

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE QUÍMICA
Departamento de Química Física I



TESIS DOCTORAL

Derivados lipídicos biocompatibles : una mejora en la vectorización del DNA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

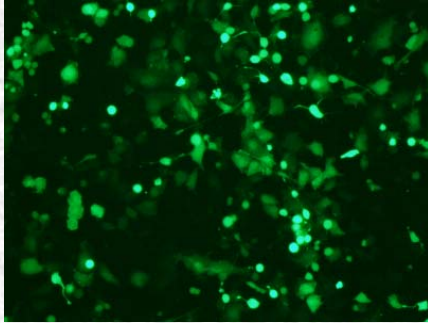
PRESENTADA POR

Ana Lilia Barrán Berdón

Directores

Elena Junquera González
Emilio Aicart Sospedra

Madrid, 2015



Esta memoria recoge la caracterización biofísica y bioquímica de nuevos vectores no virales de transfección, en nuestra búsqueda por encontrar sistemas más biocompatibles que permitan mejorar tanto las eficiencias de transfección como la viabilidad celular. Para ello, se han utilizado una amplia gama de compuestos de síntesis tales como lípidos catiónicos gémuni, lípidos aniónicos, y macrociclos catiónicos con matriz lipídica. De igual forma, se ha estudiado la evolución temporal de la corona de proteínas formada sobre la superficie de los vectores lipídicos y su efecto sobre las prestaciones biológicas del vector.

UCM
2015

Derivados Lipídicos Biocompatibles:
Una Mejora en la Vectorización del DNA

Ana Lilia
Barrán Berdón

Derivados Lipídicos Biocompatibles: Una Mejora en la Vectorización del DNA

Ana Lilia Barrán Berdón



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Física I
2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Física I



DERIVADOS LIPÍDICOS BIOCOMPATIBLES: UNA MEJORA EN LA VECTORIZACIÓN DEL DNA

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias, por:

Ana Lilia Barrán Berdón

Directores

Elena Junquera González

Catedrática de la

Universidad Complutense de Madrid

Emilio Aicart Sospedra

Catedrático de la

Universidad Complutense de Madrid

Madrid 2015

“El hombre de ciencia no aspira aun resultado inmediato. No espera que sus avanzadas ideas estén listas para ser asumidas. Su trabajo es como el del sembrador: para el futuro. Su deber es poner los cimientos para los que están por venir y señalar el camino. Vive, trabaja y mantiene la esperanza”.

Nikola Tesla

Dedicada a mi familia y a Ismael

Índice

Glosario de Acrónimos	1
Glosario de Símbolos	7
Abstract	13
Capítulo 1. Introducción	21
1.1 Terapia Génica	21
1.1.1 Agentes terapéuticos usados en la terapia génica: Ácidos Nucleicos	22
1.1.2 Barreras fisiológicas en la terapia génica	25
1.2. Métodos de transfección	32
1.2.1 Vectores virales	34
1.2.2 Vectores no virales	36
1.2.2.1 Vectores Lipídicos	38
Vectores lipídicos catiónicos	44
Vectores lipídicos aniónicos	47
Vectores lipídicos con macrociclos en su estructura	48
1.2.2.2 Complejos vector lipídico-DNA: Lipoplejos	51
1.3 Métodos de caracterización	59
1.3.1 Métodos de caracterización de los vectores lipídicos	59
1.3.2 Métodos de caracterización de la corona de proteínas	60
1.4 Bibliografía	63
Capítulo 2. Sección Experimental	69
2.1 Materiales	69
2.1.1 Lípidos catiónicos (CL)	69
2.1.2 Lípidos aniónicos (AL) y zwitteriónico	71
2.1.3 Lípidos macrocíclicos catiónicos	72
2.1.4 Ácido desoxirribonucleico (DNA)	74
2.2 Preparación de liposomas, lipoplejos, y complejos CL:HP	75
2.2.1 Preparación de liposomas	75

Preparación de liposomas con sondas fluorescentes	77
2.2.2 Preparación de lipoplejos	78
2.2.3 Preparación de complejos CL:HP	79
2.3 Métodos Experimentales	80
2.3.1 Potencial ζ y movilidad electroforética	81
2.3.2 Electroforesis en Gel	84
2.3.2.1 Electroforesis en gel de agarosa	85
2.3.2.2 Electroforesis en SDS-PAGE	88
2.3.3 Anisotropía de fluorescencia	90
2.3.4 Microscopía Electrónica de transmisión	92
2.3.5 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)	95
2.3.6 Nanocromatografía de líquidos acoplada a detector de masas-masas (NanoCL-MS/MS)	99
2.3.7 Cultivo celular y proceso de transfección	103
2.3.8 Citometría de Flujo (FACS)	105
2.3.9 Ensayo de viabilidad celular (Ensayo MTT)	108
2.3.10 Microscopia de fluorescencia y microscopia confocal de fluorescencia (MCF).	110
2.4 Bibliografía	114
Capítulo 3. Resultados	115
3.1 Vectores lipídicos basados en lípidos catiónicos gemini	116
3.1.1 GCL derivado del aminoácido lisina: $C_6(LL)_2/DOPE$ en ausencia y presencia de DNA	116
3.1.2 Lípidos catiónicos gemini con espaciadores oligo-oxietileno como vectores no virales.	133
3.1.2.1 Liposomas mixtos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ en ausencia y presencia de DNA.	133
3.1.2.2 Liposomas mixtos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ en ausencia y presencia de DNA	148
3.2 Vectores lipídicos basados en lípidos aniónicos (ALs)	163
3.2.1 Liposomas aniónicos mixtos DOPG/DOPE y DOPS/DOPE en presencia de Ca^{2+} y pDNA.	164
3.2.2 Liposoma aniónico mixto DOPG/DOPE en presencia del macrociclo catiónico multivalente P^{10+} y pDNA.	177

3.4. Lipoplejos basados en lípidos catiónicos multivalentes con estructura macrocíclica.	189
3.5 Interacciones de liposomas catiónicos mixtos DC-Chol/DOPE con las proteínas presentes en el suero humano.	203
3.6 Bibliografía	219
Capítulo 4. Relevant aspects and conclusions	223
Anexos	235
5.1 Anexo 1	235
5.2 Anexo 2	239
5.3 Anexo 3	257

Glosario de Acrónimos

Glosario de Acrónimos

A

A549	Línea celular epitelial humana de adenocarcinoma de pulmón
AAV	Virus adenoasociado
ACN	Acetonitrilo
ADA	Gen adenosina desaminasa
AFM	Microscopía de fuerza atómica
ALs	Lípidos aniónicos
APS	Persulfato de amonio

B

bp	Pares de bases de DNA
----	-----------------------

C

$(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$	Bromuro de 1,2-bis(hexadecildimetilamonio)oxietileno
$(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$	Bromuro de 1,2-bis(hexadecilimidazol)oxietileno
$C_6(LL)_2$	Cloruro de N^α, N^ω -bis(Na-lauroil-lisina) α, ω -hexilendiamida
CAC	Concentración de agregación crítica
CaCO-2	Línea celular epitelial humana de adenocarcinoma colorectal
CCD	Cámara de detección de luz (charge-coupled device)
CD	Dicroísmo circular
CDs	Ciclodextrinas
CFM	Microscopía confocal de fluorescencia
CMC	Concentración micelar crítica
CLs	Lípidos catiónicos
Crio-TEM	Crio-microscopía electrónica de transmisión
ctDNA	DNA procedente del timo de ternera <i>Calf thymus</i>

Glosario de Acrónimos

CT	Estructura tipo <i>cluster-type</i>
CVC	Concentración vesicular crítica
CXs	Calixarenos
CxCL	Lípido catiónico calixareno
D	
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAas	Enzimas que degradan el DNA
DC-Chol	Cloruro de 3- β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]-colesterol
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	Medio de cultivo modificado de Dubelco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOGS	1,2- dioleoil-sn-glicero-3-succinato
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) de sodio
DOPS	1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina de sodio
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio
DPBS	Disolución reguladora salina de fosfatos
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	DL-Ditiotreitol
E	
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EMAN	Programa informático de análisis de micrografía electrónica
ESI	Ionización por electrospray
ESRF	Laboratorio Europeo de Radiación Síncrotrón

F

FACS	Citometría de flujo con <i>Cell Sorting</i>
FBS	Suero Fetal Bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.
FP	Estructura tipo <i>fingerprint-type</i>
FRET	Transferencia de energía de resonancia Förster
FTIR	Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier

G

GCLs	Lípidos catiónicos gémini
GFP	Proteína verde fluorescente
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
GV	Vector génico

H

H _{II} ^c	Fase hexagonal inversa
H101	Adenovirus oncolítico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEK293T	Línea celular humana de cáncer de riñon 293 T.
HeLa	Línea celular humana de cáncer cérvico-uterino
HEPES	Disolución reguladora HEPES-H + HEPES-Na
HEPES-H	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperacina-1-etanosulfónico
HEPES-Na	4-(2-hidroxietil)-piperacina-1-etanosulfonato sódico
H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protón
HP	Suero humano (<i>human plasma</i>)

I

IC ₅₀	Inhibición de crecimiento al 50% de la población
ITC	Calorimetría isoterma de valoración

L

L _α	Fase lamelar
----------------	--------------

Glosario de Acrónimos

LB 1X	Disolución reguladora de carga 1X (<i>loading buffer</i>)
LB 10X	Disolución reguladora de carga 10X (<i>loading buffer</i>)
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Lipo2000	Lipofectamina 2000
Lipo2000*	Lipofectamina 2000 en presencia de suero FBS
LMV	Vesículas multilamelares
LPLD	Deficiencia de lipoproteína lipasa
LUV	Vesículas unilamelares grandes
M	
MALDI	Ionización por laser
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MLV	Vesículas multilamelares
MOG	Derivados del monoolein glicerol
MS	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol
MW	Peso molecular
MWNSC	Porcentaje del peso molecular normalizado para una proteína
N	
NanoLC	Nano-cromatografía de líquidos
NBD-DOPE	7-nitrobenzofurazan-1,2-Dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina
NPs	Nanopartículas
NSCs	Normalización de conteo espectral
P	
p ¹⁰⁺	Pilar[5]areno
PC3	Línea celular de cáncer de próstata
pDNA	Plásmido
pEGFP-C3	Plásmido que codifica para la expresión de la proteína GFP

PI	Ioduro de propidio
Q	
QEELS	Dispersión Cuasi-elástica de luz
R	
RNA	Ácido ribonucleico
RPA	Abundancia relativa de proteínas
RB	Estructura tipo <i>ribbon-type</i>
S	
SAXS	Difracción de rayos-x a bajo ángulo
SCID	Síndrome de inmunodeficiencia combinada severa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SPR	Resonancia plasmónica de superficie
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> clase B tipo 1
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
T	
TAE	Disolución reguladora compuesta de Tris-HCl, acetato y EDTA (pH = 8,2)
TCR	Sub-unidades de receptor de células T
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	Tetrametildietilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TMAC4	Calixareno con 4 cargas positivas
U	
UV-VIS	Ultravioleta-visible
V	
V _I	Fase cúbica

Glosario de Símbolos

Glosario de Símbolos

a_0	Área efectiva que ocupa la cabeza polar de un tensioactivo en la superficie del agregado
C	Capacitancia eléctrica
D	Masa de DNA
d	Espaciado de la red d_{hkl}
d_{pDNA}	Distancia entre dos plásmidos consecutivos en la monocapa acuosa
d_m	Espesor de la bicapa lipídica
d_w	Espesor de la capa acuosa donde debe incorporarse el DNA
E_0	Energía de unión por complejo en un <i>cluster</i>
E_e	Campo eléctrico aplicado
e	Carga del electrón (= 1.602×10^{-19} C)
f	Coefficiente de fricción
$f(\kappa_D a)$	Función de Henry
G	Factor G de corrección del instrumento
H	Intensidad del campo magnético
I	Intensidad
I_{HH}	Intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada horizontalmente en la excitación y en la emisión
I_{HV}	Intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada horizontalmente en la excitación y verticalmente en la emisión

Glosario de Símbolos

I_{VH}	Intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada verticalmente en la excitación y horizontalmente en la emisión
I_{VH}	Intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada verticalmente en la excitación y en la emisión
k	Factor proporcional
k_B	Constante de Boltzmann ($= 1.381 \times 10^{23}$ J/K)
L	Masa de lípido total
l_c	Longitud crítica de la cadena hidrófoba
$[L]$	Concentración de lípido total
L^+	Masa de lípido catiónico
$[L^+]$	Concentración de lípido catiónico
L^0	Masa de lípido zwitteriónico
$[L^0]$	Concentración de lípido zwitteriónico
L/D	Relación de masas lípido/DNA
$(L/D)_\phi$	Relación de masas lípido/DNA en la electroneutralidad
\bar{M}_{bp}	Peso molecular promedio de un par de bases del DNA
M_{L^+}	Peso molecular del lípido catiónico
M_{L^0}	Peso molecular del lípido zwitteriónico
m_{L^0}	Masa del lípido zwitteriónico
m_{CxCL^+}	Masa del vector lipídico calixareno
m_{DNA}	Masa total de DNA
m_{GV}	Masa total del vector génico catiónico
m/z	Relación masa-carga
n	Número de grupos (C_2O) en la cadena espaciadora de los GCLs

n_+	Número de moles de cargas positivas
n_-	Número de moles de carga negativa
n_c	Número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada de un liposoma
n_{L^+}	Moles de lípido catiónico
n_{L^0}	Moles de lípido zwitteriónico
N_i	Iónes presentes en la disolución
n_i	Concentración de la disolución
P_c	Parámetro de empaquetamiento
$P_d(S)$	Concentración de segmentos de DNA a la cual los complejos se agregan para formar " <i>clusters</i> "
$P_d(S)$	Concentración de segmentos de DNA a la cual los " <i>clusters</i> " se desagregan en complejos libres
Q	Carga positiva del liposoma mixto
Q^*	Carga límite del lipoplejo en el régimen inestable
Q_c	Carga neta del lipoplejo
ΔQ_c	Variaciones de Q_c
q	Vector de ondas
$-q$	Carga de un polielectrolito de longitud flexible de signo opuesto al de los liposomas
$q_{L^+}^+$	Cargas efectivas positivas del lípido catiónico
q_{ctDNA}^-	Cargas efectivas negativas del par de bases del DNA lineal
q_{pDNA}^-	Cargas efectivas negativas del par de bases del plásmido DNA
r	Anisotropía de fluorescencia
S	Concentración de liposomas

Glosario de Símbolos

S_0	Concentración de liposoma a la cual se alcanza la electronutralidad
S_a	Concentración de liposomas a la cual los complejos comienzan a formar <i>clusters</i>
S_d	Concentración de liposomas a la cual los <i>clusters</i> se desagregan en complejos libres
T	Temperatura
T_m	Temperatura de transición de fase termotrópica gel-fluido
t	Tiempo
V	Velocidad del fluido
v_0	Volumen normalizado
v	Volumen de las cadenas hidrocarbonadas
x	Fracción de liposomas que forman parte de los " <i>clusters</i> "
z_i	Valencia de los iones
α	Composición molar de lípido catiónico en el liposoma mixto (en moles)
γ	Semi-ángulo de recopilación de la lente magnificadora del microscopio
ϵ_0	Permitividad del vacío ($= 8,854 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ m}^{-1}$)
ϵ_r	Permitividad relativa
η	Viscosidad del disolvente
θ	Semiángulo de dispersión
κ	Conductividad específica
κ_D^{-1}	Longitud de Debye
λ	Longitud de onda de la radiación
λ_{em}	Longitud de onda de emisión

λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
μ	Viscosidad
μ_e	Movilidad electroforética
μ_i	Fuerza iónica
ρ	Relación molar de carga CL/DNA
ρ_{eff}	Relación molar de cargas efectiva CL/DNA
σ_ζ	Densidad de carga superficial
ζ	Potencial dseta o zeta
z_i	Valencia de los iones presentes en la disolución

Abstract

Abstract

Introduction

Gene therapy is a recent branch of medicine with the objective of curing, at a molecular level, acquired and inherited diseases by repairing damaged cellular DNA by inserting and expressing functional genes inside living cells. However, (a) the rigidity of the DNA molecule and its high negative charge density, provided by the phosphate groups, limits its transport through the cell membrane (also negatively charged), and (b) the DNA is easily degraded by nucleases present in biological fluids. Both troubles may be solved by using gene vectors to compact and transport DNA into the cells. The gene vectors can be classified into two major groups: viral and non-viral vectors. Viral vectors are usually more effective than non-viral systems but may produce an immune response and, additionally, their cost production is high. However, non-viral vectors have significant advantages over viral vectors, i.e., they are safer to use, easier to prepare and can transfect large size plasmids into cells. For those reasons, many research groups are working hard looking for improved non-viral vectors with higher transfection efficiency and lower cytotoxicity. In this sense, several kind of non-viral gene vectors have been developed recently, such as cationic, neutral or anionic lipids, surfactants, dendrimers, macrocycles, polymers and nanoparticles. The most common non-viral vectors are the cationic liposomes formed by amphiphilic lipids, because they are able to compact DNA forming what is known as lipoplexes. On the other hand, the positive charge of the cationic liposomes and its similarity with the cell membrane allow them a better interaction that improves the capability to transfect nucleic acids. Therefore, trying to find improved non-viral lipid vectors, this PhD Thesis is based on new cationic gene vectors based on biocompatible lipids: gemini lipids, anionic lipids and macrocyclic policationic

lipid. However, even when the non-viral vectors compact and protect the DNA and interact efficiently with cell membrane, another inherent problem is still remaining: the non-specific interactions between the lipidic vector and the biomolecules present in biological fluids. Thus, when liposomes enter in the human blood, proteins compete for binding to the liposome surface forming layers of proteins called: "protein-corona". Unfortunately, many of the proteins that shape the protein corona are opsonins, which promote the liposome phagocytosis. Because it is known that protein corona composition changes with time, and in order to understand one of the steps of the gene delivery process, this PhD Thesis has developed a new approach towards the time evolution of protein corona formed around cationic mixed liposomes upon exposure to human serum.

Objectives

The main objective of the present PhD Thesis has been to characterize the biophysical and biochemical properties of new potential biocompatible non-viral gene vectors. This characterization allows to better understand the relationship between the biophysical properties and the biological activity of the studied gene vectors. The ultimate goal of the thesis is to contribute to the basic knowledge required to a better design of new generations of non-viral gene vectors.

Material and methods

In this PhD Thesis, several non-viral vectors have been formed by using cationic mixed liposomes which contain a zwitterionic lipid DOPE and one of the following cationic lipids: a gemini cationic lysine derivative lipid ($C_6(LL)_2$); or a gemini cationic lipid of the series $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$ with: (a) an oligo-oxyethylene spacer of different lengths ($n = 1, 2$ or 3), and (b) two cationic head groups based on ammonium or imidazolium; or a calixarene cationic lipid (TMAC4). Additionally, another set of non-viral vectors based on the mixed liposomes formed by DOPE and an anionic lipid (DOPG or DOPS) in the presence of divalent cation Ca^{2+} or macrocyclic pillar[5]arene has been also analyzed. All these non-viral vectors have studied in the presence of two types of DNA

(plasmid pEGFP-C3 and calf thymus DNA). All these systems have been characterized by several biophysical techniques, such as: zeta potential, gel electrophoresis, synchrotron small angle X-ray scattering (SAXS), fluorescence anisotropy, negative staining TEM and/or cryo-TEM. The transfection efficiency of those systems has been also evaluated by several methods such as fluorescence microscopy, confocal fluorescence microscopy and flow cytometry. The cell viability has been determined by MTT assays. In addition, and in order to confirm the electrochemical results, a theoretical approach towards the complexation process has been applied. Finally, in a three months stay at the laboratory of Prof. G. Caracciolo (La Sapienza University of Rome), zeta potential, DLS, and proteomic techniques such as 1D SDS-PAGE and nanoLC-MS/MS have been used to analyze the temporal evolution of the protein-corona around DC-Chol/DOPE cationic mixed liposomes in the presence of human plasma (HP). The internalization of DC-Chol/DOPE-HP complexes has been also evaluated by confocal microscopy.

Results and discussion

The characterization of the $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA lipoplex shows interesting results. The electrochemical results confirm that, in the presence of cationic mixed liposomes and in contrast with what usually it has been found for linear DNA, the plasmid DNA (pDNA) is compacted retaining a large number of its Na^+ counterions, thus yielding a much lower effective negative charge (q_{pDNA}^-) than that for linear DNA (ctDNA), in good agreement with previous results for other lipoplexes. This finding is revealed to be crucial for an optimum and efficient lipoplex preparation, since a lower effective negative charge implies a lower quantity of cationic lipid and, accordingly, a potentially lower cytotoxicity. TEM experiments reveal a complex scenario of multilamellar nano-aggregates, from ribbon-type (typically present for chiral lipids) to cluster-type (CT-type) structures (usually found in cationic lipids/DOPE systems), with the composition of the mixed liposome playing an important role in the final morphology of the lipoplexes. The deconvolution process of the first peak of the SAXS diffractograms into two overlapping bands confirms the presence of

these two types of multilamellar structures. On the other hand, a theoretical complexation model has been employed to determine the net charge of the lipoplexes studied in this work. The model, which allows the analysis and comparison of the electroneutrality behaviour of lipoplexes containing linear DNA versus those with a supercoiled DNA, confirms the experimental findings. The MTT assay shows that the lipoplex $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA presents good cell viability levels. However, despite all these excellent results, this system does not show any significant transfection levels.

The lipoplexes formed by mixed liposomes constituted by a gemini cationic lipid of the series $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$ or $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$, DOPE and pDNA show electrochemical results similarly to those obtained by $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA lipoplex. Cryo-TEM micrographs show nano-aggregates with two multilamellar structures, a typically CT-type and a fingerprint-type (FP-type). For $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplexes, the CT-type has been found at low-to-medium GCL composition, the FP-type and CT-type both coexisting at medium GCL composition, and the FP-type appearing only at high GCL composition. On the other hand, the $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplexes, rearrange in a CT-type structure at low GCL composition ($\alpha = 0.2$) and in a FP-type one at medium-to-high GCL composition ($\alpha \geq 0.5$). SAXS studies reveal that the presence of several lamellar structures ($L_{\alpha \text{ DOPE rich}}$, $L_{\alpha \text{ main}}$ and $L_{\alpha \text{ GCL rich}}$) depends on GCL lipid composition. The $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplexes show the three structures, two of them in coexistence at low and higher content of GCL composition while in the $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplexes, the coexistence of the two structures is only observed at low GCL composition ($\alpha = 0.2$). Lipoplexes of the $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA series show optimum transfection efficiency (TE) for GCL with longer ($n = 3$) or shorter ($n = 1$) oligo-oxyethylene spacers, in both cases at high GCL composition ($\alpha = 0.7$) and low effective charge ratio ($\rho_{\text{eff}} = 2$). In the case of the $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA series, higher TE has been found for lipoplexes with any of the three GCLs. However, in contrast with the $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplexes, the best results are achieved at low GCL composition ($\alpha = 0.2$). By using formulations with one of the six lipoplexes

containing a GCL of the referred series, the TE of pDNA to several cancer cell lines has been determined. In all cases, the TE of the optimized formulations has been much better than the commercial control, Lipofectamine 2000. However, despite both systems present good TE, the best ones have been those of GCLs with two imidazolium head groups $((C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA)$, especially for longer ($n = 3$) and shorter spacer ($n = 1$) length. The biological activity of optimized formulations may be attributed to the combination of several factors, such as: the coexistence of two lamellar lipoplex structures, the higher biocompatibility of the oligo-oxyethylene spacer, a higher membrane fluidity (determined by fluorescence anisotropy) of the lipoplex, and/or the presence of the fusogenic DOPE lipid. All the optimum formulations reported herein are highly efficient, with negligible levels of toxicity, and thus may be considered to be very promising gene vectors for *in vivo* applications.

Furthermore, in order to improve the biocompatibility, the potentiality of anionic lipids (ALs) assisted by a divalent cation as effective nontoxic DNA vectors have been also analyzed. The lipoplexes studied are those comprised of an anionic lipid, such as DOPG or DOPS, the DOPE helper lipid, the Ca^{2+} divalent cation and pDNA. The studies have been carried out at different liposome and lipoplex compositions and in the presence of a variety of $[Ca^{2+}]$. Electrochemical experiments have revealed that DOPG/DOPE and DOPS/DOPE anionic liposomes may compact pDNA more effectively at low molar fractions ($\alpha = 0.2$) and at AL/pDNA ratios ≈ 20 . Calcium concentrations around 15-20 mM are needed to yield neutral or slightly positive lipoplexes. From a structural standpoint, DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA lipoplexes are self-assembled into an inverted hexagonal H_{II}^c phase, while DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA lipoplexes show two phases in coexistence: one classical H_{II}^c phase which contains supercoiled pDNA and one lamellar L_α phase without pDNA among the lamellae, i.e., a lamellar stack of lipidic bilayers held together by Ca^{2+} bridges. Transfection and cell viability studies have been done using HEK293T and HeLa cell lines in the presence of serum. Compared to Lipofectamine 2000, a standard commercial cationic lipid formulation, DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA and DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA lipoplexes show a moderate-to-low TE together with a moderate-to-high cell

viability, but none of them improves the output of typical CL gene vectors, mostly if they are gemini cationic lipids such as $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$.

In order to improve the TE efficiencies of anionic lipoplexes, the divalent cation Ca^{2+} was replaced by a multivalent macrocyclic such as pilar[5]arene. The biophysical and biochemical characterization has been carried out at several DOPG/DOPE molar compositions, α , and several $[P^{10+}]$. Electrochemical experiments have revealed that, in contrast to the results obtained for DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA, the DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA lipoplex shows a ζ potential sign inversion, which permits to determine the electroneutrality values. Similarly to the cationic lipoplexes, the DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA lipoplex presents a lower electroneutrality value compared to the lipoplexes formed with ctDNA. Both, zeta potential and gel electrophoresis studies show that, at $[P^{10+}] \geq 15 \mu M$, pDNA is efficiently compacted by DOPG/DOPE using P^{10+} as a bridge between the negative charge of the anionic liposome and anionic pDNA. SAXS diffractograms confirm the presence of two structures: an inverted hexagonal one found at low composition ($\alpha = 0.2$) and a lamellar one at medium composition ($\alpha = 0.5$). Cryo-TEM experiments have confirmed the two structures, inverted hexagonal and lamellar ones, as previously found by SAXS. Transfection and cell viability studies have been done with HEK293T cell lines in the presence of serum. The DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA lipoplexes show moderate-to-high cell viability but no significant levels of transfection has been found. This fact would indicate that, at present, lipofection using anionic lipids and multivalent small cations as mediators still needs to enhance the transfection levels prior to be considered a genuinely plausible alternative to those improved CLs-based lipoplexes.

A different approach, based on a gene vector such as calixarene cationic lipid (TMAC4) that contains a cationic supramolecular macrocycles in its structure, has been also analyzed. To this end, the TMAC4/DOPE-pDNA lipoplexes has been characterized by the same methods described previously. Zeta potential and electrophoresis gel results indicate that pDNA is efficiently compacted by the TMAC4/DOPE liposomes. PALS and cryo-TEM results show that, depending on the TMAC4 composition, the TMAC4/DOPE gene vector forms three types of

aggregates: spherical and oblate micelles, and liposomes. SAXS diffractograms reveal that TMAC4/DOPE-pDNA lipoplexes form a lamellar structure. Cryo-TEM experiments confirm the presence of two multilamellar nano-aggregates: CT-type and FP-type, both coexisting at $\alpha = 0.2$. When transfected to HEK293T cell lines, the TMAC4/DOPE-pDNA lipoplexes show moderate-to-high transfection efficiency and cell viability, and thus this lipoplex could be considered a potential gene vector.

Finally, understanding the time evolution of proteins on the time scale of a particle's lifetime in blood is fundamental to predict its fate *in vivo*. Because DC-Chol/DOPE cationic mixed liposomes are quite well nanocarriers *in vitro* and *in vivo*, they have used in this PhD Thesis to investigate the time evolution upon their exposure to HP. On time scales between 1 and 60 minutes, nanoLC-MS/MS has revealed that the protein corona of DC-Chol/DOPE liposomes is mainly constituted of apolipoproteins (Apo A-I, Apo C-II, Apo D, and Apo E are the most enriched). Since the total apolipoprotein content is relevant, the protein corona has been exploited to target PC3 prostate carcinoma cell lines that express high levels of scavenger receptor class B type 1 receptor, which mediates the bidirectional lipid transfer between low-density lipoproteins, high-density lipoproteins, and cells. By combining laser scanning confocal microscopy experiments with flow cytometry, it has been demonstrated that DC-Chol/DOPE-HP complexes enter PC3 cells by a receptor-mediated endocytosis mechanism.

Conclusions

In the present PhD Thesis, a complete biophysical and biochemical characterization of new generations of non-viral gene vectors was performed. The work undertaken allows for establishing empirical correlations among electrochemical and structural properties and the resulting transfection capabilities of the different non-viral gene vectors.

The following specific conclusions have been obtained:

1. The electrochemical studies allow for finding the optimized formulations of the used non-viral vectors at which they are able to compact efficiently pDNA.

In all the cases, pDNA presents a much lower effective negative charge, i.e., only 10 - 25 % of its nominal one (-2 bp).

2. The structural and morphological studies of the different non-viral vectors have revealed a rich scenario of nano-aggregates types, ranging from ribbon-type structures of chiral lipids (such lysine derived) to typical cluster-type and fingerprint-type structures, usually found for CL-formed lipoplexes. Depending on the DOPE content, these structures are formed by the supramolecular self-organization of liposomes and p-DNA in lamellar or inverted hexagonal phases. It is remarkable that, in some compositions, coexistence of the two phases has been found, the resulting de-mixing phases being linked to empirical improvement of resulting transfection levels.

