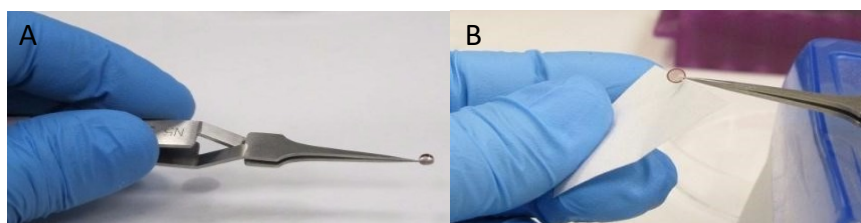


Figura 3. Imágenes que muestran la preparación de las rejillas para TEM. A) Rejilla con una gota de muestra en la superficie. B) Se hace pasar la muestra a través de la rejilla colocando un poco de papel en la parte inferior.

2. Microscopia electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es otra técnica importante para obtener imágenes de alta resolución que describen la morfología de la superficie de la muestra. SEM también se conoce como una herramienta útil para examinar nanoestructuras comúnmente en la ciencia de los materiales.

El principio de funcionamiento de SEM se basa en la interacción entre el haz de electrones y la muestra. El cañón de electrones produce los electrones y los acelera a un nivel de energía de 0.1-30 keV. El SEM usa ese haz de electrones enfocado para escanear a través de la superficie de la muestra. El método primario de imagen se obtiene al recolectar esos electrones, que son liberados por la muestra analizada. Es posible correlacionar la señal obtenida con la posición de exploración de muestra. El haz de electrones generalmente se escanea en un patrón de escaneo y la posición del rayo se combina con la señal detectada para producir una imagen. En los resultados, se puede obtener una imagen en blanco y negro, debido a la iluminación y el sombreado en la topografía de la superficie por parte de los electrones. SEM permite ver estructuras de menos de 1 μm , pero la resolución óptica está limitada a unos pocos nanómetros. En este trabajo, un SEM, Inspect F50; FEI, Eindhoven, Países Bajos, a una tensión de aceleración de 10-15 kV se empleó para determinar el tamaño y la morfología de las NP sintetizadas de PLGA.

3. Dispersión dinámica de la luz

Dynamic Light Scattering (DLS, también conocido como espectroscopia de correlación de fotones o Dispersión de luz) es una de las técnicas de dispersión de luz más populares porque permite el dimensionamiento de partículas de hasta 1 nm de diámetro. Las aplicaciones típicas son emulsiones, micelas, polímeros, proteínas, nanopartículas o coloides. El principio básico es simple: la muestra se ilumina con un rayo láser y las fluctuaciones de la luz dispersada se detectan mediante un detector de fotones rápidos.

Desde un punto de vista microscópico, las partículas dispersan la luz y, por lo tanto, imprimen información sobre su movimiento. El análisis de la fluctuación de la luz dispersa produce información sobre las partículas.

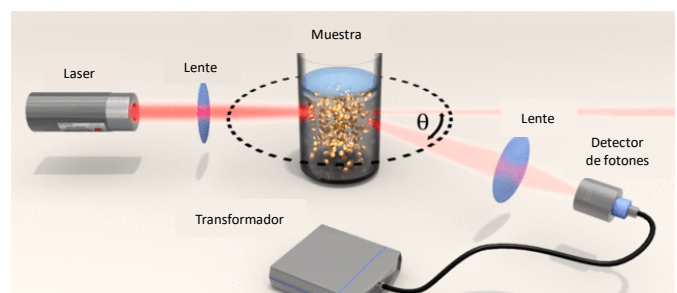


Figura 4. Imagen representativa del funcionamiento del DLS.

En nuestro estudio se realizan cinco ciclos por muestra de 3 minutos cada uno y como parámetros se utiliza un índice de refracción imaginario de 0,1 y un índice de refracción real de 1,55 en el caso de las PLGANPs y un índice real de 3.338 y uno imaginario de 0.119 en el caso de las AuPEIPEGNPs.