3. Among the studied non-viral vectors, it can be concluded that, in terms of transfection efficiency and cell viability, gemini cationic lipids are the bests. Among them, GCLs containing two imidazolium heads together with an oligo-oxyethylene spacer have revealed as the best ones. The use of the DOPE helper lipid plays a key role in the resulting transfection capability of the gene vectors studied in the present PhD Thesis.

4. The nanovector-biological fluid interactions depending on different external parameters, and the protein corona formation has been performed by applying the usual biophysical, biological methods together with the last-generation instrumental techniques (such as nanoLC-MS/MS). The presence of serum and the incubation time of the vector with the biological fluids have been found to be critical parameters which modify the composition of the formed protein corona and the final transfection efficiencies of DC-Chol/DOPE liposomes. Specifically, longer incubation times (1 h) improves the dys-opsonin proteins content (such as apolipoproteins) which increases the cellular uptake in cell lines with scavenger (SR-BI) receptors such PC3 cell line.

Capítulo 1. Introducción

Capítulo 1. Introducción

1.1 Terapia Génica

Gran parte de las enfermedades que aquejan actualmente a nuestra sociedad tienen su origen a nivel genético; es por ello que el uso de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos ha atraído especial atención en el campo de la medicina, como un nuevo enfoque para el tratamiento de enfermedades, tanto hereditarias como adquiridas.

La terapia génica se define como el conjunto de técnicas que permiten introducir secuencias de material genético (ácidos nucleicos) al interior de las células, con el fin de modular la expresión de genes que se encuentran alterados, restaurando de esta forma el funcionamiento normal de las células.^{1,2} La terapia génica siempre va de la mano del término **transfección**, el cual se define como la introducción y expresión de material genético externo dentro de células eucariotas, específicamente de mamíferos.

La terapia génica apareció en la década de los setenta cuando se desarrolló el cultivo de líneas celulares de mamíferos, y surgió la idea de introducir en ellas DNA exógeno de manera permanente, estable, funcional y capaz de heredarse, a fin de proveer nuevas funciones genéticas. Sin embargo, el pobre desarrollo de la biología molecular y las polémicas relacionadas con los principios éticos en las investigaciones impidió obtener resultados importantes en ese momento.³ Esta situación cambió con el desarrollo de los vectores retrovirales de primera generación y el avance en los principios legales pertinentes. A principios de la década de los 90, se realizaron los primeros ensayos clínicos usando vectores retrovirales para introducir copias del gen adenosina desaminasa (ADA) en linfocitos T en un paciente con deficiencia de ADA.^{4,5}

A partir de esa época hasta ahora, ha habido un creciente número de ensayos clínicos dirigidos a una amplia gama de enfermedades (Figura 1.1).⁶ El

esfuerzo desarrollado en las pasadas décadas en el campo de la biología molecular, junto con los avances en la ingeniería genética y la secuenciación completa del genoma humano, ha transformado el concepto inicial de la terapia génica en una tecnología potencialmente útil, capaz de desarrollar nuevas terapias para diversas enfermedades.

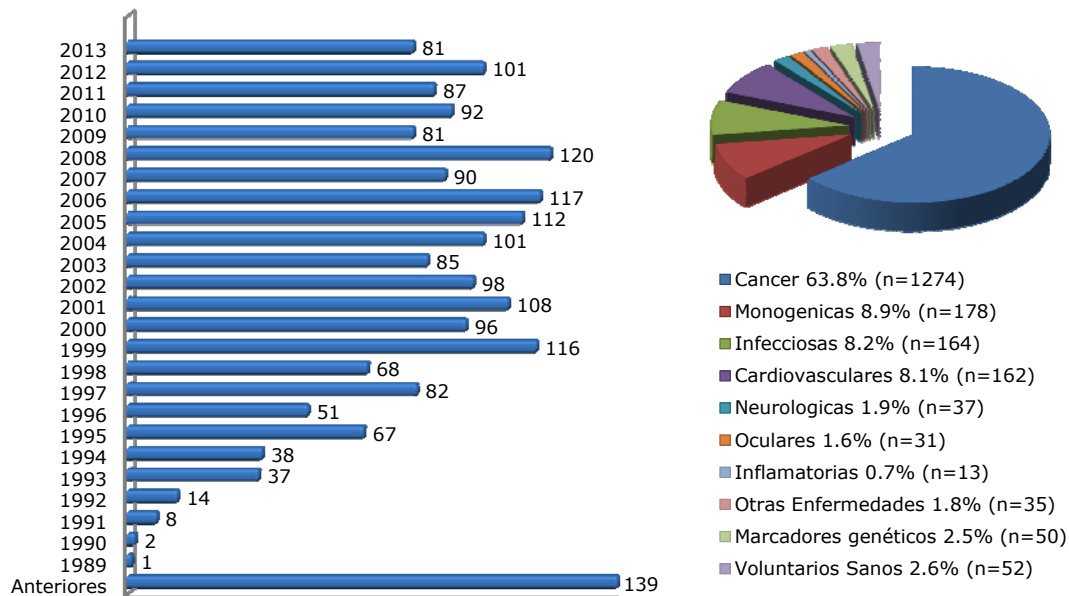


Figura 1.1 Ensayos clínicos empleando terapia génica aprobados en todo el mundo de 1989-2013 (izquierda) y enfermedades a las que se ha dirigido los ensayos (derecha).⁶

Sin embargo, aún existen aspectos en los que es necesario una comprensión científica más profunda, como un mejor entendimiento de los principios moleculares que gobiernan las enfermedades, el desarrollo de sistemas que permitan introducir el material genético dentro de las células de manera selectiva, eficiente y segura, así como una clara comprensión de los procesos de transfección en estudios "in vivo". Todo esto permitirá que, en un futuro, la utilización de genes y ácidos nucleicos como fármacos sea una realidad con incalculables aplicaciones terapéuticas.

1.1.1 Agentes terapéuticos usados en la terapia génica: Ácidos Nucleicos

En la actualidad, existe un gran número de agentes terapéuticos basados en diferentes tipos de ácidos nucleicos, los cuales pueden dividirse en ácidos

nucleicos codificantes (secuencias de DNA que presentan la información requerida para la síntesis de *novο* de una proteína)⁷ y **ácidos nucleicos no codificantes** o interferentes (que no incluyen información para codificar proteínas, sino que interfieren en la síntesis de alguna proteína específica en alguno de los niveles: traduccional, transcripcional o post-transcripcional), como ribozimas, DNAzimas, RNAs pequeños de interferencia o aptámeros (Tabla 1.1).⁸⁻¹² Se han usado ejemplos de cada categoría en pruebas clínicas para el tratamiento de un amplio abanico de enfermedades, tales como el cáncer, VIH, así como desórdenes cardiacos o neurológicos (como el Parkinson y Alzheimer).¹³

Tabla 1.1 Tipos de ácidos nucleicos terapéuticos.

Ácidos Nucleicos Codificantes	Sustitución de proteínas perdidas o proteínas celulares mutadas	
	Proteínas que modulan funciones celulares	
	Factores de crecimiento y citoquinas	
	Proteínas reguladoras de supervivencia celular y apoptosis	
	Antígenos para vacunas	
	Anticuerpos y anticuerpos intracelulares	
	Sub-unidades de receptor de células T (TCR)	
Ácidos Nucleicos no Codificantes	Oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados	Oligonucleótidos fosforotioatos Oligonucleótidos modificados en 2' - ribosa Ácidos nucleicos bloqueados y ácidos nucleicos con puentes de etileno. Morfolinos Ácidos nucleicos peptídicos
	DNAs y RNAs Catalíticos	Ribozimas y DNAzimas
	RNAs pequeños	siRNAs, shRNAs y microRNAs
	RNAs largos de antisentido	
	Aptámeros	

La elección del tipo de ácido nucleico a usar como fármaco dependerá del tipo de desorden genético que se desee tratar. Si lo que se requiere es la expresión de una proteína específica que revierta los daños provocados por la falta de

ésta, se recurre a una terapia génica basada en secuencias codificantes de DNA introducidas en plásmidos.

Los **plásmidos** son moléculas de DNA extracromosómico (generalmente de forma circular y enrollado o superenrollado), capaces de replicarse y transcribirse de manera independiente al DNA cromosómico (Figura 1.2). Los plásmidos son relativamente fáciles de manipular a nivel molecular, es decir, se les puede introducir secuencias codificantes de manera sencilla. Estas dos características, autorreplicación y facilidad de manipulación, hacen de los plásmidos un sistema idóneo para la terapia génica basada en DNA. Sin embargo, aún existen ciertas limitaciones asociadas a su uso, ya que además de transportar las secuencias codificantes de interés, los plásmidos contienen una serie de elementos que provocan señales regulatorias de la expresión génica, como promotores y amplificadores de secuencias. Dichos elementos pueden generar efectos secundarios negativos como la modificación del proceso de transcripción génica, evitando o dificultando una transfección eficiente, y el desarrollo de una posible respuesta inmune. Es así que la ingeniería genética de plásmidos tiene que trabajar en la obtención de promotores capaces de reconocer e insertarse en el genoma humano de manera eficiente, y en el desarrollo de secuencias que no provoquen respuesta inmune.

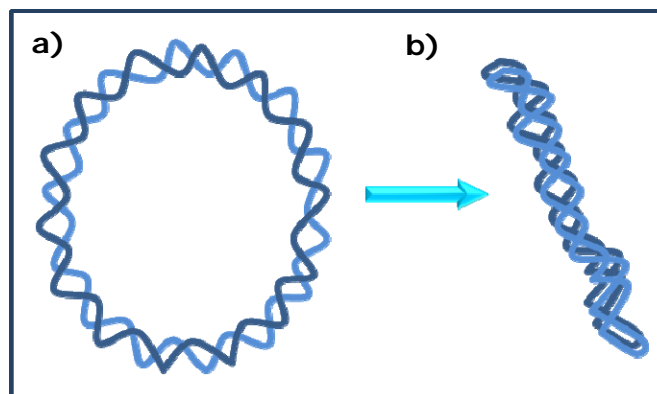


Figura 1.2. Plásmido a) forma relajada; b) forma enrollada.

La terapia génica se puede llevar a cabo a través de dos vías: “*in vitro*” e “*in vivo*”. En el primer caso, la administración de los ácidos nucleicos se realiza fuera del cuerpo del paciente, para ello se obtiene una biopsia del órgano de

interés, se expanden las células mediante cultivo celular y se ponen en contacto con el ácido nucleico mientras están siendo cultivadas. Esto hace posible seleccionar las células que hayan sido modificadas genéticamente y reintroducirlas en el paciente. En el segundo caso, el ácido nucleico se suministra directamente al individuo enfermo por cualquiera de las vías habituales (intramuscular, oral, intravenosa, o subcutánea). Sin embargo los riesgos y obstáculos que presenta este procedimiento son mucho mayores.¹⁴

La introducción de ácidos nucleicos al interior de las células tanto en la terapia génica *in vivo* como *in vitro* presenta una serie de barreras fisiológicas que impiden una eficiente transfección. A continuación se hablará más detalladamente de dichas barreras.

1.1.2 Barreras fisiológicas en la terapia génica

La trayectoria de los ácidos nucleicos en el proceso de la terapia génica no es un proceso sencillo, ya que en general todos los sistemas biológicos siempre intentan destruir cualquier "objeto" extraño que penetra en su interior.^{15,16} Las principales barreras con las que se encuentran los ácidos nucleicos son las siguientes:

- a) Captación de los ácidos nucleicos por el sistema endotelial.
- b) Interacciones no específicas con los componentes de la sangre.
- c) Internalización de los ácidos nucleicos en las células.
- d) Liberación oportuna de los ácidos nucleicos en el interior de la célula.
- e) Llegada de los ácidos nucleicos al compartimento celular adecuado.

Estas barreras pueden depender de la propia naturaleza del ácido nucleico, y/o sistema que lo transporta. Es así que la llegada de un ácido nucleico a su destino final en un ser vivo se ve altamente afectado por las barreras fisiológicas, las cuales se agravan cuando la transfección se realiza *in vivo*.

El primero de los problemas a los que se enfrentan los ácidos nucleicos (desnudos o transportados con un nanovector) al entrar en el torrente sanguíneo es la captación del ácido nucleico por parte del sistema endotelial y

su posterior filtración en el riñón, provocando una pérdida total del tratamiento.¹⁷

Otro de los problemas asociados a la terapia *in vivo*, son las interacciones inespecíficas con los diversos componentes de los fluidos biológicos. La sangre presenta una gran cantidad de proteínas y enzimas que interaccionan de manera destructiva con los ácidos nucleicos. Cuando el ácido nucleico (ya sea desnudo o protegido) entra en el torrente sanguíneo, una gran cantidad de proteínas se adhieren a su superficie formando lo que se conoce como la corona de proteínas. Dentro de las proteínas que forman esta corona, se encuentran las opsoninas, las cuales funcionan como coadyuvantes de los fagocitos en el sistema de respuesta inmune. Cuando estas proteínas se adhieren al sistema que lleva los ácidos nucleicos, desencadenan una serie de señales para que el sistema sea fagocitado, reduciendo así drásticamente la eficiencia de transfección.

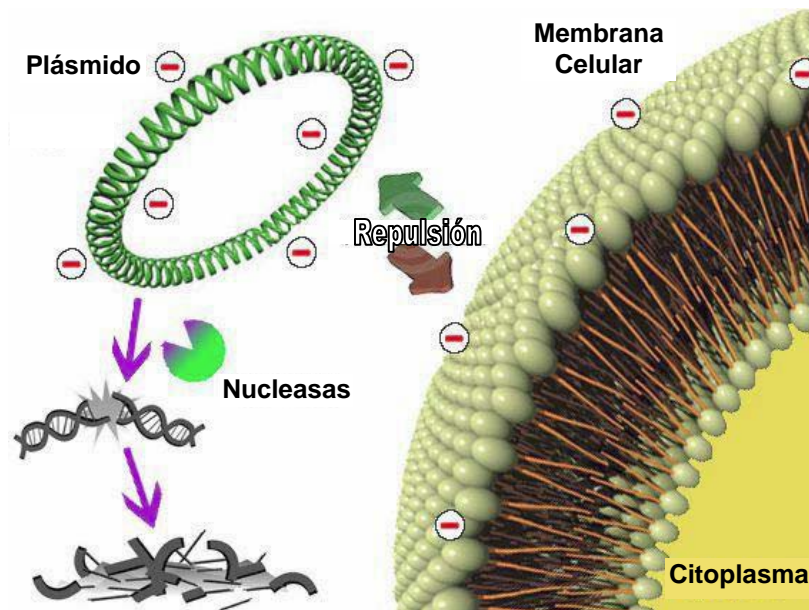


Figura 1.3. Representación esquemática de las limitaciones farmacocinéticas de la terapia génica basada en ácidos nucleicos desnudos.

Por otra parte, la presencia de nucleasas en el suero de la sangre provoca la ruptura de los enlaces fosfodiéster entre la pentosa y el grupo fosfato de los ácidos nucleicos, provocando su degradación y consecuente pérdida de actividad biológica (Figura 1.3).^{18,19}

Una vez que el ácido nucleico ha alcanzado la superficie celular se encuentra con la siguiente barrera: la membrana celular. Primero, porque la entrada de moléculas al interior de una célula se hace de manera selectiva siguiendo algunos de los procesos que se detallaran más adelante; y segundo, porque tanto las membranas celulares como los ácidos nucleicos están cargados negativamente, generándose repulsiones electrostáticas entre ambos (Figura 1.3).²⁰

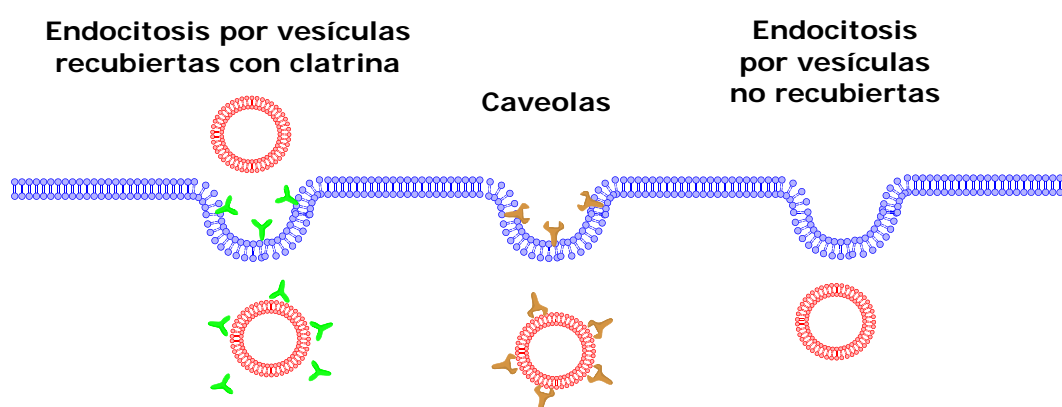


Figura 1.4. Mecanismos de internalización de los ácidos nucleicos al interior de las células.

La internalización de los ácidos nucleicos en las células no ocurre de manera pasiva, sino que tiene lugar, principalmente, a través de diferentes vías de **endocitosis**.^{21,22} La endocitosis es un proceso por el cual la célula introduce partículas grandes a su interior, y lo hace por medio de una invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula llamada endosoma, la cual termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma. Se ha demostrado que las tres vías de endocitosis seguidas en los procesos de transfección son: endocitosis mediada por **vesículas** recubiertas de **clatrina**, endocitosis mediada por **caveolas** y endocitosis mediada por **vesículas no recubiertas** (Figura 1.4). La endocitosis mediada por clatrina es el principal mecanismo de internalización de macromoléculas en las células de mamíferos. La endocitosis mediada por caveolina es la vía usada por patógenos. En ambas vías, cuando se produce la invaginación, los endosomas están revestidos de clatrina o caveolina respectivamente. La habilidad de los sistemas de transporte de ácidos nucleicos de unirse a la membrana celular y penetrar en

ella por alguna de las vías antes mencionadas dependerá principalmente de la composición del sistema de transporte y/o su tamaño (ambas características son dependientes de la corona de proteínas). La vía de entrada que se siga determinará considerablemente la eficiencia de la transfección.^{22,23}

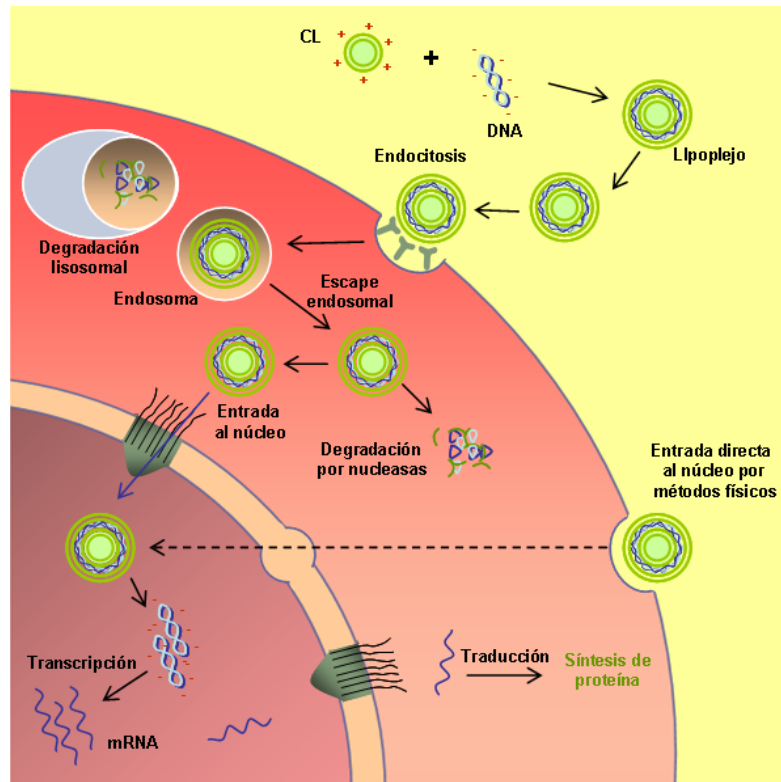


Figura 1.5. Representación esquemática del proceso de transfección.

Una vez internalizado el ácido nucleico en endosomas, éstos deben ser capaces de liberarse al citoplasma y dirigirse al orgánulo de interés, por ejemplo al núcleo celular en el caso de los plásmidos. La liberación de los ácidos nucleicos se da por la acidificación de los endosomas cuando se fusionan con los lisosomas (orgánulos celulares vesiculares que contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas que sirven para digerir materiales de origen externo, y que presentan un pH interno bastante ácido (4.5-5.0), comparado con el pH del citoplasma (7.2)).²⁴ La fusión de los endosomas a los lisosomas puede provocar daños y degradación de los ácidos nucleicos; por lo tanto, la velocidad a la que los ácidos nucleicos logren salir del endosoma formado y dirigirse al compartimento adecuado también es un punto crucial en el proceso (Figura 1.5).^{15,21,25-27}

Debido a algunas de las barreras anteriormente mencionadas, en un proceso de transfección se evita introducir en las células ácidos nucleicos desnudos. En la mayoría de los casos se usan sistemas que protegen el ácido nucleico y favorecen su internalización celular; los *vectores génicos*. Sin embargo, existen otras barreras fisiológicas que están directamente relacionadas con el vector que transporta el ácido nucleico, ya que es lo primero que "ven" las células cuando éste es administrado en el torrente sanguíneo.

Los fluidos biológicos como la sangre, el líquido tisular o el citoplasma, presentan una gran cantidad de biomoléculas que compiten por adsorberse en la superficie del vector. Estas biomoléculas están conformadas principalmente por proteínas y forman, como se ha mencionado anteriormente, la **corona de proteína**.²⁸⁻³⁷ La estructura y composición de la corona de proteínas depende de las propiedades físicoquímicas del vector que transporta al ácido nucleico (tamaño, forma, naturaleza, composición, carga y grupos funcionales presentes en su superficie), del entorno fisiológico (sangre, líquido tisular, citoplasma, etc.), de la temperatura, y de la duración de la exposición.^{30,32,38-49} La corona de proteínas altera el tamaño y composición superficial de los vectores, provocando que éstos tengan una nueva identidad biológica cuando son reconocidos por las células.^{31,33,34} Es así que la corona de proteínas juega un papel fundamental en las respuestas fisiológicas de aglomeración, captación celular, tiempo de circulación, señalización, cinética, transporte, acumulación y toxicidad.^{28,38,49-51} Por todo esto, la composición de la corona de proteínas es prácticamente única de cada material y depende de todos los parámetros anteriormente mencionados.

La adsorción de proteínas en la superficie de un vector está gobernada por afinidades de unión proteína-vector, así como interacciones proteína-proteína.⁵² La adsorción de proteínas con mayor afinidad y que presentan tiempos de intercambio largos (la desorción de estas proteínas puede implicar horas) forman lo que se conoce como la corona dura "*hard corona*"; por otra parte, las proteínas que se adsorben con baja afinidad y presentan tiempos de intercambio cortos forman la corona suave "*soft corona*".^{32,35,50} Evidentemente, el proceso de adsorción-desorción es un proceso dinámico (Figura 1.6), de tal

manera que la composición de la corona va cambiando con el tiempo hasta que alcanza una composición de equilibrio en un tiempo promedio de unas cuantas horas. De hecho, la corona dura se caracteriza por tiempos de intercambio muchos más largos (del orden de horas) que la corona suave. En la mayoría de los casos, proteínas con mayor abundancia en el suero son adsorbidas en la superficie y al paso del tiempo son remplazadas por proteínas con concentraciones menores pero con mayores afinidades a la superficie del vector.³⁰ De la misma forma, proteínas con mayores movilidades llegan primero y después son remplazadas por proteínas con movilidades menores pero con mayor afinidad superficial.

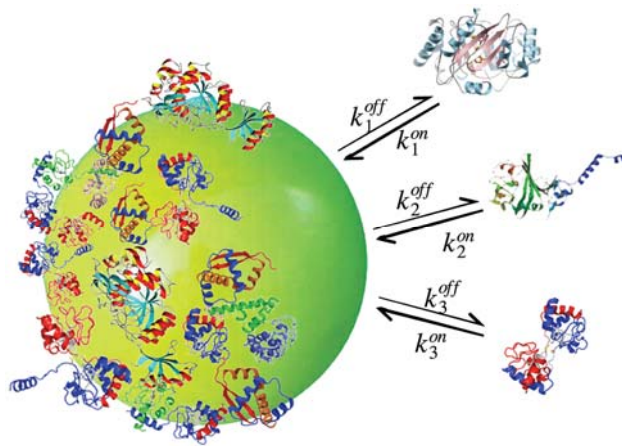


Figura 1.6. Intercambio dinámico de la corona de proteínas.⁵³

De esta forma, en cualquier momento, una proteína puede desorberse, permitiendo que otras proteínas interactúen con la superficie de nanomaterial. A los cambios en la composición de la corona de proteínas resultantes por la adsorción y desorción de proteínas se conoce como **efecto Vroman**.^{38,54} Durante la asociación de las proteínas del suero, el efecto Vroman puede dividirse en dos etapas, la etapa inicial y la etapa final. La etapa inicial involucra la rápida adsorción de albúmina, inmunoglobulinas y fibrinógeno, que son reemplazados en un segundo paso por apolipoproteínas y factores de coagulación.⁵⁵ La albúmina presenta una alta concentración en el suero de la sangre. Por lo que cuando el vector es introducido en el torrente sanguíneo, una capa de albúmina se adsorbe en su superficie en la etapa inicial, y, conforme pasa el tiempo, se reemplaza por proteínas con mayor afinidad de

adsorción superficial.³² La etapa final del efecto Vroman ocurre cuando proteínas que tienen afinidades moderadas son reemplazadas por proteínas que presentan afinidades muy altas como son las apolipoproteínas y factores de coagulación.³⁵ Es importante destacar que algunas proteínas como las inmunoglobulinas y fibrinógeno pertenecen a un grupo de proteínas coadyudantes del sistema inmunológico, por lo que cuando están adsorbidas en un material, provocan que éste rápidamente sea digerido o destruido por las células, es decir, promueven la fagocitosis del material. Por otro lado, las apolipoproteínas son parte del grupo de las dis-opsoninas, proteínas que prolongan el tiempo de circulación de un vector en el torrente sanguíneo.⁵⁶

Debido al cambio de la composición en la corona de proteínas a partir de la etapa inicial a la etapa final, el estudio temporal de la composición de la corona de proteínas sobre los vectores es de gran importancia, ya que permite determinar parte del comportamiento biológico de los vectores, así como los procesos celulares que se pueden llevar a cabo como la fagocitosis, la captación celular, y la toxicidad.⁵⁷

De esta forma, las consecuencias biológicas de la existencia de la corona de proteínas pueden ser tanto beneficiosas como perjudiciales para las aplicaciones biomédicas de los vectores génicos no virales. Así, por un lado puede favorecer que el vector terapéutico alcance su diana celular, potenciar su captación celular, y disminuir su citotoxicidad, pero, por otra parte, también puede provocar una rápida eliminación del vector del torrente sanguíneo o, incluso, provocar reacciones inflamatorias. Por lo que resulta imprescindible conocer el perfil proteómico de la corona para predecir sus efectos biológicos y para ajustar las características fisicoquímicas del vector a su pretendida actividad biológica.

De todo lo anteriormente expuesto, se puede inferir que los procesos de transfección celular son tremendamente complejos, ya que confluyen un importantísimo número de variables extra e intracelulares. Por consiguiente, para poder conocer en profundidad los mecanismos que regulan la transfección celular es imprescindible plantear estudios claramente multidisciplinarios que

aúnen los esfuerzos de varios científicos expertos en distintas áreas del conocimiento como son la física, la química, la bioquímica y la medicina. Sólo de esta forma se podrá conseguir diseñar e implementar nuevos protocolos de terapia génica que mejoren los ya existentes, y que puedan curar enfermedades a nivel molecular de forma eficiente y segura.

1.2. Métodos de transfección

En sus primeros desarrollos, la terapia génica tanto *in vivo* como *in vitro* se realizaba con DNA desnudo. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los ácidos nucleicos presentan una muy baja viabilidad en los medios biológicos. Es por ello que se han desarrollado un gran número de formas para vehicularlos al interior de las células. Aunque se conocen diversas formas de clasificar los métodos de transfección existentes, en esta tesis se van a agrupar esencialmente en dos categorías: **métodos físicos** y **métodos asistidos por vectores**.

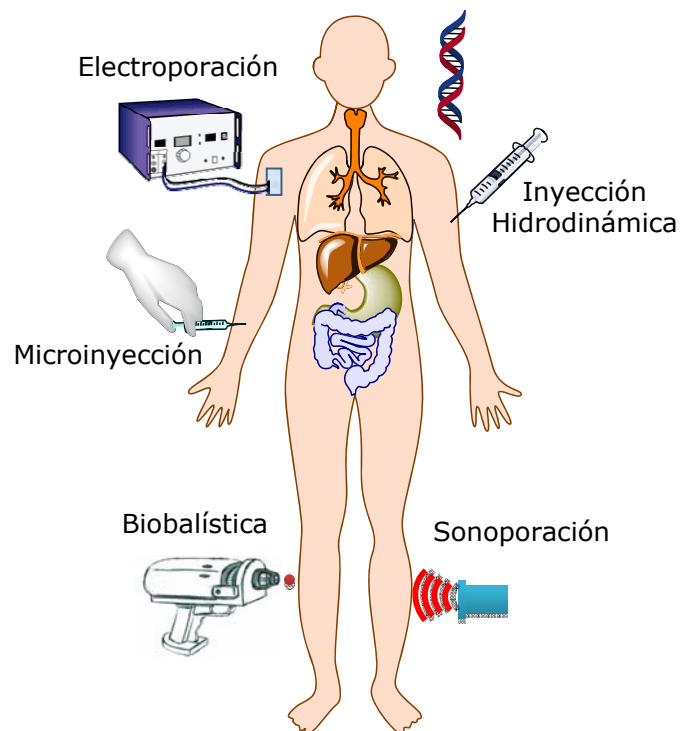


Figura 1.7. Métodos físicos usados en la terapia génica.

Los métodos físicos son aquellos que utilizan estímulos mecánicos o eléctricos para promover la absorción del ácido nucleico terapéutico en la célula o tejido diana. Los métodos físicos incluyen la microinyección, biobalística, electroporación, sonoporación, gradiente de presión e irradiación láser (Figura 1.7).¹⁹ Estos métodos, a pesar de ser operativamente sencillos, presentan ciertas desventajas, como son: bajos niveles de transfección, limitada cantidad de DNA que puede ser transportada a las células, distribución no homogénea del DNA en las células y la toxicidad, ya que en muchos de los casos estos métodos pueden provocar daños celulares irreversibles.¹⁹

Por otro lado, los métodos asistidos por vectores, son aquellos en los que se utiliza un agente biológico o químico para transportar los ácidos nucleicos al interior de las células. Estos vectores, además de proveer protección a los ácidos nucleicos, deben reunir una serie de características para su uso potencial como eficientes agentes de transfección. A continuación, se enumeran algunas de ellas:²

- a) Fáciles de producir y almacenar
- b) Coste de producción razonable
- c) Resistencia a la degradación
- d) Inmunologicamente inertes
- e) Presentar gran capacidad de compactación de material genético de amplio intervalo de tamaño (entre 350 a 12000 pares de bases)
- f) Especificidad en los tejidos
- g) Favorecer la integración y replicación de la secuencia introducida
- h) Bajos niveles de toxicidad y/o efectos secundarios mínimos.

Aunque éstas son las características que se requieren para tener un vector ideal, aún no se conoce ningún sistema que cumpla con todos los requisitos. Como se verá más adelante, cada tipo de vector presenta ventajas y desventajas.

Los métodos asistidos por vectores se pueden dividir en dos grandes subgrupos: **vectores virales** y **vectores no virales** (vectores sintéticos).

1.2.1 Vectores virales

Los **vectores virales** fueron los primeros en ser utilizados, ya que de manera natural los virus son capaces de transportar material genético al interior de células huésped para su posterior replicación.^{2,5,58} Sin embargo, para poder utilizar un virus en terapia génica, es necesario realizar ciertas modificaciones en su ciclo replicativo a fin de evitar que éste infecte a la célula objetivo y genere patogenicidad. Por esta razón, a los virus utilizados en la terapia génica se les conoce como *virus recombinantes o defectivos*. Una vez modificado el virus, se procede a sustituir el genoma viral por el ácido nucleico terapéutico. Desafortunadamente, las transformaciones en los virus han resultado ser bastante complejas y solo los virus más simples (retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), poxvirus, vavaccinia virus, lentivirus y el virus del herpes) han sido modificados exitosamente para su uso como vectores de transfección (Figura 1.8).^{2,5,59-64}

Los retrovirus fueron los primeros en ser empleados en terapia génica; sin embargo, su uso ha ido disminuyendo con el paso del tiempo, debido a una serie de resultados adversos encontrados en algunos ensayos de síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SCID).⁶⁵

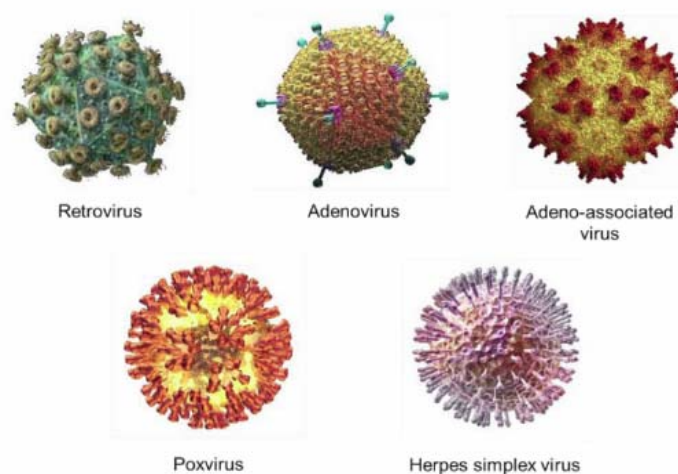


Figura 1.8. Tipos de virus usados en la terapia génica.

Los vectores virales más usados actualmente en terapia génica son los adenovirus (23% de todas las pruebas clínicas, ver Figura 1.9), ya que presentan una capacidad de transporte de DNA en general superior a la del resto de vectores virales. Además, las mayores ventajas que presentan los adenovirus son: su capacidad para lograr una alta eficiencia en la traducción, sus altos niveles de expresión génica y capacidad de transfectar células que no están en división, así como una menor respuesta inmune que otros vectores virales.

Aunque durante estos años se han encontrado niveles terapéuticamente relevantes de expresión génica en diferentes órganos para distintas enfermedades utilizando vectores virales,⁶⁶⁻⁷² y que más de las dos terceras partes de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha (Figura 1.9) se han realizado con estos vectores, aún existen graves riesgos y limitaciones relativos a su aplicabilidad.⁷² Por un lado, los vectores virales son potencialmente capaces de recombinarse con virus competentes para la replicación, pueden inducir una respuesta inmune o inflamatoria, y eventualmente, su información genética podría insertarse en el genoma del huésped.^{72,73} Por otra parte la fabricación a gran escala, incluso de los virus más simples aún no es posible.

En la actualidad, a nivel global se han aprobado cuatro tratamientos basados en vectores virales (Europa, 1, USA, 1, y China, 2). La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobó el uso de Glybera®(UniQure), tratamiento basado en un vector de AAV que codifica el gen de la lipoproteína lipasa humana indicado para el tratamiento de la deficiencia de lipoproteína lipasa (LPLD), una enfermedad hereditaria muy poco común que se asocia con inflamación del páncreas. La Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA) ha aprobado muy recientemente el uso de Mycadyr (Celladon) para el tratamiento de insuficiencias cardíacas, usando también un AAV que reemplaza el gen SERCA2a.⁷⁴ Las autoridades chinas han sido más permisivas, y aprobaron el uso de dos sistemas: en 2003 se aprobó el Gendicine de Shenzhen SiBionoGenTech, basado en un adenovirus para el tratamiento de cáncer de

cabeza y cuello,⁷⁵ y en 2005 se aprobó el uso del adenovirus oncolítico (H101) para el tratamiento de células tumorales.⁷⁶

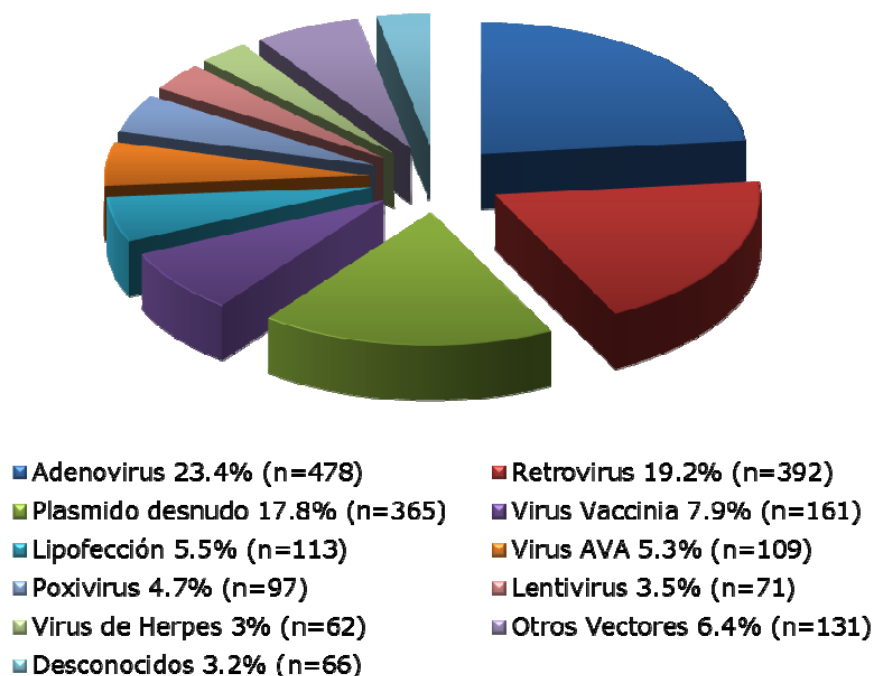


Figura 1.9. Vectores usados en los diferentes ensayos clínicos de terapia génica.⁶

Actualmente se siguen desarrollando gran cantidad de tratamientos basados en vectores virales, algunos con resultados muy interesantes; sin embargo, debido a todos los inconvenientes que dichos vectores presentan, como la respuesta inmune, oncogenicidad y la limitación de tamaño de las cadenas de DNA que pueden transportar, es necesario seguir buscando vectores de transfección más eficientes y seguros.

1.2.2 Vectores no virales

Los **vectores no virales**, por otra parte, son todos aquellos sistemas de origen no viral, capaces de transportar secuencias de ácidos nucleicos. Los vectores no virales, a diferencia de los virales, no presentan respuesta inmune, son relativamente más fáciles de preparar y son capaces de empaquetar mayores cantidades de DNA. Actualmente, los vectores no virales han ido cobrando cada vez más importancia. En esta época, donde la nanotecnología y la ciencia de los materiales avanzan a pasos agigantados, los materiales

sintéticos pueden ser diseñados prácticamente a medida, con las funcionalidades deseadas en términos de biodisponibilidad y biocompatibilidad, con capacidades para compactar y proteger los ácidos nucleicos, así como propiedades que les permitan atravesar las membranas celulares y llegar a los sitios requeridos a nivel celular. La cantidad de vectores diseñados para este propósito, así como la comprensión de su interacción con los ácidos nucleicos, ha aumentado considerablemente.

En la última década, se han realizado enormes esfuerzos en el campo de los vectores no virales, enfocados al diseño de sistemas que presenten elementos funcionales que permitan superar las barreras fisiológicas a fin de mejorar su eficiencia. De esta forma, las investigaciones se han ido dirigiendo a los siguientes aspectos:

- a) Mejorar la condensación y protección de los ácidos nucleicos en el medio extracelular.
- b) Aumentar la captación celular por mecanismos específicos con la incorporación de receptores superficiales.
- c) Promover la liberación del endosoma por agentes desestabilizadores o estructuras sensibles a cambios de pH.
- d) Explotar la maquinaria del transporte intracelular activo para dirigir su movimiento en el citoplasma.
- e) Dirigir el vector a los poros de la membrana nuclear mediante antenas de localización.
- f) Mejorar la biocompatibilidad para evitar respuestas en el sistema inmune o interacciones no específicas con el medio biológico.

El encontrar sistemas que reúnan éstos requisitos es un trabajo arduo que requiere un estudio integral de varias áreas del conocimiento. Existe una gran variedad de sistemas que se pueden usar como vectores no virales: liposomas, polímeros, nanopartículas (NPs), ciclodextrinas (CDs), calixarenos, polielectrolitos, dendrímeros y dispositivos supramoleculares.⁷⁷⁻⁹² Cada uno de estos sistemas ha demostrado ser capaz de compactar, transportar, proteger y

liberar los ácidos nucleicos dentro de las células en mayor o menor medida. Sin embargo, las eficiencias de transfección en muchos de los casos no logran ser lo suficientemente buenas en comparación con los vectores virales, y, a pesar de que este tipo de vectores no desencadenan respuesta inmune, en muchos de los casos presentan niveles considerables de toxicidad. Entre el conjunto de vectores no virales, los vectores lipídicos se presentan como una importante alternativa a los sistemas víricos, al no resultar peligrosos, presentar baja respuesta inmune y elevada capacidad de transporte de los ácidos nucleicos.

1.2.2.1 Vectores Lipídicos

El método más ampliamente usado y donde hasta ahora se han obtenidos los mejores resultados se basa en el uso de sistemas lipídicos como vectores de transfección, lo que comúnmente se conoce como "lipofección" (Figura 1.9). Actualmente se pueden encontrar varias formulaciones lipídicas en el mercado para ensayos *in vitro*, como, Lipofectamina (Life Technology), Escort (Sigma Aldrich) y Turbofect (Thermo scientific), cada una con sus variantes. Sin embargo, y a pesar de los grandes avances que se han realizado en esta área, ninguna de estas formulaciones ha logrado superar las barreras fisiológicas, en términos transfección y viabilidad celular requeridas para que llevar estos sistemas a ensayos *in vivo* viables. Es por ello que, para lograr que la lipofección sea un verdadero sustituto de los vectores virales, es necesario seguir investigando y trabajando en la búsqueda de sistemas capaces de mejorar las eficiencias de transfección para distintos tipos de ácidos nucleicos y líneas celulares, así como reducir los niveles de toxicidad.

Los vectores lipídicos están constituidos esencialmente por mezclas de moléculas anfifílicas de muy variada estructura y propiedades. Como es sabido, toda molécula anfifílica se caracteriza por presentar en su estructura una región polar, iónica o no, de carácter hidrofílico, formada por una o más grupos polares, y una región apolar hidrofóbica formada generalmente por una o más cadenas hidrocarbonadas alifáticas. Una de las características más significativas de estas moléculas es su tendencia a autoagregarse en disolución acuosa mediante un proceso cooperativo conducido por la tendencia de las

cadena hidrocarbonada de las moléculas anfifílicas a reducir su contacto con el agua.^{93,94} Como resultado de este fenómeno de autoasociación, se forman una amplia variedad de nanoagregados y/o fases de cristal líquido liotrópico (fases lamelares, hexagonales y cúbicas).

Esta asociación es de tipo físico, y por esta razón, pueden cambiar el tamaño o la forma de las nanoestructuras como respuesta a pequeños cambios en concentración, fuerza iónica, temperatura, pH y presión.^{1,95,96} En los agregados coloidales directos (en medio acuoso), los grupos hidrofóbicos evitan el contacto con el agua, mientras que los grupos hidrofílicos se localizan en su superficie, interaccionando con el agua y con cierta cantidad de contraiones no disociados. Estos nanoagregados son termodinámicamente estables y están en equilibrio químico dinámico con las moléculas anfifílicas libres.^{94,97-99}

Si bien la formación de estos nanoagregados se ve favorecida por la supresión de las interacciones desfavorables entre las cadenas hidrófobas y el agua, es de destacar la existencia de interacciones que se oponen a la formación de estos agregados. Entre ellas, las principales son las interacciones electrostáticas repulsivas entre los grupos polares y las interacciones estéricas que tienen lugar entre ellas y entre las cadenas hidrófobas.^{93,94,100} El balance entre las interacciones repulsivas y las atractivas da lugar a agregados de tamaño finito. La forma de las distintas estructuras coloidales viene determinada por el valor del **parámetro de empaquetamiento**, P , definido por *Israelachvili* en función de las características geométricas la molécula anfifílica:^{94,95,100,101}

$$P = \frac{v}{l_c a_0} \quad (1.1)$$

donde v es el volumen de las cadenas hidrocarbonadas, asumiendo que son fluidas e incompresibles, l_c es la longitud crítica de la cadena hidrocarbonada, es decir, la longitud máxima efectiva que pueden alcanzar las cadenas cuando forman parte del agregado coloidal, y a_0 es el área efectiva de la cabeza polar en la superficie del agregado (Figura 1.10).

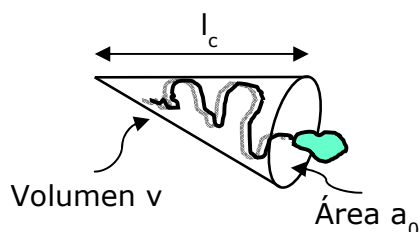


Figura 1.10. Representación esquemática de los parámetros moleculares de los que depende el parámetro de empaquetamiento, P .

Tanford propuso un modelo para estimar el volumen y la longitud de la región apolar en función del número de carbonos de la cadena hidrofóbica, n_c :^{93,102,103}

$$v = 0.027 + 0.0269n_c \text{ nm}^3 \quad (1.2)$$

$$l_c = 0.15 + 0.127 n_c \text{ nm} \quad (1.3)$$

Las moléculas anfifílicas con parámetros de empaquetamiento de $1/2 < P < 1$ dan lugar a *vesículas* o *liposomas*^a (bicapas flexibles, Figura 1.11a), como es el caso de los fosfolípidos y tensioactivos de doble cadena.^{94,95} Cuando el $P \approx 1$, las moléculas anfifílicas se organizan en forma de bicapas planas (Figura 1.11b) y cuando el $P > 1$, las moléculas tienden a agregarse en fases hexagonales inversas.

Para la formación de vectores lipídicos, se prefiere utilizar moléculas anfifílicas de doble cadena hidrofóbica (a los que a partir de ahora nos referiremos como lípidos), ya que presentan muy baja solubilidad respecto a los de cadena sencilla. Esto provoca que la agregación de los lípidos se produzca a concentraciones mucho más pequeñas (unas 10^5 veces menor), conocida como *concentración vesicular crítica, cvc*.⁹⁵ La nanoestructura principalmente formada por éste tipo de lípidos son los liposomas, los cuales están constituidos por bicapas curvadas y cerradas (de entre 4 y 5 nm de espesor generalmente) en las que las dos superficies polares mantienen contacto con el medio acuoso y protegen a las cadenas hidrofóbicas

^a Rigurosamente, el nombre de *vesículas* se reserva a las formadas por tensioactivos de origen sintético, mientras que el nombre de *liposomas* se destina a los formados por fosfolípidos. Sin embargo, es habitual en este campo encontrar ambas denominaciones para cualquiera de las dos composiciones.

del mismo,^{94,95,104,105} presentando de este modo un compartimento acuoso interno separado de la fase acuosa externa por la bicapa.

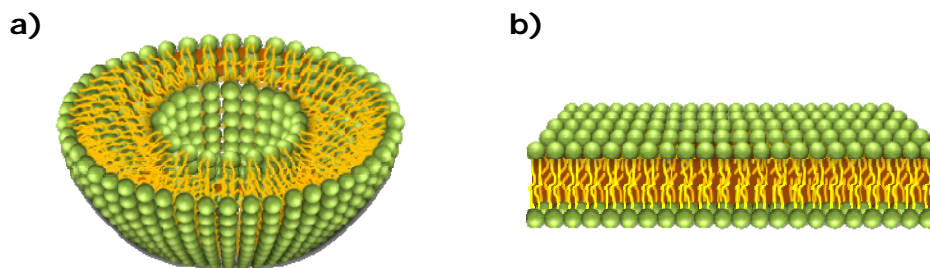


Figura 1.11. Secciones de los diferentes modos de agregación supramolecular más comunes en disolución acuosa: a) vesícula o liposoma (bicapa curva flexible) y b) bicapa lipídica plana.

La composición, así como la distinta naturaleza de las cadenas hidrocarbonadas y regiones polares de los lípidos, determinan muchas propiedades superficiales y de membrana, tales como la carga superficial, interacciones estéricas o la rigidez de la membrana.^{1,98} Esta última propiedad cobra vital importancia a la hora de la preparación de los liposomas, y viene manifestada por la presencia de *mesomorfismo termotrópico*. La existencia de este estado intermedio entre el líquido y el cristal, denominado gel, se demuestra con pequeños cambios estructurales y se produce a una cierta *temperatura de transición de fase termotrópica*, T_m ,⁹⁸ como consecuencia de las diferencias de polaridad existentes en el lípido. Por debajo de la T_m , los lípidos en la bicapa (así como una cierta cantidad de moléculas de agua) están altamente ordenados en estado gel, con las cadenas alquílicas en conformación *trans*. Sin embargo, por encima de la T_m se produce una simultánea disociación del entramado iónico por la entrada de moléculas de agua y la fusión de la región hidrofóbica,^{94,98,106} es decir, un aumento del desorden, lo que convierte a la membrana en una estructura más flexible y dinámica. Estudios previos han demostrado que la presencia de lípidos no iónicos en vesículas mixtas hace disminuir la T_m de la membrana, todo lo contrario que los lípidos catiónicos.^{107,108}

Las vesículas/liposomas se clasifican generalmente en función de la morfología o naturaleza y del número de membranas o lamelas:^{98,104-106}

- a) SUV: vesículas unilamelares pequeñas de entre 20 y 50 nm de tamaño.
- b) LUV: vesículas unilamelares grandes comprendidas en un intervalo de tamaños de 50 a 500 nm.
- c) GUV: vesículas unilamelares gigantes con tamaños superiores a 1 μm .
- d) LMV: vesículas multilamelares. Su tamaño varía en función del número de bicapas, pudiendo llegar a tamaños superiores a 10 μm .

Los **liposomas** pueden estar constituidos por uno o varios tipos de fosfolípidos, pudiendo llegar a contener algún otro componente (lípidos de doble cadena, colesterol o derivados, glicolípidos, ácidos grasos, proteínas, etc.). Por este motivo, y a diferencia de las vesículas no fosfolípídicas, se hace necesario un gran aporte energético para su preparación, llegándose a obtener liposomas de muy variada estabilidad y tamaño, en función del método aplicado, aun partiendo de una misma composición. Al desequilibrio termodinámico hay que añadirle la propia inestabilidad química fomentada por la tendencia de los fosfolípidos a oxidarse y degradarse (reacciones de hidrólisis y oxidación lipídica), más aún si cabe en estado hidratado y/o temperatura ambiente, condiciones habituales de experimentación.¹ Todo ello hace del manejo de los liposomas una complicada labor experimental, así como una preparación mucho más prolongada, laboriosa y pautada que en el caso de las vesículas comunes.

Los liposomas han sido usados ampliamente en la industria farmacéutica debido a las propiedades que presentan, entre ellas su gran similitud con las membranas celulares y capacidad para transportar fármacos en su interior. A partir de la década de los ochenta, se planteó su utilización de liposomas catiónicos como potenciales vectores de DNA en transfección.¹⁰⁹

La biocompatibilidad característica de los liposomas, así como su biodegradabilidad y el bajo efecto inmunológico en el organismo, ha permitido su uso potencial como vectores en terapia génica. La transfección basada en

lipofección se basa en la formación de un complejo DNA-liposoma, denominado **lipoplejo**, capaz de transportar, compactar y proteger el DNA hasta su llegada a la célula. En cuanto al tipo de liposomas, se ha observado que los catiónicos puros (sin la presencia de un lípido coadyuvante) no contribuyen significativamente a la transfección, al contrario de los liposomas catiónicos mixtos (con un lípido coadyuvante), más sensibles a cambios de pH y potencialmente más fusogénicos.¹

Los estudios realizados hasta el momento han permitido ir avanzando en el diseño racional de lípidos, ya que gran parte del éxito en la transfección depende de la estructura que presenta el lípido. Es importante señalar que la eficiencia de transfección que presenta un lípido no depende únicamente de una de sus partes, sino de la combinación de ellas. Es así que la longitud y número de las colas hidrofóbicas, el número y la naturaleza de las cabezas polares (tamaño y carga) y el espaciador en el caso de lípidos del tipo géminis, juegan un papel importante en el proceso de transfección. Bhattacharya et. al. presenta una serie de consideraciones importantes para el diseño de lípidos usados en transfección.⁸⁰

Hasta el momento se sabe que lípidos con cadenas hidrocarbonadas con longitudes de entre 16 a 18 átomos de carbono son las que presentan mejores resultados de transfección. De igual forma, si las cadenas presentan insaturaciones, se observa que la bicapa se hace más fluida, favoreciendo las interacciones de los lipoplejos con las membranas celulares. A nivel del grupo polar, las variaciones tanto de carga como del número de grupos producen cambios considerables.^{16,21,110}

Dependiendo de la carga que presenten los lípidos en los grupos polares, éstos pueden ser catiónicos, aniónicos, neutros o zwitteriónicos. Debido a la naturaleza negativa del DNA, los principales sistemas usados en la lipofección, son los vectores lipídicos catiónicos. Sin embargo, también existen estudios con vectores lipídicos aniónicos y neutros.¹¹¹⁻¹¹³ A continuación, se hablará más ampliamente de los vectores lipídicos catiónicos, tanto de uno como de dos

(tipo géminis) grupos polares, de vectores lipídicos aniónicos y vectores lipídicos con macrociclos en su estructura, como agentes de transfección.

Vectores lipídicos catiónicos

Los vectores lipídicos catiónicos están formados por lípidos que presentan una carga positiva en su o sus grupos polares (lípidos catiónicos, CL), de tal forma que la carga superficial del liposoma es positiva. Esta característica favorece la interacción electrostática espontánea con las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA, es decir la formación del lipoplejo. Al mismo tiempo, la carga de los liposomas catiónicos favorece la interacción con los componentes negativos de las membranas celulares en la captación celular.^{23,114} Además los liposomas catiónicos protegen al DNA de la degradación por las enzimas DNAasas que se encuentran en los medios biológicos.

En 1987, Felgner demostró que los liposomas catiónicos formados por cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) mejoraban sustancialmente la eficiencia de transfección en comparación con otros vectores no virales.⁷⁷ A partir del trabajo realizado por Felgner, se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el fin de intentar comprender las interacciones electrostáticas entre los liposomas y el DNA, las fuerzas entrópicas que gobiernan el proceso de agregación y las interacciones del complejo formado en los medios biológicos y las células.

Desde que el primer lípido catiónico (DOTMA) fue usado como vector de transfección,⁷⁷ se han trabajado con una gran variedad de CLs, tanto comerciales como de síntesis. Entre los lípidos más ampliamente estudiados se encuentran el DOTAP, DC-Chol, DOGS y el DOSPA (Figura 1.12). Sin embargo en la literatura se puede encontrar una gran cantidad de lípidos no comerciales con diferentes variaciones estructurales usados como vectores en terapia génica.^{21,80,115}

Los lípidos catiónicos que más se han estudiado pertenecen a uno de los siguientes grupos: lípidos monovalentes, divalentes, polivalentes, derivados de colesterol y lípidos de tipo géminis (Figura 1.12). Por otra parte, los grupos polares catiónicos más ampliamente usados son amonio, imidazol y

amina/poliaminas. De todos los trabajos realizados, se ha visto que en la mayoría de los casos, los sistemas multivalentes son más eficientes que los monovalentes en la transfección.

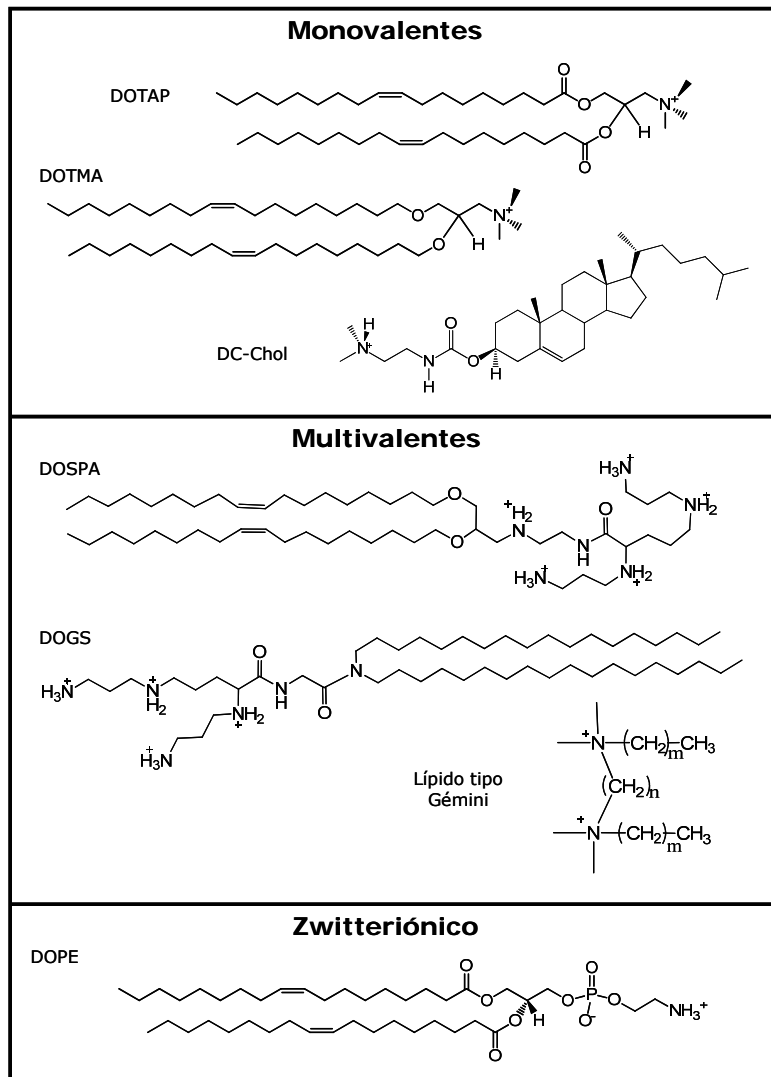


Figura 1.12. Estructuras de los distintos tipos de lípidos usados en la terapia génica.