4. Gel de Agarosa

Decidimos preparar un gel de 50 mL de Agarosa 1%, para ello se pesó 0.5 g de Agarosa y se utilizó 3 μ L de SYBR Safe para poder visualizar el ADN en el gel. Se cargó 1 μ g de muestra y se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb. Para poder cuantificar el plásmido encapsulado de manera indirecta, se decidió cargar también los sobrenadantes de las centrifugaciones que se realizaron durante la síntesis de las NPs de PLGA.

5. Protocolo de apertura de las PLGANPs

Para poder abrir las nanopartículas y analizar el contenido, se ha de poner en contacto 100 μ L de NPs con 750 μ L de Acetonitrilo y sonicar 30 minutos, posteriormente añadir 150 μ L de Metanol y volver a sonicar otros 10 minutos. Finalmente, centrifugar a 13.250 g durante 20 minutos para obtener el sobrenadante que será lo que queremos analizar.

6. Ensayo de transfección

El primer esquema del experimento de transfección para evaluar la utilidad de las NPs y los exosomas como vectores eficientes se muestra en la Figura 5 y para llevarlo a cabo se utilizó un plásmido pEGFP con una concentración de 156.8 ng/ μ L y se transfectaron cultivos de HeLa. En cambio, para el segundo experimento (Figura 6), se acotaron las condiciones a las que mejor habían resultado y se probó a transfectar otra línea celular (293T).

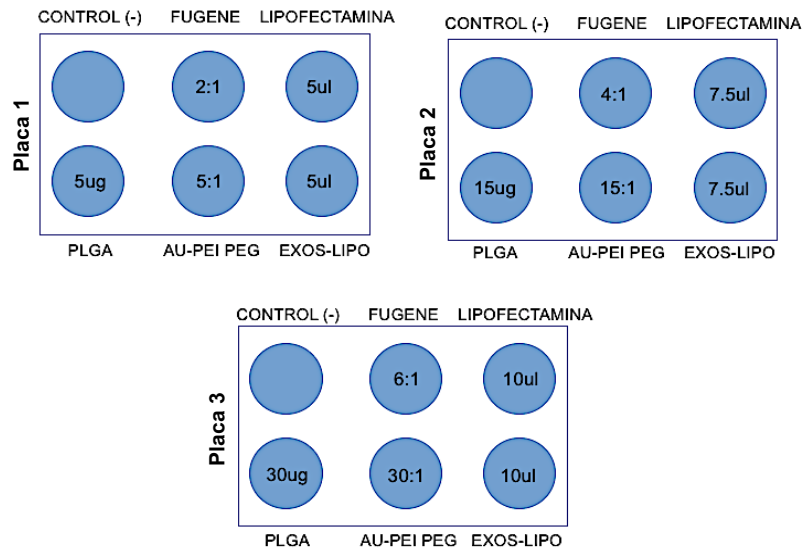


Figura 5. Esquema del primer experimento. Placas multiwell de seis pocillos utilizadas para los ensayos de transfección con las distintas condiciones y ratios estudiados.

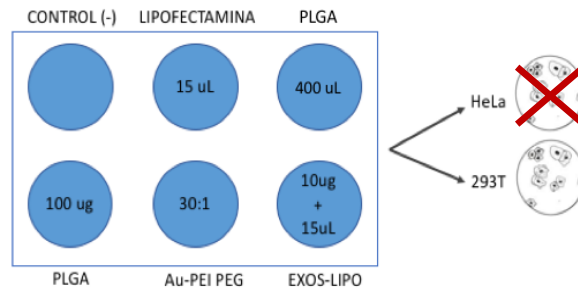


Figura 6. Esquema del segundo experimento de transfección. Placa multiwell de seis pocillos utilizada para el segundo ensayo de transfección con las distintas condiciones y ratios estudiados.