Los **lípidos tipo gémini** (CGLs) han cobrado gran importancia en la lipofección,^{80,116-119} ya que varios estudios han encontrado que dichos sistemas mejoran los niveles de transfección en gran medida en comparación con los resultados obtenidos mediante la transfección con lípidos catiónicos convencionales. Estos compuestos están constituidos por dos grupos polares de diversa naturaleza, unidos cada uno a una o dos cadena hidrofóbica de longitud variable, y entre sí por una cadena espaciadora de tipo y longitud

variable.^{110,120} Una de las ventajas que presenta este tipo de lípidos es que no sólo es posible realizar modificaciones estructurales en los grupos polares y las cadenas hidrofóbicas, sino que también se puede modificar el grupo espaciador.^{116,121,122} Hasta ahora, se han llevado a cabo varios estudios con diferentes tipos de espaciadores, encontrando que, en efecto, el espaciador interviene de forma importante en el proceso de compactación y liberación del DNA. Los resultados obtenidos muestran que, en general, lípidos con espaciadores flexibles, cortos o hidrofílicos presentan mejores eficiencias de transfección que aquellos que presentan espaciadores rígidos, muy largos, o hidrofóbicos.¹²³⁻¹²⁶ Tanto estos lípidos como los multivalentes¹²⁷ (con más de dos cargas positivas), ofrecen la ventaja sobre los lípidos catiónicos (CLs) convencionales (una carga positiva - dos cadenas hidrofóbicas) de ofrecer una mayor densidad de carga positiva por cadena, y por lo tanto una potencial menor citotoxicidad. Es por ello que los GCLs han sido ampliamente estudiados durante la realización de esta tesis doctoral.

Aunque los lípidos catiónicos son capaces de compactar eficientemente el DNA, un gran número de estudios ha demostrado que los liposomas catiónicos puros, no favorecen la transfección y presentan niveles altos de citotoxicidad. Es así que la mayoría de los liposomas catiónicos utilizados en terapia génica están formados por la mezcla de un lípido catiónico y un lípido zwitteriónico o neutro que funciona como coadyudante.

Estos **lípidos zwitteriónicos** se caracterizan por presentar carga positiva y negativa en la misma molécula, siendo, por tanto, el pH del medio el que determina la carga neta global. Habitualmente, se utilizan mezclados en distintas proporciones con el lípido catiónico a un pH tal que su carga neta sea nula. Se les considera imprescindibles en la transfección ya que disminuyen la temperatura de transición gel-fluido, T_m , de las bicapas lipídicas, fluidificándolas y favoreciendo así la fusión con la membrana celular (carácter fusogénico) lo que provoca un aumento en los niveles de transfección.^{25,128-131} El lípido más usado como coadyudante es el 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE, Figura 1.12). Se sabe que el uso de DOPE reduce la citotoxicidad proveniente por el lípido catiónico,^{128,129} y ciertos estudios han

demostrado además, que este fosfolípido facilita la liberación de contraiones de la superficie lipídica por el acercamiento del DNA^{108,132-134} y disminuye la hidratación lipídica.^{134,135} Por otra parte se sabe que éste lípido induce la formación de fases hexagonales, de las que se hablará más adelante.

Sin embargo, a pesar de que los liposomas catiónicos mixtos (lípido catiónico + zwitteriónico) son eficientes vectores de transfección, presentan una serie de inconvenientes:

- a) Los niveles de transfección logrados son inferiores a los obtenidos mediante vectores virales.
- b) Presentan interacciones desfavorables con las proteínas de la sangre.
- c) No presentan especificidad a nivel celular.
- d) En ensayos *in vivo* presentan problemas de difusión en el organismo.

Debido a todas estas desventajas, otro planteamiento es el uso de vectores lipídicos aniónicos como una alternativa potencialmente plausible a la lipofección catiónica.

Vectores lipídicos aniónicos

El uso de vectores lipídicos aniónicos en terapia génica ha recibido mucha menos atención que los vectores lipídicos catiónicos. La carga negativa del grupo polar de los lípidos aniónicos (ALs) impide su asociación con el DNA debido a la fuerza electrostática repulsiva que existe entre los grupos fosfato del DNA y el grupo aniónico del lípido. Sin embargo, es posible mitigar este efecto por el uso de cationes divalentes que anulan las repulsiones electrostáticas y facilitan la formación del lipoplejo.¹¹¹ Debido a que los vectores lipídicos aniónicos están constituidos en su mayor parte por fosfolípidos que se encuentran naturalmente en las membranas celulares (fosfatidilglicerol y fosfatidilcolina), estos lipoplejos son biocompatibles y presentan bajos niveles de toxicidad. Además, la fagocitosis de los lipoplejos con potenciales de membrana negativos por macrófagos es menor que para los lipoplejos catiónicos, lo cual se debe a que la mayoría de las proteínas de reconocimiento celular en los medios biológicos están cargadas negativamente,

por lo cual las interacciones electrostáticas no son favorables.¹³⁶ Todos estos factores hacen pensar que podrían ser una buena plataforma para la terapia génica en ciertas condiciones.

Como se mencionó anteriormente, el uso de cationes divalentes es crucial para la formación de los lipoplejos con liposomas aniónicos. Los cationes usados en la bibliografía incluyen: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} .^{136,137} De todos ellos, el calcio ha demostrado ser el mejor, ya que además de compactar de manera más eficiente al DNA a los liposomas aniónicos,^{137,138} también promueve la entrada de los lipoplejos al interior de las células.¹¹¹

En general, los pocos estudios existentes indican que los liposomas aniónicos presentan resultados de transfección moderados. Al igual que para los liposomas catiónicos, el uso de lípido coadyudante DOPE ha demostrado aumentar las eficiencias de transfección en los liposomas aniónicos. Sin embargo, los resultados de transfección obtenidos hasta el momento con este tipo de sistemas no han logrado superar los valores encontrados en algunos sistemas catiónicos.

Vectores lipídicos con macrociclos en su estructura

Uno de los principales problemas asociados a los vectores lipídicos presentados en la sección anterior es el poco control que se tiene sobre las estructuras multilamelares y hexagonales que se forman cuando el liposoma interactúa con el DNA, y sobre sus tamaños y polidispersidades.^{79,139,140} Parte de estos problemas podrían resolverse con el diseño de nuevos agentes químicos que presenten estructuras bien definidas, que controlen su agregación en presencia de DNA y que se mantengan estables en medios biológicos. El desarrollo de la nanotecnología y de la química supramolecular ha dado como resultado la posibilidad de obtener sistemas con alto grado de organización supramolecular. Entre los compuestos que presentan estas características, los macrociclos como los fullerenos, ciclodextrinas, calixarenos y pilararenos son particularmente prometedores ya que son capaces de presentar una tipología 3D muy bien definida. Sin embargo, el verdadero potencial de este tipo de vector en terapia génica surge de la posibilidad de ser selectivamente

funcionalizados. De hecho, se han sintetizado en los últimos años una serie importante de vectores biocompatibles basados en macrociclos, en los que sus capacidades como agentes de transfección han sido moduladas de acuerdo a un plan previamente diseñado. Todos estos sistemas tienen en común una característica muy interesante para nuestros objetivos, su anfifilicidad facial, es decir el hecho de presentar dos caras con características diferentes y funcionalizables. De esta forma, este tipo de macrociclos surgen de la incorporación secuencial y controlada de diferentes entidades tipo policatiónico en uno de los lados de la molécula y de tipo lipídico en el otro lado, lo que les confiere la marcada anfifilicidad facial antes comentada.

El vector resultante tenderá a autoagregarse en medios polares como el fisiológico y presentará, en principio, buenas aptitudes para biomimetizarse con la membrana celular y atravesarla, dos características muy adecuadas para poder ser un buen vector génico. Son, por tanto, vectores multivalentes (varias cargas positivas), que aúnan las capacidades de los conocidos lípidos catiónicos, por un lado, y de los polímeros catiónicos, por otro.

Los primeros ejemplos de macrociclos usados como vectores no virales fueron propuestos por el grupo de Aoyama y Ungaro quienes usaron calix[4]resorciarenos y calix[4]arenos, respectivamente.^{141,142} Desde entonces, se han usado varios tipos de macrociclos con este propósito. Los fulerenos forman complejos estables con DNA, aunque con un tamaño relativamente grande, lo que dificulta su internalización en las células, y con elevados niveles de toxicidad.⁹¹ Otro de los macrociclos comúnmente utilizados son las ciclodextrinas, las cuales forman complejos estables con DNA con tamaños de entre 40-47 nm, exhiben niveles significativos de transfección en ensayos *in vitro* y con bajos niveles de toxicidad.⁹¹ Sin embargo, las modificaciones químicas regioselectivas en las ciclodextrinas son complicadas, lo que las hace productos bastante costosos.

Los **calixarenos** son compuestos que han despertado gran interés en su utilización como vectores de transfección en terapia génica debido a sus características. Un calixareno es un macrociclo basado en un producto de

hidroquilación entre un fenol y un aldehído. La palabra calixareno deriva de la palabra "caliz", ya que es la forma estructural a la que se asemeja esta molécula (Figura 1.13).^{91,143} Los calixarenos como ya se ha comentado, pueden presentar diferentes grupos funcionales tanto en los bordes superiores como inferiores del macrociclo, lo que permite que sean sistemas muy versátiles y con un amplio número de opciones de preparación. Al igual que los lípidos, los calixarenos pueden ser moléculas anfifílicas, lo que les permite generar agregados en disolución. Tanto la capacidad de formar estructuras supramoleculares, como la posibilidad de tener cabezas polares cargadas positivamente en uno de los bordes les hacen candidatos adecuados para la compactación de DNA.^{142,144,145} A partir de los estudios realizados por el grupo de Aoyama sobre la interacción de los calixarenos con DNA,¹⁴⁶ se han llevado a cabo una serie de trabajos basados en este tipo de molécula, como vectores de transfección.^{145,147-151} Estos estudios han permitido sentar algunas bases sobre la manera de obtener mejores resultados de transfección. A nivel estructural, se ha visto que las mejores eficiencias de transfección se obtienen con calixarenos que presentan cadenas de 6 a 8 átomos de carbono en el borde inferior y cabezas de guanidinio en el borde superior. Por otra parte, el uso de lípido coadyudante DOPE ha mejorado sustancialmente los niveles de transfección.¹⁵² Cabe destacar que se han obtenido resultados muy prometedores en líneas celulares de interés médico que presentan serias dificultades para ser transfectadas con los métodos habituales, tal es el caso de los resultados obtenidos por el grupo de Ungaro para células RD-4.¹⁴⁸ Los calixarenos, además, presentan niveles moderados de citotoxicidad celular, muy similares a los resultados que se obtienen con los lípidos catiónicos. De esta forma, los calixarenos catiónicos son capaces de compactar y transfectar adecuadamente el DNA. Sin embargo, son sistemas que aún presentan un gran potencial de desarrollo, ya que, a pesar de que los primeros trabajos se realizaron hace poco más de 10 años, la cantidad de investigaciones sobre el tema sigue siendo muy limitada.

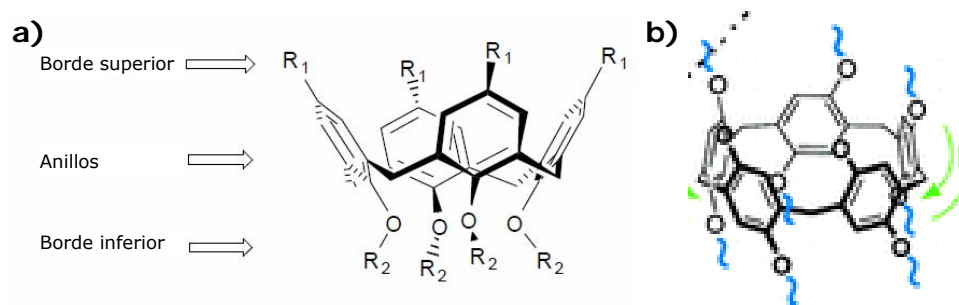


Figura 1.13. Estructuras moleculares a) calixarenos; b) pilararenos.

Por otro lado, un nuevo tipo de macrociclos recientemente descubiertos son los **pilararenos**, los cuales están formados por subunidades de hidroquinonas unidas por metilenos en sus posiciones 2 y 5 (Figura 1.13). A diferencia de otros macrociclos que presentan forma de cono, los pilararenos adoptan una forma tubular.¹⁵³ Actualmente, estos compuestos se están usando en diferentes aplicaciones químicas y biológicas.¹⁵⁴⁻¹⁵⁸ Un estudio muy reciente ha demostrado la capacidad de los pilararenos para compactar y transfectar el plásmido pCMV-Luc en células HeLa.¹⁵³ Aunque no está muy claro las propiedades que pueden presentar estos compuestos a nivel biológico, es una nueva línea de vectores supramoleculares que debe estudiarse con más detenimiento.

1.2.2.2 Complejos vector lípidico-DNA: Lipoplejos

La información de que se dispone en la literatura acerca del fenómeno de compactación lipídica del DNA pone de manifiesto que la formación de los lipoplejos constituye un fenómeno de origen tanto termodinámico como cinético que da lugar a una gran distribución de formas y tamaños. Se trata de una interacción esencialmente electrostática pero entrópicamente dirigida, es decir, el incremento entrópico originado por la liberación de restricciones por ambas especies es la fuerza conductora de la asociación DNA-liposoma (condensación de Manning).¹⁵⁹ Así, la atracción electrostática entre ambos da como resultado un agregado mesoscópico cuya estabilidad y cinética de agregación dependerán, entre otros parámetros, de la composición del liposoma, composición del lipoplejo, carga neta del mismo, fuerza iónica del medio, etc.

En el caso del DNA, parte de sus cargas negativas (grupos fosfatos) se encuentran neutralizadas por contraiones, de modo que cuando se añaden sistemas catiónicos, sus grupos cargados positivamente tienden a neutralizar por completo la carga del DNA. Para ello, los lípidos catiónicos de los liposomas no sólo neutralizan los grupos fosfatos del DNA que quedaban libres sino que además reemplazan a una parte de los contraiones que inicialmente neutralizaban la mayor parte de la carga del DNA. Paralelamente, los contraiones de los lípidos de los liposomas también son reemplazados por las cargas del DNA de manera que la expulsión de los respectivos contraiones son los que dan origen a la formación del lipoplejo resultante.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Por el contrario, cuando el lípido es zwitteriónico o aniónico, el mecanismo de formación y estabilidad del lipoplejo es un proceso más complejo que implica el uso de cationes multivalentes que hagan de puente entre el liposoma y el DNA. Estos contraiones de carga positiva se hallan inicialmente próximos a las cargas de los fosfolípidos y a los grupos cargados del DNA de modo que para que el complejo se pueda formar, es necesario que el sistema experimente un proceso de inversión de carga, ya sea del liposoma o del DNA. Este fenómeno, también conocido como *efecto de sobrecarga*, consiste en la capacidad de un coloide cargado de atraer contraiones hasta el punto de que la carga neta del sistema sea de signo contrario a la que el coloide poseía originalmente. En la actualidad, aunque existe aún mucha controversia acerca del mecanismo de inversión de carga, sus aplicaciones biomédicas son cada vez más frecuentes.

Por consiguiente, es crucial analizar y comprender el balance de cargas y la interacción electrostática que dan origen a la formación del lipoplejo. La caracterización electroquímica de los lipoplejos constituye, de hecho, el punto de arranque sobre el que se asienta el conjunto de estudios, no solo los biofísicos, sino también los estudios bioquímicos. Como se ha mencionado anteriormente, en la formación del lipoplejo se produce un balance entre las cargas positivas del lípido catiónico y las negativas del DNA, y por ello, las propiedades electroquímicas, como la movilidad electroforética y las propiedades que de ella derivan, el potencial zeta, ζ , o la densidad de carga

superficial, σ_c , son las que pueden aportar la información más completa del citado proceso.

Se sabe que la composición tanto del liposoma catiónico como del lipoplejo son factores que tienen una gran influencia en su comportamiento, características y estructura, y, por consiguiente, son determinantes en sus prestaciones finales como vectores génicos. La composición del liposoma se expresa normalmente en términos de su fracción molar, α , mientras que para la composición del lipoplejo se suelen utilizar en la bibliografía dos parámetros adimensionales, la relación de masas (L/D) o su relación de cargas efectivas, ρ_{eff} , que nos informa del cociente entre las cargas positivas efectivas aportadas por el vector lipídico catiónico y las cargas negativas efectivas aportadas por los grupos fosfato del DNA. Estas magnitudes están relacionadas a través de las siguientes ecuaciones:

$$\frac{L}{D} = \frac{L^+ + L^0}{D} \quad (1.4)$$

$$\alpha = \frac{L^+/M_{L^+}}{L^+/M_{L^+} + L^0/M_{L^0}} \quad (1.5)$$

$$\rho = \frac{n^+}{n^-} = \frac{q_{L^+}^+ L^+ / M_{L^+}}{q_{\text{DNA}}^- D / \bar{M}_{\text{bp}}} \quad (1.6)$$

en las que L^+ y L^0 son las masas de lípido catiónico y lípido neutro, respectivamente ($L = L^+ + L^0$, siendo L la masa total de lípido); D es la masa de DNA; M_{L^+} y M_{L^0} son sus masas molares; n^+ y n^- son el número de moles de cargas positivas y negativas; $q_{L^+}^+$ y q_{DNA}^- son las cargas de lípido catiónico y DNA (por par de bases, en adelante bp); y \bar{M}_{bp} es la masa molar promedio de DNA por bp.

Por definición, la composición del lipoplejo para la que el número de cargas positivas aportadas por el lípido catiónico es igual al número de cargas

negativas aportadas por los grupos fosfato del DNA ($\rho = 1$) se conoce como **relación de electroneutralidad**, $(L/D)_{\phi}$, y es característica de cada sistema. Conocer la composición del complejo para la cual se da la electroneutralidad es importante porque para composiciones mayores, i.e. $\rho > 1$ y/o $(L/D) > (L/D)_{\phi}$, los lipoplejos no sólo protegen el DNA sino que facilitan su transfección a las células. Lipoplejos que presentan una carga superficial neta positiva pueden interaccionar de manera más eficiente con la membrana celular, cargada negativamente. Por tanto, a partir de esta composición, los lipoplejos se convierten en vectores génicos potencialmente aceptables, por lo que la composición de electroneutralidad marca un límite inferior de composiciones a considerar en los siguientes estudios.

Esta relación puede ser determinada experimentalmente, predicha teóricamente, o estimada a partir de la siguiente ecuación, que resulta de combinar las ecuaciones 1.4-1.6:

$$\left(\frac{L}{D}\right)_{\phi} = \frac{q_{DNA}^{-} [\alpha M_{L^+} + (1-\alpha) M_{L^0}]}{q_{L^+} \alpha M_{bp}} \quad (1.7)$$

Respecto a la carga que presenta el DNA, q_{DNA}^{-} , existen diversos trabajos publicados en la bibliografía por distintos grupos de investigación, incluido el nuestro, que han confirmado que el DNA lineal, como el del timo de ternera (ctDNA) o el del espermatozoide de salmón, ofrecen toda su carga negativa accesible al lípido catiónico, y por tanto, $q_{linearDNA}^{-} = -2$ (por bp). Sin embargo, experimentos recientes de nuestro grupo han demostrado que a pH fisiológico y dependiendo de la fuerza iónica, el plásmido pEGFP-C3, pDNA, permanece en una conformación superenrollada, de modo que ofrece una carga negativa menor que su carga nominal, es decir, $q_{pDNA}^{-} \ll -2$.^{125,126,161} Una evidencia experimental indiscutible de este hecho es que el valor experimental de $(L/D)_{\phi}$, es menor en presencia de pDNA que con el ctDNA para un mismo liposoma mixto, lo que significa que para alcanzar la electroneutralidad del lipoplejo (y por tanto para formar el lipoplejo con carga positiva) es necesaria una menor cantidad de liposoma mixto catiónico cuando éste compacta el pDNA. Esta

evidencia se ha observado en todos los sistemas estudiados hasta el momento.^{126,161}

Resulta evidente, por tanto, que cualquier estudio biofísico o bioquímico de lipoplejos debe empezar por la determinación de las cargas reales o efectivas de ambos compuestos, el lípido catiónico, $q_{L^+}^+$, y el plásmido, q_{pDNA}^- , cuando forman el lipoplejo, habida cuenta de que el lípido zwitteriónico, DOPE, siempre presente, presenta carga neta nula a pH fisiológico. Brevemente, el protocolo diseñado por nuestro grupo a este respecto consta de los siguientes pasos:

- i. determinación de la carga efectiva del lípido catiónico, $q_{L^+}^+$, para un cierto valor de la fracción molar, α , a partir de la ecuación 1.8 y haciendo uso del valor de $(L/D)_\phi$ determinado experimentalmente con el potencial zeta para el lipoplejo que se esté caracterizando, CL/DOPE-ctDNA (en el que $q_{linearDNA}^- = -2$). Los resultados obtenidos en los últimos años apuntan a que las cabezas polares de los lípidos catiónicos utilizados para preparar los lipoplejos poseen una carga efectiva que en algunos casos coincide con su carga nominal (+1 para los lípidos monovalentes CL y +2 para los divalentes, GCL), pero que en la mayoría de los casos de los lípidos tipo géminis la carga es ligeramente menor;

$$q_{L^+}^+ = \frac{q_{pDNA}^- \alpha M_{L^+} + (1 - \alpha) M_{L^0}}{(L/D)_\phi \alpha M_{bp}} \quad (1.8)$$

- ii. determinación de la carga efectiva del plásmido (por par de bases), q_{pDNA}^- , a partir del mismo tipo de medidas de potencial zeta, determinando $(L/D)_\phi$ del lipoplejo en las mismas condiciones experimentales, pero ahora utilizando el plásmido circular superenrollado, en vez del lineal ctDNA, y haciendo uso de la ecuación:

$$q_{pDNA}^- = \left(\frac{L}{D} \right)_\phi \left(\frac{q_{L^+}^+ \alpha \bar{M}_{bp}}{\alpha M_{L^+} + (1 - \alpha) M_{L^0}} \right) \quad (1.9)$$

Se ha encontrado que los valores de q_{pDNA}^- en una gran cantidad de lipoplejos y a varias fracciones molares del lípido catiónico en el liposoma mixto, α , es menor o incluso mucho menor que la nominal, -2 por par de bases, lo que ha puesto de manifiesto que DNAs lineales y plásmidos de DNA tienen comportamientos electroquímicos completamente diferentes, con importantes implicaciones en sus capacidades transfectoras y citotoxicidad finales. Los plásmidos, al adoptar conformaciones superenrolladas (sobre todo en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica), presentan una menor carga negativa efectiva que los DNAs lineales ($q_{linearDNA}^- = -2$ por par de bases) porque parte de los contraiones permanecen neutralizando los grupos fosfatos, sin ser desplazados por las cargas positivas de los lípidos. Por consiguiente, para una misma cantidad de DNA, la electroneutralidad y por tanto la carga neta positiva necesaria, se alcanzan con una menor cantidad de lípido catiónico, reduciendo así su citotoxicidad y alcanzando niveles de eficacia transfectora muy adecuados y superiores a los de los estándares habitualmente utilizados. Es por ello que una vez determinadas las cargas efectivas tanto del lípido como del DNA el siguiente paso debe ser la determinación de la relación molar de carga efectiva, ρ_{eff} , a partir de la ecuación 1.6.

Quizás una de las aportaciones más relevantes de nuestro grupo de investigación al avance en este campo haya sido, precisamente, concienciar a la comunidad científica de la necesidad de: i) trabajar siempre con cargas efectivas, habida cuenta de que son diferentes a las nominales; y ii) de llevar a cabo los estudios biofísicos y los ensayos bioquímicos con el mismo DNA, es decir, el estudio biofísico se debe realizar con el plásmido pDNA con el que luego se va a transfectar las células, habida cuenta de que su comportamiento electroquímico es tan diferente al del ctDNA (tradicionalmente usado en las caracterizaciones biofísicas en la literatura).

Por otra parte, cuando se forma el lipoplejo, éste tiende a organizarse en diferentes fases de cristal líquido liótroico documentadas ampliamente en la literatura. En una primera etapa, los segmentos de DNA cubren la superficie de los liposomas catiónicos por la acción de una fuerte interacción electrostática

entrópicamente dirigida, como se ha comentado previamente. En una segunda etapa, las bicapas de fosfolípidos de los liposomas se rompen y se reorganizan originando distintas fases de cristal líquido liotrópico, que aparecen esquematizadas en la Figura 1.14:

- a) Fase hexagonal inversa, H_{II}^c
- b) Fase lamelar, L_α y
- c) Fase cúbica bicontinua (o giroidal), V_I

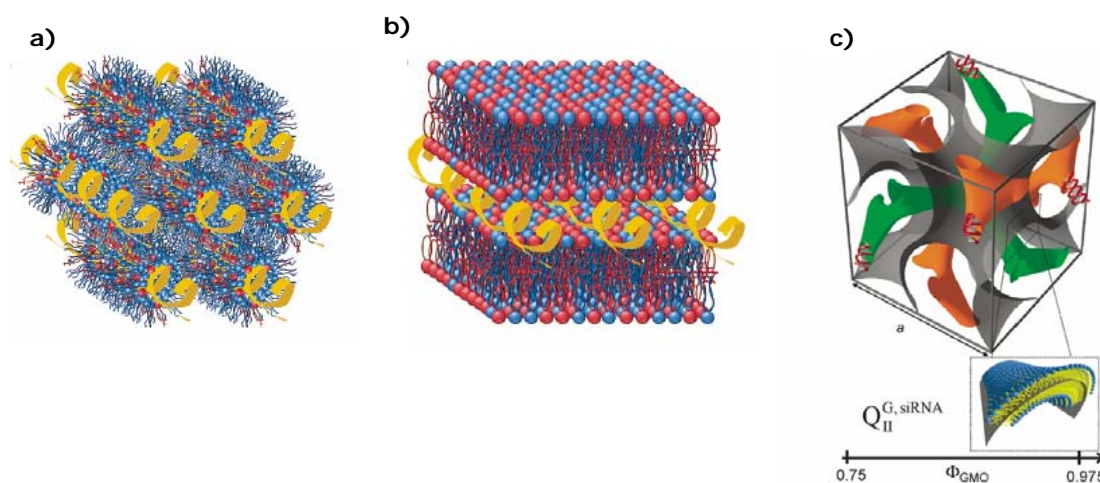


Figura 1.14. Estructuras más aceptadas de los lipoplejos. a) DNA en el interior acuoso de micelas cilíndricas inversas (fase hexagonal inversa, H_{II}^c). b) DNA intercalado entre bicapas paralelas de fosfolípidos (fase lamelar, L_α). c) siRNA intercalado entre bicapas lipídicas formando una fase cúbica de doble giro (Ia3d). (Fuente: C. Leal, N. F. Boussein, K. K. Ewert, and C. R. Safinya, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 16841) ¹⁶²

La Figura 1.14 presenta un esquema de las tres estructuras habitualmente encontradas en estos sistemas. Como puede verse claramente en la figura, la fase L_α se caracteriza por bicapas lipídicas en disposición de multicapa, separadas entre sí por una monocapa acuosa donde se compacta en disposición tipo *sandwich* las dobles hélices de ctDNA o los plásmidos pDNA superenrollados. En cambio, a fase H_{II}^c se caracteriza por ser una fase inversa (o reversa) en la que la mezcla de lípidos (catiónico/neutro) se auto-organizan en forma de micelas cilíndricas inversas en empaquetamiento hexagonal. Al ser una fase inversa, las cabezas polares catiónicas de los lípidos están dirigidas hacia el interior de los cilindros; por consiguiente, el DNA cargado

negativamente se aloja en el interior de dichos cilindros. Por último, la fase cúbica bicontinua V_I es una fase de cristal líquido liotrópico no convencional, en el sentido de que los lípidos se autoagregan formando canales lipídicos continuos con las cabezas catiónicas dispuestas también hacia el interior, que, por tanto será donde se sitúe el biopolímero.

La naturaleza del lípido coadyuvante, y su estructura, a través del parámetro de empaquetamiento de Israelachvili, parecen tener una influencia decisiva en el tipo de fase que presente el lipoplejo resultante; así, se ha encontrado que los fosfolípidos de la familia de las fosfatidiletanolaminas (como el DOPE) favorecen las fases hexagonales, mientras que los de la familia de las fosfatidilcolinas (DOPC) favorecen las fases lamelares y los derivados del monooleoil glicerol (MOG) favorecen las fases cúbicas. Los estudios bioquímicos de la literatura apuntan a que la eficiencia en la transfección celular sigue el orden:

Fase Cúbica > Fase Hexagonal > Fase Lamelar

Como los lipoplejos, tanto los ya estudiados como los propuestos en esta tesis, están siempre constituidos por lípidos de diversa naturaleza, y el lípido coadyuvante DOPE, se podrá encontrar un amplio abanico de estructuras en función de la proporción de lípido coadyuvante presente en el sistema, incluso la coexistencia de fases de cristal líquido en una misma muestra, hecho que normalmente está correlacionado con una mayor eficiencia en la transfección, en un claro efecto sinérgico.

Esta correlación estructura-actividad biológica es de gran interés, por lo que resulta muy conveniente conocer la estructura de los lipoplejos que posteriormente se van a ensayar en distintas líneas celulares. De esta forma, se podrá avanzar en el conocimiento de esta correlación, llegando incluso a poder predecir el comportamiento de un determinado vector a partir de su estudio estructural.

1.3. Métodos de caracterización

La búsqueda de sistemas óptimos para terapia génica, se basa en el entendimiento de los procesos que gobiernan la transfección, así como en el diseño racional de los compuestos usados para dicho fin. Hasta ahora, se ha ido hablando de los diferentes sistemas que pueden ser usados como vectores potenciales en terapia génica. Ahora bien, el lograr encontrar un vector ideal en la terapia génica, parte del hecho de comprender sus propiedades biofísicas y bioquímicas, por lo que la caracterización de los vectores lipídicos es una parte fundamental en los procesos de transfección. Este apartado presenta algunos de los métodos de caracterización más utilizados en la bibliografía, mientras que en la sección experimental de esta memoria se describen brevemente aquellos que han sido utilizados en esta tesis doctoral.

1.3.1 Métodos de caracterización de los vectores lipídicos

El estudio de los vectores no virales requiere una amplia caracterización tanto biofísica como bioquímica. Se ha desarrollado una serie de metodologías y el uso de diversas técnicas experimentales para poder determinar las características que intervienen en los procesos de transfección. En la caracterización biofísica, destaca el uso de las más variadas técnicas experimentales de alta precisión como potencial zeta, ζ , dispersión de luz polarizada (DLS), diferentes tipos de microscopias (microscopia de transmisión electrónica (TEM) y crio-microscopia de transmisión electrónica (crio-TEM), microscopia electrónica de crio-fractura, microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopia confocal de fluorescencia (CFM)), técnicas espectroscópicas (espectroscopia de fluorescencia, espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)), dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), conductimetría, tensión superficial, calorimetría de barrido diferencial (DSC), etc., por mencionar sólo las más representativas.^{139,159,163-174} Por otro lado, encontramos los métodos de simulación *in silico* (*coarse graining* ya sea por dinámica molecular o montecarlo)¹⁷⁵ y/o modelos semiempíricos y/o teóricos^{176,177} (modelo de *agregación-desagregación* o de *condensación y condensación reentrante*, teoría de la renormalización de cargas, etc.).^{168,178-180}

En referencia al estudio de la interacción y los efectos sobre los sistemas biológicos, la caracterización bioquímica actualmente se basa en las medidas de los resultados de transfección y estudios de viabilidad celular usando diferentes técnicas de biología celular. Para evaluar la eficiencia en la transfección del vector coloidal, es decir, su capacidad para compactar el DNA, transportarlo al interior celular y liberarlo en el citoplasma, para su posterior entrada y expresión en el núcleo celular, se usan principalmente las técnicas de citometría de flujo (FACS), espectrofotometría, FRET, fotometría y microscopía de fluorescencia y confocal de fluorescencia, ^{116,159,160,181-189}. Para evaluar la citotoxicidad y la actividad inmune del vector y del complejo formado con DNA, así como el comportamiento de las células y de los vectores en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se usan diversas técnicas de biología celular (expresión génica, medidas de actividades enzimáticas, etc.), siendo el más usado el ensayo de MTT empleando técnicas espectrofotométricas. ^{25,27,130,190-197}

1.3.2 Métodos de caracterización de la corona de proteínas

Como se menciona en el apartado 1.2, las barreras fisiológicas son una de las causas fundamentales del éxito o del fracaso en la transfección. El entender las interacciones de los vectores coloidales con los fluidos biológicos es la clave para lograr aplicaciones eficientes y seguras. El reclamo científico de comprender más sobre los fenómenos que ocurren a nivel fisiológico cuando un vector es introducido en un fluido biológico, abre un abanico de posibilidades por explorar. Una de estas vías es la investigación de la corona de proteínas formada en la superficie de los vectores coloidales. Como se ha dicho anteriormente, la corona de proteínas es la principal identidad biológica que reconoce la célula. ^{29,31,34,37,38,45,50,51,198} De esta forma, el estudio de la corona de proteínas ha cobrado gran importancia en los últimos años. ^{199,200} Para ello, se han usado diversas técnicas que permiten determinar las proteínas que se unen al vector en presencia de los fluidos biológicos, en las que destaca, DLS, potencial zeta, FTIR, dicroísmo circular (CD), calorimetría isotérmica de valoración (ITC), resonancia plasmónica de superficie (SPR), espectrometría de masas, cromatografía de exclusión, nanocromatografía de líquidos acoplada a

espectroscopia de masas (NanoLC-MS/MS), geles de poliacrilamida SDS-PAGE, microscopia confocal y citometría de flujo. De tal manera, que es posible obtener una correlación entre las proteínas que conforman la corona de proteínas y su interacción con las células y subsecuente captación celular.^{16,141,157-161,}

Debido a la gran cantidad de procesos que intervienen en terapia génica, la comprensión de la forma en la que se lleva a cabo la transfección y de las variables más importantes involucradas es un gran reto que requiere el esfuerzo conjunto tanto de químicos, físicos, biólogos y médicos. La conducción de los diseños experimentales debe tener las bases suficientes para lograr el éxito en la terapia génica teniendo una comprensión clara de los que ocurre en cada etapa del proceso.

La problemática del diseño de los vectores no virales debe estudiarse bajo el cuádruple planteamiento coordinado de:

- a) Síntesis de compuestos biocompatibles, que mejoren las prestaciones de los comerciales.
- b) Caracterización biofísica de los complejos formados por el vector supramolecular y el DNA bajo las mismas condiciones en las que se realicen los experimentos de transfección.
- c) Evaluación bioquímica de los lipoplejos caracterizados, analizando finalmente su capacidad de transfección celular y su citotoxicidad.
- d) Evaluación de la adsorción de proteínas en los vectores coloidales para la formación de la corona de proteínas, para entender las interacciones con los medios biológicos y los procesos de captación celular.

Esta tesis abarca el estudio de vectores no virales bajo este cuádruple enfoque. Así, se ha trabajado tanto con lípidos comerciales y DNA lineal de doble hebra comercial, como con vectores lipídicos de diseño (lípidos géminis catiónicos y aniónicos y vectores lipídicos basados en macrociclos tipo calixareno y pilarareno) y el plásmido pEGFP-C3 (el cual codifica para la

proteína verde fluorescente). Se han caracterizado los lipoplejos formados con diversas técnicas experimentales y modelos teóricos, desde un punto de vista electroquímico y estructural. Finalmente, se ha analizado la potencialidad de los sistemas usados como vectores génicos de DNA mediante su inserción en células *in vitro* (estudiando su eficiencia de transfección y su citotoxicidad). Por otra parte, se ha realizado una primera aproximación al estudio de los procesos que los vectores no virales sufren en un sistema biológico complejo; de esta forma, se ha hecho la caracterización, mediante técnicas de espectrometría de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, de la corona de proteínas formada por la acción de un liposoma catiónico mixto en presencia de suero humano, y su carácter dinámico en función del tiempo. Todo este trabajo representa un avance en la ciencia de la terapia génica, tanto en la comprensión del diseño racional de vectores, como en la comprensión de las interacciones vector:DNA y su posterior comportamiento en presencia de fluidos biológicos.

1.4 Bibliografía

- 1 D. D. Lasic, *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997.
- 2 N. Somia and I. M. Verma, *Nat Rev Genet*, 2000, **1**, 91-99.
- 3 T. Friedmann, *Nat Genet*, 1992, **2**, 93-98.
- 4 R. M. Blaese, K. W. Culver, A. D. Miller, C. S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, J. J. Greenblatt, S. A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C. A. Mullen, W. J. Ramsey, L. Muul, R. A. Morgan and W. F. Anderson, *Science*, 1995, **270**, 475-480.
- 5 N. S. Templeton, *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2009.
- 6 T. J. o. G. Medicine, Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
- 7 C. Uherek and W. Wels, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2000, **44**, 153-166.
- 8 R. A. Stull and F. C. Szoka, Jr., *Pharm Res*, 1995, **12**, 465-483.
- 9 Y. Dorsett and T. Tuschl, *Nature reviews. Drug discovery*, 2004, **3**, 318-329.
- 10 R. R. S. P. Saraswat, A. Bhandari, and B. P. Nagori, *Indian J Pharm Sci.*, 2009, **71**, 488-498.
- 11 S. Akhtar, M. D. Hughes, A. Khan, M. Bibby, M. Hussain, Q. Nawaz, J. Double and P. Sayyed, *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, **44**, 3-21.
- 12 S. D. Jayasena, *Clinical chemistry*, 1999, **45**, 1628-1650.
- 13 S. D. Patil, D. G. Rhodes and D. J. Burgess, *AAPS Journal*, 2005, **7**, E61-77.
- 14 S. M. Selkirk, *Postgraduate medical journal*, 2004, **80**, 560-570.
- 15 J. Zabner, A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger and M. J. Welsh, *The Journal of biological chemistry*, 1995, **270**, 18997-19007.
- 16 C. H. Jones, C. K. Chen, A. Ravikrishnan, S. Rane and B. A. Pfeifer, *Molec. Pharm.*, 2013, **10**, 4082-4098.
- 17 L. Xu and T. Anchordoquy, *J Pharm Sci*, 2011, **100**, 38-52.
- 18 R. J. Boado and W. M. Pardridge, *Bioconjug Chem*, 1992, **3**, 519-523.
- 19 S. Mehier-Humbert and R. H. Guy, *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57**, 733-753.
- 20 M. S. Al-Dosari and X. Gao, *The AAPS journal*, 2009, **11**, 671-681.
- 21 M. Donkuru, I. Badea, S. Wettig, R. Verrall, M. Elsabahy and M. Foldvari, *Nanomedicine*, 2010, **5**, 1103-1127.
- 22 J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn and D. Hoekstra, *The Biochemical journal*, 2004, **377**, 159-169.
- 23 A. Elouahabi and J. M. Ruysschaert, *Mol Ther*, 2005, **11**, 336-347.
- 24 J. A. Mindell, *Annual review of physiology*, 2012, **74**, 69-86.
- 25 S. W. Hui, M. Langner, Y.-L. Zhao, P. Ross, E. Hurley and K. Chan, *Biophys. J.*, 1996, **71**, 590-599.
- 26 X. H. Zhou and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, 1994, **1189**, 195-203.
- 27 P. R. Clark and E. M. Hersh, *Curr. Opin. Molec. Therapeutics*, 1999, **1**, 158-176.
- 28 C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili and W. C. Chan, *J Am Chem Soc*, 2012, **134**, 2139-2147.
- 29 I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse and K. A. Dawson, *Adv Colloid Interface Sci*, 2007, **134-135**, 167-174.
- 30 I. Lynch and K. A. Dawson, *Nano Today*, 2008, **3**, 40-47.
- 31 I. Lynch, A. Salvati and K. A. Dawson, *Nature nanotechnology*, 2009, **4**, 546-547.
- 32 M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggard, M. B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia and K. Dawson, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7503-7509.
- 33 M. P. Monopoli, F. B. Bombelli and K. A. Dawson, *Nature nanotechnology*, 2011, **6**, 11-12.
- 34 M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati and K. A. Dawson, *Nature nanotechnology*, 2012, **7**, 779-786.
- 35 M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. H. Yahia and M. Mahmoudi, in *Protein-Nanoparticle Interactions*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 21-44.
- 36 G. Caracciolo, L. Callipo, S. C. De Sanctis, C. Cavaliere, D. Pozzi and A. Lagana, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 536-543.
- 37 T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggard, S. C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse and K. A. Dawson, *Angewandte Chemie*, 2007, **46**, 5754-5756.

- 38 P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia and S. E. McNeil, *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**, 428-437.
- 39 A. J. Bradley, D. V. Devine, S. M. Ansell, J. Janzen and D. E. Brooks, *Arch Biochem Biophys*, 1998, **357**, 185-194.
- 40 T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson and S. Linse, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**, 2050-2055.
- 41 Z. J. Deng, G. Mortimer, T. Schiller, A. Musumeci, D. Martin and R. F. Minchin, *Nanotechnology*, 2009, **20**, 455101.
- 42 M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri, J. Zheng, J. D. Clogston, N. Ayub, P. Aggarwal, B. W. Neun, J. B. Hall and S. E. McNeil, *Nanomedicine*, 2009, **5**, 106-117.
- 43 M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall and K. A. Dawson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**, 14265-14270.
- 44 M. Mahmoudi, I. Lynch, M. R. Ejtehadi, M. P. Monopoli, F. B. Bombelli and S. Laurent, *Chem Rev*, 2011, **111**, 5610-5637.
- 45 N. Oku, Y. Tokudome, Y. Namba, N. Saito, M. Endo, Y. Hasegawa, M. Kawai, H. Tsukada and S. Okada, *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1280**, 149-154.
- 46 S. Lindman, I. Lynch, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson and S. Linse, *Nano Lett*, 2007, **7**, 914-920.
- 47 M. De, C. C. You, S. Srivastava and V. M. Rotello, *J Am Chem Soc*, 2007, **129**, 10747-10753.
- 48 P. R. Cullis, A. Chonn and S. C. Semple, *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, **32**, 3-17.
- 49 S. M. Moghimi and H. M. Patel, *FEBS Lett*, 1988, **233**, 143-147.
- 50 M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. B. Bombelli and K. A. Dawson, *J Am Chem Soc*, 2011, **133**, 2525-2534.
- 51 D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch and K. A. Dawson, *J Am Chem Soc*, 2010, **132**, 5761-5768.
- 52 C. D. Walkey and W. C. Chan, *Chem Soc Rev*, 2012, **41**, 2780-2799.
- 53 F. Darabi Sahneh, C. Scoglio and J. Riviere, *PLoS One*, 2013, **8**, e64690.
- 54 L. Vroman, A. L. Adams, G. C. Fischer and P. C. Munoz, *Blood*, 1980, **55**, 156-159.
- 55 T. M. Goppert and R. H. Muller, *J Drug Target*, 2005, **13**, 179-187.
- 56 P. Opanasopit, M. Nishikawa and M. Hashida, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2002, **19**, 191-233.
- 57 T. M. Goppert and R. H. Muller, *Int J Pharm*, 2005, **302**, 172-186.
- 58 M. A. Kay, J. C. Glorioso and L. Naldini, *Nature medicine*, 2001, **7**, 33-40.
- 59 H. Buning, L. Perabo, O. Coutelle, S. Quadt-Humme and M. Hallek, *The journal of gene medicine*, 2008, **10**, 717-733.
- 60 Z. S. Guo, S. H. Thorne and D. L. Bartlett, *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1785**, 217-231.
- 61 F. Kreppel and S. Kochanek, *Mol Ther*, 2008, **16**, 16-29.
- 62 S. McTaggart and M. Al-Rubeai, *Biotechnology advances*, 2002, **20**, 1-31.
- 63 P. D. Robbins and S. C. Ghivizzani, *Pharmacology & Therapeutics*, 1998, **80**, 35-47.
- 64 A. E. a. M. A. K. Clare E. Thomas, *Nature Reviews Genetics*, 2003, **4**, 346-358.
- 65 S. L. Ginn, I. E. Alexander, M. L. Edelstein, M. R. Abedi and J. Wixon, *The journal of gene medicine*, 2013, **15**, 65-77.
- 66 F. Zhao, J. Tian, L. An and K. Yang, *Journal of neuro-oncology*, 2014.
- 67 F. Touzot, S. Hacein-Bey-Abina, A. Fischer and M. Cavazzana, *Expert opinion on biological therapy*, 2014, **14**, 789-798.
- 68 D. S. Ojala, D. P. Amara and D. V. Schaffer, *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 2014.
- 69 D. Majhen, H. Calderon, N. Chandra, C. A. Fajardo, A. Rajan, R. Alemany and J. Custers, *Human gene therapy*, 2014, **25**, 301-317.
- 70 V. S. Lopes, T. Diemer and D. S. Williams, *Advances in experimental medicine and biology*, 2014, **801**, 725-731.
- 71 Z. Han, S. M. Conley and M. I. Naash, *Advances in experimental medicine and biology*, 2014, **801**, 719-724.
- 72 S. Nayak and R. W. Herzog, *Gene Ther*, 2010, **17**, 295-304.
- 73 H. Sakurai, K. Kawabata, F. Sakurai, S. Nakagawa and H. Mizuguchi, *Int J Pharm*, 2008, **354**, 9-15.
- 74 B. E. Jaski, M. L. Jessup, D. M. Mancini, T. P. Cappola, D. F. Pauly, B. Greenberg, K. Borow, H. Dittrich, K. M. Zsebo, R. J. Hajjar and I. Calcium Up-Regulation by Percutaneous

- Administration of Gene Therapy In Cardiac Disease Trial, *Journal of cardiac failure*, 2009, **15**, 171-181.
- 75 S. Pearson, H. Jia and K. Kandachi, *Nat Biotech*, 2004, **22**, 3-4.
- 76 K. Garber, *Journal of the National Cancer Institute*, 2006, **98**, 298-300.
- 77 J. H. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, **84**, 7413-7417.
- 78 P. L. Felgner, *Scientific American*, 1997, **276**, 102-106.
- 79 R. Rodik, A. Klymchenko, Y. Mely and V. Kalchenko, *J. Incl. Phenom. Macrocyc. Chem.*, 2014, 1-12.
- 80 S. Bhattacharya and A. Bajaj, *Chem. Commun.*, 2009, 4632-4656.
- 81 A. Masotti, G. Mossa, C. Cametti, G. Ortaggi, A. Bianco, N. Del Grosso, D. Malizia and C. Esposito, *Colloids Surf. B*, 2009, **68**, 136-144.
- 82 L. Wasungu and D. Hoekstra, *J. Control. Rel.*, 2006, **116**, 255-264.
- 83 W. J. Yi, X. C. Yu, B. Wang, J. Zhang, Q. Y. Yu, X. D. Zhou and X. Q. Yu, *Chem Commun (Camb)*, 2014.
- 84 B. Maury, C. Goncalves, G. Tresset, M. Zeghal, H. Cheradame, P. Guegan, C. Pichon and P. Midoux, *Biomaterials*, 2014, **35**, 5977-5985.
- 85 M. Imamura, Y. Kodama, N. Higuchi, K. Kanda, H. Nakagawa, T. Muro, T. Nakamura, T. Kitahara and H. Sasaki, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2014, **37**, 552-559.
- 86 D. Ibraheem, A. Elaissari and H. Fessi, *Int J Pharm*, 2014, **459**, 70-83.
- 87 S. Huang, H. Deshmukh, K. K. Rajagopalan and S. Wang, *Electrophoresis*, 2014.
- 88 X. Ge, J. Feng, S. Chen, C. Zhang, Y. Ouyang, Z. Liu and W. Yuan, *Journal of nanobiotechnology*, 2014, **12**, 13.
- 89 X. Du, B. Shi, Y. Tang, S. Dai and S. Z. Qiao, *Biomaterials*, 2014, **35**, 5580-5590.
- 90 F. N. Al-Deen, C. Selomulya, C. Ma and R. L. Coppel, *Methods Mol Biol*, 2014, **1143**, 181-194.
- 91 C. Ortiz Mellet, J. M. Benito and J. M. Garcia Fernandez, *Chemistry*, 2010, **16**, 6728-6742.
- 92 A. B. Davila-Ibanez, V. Salgueirino, V. Martinez-Zorzano, R. Marino-Fernandez, A. Garcia-Lorenzo, M. Maceira-Campos, M. Munoz-Ubeda, E. Junquera, E. Aicart, J. Rivas, F. Javier Rodriguez-Berrol and J. L. Legido, *ACS Nano*, 2012, **6**, 747-759.
- 93 C. Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Wiley & Sons, New York, 1980.
- 94 R. Zana, *Dynamics of Surfactant Self-Asssemblies. Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases*, CRC Press, Boca Raton, 2005.
- 95 D. Fennell-Evans and H. Wennerström, *The Colloidal Domain*, John Wiley & Sons, New York, 1999.
- 96 D. Attwood and A. T. Florence, *Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology*, Chapman and Hall, London, 1983.
- 97 R. J. Hunter, *Fundations of Colloid Science*, Oxford University Press, Oxford, 1986.
- 98 M. Jones and D. Chapman, *Micelles, Monolayers, and Biomembranes*, John Wiley & Sons, New York, 1995.
- 99 F. M. Menger, R. Zana and B. Lindman, *J. Chem. Educ.*, 1998, **75**, 115.
- 100 J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell and B. W. Ninham, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 1976, **72**, 1525-1568.
- 101 J. Israelachvili, *Intermolecular and Surfaces Forces*, Academic Press, London, 1992.
- 102 C. Tanford, *J. Phys. Chem.*, 1972, **76**, 3020-3024.
- 103 C. Tanford, *J. Phys. Chem.*, 1974, **78**, 2469-2479.
- 104 M. Rosoff, *Vesicles*, Marcel Dekker, New York, 1996.
- 105 A. S. Janoff, *Liposomes: Rational Design*, Marcel Dekker, New York, 1999.
- 106 J. H. Fendler, *Membrane Mimetic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1982.
- 107 P. C. A. Barreleiro, G. Olofsson, W. Brown, K. Edwards, N. M. Bonassi and E. Feitosa, *Langmuir*, 2002, **18**, 1024-1029.
- 108 E. Feitosa, F. R. Alves, A. Niemiec, M. E. C. D. Real Oliveira, E. M. S. Castanheira and A. L. F. Baptista, *Langmuir*, 2006, **22**, 3579-3585.
- 109 R. Fraley, R. M. Straubinger, G. Rule, E. L. Springer and D. Papahadjopoulos, *Biochemistry*, 1981, **20**, 6978-6987.
- 110 A. J. Kirby, P. Camilleri, J. Engberts, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, O. Soderman, M. Bergsma, P. C. Bell, M. L. Fielden, C. L. G. Rodriguez, P. Guedat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin and M. C. P. van Eijk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 1448-1457.

- 111 S. D. Patil, D. G. Rhodes and D. J. Burgess, *AAPS Journal*, 2004, **6**.
- 112 M. Pisani, P. Bruni, G. Caracciolo, R. Caminiti and O. Francescangeli, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 13203-13211.
- 113 P. Bruni, M. Pisani, A. Amici, C. Marchini, M. Montani and O. Francescangeli, *Appl. Phys. Lett.*, 2006, **88**.
- 114 P. Pires, S. Simões, S. Nir, R. Gaspar, N. Düzgünes and M. C. Pedroso de Lima, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1999, **1418**, 71-84.
- 115 E. Junquera and E. Aicart, *Curr. Topics Med. Chem.*, 2014, **14**, 649-663.
- 116 A. Bajaj, P. Kondaiah and S. Bhattacharya, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 991-999.
- 117 G. Candiani, D. Pezzoli, L. Ciani, R. Chiesa and S. Ristori, *Plos One*, 2010, **5**.
- 118 M. Damen, J. Aarbiou, S. F. M. van Dongen, R. M. Buijs-Offerman, P. P. Spijkers, M. van den Heuvel, K. Kvashnina, R. J. M. Nolte, B. J. Scholte and M. C. Feiters, *J. Control. Rel.*, 2010, **145**, 33-39.
- 119 V. D. Sharma and M. A. Ilies, *Med Res Rev*, 2014, **34**, 1-44.
- 120 R. Zana, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2002, **97**, 205-253.
- 121 X. Wang, J. Wang, Y. Wang, H. Yan, P. Li and R. K. Thomas, *Langmuir*, 2004, **20**, 53-56.
- 122 S. D. Wettig, R. E. Verrall and M. Foldvari, *Curr Gene Ther*, 2008, **8**, 9-23.
- 123 P. Luciani, C. Bombelli, M. Colone, L. Giansanti, S. J. Ryhanen, V. M. J. Saily, G. Mancini and P. K. J. Kinnunen, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 1999-2003.
- 124 L. Karlsson, M. C. van Eijk and O. Soderman, *J Colloid Interface Sci*, 2002, **252**, 290-296.
- 125 M. Muñoz-Ubeda, S. K. Misra, A. L. Barran-Berdon, S. Data, C. Aicart-Ramos, P. Castro-Hartmann, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 3926-3937.
- 126 S. K. Misra, M. Muñoz-Ubeda, S. Data, A. L. Barran-Berdon, C. Aicart-Ramos, P. Castro-Hartmann, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 3951-3963.
- 127 A. Ahmad, H. M. Evans, K. Ewert, C. X. George, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *J. Gene Med.*, 2005, **7**, 739-748.
- 128 J. Gustafsson, G. Arvidson, G. Karlsson and M. Almgren, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1235**, 305-312.
- 129 D. C. Litzinger and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1113**, 201-227.
- 130 S. Simões, V. Slepishkin, R. Gaspar, M. C. P. de Lima and N. Düzgünes, *Gene Therapy*, 1998, **5**, 955-964.
- 131 M. C. Pedroso de Lima, S. Simoes, P. Pires, H. Faneca and N. Duzgunes, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2001, **47**, 277-294.
- 132 N. J. Zuidam and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1329**, 211-222.
- 133 N. J. Zuidam and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1368**, 115-128.
- 134 D. Hirsch-Lerner, M. Zhang, H. Eliyahu, M. E. Ferrari, C. J. Wheeler and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1714**, 71-84.
- 135 D. Hirsch-Lerner and Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1370**, 17-30.
- 136 F. Roerdink, N. M. Wassef, E. C. Richardson and C. R. Alving, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1983, **734**, 33-39.
- 137 C. Srinivasan and D. J. Burgess, *J. Control. Rel.*, 2009, **136**, 62-70.
- 138 V. I. Kulkarni, V. S. Shenoy, S. S. Dodiya, T. H. Rajyaguru and R. R. Murthy, *Expert opinion on drug delivery*, 2006, **3**, 235-245.
- 139 C. R. Safinya, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, **11**, 440-448.
- 140 I. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler and C. R. Safinya, *Science*, 1998, **281**, 78-81.
- 141 O. Hayashida, K. Mizuki, K. Akagi, A. Matsuo, T. Kanamori, T. Nakai, S. Sando and Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **125**, 594-601.
- 142 M. Dudic, A. Colombo, F. Sansone, A. Casnati, G. Donofrio and R. Ungaro, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 11613-11618.
- 143 G. M. S. O. M. K. N. a. D. Diamond, *ARKIVOC*, 2003, **2003**, 23-31.
- 144 S. B. Nimse and T. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 366-386.
- 145 R. V. Rodik, A. S. Klymchenko, N. Jain, S. I. Miroshnichenko, L. Richert, V. I. Kalchenko and Y. Mely, *Chemistry – A European Journal*, 2011, **17**, 5526-5538.
- 146 Y. Aoyama, *Chemistry – A European Journal*, 2004, **10**, 588-593.
- 147 V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati and R. Ungaro, *Nature communications*, 2013, **4**, 1721.

- 148 V. Bagnacani, V. Franceschi, L. Fantuzzi, A. Casnati, G. Donofrio, F. Sansone and R. Ungaro, *Bioconjug Chem*, 2012, **23**, 993-1002.
- 149 L. Nault, A. Cumbo, R. F. Pretot, M. A. Sciotti and P. Shahgaldian, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 5581-5583.
- 150 F. Sansone, M. Dudič, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai and R. Ungaro, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 14528-14536.
- 151 Y. Aoyama, T. Kanamori, T. Nakai, T. Sasaki, S. Horiuchi, S. Sando and T. Niidome, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 3455-3457.
- 152 V. Bagnacani, F. Sansone, G. Donofrio, L. Baldini, A. Casnati and R. Ungaro, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 3953-3956.
- 153 I. Nierengarten, M. Nothisen, D. Sigwalt, T. Biellmann, M. Holler, J.-S. Remy and J.-F. Nierengarten, *Chemistry – A European Journal*, 2013, **19**, 17552-17558.
- 154 G. Yu, Y. Ma, C. Han, Y. Yao, G. Tang, Z. Mao, C. Gao and F. Huang, *J Am Chem Soc*, 2013, **135**, 10310-10313.
- 155 T. Ogoshi, N. Ueshima and T. A. Yamagishi, *Org Lett*, 2013, **15**, 3742-3745.
- 156 J. Fan, H. Deng, J. Li, X. Jia and C. Li, *Chem Commun (Camb)*, 2013, **49**, 6343-6345.
- 157 G. Yu, C. Han, Z. Zhang, J. Chen, X. Yan, B. Zheng, S. Liu and F. Huang, *J Am Chem Soc*, 2012, **134**, 8711-8717.
- 158 I. Nierengarten, S. Guerra, M. Holler, J. F. Nierengarten and R. Deschenaux, *Chem Commun (Camb)*, 2012, **48**, 8072-8074.
- 159 C. R. Safinya, K. Ewert, A. Ahmad, H. M. Evans, U. Raviv, D. J. Needleman, A. J. Lin, N. L. Slack, C. George and C. E. Samuel, *Philos. Trans. R. Soc., A*, 2006, **364**, 2573-2596.
- 160 K. Ewert, N. L. Slack, A. Ahmad, H. M. Evans, A. J. Lin, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *Curr. Med. Chem.*, 2004, **11**, 133-149.
- 161 M. Muñoz-Ubeda, S. K. Misra, A. L. Barran-Berdon, C. Aicart-Ramos, M. B. Sierra, J. Biswas, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 18014-18017.
- 162 C. Leal, N. F. Bouxsein, K. K. Ewert and C. R. Safinya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 16841-16847.
- 163 R. C. MacDonald, A. Gorbonos, M. M. Mornsen and H. L. Brockman, *Langmuir*, 2006, **22**, 2770-2779.
- 164 J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt and C. R. Safinya, *Science*, 1997, **275**, 810-814.
- 165 J. O. Rädler, I. Koltover, A. Jamieson, T. Salditt and C. R. Safinya, *Langmuir*, 1998, **14**, 4272-4283.
- 166 A. Rodriguez-Pulido, E. Aicart, O. Llorca and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 2187-2197.
- 167 A. Rodriguez-Pulido, F. Ortega, O. Llorca, E. Aicart and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 12555-12565.
- 168 A. Rodriguez-Pulido, A. Martin-Molina, C. Rodriguez-Beas, O. Llorca, E. Aicart and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 15648-15661.
- 169 G. Caracciolo, R. Caminiti, D. Pozzi, M. Friello, F. Boffi and A. Congiu-Castellano, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, **351**, 222-228.
- 170 G. Caracciolo, D. Pozzi, H. Amenitsch and R. Caminiti, *Langmuir*, 2005, **21**, 11582-11587.
- 171 G. Caracciolo, D. Pozzi, A. Amici and H. Amenitsch, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 2028-2032.
- 172 C. Marchini, D. Pozzi, M. Montani, C. Alfonsi, A. Amici, H. Amenitsch, S. C. De Sanctis and G. Caracciolo, *Langmuir*, 2010, **26**, 13867-13873.
- 173 H. Amenitsch, G. Caracciolo, P. Foglia, V. Fuscoletti, P. Giansanti, C. Marianecci, D. Pozzi and A. Lagana, *Colloids Surf. B*, 2011, **82**, 141-146.
- 174 D. Pozzi, G. Caracciolo, R. Caminiti, S. C. De Sanctis, H. Amenitsch, C. Marchini, M. Montani and A. Amici, *Appl. Mat. Interfaces*, 2009, **1**, 2237-2249.
- 175 O. Farago and N. Gronbeck-Jensen, *Soft Matter*, 2011, **7**, 4302-4306.
- 176 M. Quesada-Perez, E. Gonzalez-Tovar, A. Martin-Molina, M. Lozada-Cassou and R. Hidalgo-Alvarez, *Chem. Phys. Chem.*, 2003, **4**, 234.
- 177 A. Rodriguez-Pulido, A. Casado, M. Muñoz-Ubeda, E. Junquera and E. Aicart, *Langmuir*, 2010, **26**, 9378-9385.
- 178 M. Quesada-Perez, J. Callejas-Fernandez and R. Hidalgo-Alvarez, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2002, **95**, 295-315.

Capítulo 1. Introducción

- 179 A. Martín-Molina, M. Quesada Perez, F. Galisteo Gonzalez and R. Hidalgo Alvarez, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 6881-6886.
- 180 A. Martín-Molina, J. A. Maroto-Centeno, R. Hidalgo-Alvarez and M. Quesada-Perez, *J. Chem. Phys.*, 2006, **125**.
- 181 G. Caracciolo, R. Caminiti, M. A. Digman, E. Gratton and S. Sanchez, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 4995-4997.
- 182 G. Caracciolo, D. Pozzi, R. Caminiti, C. Marchini, M. Montani, A. Amici and H. Amenitsch, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 11298-11304.
- 183 G. Caracciolo, D. Pozzi, R. Caminiti, C. Marchini, M. Montani and H. Amenitsch, *J. Appl. Phys.*, 2008, **104**, 14701-14701.
- 184 R. Koynova, Y. S. Tarahovsky, L. Wang and R. C. MacDonald, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1768**, 375-386.
- 185 M. Ahmed, Z. C. Deng, S. Y. Liu, R. Lafrenie, A. Kumar and R. Narain, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 2169-2176.
- 186 K. K. Ewert, H. M. Evans, N. F. Bouxsein and C. R. Safinya, *Bioconjugate Chem.*, 2006, **17**, 877-888.
- 187 A. Bajaj, P. Kondaiah and S. Bhattacharya, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 1537-1546.
- 188 S. Bose, K. Tuunainen, M. Parry, O. P. Medina, G. Mancini and P. K. J. Kinnunen, *Anal. Biochem.*, 2004, **331**, 385-394.
- 189 P. Reynier, D. Briane, R. Coudert, G. Fadda, N. Bouchemal, P. Bissieres, E. Taillandier and A. Cao, *J. Drug Targeting*, 2004, **12**, 25-38.
- 190 R. C. MacDonald, G. W. Ashley, M. M. Shida, V. A. Rakhmanova, Y. S. Tarahovsky, D. P. Pantazatos, M. T. Kennedy, E. V. Pozharski, K. A. Baker, R. D. Jones, H. S. Rosenzweig, K. L. Choi, R. Qiu and T. J. McIntosh, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 2612-2629.
- 191 Y. H. Xu, S. W. Hui, P. Frederik and F. C. Szoka, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 341-353.
- 192 M. C. Fillion and N. C. Phillips, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1329**, 345-356.
- 193 C. Nicolazzi, M. Garinot, N. Mignet, D. Scherman and M. Bessodes, *Curr. Med. Chem.*, 2003, **10**, 1263-1277.
- 194 R. I. Zhdanov, O. V. Podobed and V. V. Vlassov, *Bioelectrochemistry*, 2002, **58**, 53-64.
- 195 L. Xu, K. F. Pirollo and E. H. Chang, *J. Control. Rel.*, 2001, **74**, 115-128.
- 196 K. Hattori, W. Ding and Y. Maitani, *J. Control. Rel.*, 2007, **120**, 122-130.
- 197 M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. H. Yahia and M. Mahmoudi, in *Protein-Nanoparticle Interactions*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 65-82.
- 198 A. Lesniak, A. Campbell, M. P. Monopoli, I. Lynch, A. Salvati and K. A. Dawson, *Biomaterials*, 2010, **31**, 9511-9518.
- 199 G. Caracciolo, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*.
- 200 Y. K. Lee, E.-J. Choi, T. J. Webster, S.-H. Kim and D. Khang, *International Journal of Nanomedicine*, 2015, **10**, 97-113.

Capítulo 2. Sección Experimental

Capítulo 2. Sección Experimental

2.1 Materiales

2.1.1 Lípidos Catiónicos (CL)

Cloruro de 3-β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]-colesterol (DC-Chol). Lípido catiónico derivado del colesterol que posee un conjunto de cicloalcanos en la región hidrofóbica y cuya cabeza polar está formada por el carbamato N-sustituido. Este lípido catiónico fue adquirido en Avanti Polar Lipids Inc. (EE.UU.) en estado sólido (polvo) y tiene una pureza del 98 % (Figura 2.1 y Tabla 2.1)

Cloruro de N^α,N^ω-bis(N^α-lauroil-lisina)_{α,ω}-hexilendiamida C₆(LL)₂. Lípido catiónico tipo gémuni derivado del aminoácido lisina, que presenta una carga positiva en los grupos ε-amina de cada una de sus dos cabezas polares, una cadena alquílica espaciadora de 10 átomos de carbonos y dos cadenas hidrofóbicas saturadas de 12 átomos de carbono (Figura 2.1 y Tabla 2.1). Este lípido fue sintetizado por el grupo de la Prof. Lourdes Pérez del Departamento de Tecnología Química y de Tensioactivos, IQAC, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, de Barcelona (España).¹

Bromuro de 1,2-bis(hexadecildimetilamonio)oxietileno. Serie de tres lípidos tipo gémuni (C₁₆Am)₂(C₂O)_n conformados por dos cabezas polares catiónicas compuestas por un grupo amonio, un espaciador oxietileno de longitud variada, siendo n = 1, 2 ó 3, el número de oxietilenos de la cadena espaciadora, y dos colas hidrofóbicas saturadas de 16 átomos de carbono (Figura 2.1 y Tabla 2.1).

Bromuro de 1,2-bis(hexadecilimidazol)oxietileno. Al igual que el anterior sistema, éste es una serie de tres compuestos de tipo gémuni $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$, siendo $n = 1, 2$ ó 3 , el número de oxietilenos de la cadena espaciadora. La estructura de éstos lípidos es similar a la de los $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$ siendo la única diferencia el tipo de cabeza polar. De esta forma éstos compuestos presentan dos cabezas polares catiónicas compuestas de un grupo imidazol en lugar de los grupos amonio (Figura 2.1 y Tabla 2.1).

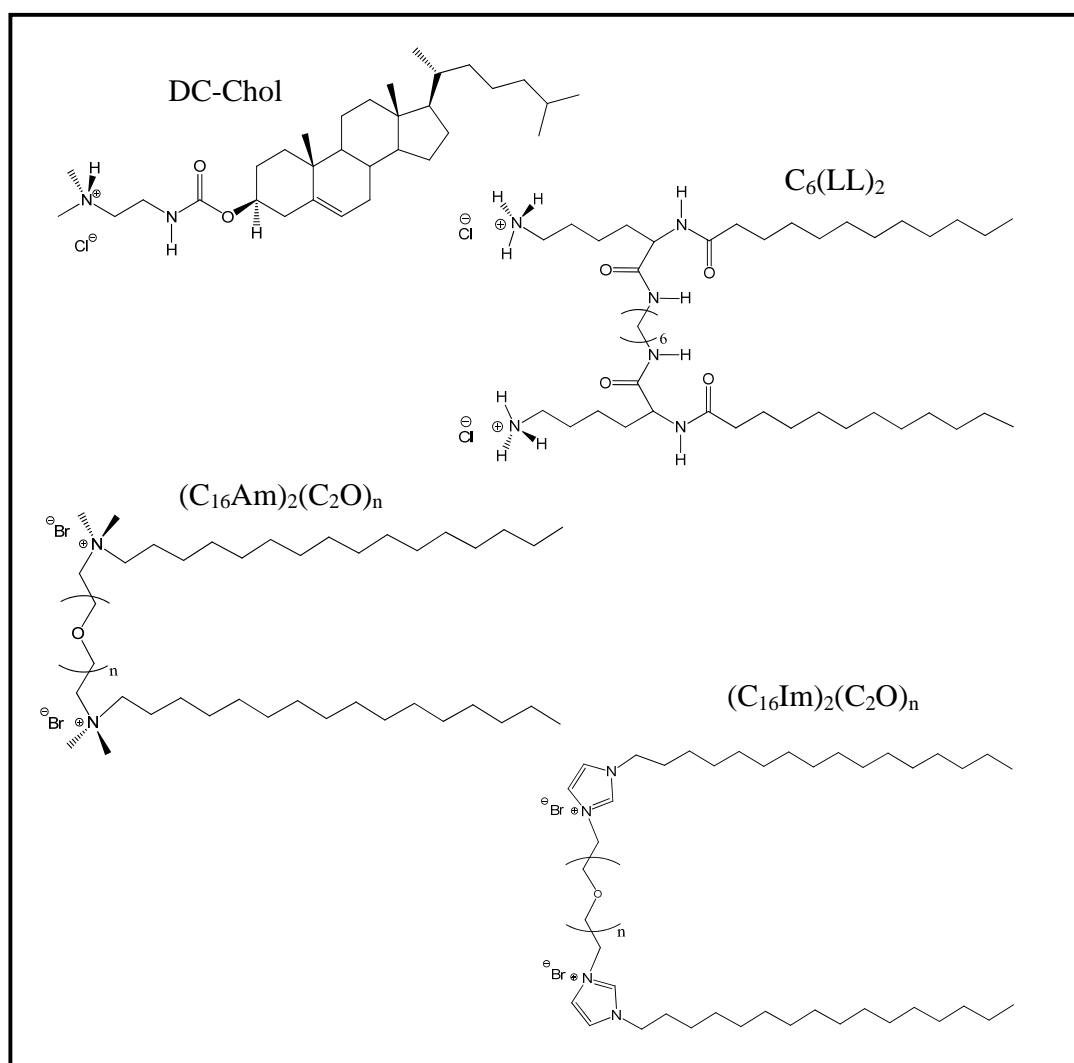


Figura 2.1. Estructuras de los lípidos catiónicos: DC-Chol, C₆(LL)₂, (C₁₆Am)₂(C₂O)_n y (C₁₆Im)₂(C₂O)_n.

Los lípidos catiónicos gémuni con espaciador oxietileno ((C₁₆Am)₂(C₂O)_n y (C₁₆Im)₂(C₂O)_n) fueron sintetizados en el laboratorio de Química Orgánica del

Prof. S. Bhattacharya, ubicado en el Indian Institute of Science, IISc, en Bangalore (India).²

2.1.2. Lípidos aniónicos (AL) y zwitteriónico

1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) de sodio (DOPG) y *1,2-di-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfo-L-serina de sodio* (DOPS). Ambos lípidos aniónicos poseen dos cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono cada una, con una insaturación en la posición 9 en configuración cis, por lo que su única diferencia radica en la cabeza polar: el DOPG presenta una cabeza polar de glicerol y el DOPS una cabeza de serina (Figura 2.2 y Tabla 2.1)

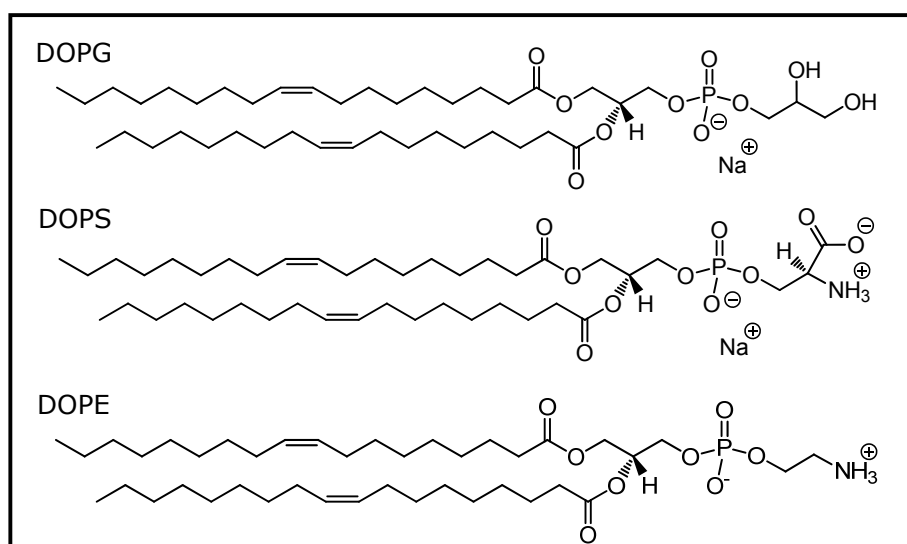


Figura 2.2. Estructuras de los lípidos aniónicos DOPG y DOPS y del lípido zwitteriónico DOPE.

1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE). Este lípido pertenece a la familia de las fosfatidiletanolaminas y presenta la misma cola hidrofóbica que los lípidos aniónicos anteriormente mencionados (Figura 2.2 y Tabla 2.1). A pH fisiológico (~ 7.4), el DOPE es eléctricamente neutro. El DOPE es un lípido fusogénico, capaz de fluidificar las bicapas lipídicas en las que participa. Este hecho se debe a su baja temperatura de transición gel-líquido ($T_m = -16\text{ }^\circ\text{C}$), lo que le permite rebajar la T_m de la mezcla hasta temperaturas próximas a la temperatura ambiente.³ Este lípido zwitteriónico se ha utilizado mezclado con los lípidos catiónicos y aniónicos para formar los correspondiente liposomas

mixtos, a diferentes fracciones molares. Su presencia rebaja la T_m de la mezcla, aumentando la capacidad del liposoma resultante para fusionarse con la membrana celular.

Todos los lípidos comerciales anteriormente mencionados han sido suministrados por Avanti Polar Lipids Inc. (EE.UU.), con una pureza superior al 99%, en estado sólido. Los lípidos de una sola cabeza polar se han mantenido a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, mientras que los lípidos gémini sintetizados se han almacenado a temperatura ambiente. En la Tabla 2.1 se recoge la fórmula molecular y pesos moleculares de todos los lípidos utilizados en esta tesis.

2.1.3. Lípidos macrocíclicos catiónicos

Calixareno (TMAC4). Este vector está formado por 4 anillos aromáticos unidos por metilenos en las posiciones 3 y 5. Cada anillo presenta una cola hidrocarbonada de 10 átomos y una cabeza polar formada por una amina cuaternaria cargada positivamente (Figura 2.3 y Tabla 2.1).

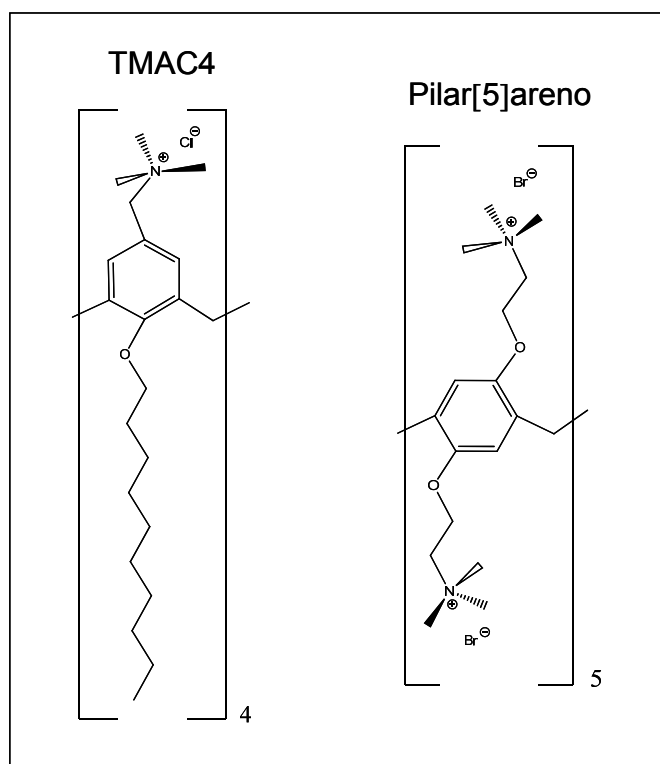


Figura 2.3 Estructuras de los vectores macrocíclicos con matriz lipídica: calixareno TMAC4 y pilar[5]areno.

Pilar[5]areno. Vector formado por 5 anillos aromáticos unidos por metilenos en las posiciones 2 y 5. Cada anillo presenta en la posición 1 y 4 una cadena alquílica con una amina cuaternaria en el extremo (Figura 2.3 y Tabla 2.1).

Ambos compuestos fueron sintetizados por el grupo del catedrático Luis García Río del Departamento de Químico-Física del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares de la Universidad de Santiago de Compostela (España) y sus fórmulas moleculares y pesos moleculares se muestran en la Tabla 2.1

Tabla 2.1. Fórmulas moleculares, pesos moleculares, M, y pureza de los lípidos utilizados en esta tesis. En el caso de GCLs, se indica también la longitud del espaciador, n.

Lípido	n = nº de átomos de carbono del espaciador	Fórmula Molecular	M (g/mol)	Pureza (%)
DC-Chol		C ₃₂ H ₅₇ ClN ₂ O ₂	537.26	98
C ₆ (LL) ₂		C ₄₂ H ₈₆ CL ₂ N ₆ O ₄	810.08	>99
(C ₁₆ Am) ₂ (C ₂ O) _n	1	C ₄₀ H ₈₆ Br ₂ N ₂ O	770.93	>99
	2	C ₄₂ H ₉₀ Br ₂ N ₂ O ₂	814.98	>99
	3	C ₄₄ H ₉₄ Br ₂ N ₂ O ₃	859.09	>99
(C ₁₆ Im) ₂ (C ₂ O) _n	1	C ₄₂ H ₈₀ Br ₂ N ₄ O	816.92	>99
	2	C ₄₄ H ₈₄ Br ₂ N ₄ O ₂	860.97	>99
	3	C ₄₆ H ₈₈ Br ₂ N ₄ O ₃	905.02	>99
DOPG		C ₄₂ H ₇₈ NaO ₁₀ P	797.04	>99
DOPS		C ₄₂ H ₇₇ NNaO ₁₀ P	810.03	>99
TMAC4		C ₈₄ H ₁₄₄ Cl ₄ N ₄ O ₄	1415.88	>99
Pilar[5]areno		C ₈₅ H ₁₅₀ Br ₁₀ N ₁₀ O ₁₀	2271.2	95
DOPE		C ₄₁ H ₆₄ NO ₈ P	744.05	>99

2.1.4. Ácido desoxirribonucleico (DNA)

Durante la realización de esta tesis doctoral se han utilizado dos tipos de DNA: un DNA lineal de doble hebra y un plásmido, pDNA.

DNA lineal. DNA liofilizado procedente del timo de ternero (ctDNA) en su forma de sal sódica, suministrado por Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.) con una pureza superior al 95 %, es decir, con menos de 5 % de impurezas proteínicas. Este DNA lineal presenta 2700 pares de bases, las cuales fueron determinadas mediante electroforesis en gel de agarosa. El ctDNA se conserva a 4 °C a fin de mantener sus propiedades.

Plásmido pEGFP-C3. Plásmido de 4700 pares de bases que codifica para la expresión de la proteína GFP. El plásmido se obtiene de la bacteria recombinante E.Coli, DH5 α . Se aísla y purifica mediante el kit comercial GenElute HP Select Plasmid Gigaprep Kit de Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.). Una vez purificado se liofiliza y almacena a 4 °C para su conservación. El plásmido usado en esta tesis doctoral fue amplificado, purificado y liofilizado por la Dr. Clara Aicart del departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de esta universidad.

Las disoluciones de DNA (ctDNA o pDNA) se preparan en HEPES a concentraciones de 0.1 mg/mL para las medidas de potencial zeta, espectroscopia de fluorescencia, electroforesis en gel de agarosa y técnicas biológicas; 2 mg/mL para las medidas de crio-TEM; y 10 mg/mL para determinar las estructuras de los lipoplejos mediante la técnica de SAXS. Para preparar las disoluciones de DNA, se pesa la cantidad apropiada de DNA y se agrega el volumen requerido de disolución tampón o agua. Una vez preparada la disolución, se deja reposar a temperatura ambiente por 24 h y 4 h para el ctDNA y pDNA, respectivamente. Pasado este tiempo, la disolución se debe almacenar en una nevera a -30 °C para evitar una posible degradación.

2.2 Preparación de liposomas, lipoplejos, y complejos liposomas-Suero Humano.

La comprensión de las propiedades biofísicas y bioquímicas de los vectores de transfección del DNA resulta de vital importancia para lograr resultados óptimos en terapia génica. Durante esta tesis doctoral, se llevó a cabo la caracterización biofísica y bioquímica de una serie de lipoplejos. Todos los sistemas se estudiaron en diferentes condiciones, es decir a diferentes relaciones molares, α y relaciones de masa, L/D, o carga efectiva, ρ_{eff} , a fin de tener los complejos óptimos en transfección. A continuación se describe de manera general los protocolos de preparación de los liposomas y lipoplejos.

2.2.1 Preparación de liposomas

Partiendo del método experimental para la preparación de liposomas⁴ descrito por Lasic, y el protocolo desarrollado y optimizado en nuestro laboratorio,⁵ los liposomas se preparan siguiendo tres etapas:⁵⁻⁷

1. Formación de la película lipídica seca (film).
2. Hidratación del film y formación de liposomas unilamelares pequeños.
3. Homogenización de los liposomas mediante extrusión.

Para la preparación de las películas lipídicas, inicialmente se pesan los lípidos que van a formar la mezcla liposómica. La cantidad de lípido requerida depende de dos factores: relación de masa o carga efectiva (L/D o ρ_{eff}) del lipoplejo, y composición molar del liposoma mixto, α , ambos factores han sido explicados previamente en la introducción.

De esta forma, la cantidad de lípido requerida se obtiene tomando en cuenta: i) la relación entre la masa de liposoma total ($L = L^+ + L^0$) y la masa de DNA presente en la disolución de lipoplejo final, L/D, y/o ii) la relación entre el número de moles de carga efectiva del lípido catiónico y el número de moles de carga efectiva del DNA, ρ_{eff} . Para dichos cálculos, la concentración de DNA

se mantiene constante y, por lo tanto, sólo varía la cantidad de liposoma mixto utilizado. Cabe destacar que la concentración de DNA depende del liposoma mixto estudiado y de la técnica que se requiere utilizar.

A fin de llevar a cabo una amplia caracterización de los diferentes sistemas estudiados, se cubre un amplio intervalo de valores L/D y ρ_{eff} referidas, así como composiciones molares, α , entre los lípidos catiónico, $[L^+]$, o aniónico, $[L^-]$, y zwitteriónico, $[L^0]$. Los valores de α y ρ_{eff} utilizados en cada sistema se encuentran indexados en la Tabla 2.2.

Una vez determinada la cantidad de los lípidos a utilizar, se pesa la cantidad adecuada y a continuación se adiciona un pequeño volumen de cloroformo para asegurar la disolución de los mismos (los liposomas se pueden preparar en tubos de vidrio o eppendorf de 1.5 mL). Después de mezclar la disolución que contiene los lípidos con agitación en un Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc. EE.UU), se elimina el disolvente orgánico por evaporación a vacío con un evaporador-centrífuga Jouan RC10.09 (Société Jouan, Francia) a 1200 rpm y a $5 \cdot 10^{-4}$ atm durante al menos 2 h, con lo que en las paredes del vial se forman capas o películas secas muy finas que contienen la mezcla lipídica. A pesar de que con este proceso prácticamente todo el disolvente es eliminado, las trazas ocluidas entre las películas se eliminan posteriormente en un desecador a vacío durante al menos 1 hora (el número de horas dependerá de la cantidad de muestras que preparen). Finalizada esta última etapa, las películas formadas, libres de cloroformo, se conservan a -80 °C. Este método de almacenaje permite mantener las propiedades del liposoma íntegras y evitar la oxidación lipídica hasta su utilización.

La hidratación de las películas se realiza con diferentes medios de acuerdo al sistema estudiado: i) en el caso de los liposomas catiónicos mixtos, la hidratación se hace en una disolución reguladora HEPES 40 mM (pH = 7.4); ii) para los liposomas aniónicos mixtos, se hace en HEPES 10 mM (pH = 7.4). Después de adicionar el volumen necesario de disolución reguladora a las películas, se aplica de manera alterna 10 ciclos de agitación con vortex

durante 3 min, y pequeños períodos de sonicación de 2 min. Posteriormente, los liposomas se dejan en agitación en vortex de 2 a 4 h para asegurar su hidratación y homogeneización,³ de esta forma se consigue una población de liposomas unilamelares con cierta polidispersidad.

A fin de obtener liposomas de un tamaño de 200 ó 100 nm y con bajos niveles de polidispersidad, se aplica un protocolo de extrusión secuencial, usando el extrusor Thermobarrel Lipex Extruder (Nothorn Lipids Inc., Canadá) (Figura 2.4). Para una óptima extrusión, se debe realizar una extrusión secuencial, de modo que la disolución de liposomas mixtos se pasa de manera sucesiva a través de una membrana con diferentes diámetros de poro. Para obtener liposomas de 200 nm, la disolución de liposoma mixto se extruye con membranas de 400 nm de diámetro de poro (5 veces) y de 200 nm (10 veces); para liposomas de 100 nm, la extrusión se hace con membranas de 400 nm de diámetro de poro (5 veces), de 200 nm (5 veces) y de 100 nm (10 veces).

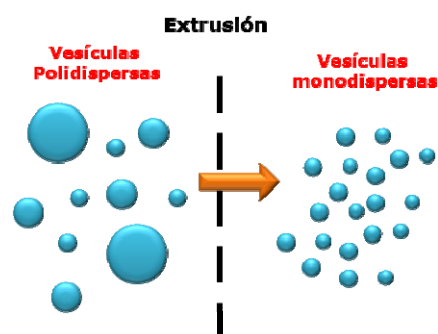


Figura 2.4. Fotografía del extrusor Thermobarrel Lipex Extruder y diagrama de extrusión.

Preparación de liposomas con sondas fluorescentes

Preparación de liposomas con marcaje fluorescente para la técnica de anisotropía de fluorescencia. La técnica de anisotropía de fluorescencia requiere que los liposomas mixtos presenten la sonda fluorescente DPH intercalada en la bicapa, para ello, antes de preparar los liposomas, se debe añadir en un vial la cantidad de sonda fluorescente DPH disuelta en etanol ($1,91 \cdot 10^{-4}$ M en etanol) necesaria para tener una relación molar 200:1 entre la

cantidad total de lípido L y la sonda DPH (L:DPH). Una vez añadida la sonda, el etanol se evapora bajo una corriente de aire y posteriormente se procede a preparar el liposoma mixto sobre el vial que contiene el DPH de acuerdo al protocolo de preparación de liposomas.

Preparación de liposomas con marcaje fluorescente para determinar la internalización celular de los complejos CL:HP. La preparación de estos liposomas requiere que a la mezcla de lípidos se añada el marcador 7-nitrobenzofurazan-1,2-Dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (NBD-DOPE). La concentración del marcador fluorescente se fija a en 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a una relación molar de lípido fluorescente/lípido total de 5/1000). Una vez realizada la mezcla los lípidos, los liposomas se preparan de acuerdo al protocolo.

2.2.2 Preparación de lipoplejos

Los lipoplejos se forman al mezclar los volúmenes necesarios tanto de la disolución de liposomas mixtos y de disolución de DNA (ctDNA o pDNA) a fin de obtener el L/D o ρ_{eff} requerido. Después, la mezcla se deja reposar por 20 min antes de realizar cualquier prueba o medida.

Para los lipoplejos formados por lípidos aniónicos, primero se mezclan las cantidades adecuadas de Ca^{2+} y pDNA, y posteriormente se añade la cantidad apropiada de liposoma aniónico mixto en orden a obtener la relación AL/pDNA y la concentración final de calcio necesarias.

El volumen final de la mezcla depende de la técnica usada (potencial ζ , 1.6 mL; gel electroforesis 15-25 μL ; anisotropía de fluorescencia, 2 mL; SAXS 50-75 μL ; Crio-TEM 0.5 mL; transfección 100-200 μL). En la Tabla 2.2 se muestran las diferentes relaciones usadas en la preparación de los lipoplejos.

Tabla 2.2 Resumen de las composiciones molares del liposoma mixto, α ; relaciones molares de carga efectiva del lipoplejo, ρ_{eff} ; relaciones molares AL/pDNA y concentración de Ca^{2+} (en el caso de los sistemas aniónicos mediados por cationes) para los diferentes sistemas estudiados en esta tesis.

Liposomas Catiónicos	α	Lipoplejos	ρ_{eff}
DC-Chol/DOPE	0.5	-	-
$C_6(LL)_2/DOPE$	0.20, 0.25, 0.30, 0.40 0.50, 0.60 ó 0.80	$C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA	1.8, 3.6, 5.3,
		$C_6(LL)_2/DOPE$ -ctDNA	8.9 ó 10.7
$(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$	0.20, 0.40, 0.50 ó 0.70	$(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA	1.5, 2.0, 2.5,
		$(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -ctDNA	3.0 ó 5.0
$(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$	0.20, 0.40, 0.50 ó 0.70	$(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA	1.5, 2.0, 2.5,
		$(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -ctDNA	3.0 ó 5.0
TMAC4/DOPE	0.2, 0.4, 0.5 y 0.7	TMAC4/DOPE-pDNA	1.5, 2.0 y
		TMAC4/DOPE-ctDNA	4.0
Liposomas Aniónicos	α	[Ca^{2+}] (mM)	AL/pDNA
DOPG/DOPE	0.20, 0.25, 0.50	5, 10, 25, 50 ó 100	10, 15 ó 20
DOPS/DOPE	0.2	5, 10, 25, 50 ó 100	10, 15 ó 20
Liposomas Aniónicos	α	Pilar[5]areno¹⁰⁺ (μM)	AL/pDNA
DOPG/DOPE	0.2, 0.5 ó 1.0	4, 8, 15, 30, 60	1

2.2.3 Preparación de complejos: liposomas mixtos con suero humano (CL:HP)

Una vez preparados los liposomas mixtos, se mezcla volúmenes iguales de liposoma mixto con suero humano (v/v)⁸⁻¹³ y se dejan incubar a diferentes tiempos (1, 30 y 60 min). El volumen de liposoma mixto y suero depende de la técnica a utilizar: se añaden 20, 200 y 500 μ L de cada uno para potencial zeta, 1D SDS-PAGE y CL-MS/MS respectivamente. Después de la incubación, las muestras se centrifugan por 15 min a 14000 rpm y se elimina el sobrenadante a fin de eliminar las proteínas que no se unieron al liposoma mixto; seguidamente, se añaden 200 μ L de una disolución reguladora Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM y NaCl 150 mM con pH = 7.5 y se resuspende la muestra

agitando en vortex durante 5 s. Los ciclos de centrifugado y lavado se repiten tres veces más; en el último ciclo, las muestras se dejan secar 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar, el *pellet* obtenido se resuspende en el medio y volumen adecuado de acuerdo a la técnica a utilizar. Todos los estudios sobre la corona de proteínas fueron realizados durante una estancia realizada con el grupo de investigación del Prof. Giulio Caracciolo del departamento de fisicoquímica de la Universidad de la Sapienza en Roma.

2.3 Métodos Experimentales

En este apartado se presentan brevemente las técnicas experimentales utilizadas en esta tesis doctoral (ver Tabla 2.3). De acuerdo al tipo de caracterización realizada, se puede distinguir tres grandes grupos:

- i) técnicas de caracterización biofísica de los liposomas estudiados en ausencia y en presencia de DNA.
- ii) técnicas de evaluación bioquímica de su eficiencia como vectores coloidales de DNA en terapia génica y de su viabilidad en entornos celulares.
- iii) técnicas de caracterización de la corona de proteínas que se forma al interaccionar un liposoma mixto con suero humano.

A continuación, se presentarán las técnicas utilizadas con una introducción breve de los fundamentos de cada una de ellas seguida de la metodología de preparación de las muestras. Puesto que algunas de las técnicas se utilizan en más de una caracterización, la preparación de muestras se explicará por técnica.

Tabla 2.3. Resumen de técnicas utilizadas en esta tesis.

Técnica	Caracterización		
	Biofísica	Bioquímica	Corona de Proteínas
Movilidad Electroforética y Potencial Zeta	✓		✓
Dispersión Cuasi-elástica de luz (QELS)	✓		
Dispersión luz dinámica (DLS)			✓
Gel Electroforesis	✓		
Anisotropía de fluorescencia	✓		
Crio-Microscopía electrónica de transmisión (Crio-TEM)	✓		
Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)	✓		
Ensayo MTT		✓	
Citometría de flujo		✓	✓
Microscopía confocal de fluorescencia		✓	✓
Microscopía de fluorescencia		✓	
Electroforesis 1D SDS-PAGE			✓
Nanocromatografía en fase líquida acoplado a espectrometría de masas-masas (nanoLC-MS/MS)			✓

2.3.1 Potencial ζ y movilidad electroforética

Fundamento

A fin de evaluar la carga superficial de los liposomas y lipoplejos, y determinar con precisión la composición del lipoplejo para la cuál es eléctricamente neutro (electroneutralidad), se realizan medidas de movilidad electroforética y potencial ζ . La importancia de conocer la carga superficial del sistema radica en la capacidad de obtener complejos cargados neutra o positivamente para que sean vectores potencialmente eficaces en transfección celular. Por consiguiente, esta técnica suministra una información imprescindible para saber el intervalo de composiciones y concentraciones que interesa preparar para evaluar la eficiencia de los complejos estudiados como vectores coloidales del DNA.

Para determinar la movilidad electroforética se usó un equipo de ZetaPALS y (Phase Analysis Light Scattering; Brookhaven Instrum. Corp., EE.UU.) y el equipo Zetasizer NanoZS90 (Malvern U.K). Ambos equipos utilizan la técnica interferométrica conocida como PALS para determinar la movilidad electroforética de una suspensión coloidal cargada. Además estos equipos también permiten determinar el tamaño de partícula: en el equipo ZetaPALS (Figura 2.5), la determinación se realiza mediante la técnica de Dispersión Cuasi-elástica de luz (QEELS), y en el Zetasizer se realiza por medio de dispersión de luz dinámica (DLS).

El potencial zeta, ζ , de los liposomas y lipoplejos se obtiene a partir de medidas experimentales de movilidad electroforética, μ_e , de estas partículas cargadas cuando se mueven en el seno de un campo eléctrico según la ecuación de Henry:

$$\zeta = \frac{3\eta}{2\varepsilon_r\varepsilon_0 f(\kappa_D a)} \mu_e \quad (2.1)$$

donde ε_0 y ε_r son las permitividades en el vacío y relativa, respectivamente, η es la viscosidad del disolvente, y $f(\kappa_D a)$ la función de Henry, que combina el tamaño de la partícula coloidal, a , con el espesor de la atmósfera iónica o longitud de Debye, $1/\kappa_D$, dada por la ecuación:

$$\frac{1}{\kappa_D} = \left(\varepsilon_r \varepsilon_0 k_B T / \sum_{i=1}^{N_i} e^2 z_i^2 n_i \right)^{1/2} \quad (2.2)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, z_i es la valencia de los N_i iones presentes en la disolución a una concentración n_i y e es la carga del electrón.

Cuando el tamaño de las partículas es muy superior al espesor de la interfase electrificada que las rodea ($\kappa_D a \gg 1$ o $a \gg \kappa_D^{-1}$), como es el caso de los liposomas y lipoplejos estudiados en esta tesis, se puede aproximar la función

de Henry a un valor límite, $f(\kappa_D a) = 1.5$. Es la conocida aproximación de Smoluchowski o de la doble capa fina,^{15,16} según la cual la ecuación 2.1 se simplifica:

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \mu_e \quad (2.3)$$

Metodología

Una vez preparadas las disoluciones de lipoplejos tal y como se ha especificado en el apartado 2.2.2, se procede a su caracterización electroquímica mediante la medida de la movilidad electroforética. Para ello, en una celda de plástico, se añade 1.6 mL del liposoma mixto y se realiza la medida a 25 °C. Cada valor de movilidad electroforética se toma como un promedio de 50 medidas independientes.

La concentración de DNA es de 0.05 mg/mL para todos los sistemas estudiados, excepto para los liposomas aniónicos para los cuáles se usa una concentración de 0.008 mg/mL. La concentración de sistema mixto se debe variar de acuerdo al α y a la composición del lipoplejo requerida, L/D. Todas las medidas se realizan previa calibración y acondicionamiento del equipo y de la celda, respectivamente, de acuerdo a los estándares determinados por el proveedor del equipo.



Figura 2.5 Equipo zetaPALS Brookhaven Instruments, para medir potencial ζ y tamaño de partícula.

El tamaño de partícula sólo se mide en los liposomas mixtos; para ello, una vez extruída la muestra se colocan entre 1-2 mL en la cubeta de plástico, se introduce la cubeta tapada en el equipo ZetaPALS, se asignan los parámetros de medida y se realizan 3 medidas con duración de 5 min por muestra.

Las medidas de potencial zeta y tamaño para los liposomas mixtos con suero humano, se deben realizar después de haber realizado las incubaciones pertinentes, y los tratamientos de lavado descritos en el apartado 2.2.3. Una vez lavadas las muestras y eliminado todo el exceso de disolvente, el *pellet* obtenido se resuspende en 1 mL de agua MiliQ y se realizan las medidas de potencial zeta y tamaño a 25 °C.

2.3.2 Electroforesis en Gel

Las técnicas de electroforesis en gel son ampliamente usadas en biología para separar moléculas de gran interés, como son el DNA y las proteínas. Se basan, esencialmente, en la migración de moléculas con carga neta de una muestra a través de un medio gelificado hacia el polo opuesto de su carga, cuando la muestra es sometida a un campo eléctrico. La velocidad de migración viene dada por las características de la molécula (carga neta, tamaño y forma)¹⁷, la intensidad del campo eléctrico, y las características del medio en el que tiene lugar. Hay dos fuerzas que determinan la velocidad con que una molécula migra: la fuerza eléctrica y la de rozamiento. La primera es la responsable de que la molécula en cuestión sea atraída hacia uno de los electrodos; cuanto mayor sea el cociente carga/masa de la molécula, mayor será la aceleración con que se mueva. Sin embargo, la fuerza de rozamiento, que depende del tamaño y forma de la molécula que migra y de las características del medio en que se mueve (fuerza iónica, viscosidad y temperatura), tiene una acción opuesta: a mayor rozamiento, menor velocidad de migración. De esta forma, una muestra polidispersa puede separarse en las distintas fracciones de moléculas que la constituyen, con formas y pesos moleculares diferentes.

Para que la separación sea eficiente, se debe utilizar un medio de migración adecuado, que suministre una fuerza de rozamiento suficiente. Para ello, se

trabaja habitualmente con un gel que consiste en un polímero orgánico entrecruzado (por ejemplo, agarosa, derivado de un polisacárido de un alga o geles de poliacrilamida) que aumenta considerablemente la fricción, impidiendo a la vez la difusión de las moléculas a través del medio acuoso en todas las direcciones.

Se pueden encontrar hoy en día técnicas y protocolos bien definidos para diferentes moléculas de interés. Tal es el caso de los ácidos nucleicos y las proteínas, para los que habitualmente se recurre a la electroforesis en gel de agarosa y la electroforesis en geles de poliacrilamida, respectivamente.

2.3.2.1 Electroforesis en gel de agarosa

Fundamento

La *electroforesis en gel de agarosa* es ampliamente utilizada para analizar y caracterizar principalmente ácidos nucleicos, siendo una herramienta analítica simple, rápida y sensible. En el caso de DNA de doble cadena, como la carga neta está dada por los grupos fosfatos, hay un fosfato cargado negativamente por cada nucleótido y la masa de los cuatro desoxirribonucleótidos es similar, se puede afirmar que el cociente carga/masa es independiente de la secuencia y la longitud de la doble cadena de DNA (todas las moléculas de DNA migrarán entonces hacia el ánodo). Ello quiere decir que las diferencias en la migración no vienen determinadas por la fuerza eléctrica, sino que están dadas exclusivamente por la fuerza de rozamiento. Como los fragmentos de DNA migran en el mismo medio, si todos tienen la misma forma, la velocidad de migración tiene que ver únicamente con su tamaño (la longitud de la doble cadena, medida en pares de bases). En el caso de plásmidos, es la fuerza iónica del medio la que determina su conformación, más o menos enrollada, siendo su velocidad de migración siempre menor que la del DNA de doble hebra lineal.

Cuando se utiliza la técnica para caracterizar ácidos nucleicos, es necesario utilizar una sonda fluorescente inmersa en el soporte electroforético junto con

el gel, para que su emisión a una determinada longitud de onda permita analizar, finalmente, con la ayuda de una lámpara UV, las bandas correspondientes a los diferentes fragmentos de DNA. Habitualmente se escoge el bromuro de etidio o el *GelRed* como sonda fluorescente, puesto que su emisión experimenta un apreciable aumento (aumenta el rendimiento cuántico de fluorescencia) cuando se intercala entre los pares de bases del DNA, que le proporcionan un entorno hidrofóbico protector. Una vez separados los fragmentos de DNA de distintos tamaños, es posible conocer el peso molecular de cada uno (o su longitud medida en número de pares de bases), ya que la distancia recorrida por cada fragmento de DNA, con respecto a su punto de *siembra*, es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Para ello, es necesario realizar previamente el experimento con una mezcla de DNAs de pesos moleculares o longitud en pares de bases conocidos (marcadores de peso molecular).

En esta tesis, se ha utilizado esta técnica con dos objetivos:

i) determinación del tamaño promedio de los fragmentos de ctDNA y del tamaño del pDNA utilizado, y

ii) determinación cualitativa de la composición del lipoplejo para la que se da la electroneutralidad (carga neta nula). Un desplazamiento del DNA a través del gel de agarosa tras aplicar el campo eléctrico, es decir, la presencia de bandas fluorescentes a lo largo del carril es una evidencia de que el DNA no está totalmente compactado por el vector catiónico, es decir hay DNA libre, con el *GelRed* intercalado entre sus pares de bases. Por el contrario, si no se observa desplazamiento del DNA a través del gel agarosa, es decir, no se observan bandas fluorescentes a lo largo del carril, se puede asegurar que el DNA presente está totalmente compactado, lo que conlleva la expulsión de la sonda fluorescente de entre las hélices del DNA hacia el medio, donde su rendimiento cuántico de fluorescencia decae bruscamente. Si el experimento se diseña de tal forma que se preparan varias muestras del lipoplejo a varias composiciones (varias L/Ds o varias ρ_{eff}), y cada una de estas muestras se

agrega en uno de los pocillos del gel, se puede determinar, de una forma cualitativa, la composición del lipoplejo (o más precisamente, el intervalo de composiciones) para la que se da la electroneutralidad, viendo a partir de qué muestra no se observa fluorescencia a lo largo de su carril de desplazamiento. Sin duda, el potencial zeta confiere una mayor precisión en esta determinación.

Metodología

Para realizar la electroforesis en gel de agarosa, primero se prepara el gel de agarosa al 1 % en TAE 1x (Tris-HCl, Acetato y EDTA), una vez disuelto el gel se añade 0.7 μL de la sonda fluorescente, *GelRed*, y se deja solidificar en el soporte durante 15-20 min.

Los lipoplejos se preparan en un volumen total de entre 15-20 μL con una cantidad de 200 ng de pDNA y la correspondiente cantidad de vector. Después de transcurrido el tiempo de incubación, se añade el volumen necesario de disolución reguladora de carga para lograr una proporción del 1% respecto al volumen final en las muestras. Cada muestra se carga (15- 20 μL) en los diferentes pocillos del gel (Figura 2.6). Como control, se adiciona una disolución de pDNA sin liposoma mixto.



Figura 2.6 Cuveta de gel electroforesis en gel de agarosa, soporte y peine.

Una vez cargadas las muestras, la electroforesis se lleva a cabo a una corriente eléctrica de 80 mV durante 30 min. Después de transcurrido los 30 min, el gel se retira de la cubeta y se revela bajo luz ultravioleta usando un

equipo XR instrument (Bio-Rad). La intensidad de cada banda se mide usando el software comercial GelDoc (Bio-Rad).

2.3.2.2 Electroforesis en 1D SDS-PAGE (Electroforesis en geles de poliacrilamida).

Fundamento

La electroforesis en geles de poliacrilamida, también conocida como SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) en una dimensión es una técnica ampliamente usada en la separación de proteínas. Las proteínas son estructuralmente muy diversas, presentan diferentes secuencias de aminoácidos, tamaños y formas de plegamiento, lo cual tiene importantes implicaciones al momento de realizar una electroforesis. Si todas las proteínas presentaran la misma densidad de carga y forma, su separación únicamente dependería de su tamaño, es decir de su peso molecular. Sometiéndolas a un tratamiento previo con un tensioactivo aniónico (como el SDS, dodecilsulfato de sodio), 2-mercaptoetanol y la aplicación de calor, se desnaturalizan. La mayoría de las proteínas se unen al SDS a razón de 1.4 g SDS/g de proteína para formar compuestos con forma cilíndrica cargados negativamente. Ello resulta en un enmascaramiento de la carga intrínseca de las cadenas polipeptídicas, de tal forma que la carga neta por unidad de masa es aproximadamente constante, provocando que todas las proteínas adquieran una relación carga/tamaño muy similar, y que, por tanto, sólo se separen en función de sus masas moleculares. En un experimento de este tipo, se prepara el gel mediante un proceso de copolimerización vía radical libre de acrilamida y bis-acrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida) en presencia de persulfato de amonio (APS), seguido de entrecruzamiento con tetrametiléndiamina (TEMED). Se genera así un gel con una distribución determinada de tamaño de poro que depende mucho de la relación entre la concentración de poliacrilamida y agente de entrecruzamiento.

En esta tesis se ha utilizado la electroforesis 1D SDS-PAGE para determinar de una manera cualitativa y semi-cuantitativa, la cantidad y pesos moleculares de

las proteínas que se adhieren a la superficie de un liposomas mixto a diferentes tiempo de incubación (1, 30 y 60 min) en un medio biológico como puede es el suero humano, HP.

Metodología

Para la separación de las proteínas mediante la técnica de 1D SDS-PAGE, se usa un gel comercial pre-preparado al 12% de poliacrilamida (Mini-PROTEAN TGX *Stain-Free Precast Gels*). Después de preparar el complejo CL:HP, éste se resuspende con 50 μ L de disolución reguladora de carga LB 1X, se agita por 1 min en *vortex* y se calienta por 10 min a 100 $^{\circ}$ C a fin de eluir y desnaturalizar las proteínas. Después, la muestra se centrifuga por 2 min a 14000 rpm para eliminar cualquier partícula insoluble. Se carga 10 μ L de muestra en el pocillo correspondiente del gel. Como control, se adiciona 10 μ L de marcador de peso molecular de proteínas en uno o dos pocillos para la posterior determinación semi-cuantitativa del peso molecular de las proteínas encontradas en las muestras.

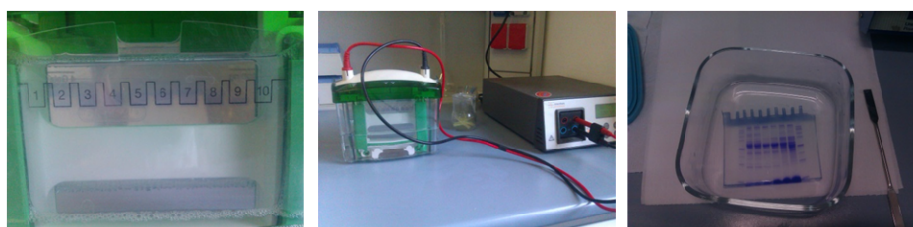


Figura 2.7. Cubeta para gel electroforesis 1D SDS-PAGE (izquierda y centro) y muestra final de gel de acrilamida teñido con azul de *Coomassie* (derecha).

Una vez cargadas las muestras, la electroforesis se lleva a cabo a una intensidad de corriente eléctrica de 20 mA durante 20 min y posteriormente de 30 mA por 40 min más. Después de transcurrido los 60 min, el gel se retira de la cubeta y se fija por una hora en 100 mL de una disolución de metanol: ácido acético: agua (MetOH:CH₃COOH:H₂O; 40:10:50). A continuación, el gel se deja durante toda la noche en un recipiente que contiene una disolución de azul de *Coomassie*, en un agitador de placas. Al siguiente día, se elimina la disolución de azul de *Coomassie* y se añaden 100 mL de ácido acético al 1% y se deja durante 30 min para eliminar el exceso de colorante en el gel (Figura

2.7). Finalmente, se realiza una fotografía al gel 1-D y la determinación del peso molecular de las proteínas encontradas se realiza con ayuda del software Kodak (Rochester, NY, USA).

2.3.3 Anisotropía de fluorescencia

Fundamento

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se basan en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada. Cuando una población de fluoróforos se excita con luz linealmente polarizada, la probabilidad de excitación de una molécula de fluoróforo depende de la orientación relativa de su momento dipolar de absorción con respecto a la dirección del vector campo eléctrico de la luz de excitación. De este modo, se excitan preferentemente las moléculas de fluoróforo cuyo momento de transición está orientado en una dirección próxima a la del vector campo eléctrico de la luz de excitación, lo que se conoce como fotoselección.¹⁸ La excitación selectiva da lugar a una población de fluoróforos parcialmente orientada y por tanto a una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada. La anisotropía de fluorescencia, r , se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (2.4)$$

donde I_{VV} y I_{VH} son intensidades de fluorescencia de la emisión polarizada vertical y horizontalmente, cuando la muestra es excitada con una luz polarizada verticalmente y G es un factor de corrección del instrumento.¹⁸

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se han utilizado ampliamente para la obtención de información sobre la rigidez de las membranas lipídicas y la determinación de la temperatura de transición gel-fluido, característica de cada lípido.

Durante esta investigación se han realizado medidas de anisotropía para determinar el grado de fluidez de la membrana de liposomas y lipoplejos,

usando la sonda fluorescente DPH.¹⁸ Una disminución en la rigidez de la membrana genera una mayor capacidad de rotación de la sonda, y por tanto una disminución de la anisotropía.¹⁸⁻²⁰ El equipo utilizado fue un espectroscopio Perkin Elmer LS50B y controlado por el software FL Winlab (Figura 2.8).

Metodología

Una vez hidratados los liposomas mixtos con DPH y preparados los complejos correspondientes con DNA en un volumen final de 1.6 mL, se procede a realizar las medidas de anisotropía de fluorescencia tanto para liposomas mixtos como lipoplejos a dos composiciones molares ($\alpha = 0.2$ y 0.5) y diferentes relaciones de carga ρ_{eff} . Las medidas se realizan a diferentes temperaturas comprendidas entre 10 y 40 °C. A cada temperatura y a la longitud de emisión asignada, se recogen 36 valores de intensidad, polarizadas tanto en la excitación como en la emisión, con los polarizadores vertical-vertical, I_{VV} , y vertical-horizontal, I_{VH} . Gracias al programa informático incorporado al equipo, se puede convertir de forma automática estos valores de intensidad en valores de anisotropía mediante la ecuación 2.5, por lo que es necesario conocer el valor del factor G de cada disolución a las longitudes de onda de excitación y emisión fijadas. Este factor se determina como la media de al menos 10 valores experimentales obtenidos como la relación entre las intensidades de fluorescencia polarizada en la excitación y en la emisión con los polarizadores situados horizontal-vertical, I_{HV} , y horizontal-horizontal, I_{HH} .

Las medidas se deben realizar a una longitud de onda de excitación, λ_{exc} , de 360 nm y una longitud de onda de emisión, λ_{em} , de 430 nm. La apertura de las rendijas de excitación y emisión se asignan entre 2.5 y 5.0 nm. La velocidad de barrido usada es de 240 nm/min.

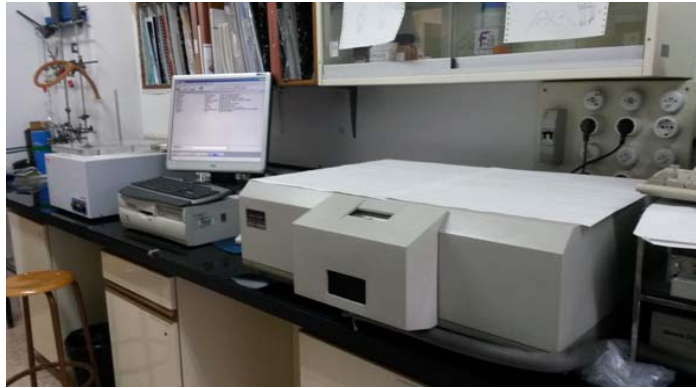


Figura 2.8 Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B para medir anisotropía de fluorescencia.

2.3.4 Microscopía Electrónica de transmisión

Fundamento

El *microscopio electrónico de transmisión* (TEM) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre una CCD que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento.

La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes. La imagen obtenida ofrece información sobre la estructura de la muestra, tanto si ésta es amorfa o cristalina. Para reducir el daño causado por la irradiación y para aumentar el contraste de la imagen, que suele ser pobre, resulta esencial preparar adecuadamente las muestras que se van a observar.²¹ Para obtener un buen contraste de la imagen obtenida por la dispersión de los electrones, es necesario realizar una tinción negativa de la muestra con un metal pesado, lo que se conoce como NS-TEM.

La técnica de *tinción negativa* (NS-TEM) consiste en sumergir la muestra en una disolución salina de un metal pesado (U, Mo o W) que desplaza al agua. El contraste se produce entre la disolución metálica, que dispersa fuertemente el haz de electrones, y la muestra que los dispersa poco. Sin embargo, los resultados obtenidos con la tinción negativa para algunos sistemas como los liposomas y lipoplejos no son lo suficientemente buenos. Esto es debido a una serie de inconvenientes que se presentan al analizar estas muestras, como son los problemas de tinción y los bajos niveles de contraste y la rápida degradación de las muestras producida por el choque del haz de electrones sobre la muestra. Es por ello que la técnica más ampliamente usada para la caracterización de liposomas y lipoplejos es la *crio-microscopía electrónica de transmisión* (Crio-TEM). Esta técnica permite visualizar y obtener información acerca de su estructura, morfología y tamaño con mayor resolución.

La *crio-microscopía electrónica de transmisión* (Crio-TEM) se basa en vitrificar la muestra a fin de conseguir un mejor contraste y disminuir los daños causados por radiación. Provocando congelaciones ultrarrápidas se consigue que el agua permanezca en forma vítrea, con lo que no aparecen cristales de hielo que dañen la muestra. Además no impone ninguna limitación a la resolución y la muestra se mantiene en la disolución fisiológica inicial.

Por estas razones, durante la realización de esta tesis doctoral la técnica más utilizada fue Crio-TEM. Para ello, se han utilizado el microscopio JEOL JEM-2011 del Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona (Figura 2.9).

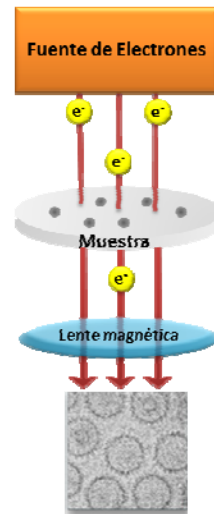


Figura 2.9 Microscopio electrónico de crio-microscopía JEOL JEM-2011 (izquierda) y diagrama de su funcionamiento.

Metodología

Los liposomas y lipoplejos se deben preparar de acuerdo al apartado 2.2, teniendo en cuenta que la concentración final de pDNA en la muestra debe ser de 1 mg/mL. Una vez formados los lipoplejos, las muestras se deben preparar siguiendo el procedimiento general propuesto por Dubochet et al.;²² Bednar y Woodcock;^{23,24} y Llorca et al,²⁵ descrito brevemente a continuación.

NS-TEM. En una rejilla de cobre se deposita una gota de la suspensión de lipoplejos y se deja 10 s, pasado este tiempo el exceso de muestra se seca al tocar la rejilla con papel filtro. A continuación, se añade una gota acetato de uranilo al 2.5 % y se deja reposar 30 s; de nuevo el exceso se retira con un papel de filtro y se deja secar al aire un par de minutos. Finalmente, las muestras se observan en el microscopio electrónico de transmisión a un voltaje de 80 a 100 kV.

Crio-TEM. Se toma una rejilla de cobre perforada recubierta de carbón (Quantifoil R1.2/1.3, diámetro de poro de 1.2 μm , con 400 agujeros cada una) y se aplica una descarga iónica sobre ella (Agar Scientific Ltd. Reino Unido) durante 1 min para favorecer así la adsorción de la muestra sobre su superficie. Se deposita 5 μL de muestra sobre la rejilla y se elimina el exceso con un papel de filtro durante 5 s. Para vitrificar la muestra, se sumerge la

rejilla con la muestra en etano líquido a -180 °C, utilizando un sistema de criotransferencia Gatan 626 (Gatan Inc., EE.UU). Las imágenes se obtienen con el Crio-TEM JEOL JEM 2011 operado a 200 kV, usando diferentes grados de desenfoque (500-700 nm) para obtener un contraste de fase adecuado. Las imágenes se graban con una cámara digital Multiscan Gatan 794 y los archivos se guardan en formato dm3.

2.3.5. Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

La dispersión de Rayos-X a bajo ángulo, junto con su distribución de intensidades, se utiliza para obtener información acerca del tamaño, forma y diversos parámetros estructurales de los lipoplejos, propiedades que se sabe tienen una clara influencia en la eficiencia de estos vectores lipídicos en la transfección celular (relación estructura-actividad biológica).

Con esta técnica se obtiene la intensidad y el vector de ondas, q (nm^{-1}), los cuáles se representan en difractogramas. Dichos difractogramas muestra los picos de Bragg, con índices de Miller característicos hkl , de intensidad I en función del vector de ondas q (nm^{-1}), relacionado con el semiángulo de dispersión, θ , y la longitud de onda de la radiación incidente ($\lambda = 0.995 \text{ \AA}$, $E = 12.6 \text{ KeV}$) a través de la ecuación 2.5.

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta \quad (2.5)$$

Conocidos los valores de q , a los que aparecen los picos en el difractograma, se puede saber qué tipo de fase presenta la muestra por comparación con los valores característicos para distintas fases tipo, recogidos en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Índices de Miller y valores típicos de q para los máximos de difracción correspondientes a las diferentes fases (L_α y H_{II}^c).

Lamelar (L_α)		Hexagonal (H_{II}^c)	
Índices de Miller (hkl)	Valores típicos de q (nm^{-1})	Índices de Miller (hkl)	Valores típicos de q (nm^{-1})
100	1	10	1
200	2	11	$3^{1/2}$
300	3	20	$4^{1/2}$
400	4	21	$7^{1/2}$
500	5	30	$9^{1/2}$
600	6	22	$12^{1/2}$
700	7	31	$13^{1/2}$

Los dos tipos de fases habitualmente encontradas en lipoplejos formados por liposomas catiónicos mixtos y plásmidos y/o DNA lineal de doble hebra son la fase lamelar, L_α , y la hexagonal inversa, H_{II}^c .^{26,27} En la Figura 2.10 se muestra un dibujo de dichas fases, conjuntamente con sus parámetros estructurales característicos.

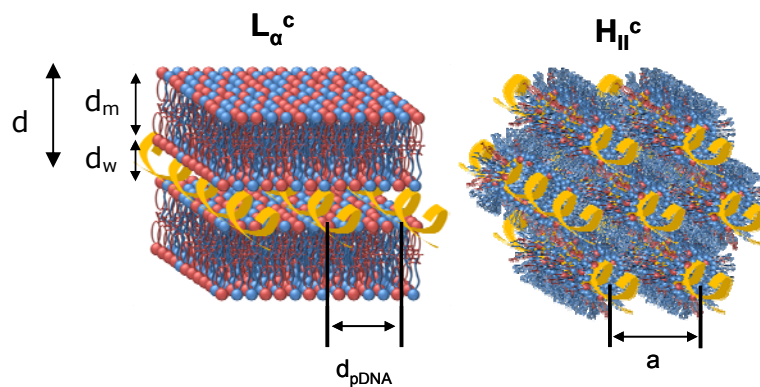


Figura 2.10 Parámetros característicos de las fases lamelar (L_α) y hexagonal inversa (H_{II}^c) de los lipoplejos.

En particular, a partir del valor de q del primer máximo de difracción observado en los difractograma es posible obtener el espaciado de la red d_{hkl} (en adelante, d), para cada tipo de fase con estas ecuaciones:

- para la fase lamelar L_α $d = \frac{2\pi}{q_{100}}$ (2.6)

$$\text{- para la fase hexagonal } H_{II}^C \quad d = a = d_{pDNA} = \frac{4\pi}{\sqrt{3}q_{10}} \quad (2.7)$$

A su vez, la distancia d , que en el caso de la fase L_α es la distancia entre bicapas lipídicas y en el caso de la fase H_{II}^C es la distancia entre centros de cilindros (también denotada como a), se puede desglosar en:

$$d = d_m + d_w \quad (2.8)$$

donde d_m , es el espesor de las bicapas lipídicas y d_w , el espesor de la fase acuosa donde se aloja el ctDNA o el pDNA.

El espesor de la bicapa lipídica, d_m , se puede estimar con modelos o medir experimentalmente (crio-TEM, por ejemplo), de tal forma que, a partir del valor de d , obtenido por SAXS y de la ecuación 2.8, se puede calcular d_w , valor que debe ser de un espesor suficiente para alojar a la doble hélice de DNA hidratada y que está directamente relacionado con el grado de compactación del biopolímero.

Por otra parte, el máximo de difracción del difractograma que no indexa con los de ninguna fase, corresponde a la correlación DNA-DNA, y su vector de ondas q_{DNA} permite obtener la separación entre las dobles hélices de DNA en la región acuosa de la fase lamelar L_α , d_{DNA} ($d_{DNA} = 2\pi/q_{DNA}$). Cabe mencionar que en el caso de la fase hexagonal H_{II}^C , $d_{DNA} = d = a$, es decir, como las hélices de DNA se alojan en el interior de los cilindros micelares inversos, la distancia a la que se sitúan es, forzosamente, la misma que la distancia entre centros de cilindros, es decir, la d característica de la estructura.

Los experimentos de SAXS se llevaron a cabo en el sincrotrón *del European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) Beamline16 y Beamline26 , ubicado en Grenoble (Francia), y en el sincrotrón ALBA BL11-NCD ubicado en Barcelona, (España).²⁸

Metodología

Una vez preparados los liposomas mixtos, se procede a preparar los capilares para las medidas de SAXS. Se usan capilares de vidrio de 1.5 mm de diámetro y con un grosor de pared de 0.01 mm (Hilgenberg, Alemania). Se añade a los capilares 200 μg de pDNA (a partir de una disolución de 10 mg/mL) y la cantidad necesaria de liposoma mixto a fin de obtener la relación de cargas efectiva, ρ_{eff} , apropiada, tomando en cuenta que el volumen máximo del capilar es 70 μL por lo que la concentración de liposoma mixto debe ser lo suficientemente alta para añadir volúmenes iguales o inferiores a 50 μL . Después de agregar tanto el liposoma mixto como el DNA, los capilares se centrifugan durante 15 min a 4900 rpm para favorecer la aparición de sólido. Una vez hecho esto los capilares se sellan a la llama y se guardan a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis en SAXS. Este estudio se ha realizado a diferentes composiciones de liposoma mixto, α , y a diferentes relaciones de carga efectiva, ρ_{eff} .

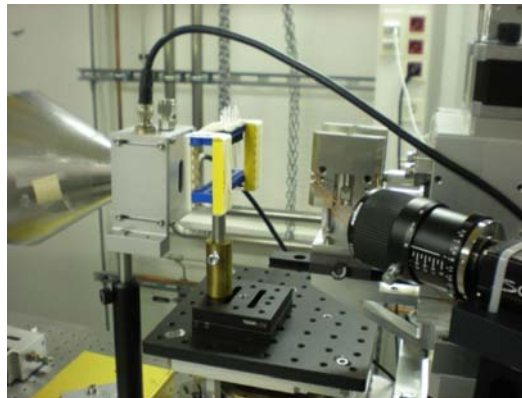


Figura 2.11. Colocación de capilares en el sincrotrón SAXS.

Las medidas de sincrotrón SAXS se realizan colocando los capilares en un soporte acondicionado para disponer varios capilares verticalmente, dispositivo que se coloca entre el haz de rayos X y el detector, en la cabina de medida de SAXS (Figura 2.11). Las condiciones de medidas se detallan en la Tabla 2.5

Tabla 2.5 Condiciones de medidas para diferentes líneas de SAXS.

Beam Line	ESRF BL16	ESRF BL26	ALBA BL11
Intensidad del haz	12.6 keV	12.6 keV	12.6 keV
λ	0.995 Å	0.995 Å	0.995 Å
Distancia detector	1.4 m	1.4 m	1.4 m
Detector	MARCCD 165	Pilatus 1M	Quantum 210r
Tiempo de adquisición	5-20 s	5-20 s	30 s

2.3.6 Nanocromatografía de líquidos acoplada a detector de masas-masas (nanoLC-MS/MS)

Fundamento

La *Nanocromatografía en fase líquida acoplada al tándem masas-masas*, conocida como nanoLC-MS/MS es una de las técnicas más ampliamente usadas en proteómica para el análisis de proteínas, puesto que permite su separación e identificación de forma rápida y con un alto grado de selectividad, sensibilidad y resolución. Gracias al desarrollo y acoplamiento de microcolumnas y nanosprays a las técnicas tradicionales de LC y MS, se ha podido desarrollar la técnica de nanoLC-MS/MS, que ha incrementado ampliamente la sensibilidad y resolución del análisis de proteínas en muestras complejas.²⁹

El sistema nanoLC-MS/MS se basa en dos procesos: una cromatografía 2D en fase líquida y una espectrometría de masas, perfectamente acopladas. La cromatografía 2D-LC consiste en la separación de los péptidos por la acción de dos columnas, la primera una columna de intercambio catiónico y la segunda una columna de fase reversa, cuya salida se somete a la detección final mediante un espectrómetro de masas.

Mediante espectrometría de masas (MS) se puede identificar cada proteína con una elevada precisión. En la técnica de MS, la muestra es vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor, y posteriormente ionizada y fragmentada (y por tanto destruida) mediante distintos métodos, entre los que

destaca el bombardeo de la muestra con una corriente de electrones a alta velocidad (EI), los métodos de electrospray (ESI) o la ionización por láser (MALDI). Los iones (moléculas o fragmentos cargados) son entonces conducidos mediante un acelerador a un tubo analizador curvado sobre el que opera un fuerte campo magnético, y de ahí a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones. Los efectos de un campo electromagnético en el movimiento de un ion son directamente proporcionales a la masa del ion e inversamente proporcionales a su carga eléctrica. Por lo que, un espectro de masas de un compuesto consiste en un gráfico de la abundancia del ion respecto a su relación m/z , del cual se puede deducir su peso molecular (MW). La separación de los diferentes iones se basa en la relación:

$$\frac{m}{z} = \frac{H^2 r^2}{2V} \quad (2.9)$$

donde H es la intensidad del campo magnético, r el radio de deflexión del tubo analizador y V es el potencial de aceleración utilizado.

Una vez realizada la separación de los iones es necesario hacer la identificación de las proteínas. Dicha identificación se realiza con los fragmentos producidos por CL-MS/MS, y la aplicación de programas informáticos disponibles comercialmente, tales como MASCOT o SEQUEST. Estos algoritmos comparan los datos de m/z obtenidos con las bases de datos de proteínas disponibles (SwissProt, NCB). De acuerdo al grado de similitud entre la proteína de la muestra y la presente en la base de datos, cada uno de estos algoritmos asigna un puntaje y el porcentaje de cobertura de la proteína a partir de los péptidos identificados.

En esta tesis, se ha utilizado esta técnica para analizar la composición cualitativa y cuantitativa de las coronas proteicas en función del tiempo de los liposomas mixtos DC/Chol-DOPE. Con tales fines, se usó el nanoLC-MS/MS Dionex Ultimate 3000 instruments (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), con automuestreador termostatzado y el detector de espectrometría de masas

LTQ-orbitrap XL instrument (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). El software utilizado fue *Proteome Discoverer* (v.2.07 ThermoFisher) (Figura 2.12)

Metodología

Después de la incubación de los liposomas mixtos con el suero, y de su lavado, el *pellet* obtenido se resuspende en 40 μ L de Urea 8 M en NH_4HCO_3 50 mM (pH=7.8). A continuación, se añaden 10 μ L DTT 200 mM con 8 μ L de iodo acetamina, IAA, 200 mM y la muestra se diluye con NH_4HCO_3 50 mM para obtener una concentración final de Urea de 1 M. Para realizar la digestión de la mezcla, se añaden 2 μ g de tripsina y se deja incubando toda la noche en un baño a 37 °C. La reacción enzimática se detiene añadiendo 3 μ L ácido trifluoroacético al 0.1% (TFA); después, la muestra se agita durante 3 s y se centrifuga durante 1 min a 14000 rpm.

Una vez digeridas las muestras, se procede a realizar la desalación, mediante el uso de una columna de sílica SPE C18, para extracción en fase sólida. La columna se lava con 1 mL de acetonitrilo (ACN) y se acondiciona con 1 mL de H_2O con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (v/v). Después, la muestra se pasa a través de la columna y se eluye con 500 μ L de H_2O :ACN (50:50 v/v) 0.05% TFA. Finalmente, se elimina todo el disolvente en un *Speed-Vac* (mod. SC 250 express, Thermo Savant, Holbrook) y se reconstituye la muestra con 100 μ L HCOOH 0.1%. Una vez hecho esto, la muestra se puede analizar o preservar a -80 °C hasta su análisis.

Para el análisis en nanoLC-MS/MS, se preconcentran 5 μ L de muestra en una μ -precolumna (Dionex) usando como fase móvil una mezcla H_2O :ACN 98:2 (v/v) con 0.1% de ácido acético, a un flujo de 10 μ L/min. La mezcla de péptidos se separa en una columna de sílica 75 μ m x 100 mm que opera a 250 nL/min. La separación se realiza con gradiente de elución, manteniendo los primeros 5 min una fase isocrática H_2O :ACN 95:5 e incrementando linealmente a H_2O :ACN 65:35 en 75 min, H_2O :ACN 20:80 dentro de 10 min y finalmente a H_2O :ACN 5:95 durante 10 min más para limpiar la columna.

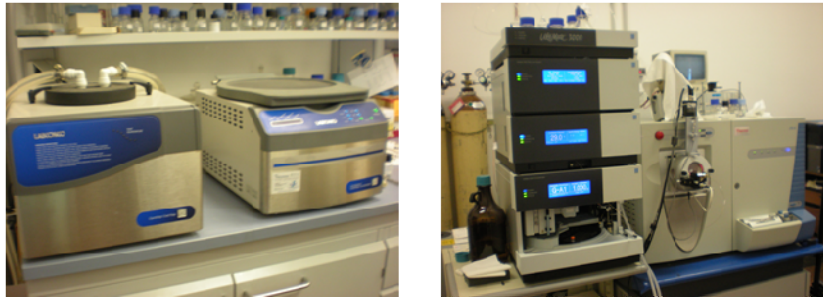


Figura 2.12. *Speed-Vac* (izquierda); *nanoLC-MS/MS* (derecha).

El espectrómetro de masas con una fuente de *nanospray* se opera en modo ión positivo. Los espectros de masa se adquieren en un rango de m/z de 350-1800 en el *Orbitrap* con la resolución fijada en 60000. Todos los espectros MS/MS se colectan usando una energía de colisión normalizada de 35% y una ventana de aislamiento de 2 m/z .

Análisis de datos

De cada muestra se realizan 5 medidas y los resultados obtenidos se analizan con el software *Proteome Discoverer*, a fin de identificar proteínas a partir de los espectros de masas de los fragmentos digeridos. Para ello se utiliza el motor de búsqueda o algoritmo *MASCOT* para procesar todos los datos obtenidos en el espectro de masas y generar una lista de picos y abundancia relativa, a partir de la base de datos *SwissProt*. Los picos representan los fragmentos de péptidos para una masa y carga dada. La búsqueda de proteínas en *SwissProt* se realiza en las entradas de humanos con la opción señuelo *built-in*, especificando la enzima proteolítica utilizada para la digestión, en este caso tripsina, y se establece la carbamidometilación de la cisteína y la oxidación de la metionina como modificación fija y variable, respectivamente. La tolerancia de masa monoisotópica para iones precursores e iones de fragmentación se establece en 10 ppm y 0.8 Da.

A fin de validar la identificación de proteínas derivadas de los resultados de secuenciación MS/MS y eliminar cualquier falso positivo, los archivos resultantes por *MASCOT* se envían al software comercial *Scaffold* (v3.1.2, *Proteome Software*). La herramienta de *Scaffold* se usa para integrar los

resultados de MASCOT con el motor de búsqueda *XITandem*. El análisis se realiza sólo considerando una identificación de proteínas basada en espectros de masas que se correlacionan con al menos dos péptidos trípticos únicos; la probabilidad mínima de identificación de péptidos se fija en 95%, y la probabilidad de identificación de proteínas en 99%. Para el análisis cuantitativo de proteínas, el software *Scaffold* permite realizar la normalización de conteo espectral (NSCs), y ofrece varias pruebas estadísticas para identificar las diferencias en la abundancia significativa entre dos o más categorías. El valor medio de NSCs de cada proteína que se obtienen de las tres réplicas experimentales se normaliza para el peso molecular de la proteína, MWNSC, y se expresa como la cantidad relativa de proteína después de aplicar la siguiente ecuación:

$$MWNSC_k = \frac{(NSC / MW)_k}{\sum_{i=1}^N (NSC / MW)_i} 100 \quad (2.9)$$

donde, $MWNSC_k$ es el porcentaje del peso molecular normalizado NSC para una proteína dada k , y MW es el peso molecular en kDa de la proteína k . Esta corrección tiene en cuenta el tamaño de la proteína y evalúa la contribución real de cada proteína reflejada en su abundancia relativa, RPA, en la corona de proteínas.

2.3.7 Cultivo celular y proceso de transfección

Antes de comenzar con los métodos experimentales utilizados para evaluar los niveles de transfección, es necesario describir las técnicas de cultivo celular y el proceso de transfección. La principal línea celular utilizada para los estudios de transfección durante esta tesis doctoral, fue la línea celular humana HEK293T (células embrionarias de riñón) y en algunos casos, los resultados fueron contrastados con las líneas celulares humanas HeLa (línea celular humana de cáncer cervical), CaCO-2 (línea celular epitelial humana de adenocarcinoma colorectal) y A549 (línea celular epitelial humana de adenocarcinoma de pulmón).

Las líneas celulares se conservan y cultivan de acuerdo a los protocolos estándares establecidos. Los estudios de transfección se realizan en placas de 24 pocillos, cultivando una cantidad 60000 células en un volumen final de 400 μL de DMEM con 10% FBS (150 células/ μL). Una vez cultivadas las células en la placa, se dejan en incubación durante 24 h antes de realizar el tratamiento con los vectores de transfección.¹⁴

En el caso de los experimentos realizados para los estudios de la corona de proteínas, se utiliza la línea celular PC3 (células de cáncer de próstata), la cual se cultiva en placas de 12 pocillos. Para ello, se pone una cantidad de 200000 células en 1 mL de DMEM con 10% de FBS durante 24 h.

Una vez preparados los cultivos celulares y liposomas, se procede a realizar la **transfección** (Figura 2.13). Primero se preparan los lipoplejos, para lo que se mezclan cantidades adecuadas de liposoma mixto y DNA en un eppendorf a fin de tener las diferentes relaciones de carga efectiva, ρ_{eff} , necesarias, manteniendo constante la cantidad de DNA por pocillo (0.8 μg para placas de 24 pocillos y de 0.2 μg para placas de 96 pocillos). Se debe agregar la cantidad necesaria de DMEM a fin de tener un volumen final de 100 μL para cada pocillo. Posteriormente, los lipoplejos se dejan reposar durante 30 min (Figura 2.14). Pasado este tiempo, se adicionan otros 100 μL de DMEM para los estudios sin suero (-FBS) y, 80 μL de DMEM con 20 μL de FBS para los estudios en presencia de suero (DMEM con 10 % +FBS). Para tener resultados estadísticamente significativos, cada muestra debe prepararse por triplicado.

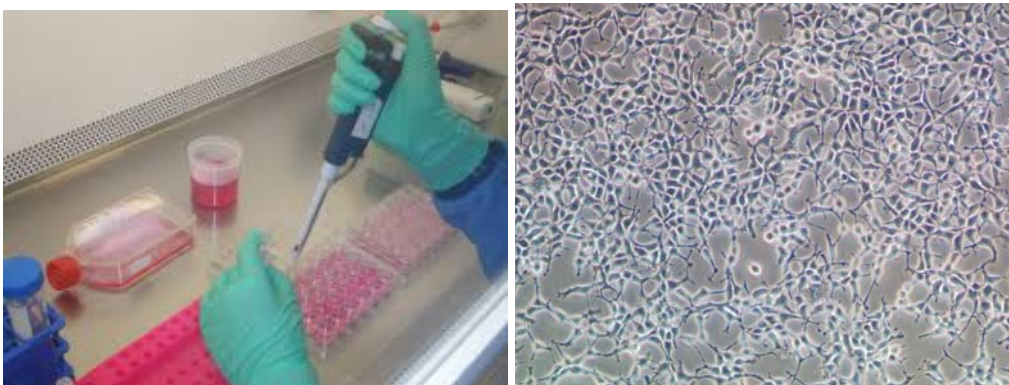


Figura 2.13. Proceso de cultivo celular (derecha) e imagen de células HEK293T (izquierda).

Durante los 30 min de formación de los lipoplejos, las células se sacan de la incubadora y se lavan. Una vez lavadas las células, se añade medio nuevo y se incuban las muestras durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se elimina la disolución de cada pocillo, excepto la de los controles y se lavan las células. Después de esto se añade nuevo medio con 10% de suero y antibiótico y se dejan incubando por 42 h más.

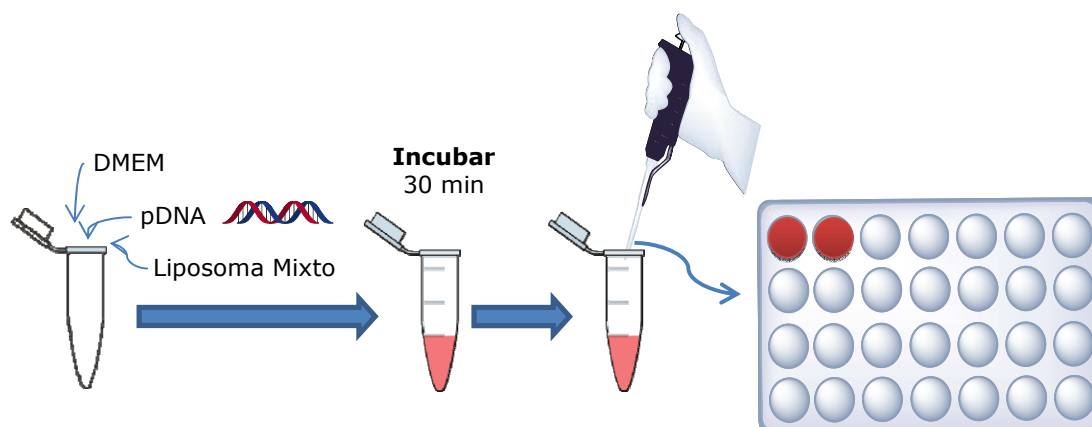


Figura 2.14. Proceso de preparación de lipoplejos para transfección

Pasadas las 48 h totales de incubación se realizan los experimentos de cuantificación de transfección y viabilidad celular mediante las técnicas comentadas a continuación. Los controles se prepararon de la misma forma usando Lipofectamina2000; las cantidades usadas de Lipofectamina2000 fueron las recomendadas por el proveedor.

2.3.8 Citometría de Flujo (FACS)

Fundamento

La *citometría de flujo* es una técnica que permite que las células (500–4000/seg) pasen en fila dentro de un flujo a través del citómetro. Mientras esto sucede, se puede hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células, para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones

celulares particulares dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha propiedades intrínsecas de la célula como la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia, como es el caso que nos ocupa. Al mismo tiempo, es posible separar las distintas poblaciones celulares de la muestra analizada. Estas ideas son la base de la técnica conocida como FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). El FACS proporciona datos tales como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia.

Para llevar a cabo lo anterior, el equipo requiere (como cualquier citómetro de flujo) de un sistema combinado de flujo, óptica y electrónica. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica y la digitaliza para el análisis en computadora (*Beckton Dickinson Immunocytometry Systems*, 1995). El sistema de citometría de flujo está compuesto por cinco unidades principales: una fuente de luz (lámpara de mercurio o láser), flujo celular, unidad de filtros ópticos para la detección de longitudes de onda específicas, fotodiodos o fotomultiplicadores para la amplificación de la señal y una unidad de operación y procesamiento de datos.

En esta tesis doctoral, la técnica FACS se ha empleado para evaluar si el vector catiónico utilizado es capaz de transfectar células vivas, y qué eficiencia presenta en dicha transfección, proceso que no sólo implica la vehiculización del plásmido pEGFP-C3 a través de la membrana celular hacia el núcleo, sino su posterior liberación y la expresión de la proteína GFP, cuya emisión fluorescente en el verde del espectro visible es característica, medible y cuantificable.

FACS proporciona dos propiedades complementarias que nos informan sobre la eficacia de la transfección celular, es decir, sobre el nivel de expresión de la GFP obtenido:

- i) el % GFP, que es una medida de la expresión de la GFP en las células transfectadas, con respecto a la emisión fluorescente residual de las células, es decir, nos informa del % de células transfectadas, y
- ii) MFI (*mean fluorescent intensity*), que es indicativa de la intensidad promedio de la fluorescencia por célula.

Todos los estudios de este apartado se llevaron a cabo en ausencia y presencia de suero con células *in vitro*, cubriendo un amplio intervalo de los parámetros estudiados en la caracterización previa, es decir, a distintas α , distintos ρ_{eff} , para todos los lipoplejos estudiados en esta tesis doctoral. El objetivo es establecer correlaciones que ligen máximos de transfección con determinadas características estructurales del vector utilizado, de tal forma que se pueda ir dibujando un mapa de estructura-actividad biológica que permita en un futuro predecir de alguna forma la potencial capacidad de un determinado vector. De igual forma se utilizó esta misma técnica para determinar el porcentaje de internalización celular de los liposomas mixtos DC-Chol/DOPE en presencia de corona de proteínas.

De igual forma, esta técnica se ha utilizado para evaluar y cuantificar las diferencias de internalización celular de liposomas catiónicos mixtos marcados fluorescentemente, en presencia de corona de proteínas de diferentes composiciones.

Metodología

Pasadas las 48 h de tiempo de incubación de las células, la placa se saca de la incubadora, se elimina el medio de cada pocillo y se realiza un lavado adicionando 100 μ L de DPBS y 100 μ L de 1x tripsina, eliminando siempre el medio entre uno y otro. A continuación, se introduce la placa en la incubadora 1 min, y se adicionan 200 μ L de DPBS con 0.2 % de FBS en cada pocillo. La disolución de células se recoge y se pasa a tubos que se mantienen en hielo hasta su posterior medida en FACS.

Las medidas de FACS se realizan en un equipo BD FACSCalibur. Para ello, las muestras se colocan en el citómetro y se optimizan los parámetros de medida hasta conseguir la máxima intensidad de emisión de cada población celular. Finalmente se procede a obtener los resultados y gráficas con el software WinMD12.8.

Para la cuantificación de la internalización celular de liposomas catiónicos mixtos en presencia de su corona de proteínas, se utilizan liposomas marcados con NBD-DOPE. Para dicho estudio se utiliza la línea celular PC3 (cáncer de próstata), preparada en placas de 12 pocillos. Una vez preparados los complejos CL-HP, éstos se añaden a las células y se incuban durante 3 h. Pasado este tiempo, las células se tripsinizan y se lavan 2 veces. Finalmente, se analizan en el citómetro de flujo Beckman Coulter, (Fullerton, CA, EE.UU.). Los datos se procesan mediante el software FCS3 express (De Novo Software, Los Angeles, CA, EE.UU.).

2.3.9. Ensayo de viabilidad celular (Ensayo MTT)

Fundamento

El ensayo colorimétrico de reducción del Bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT),³⁰ es uno de los métodos más utilizados para la determinación de viabilidad celular (citotoxicidad). El estudio se basa en la reducción del MTT soluble por parte la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán. Las células se adhieren a los anillos de tetrazolio y forman los cristales morados de formazán que son insolubles en disolución acuosa. El formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas, permitiendo cuantificar la cantidad de MTT reducido por medio de un estudio colorimétrico, ya que debido a su reducción cambia de amarillo a morado.

La capacidad de las células para reducir el MTT es indicativa de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional, y da la medida de la viabilidad celular y de la toxicidad, es decir, se puede cuantificar las células que son

activas metabolitamente.³¹ Un aumento del número de células produce un aumento de la cantidad de formazán MTT formado, lo que implica un aumento de la absorbancia detectada (Figura 2.15).

El % de viabilidad celular se determina con un espectrofotómetro a una longitud de onda entre 500-600 nm (la absorbancia máxima depende del disolvente utilizado). Los resultados se expresan como % de células vivas:

$$\%viabilidad = \frac{A_{592} - A_{592control(DMSO)}}{A_{592controlcelular} - A_{592control(DMSO)}} \times 100 \quad (2.10)$$

Se debe utilizar un control del medio celular no tratado (% vida celular > 1), un control positivo (compuesto con citotoxicidad conocida) y otro negativo (el disolvente). Las medidas se hacen por triplicado.^{32,33}

La curva dosis-respuesta se calcula a partir del intervalo de concentración utilizado y la % de reducción del crecimiento celular. Se debe calcular la concentración a la cual se produce la reducción de la viabilidad celular en un 50 %, es decir, los valores de comparación se hacen sobre una base del 50 % de inhibición del crecimiento, IC₅₀, en las células tratadas con los agentes específicos. A partir de la curva dosis-respuesta, se deduce la efectividad del agente en causar la muerte o en cambiar el metabolismo de las células. Para ello se compara la cantidad de formazán morado producido por las células tratadas con un agente con otras células no tratadas que actúan de control.

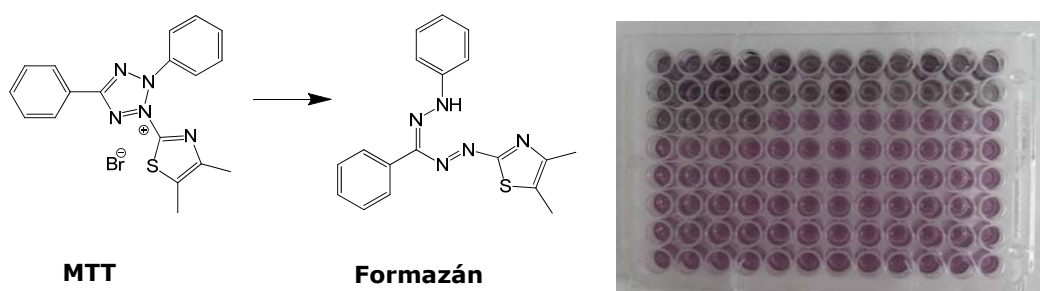


Figura 2.15. (Izquierda) Reacción celular de reducción del MTT. (Derecha) Ensayo MTT en placa de 96 pocillos.

Metodología

Para los estudios de viabilidad celular se usan placas de 96 pocillos, y las muestras se preparan de acuerdo al protocolo detallado en el apartado 2.3.2. Una vez pasado el tiempo de incubación de las células con el lipoplejo, se añaden 20 μL del reactivo MTT 4 % en DPBS (5 mg/mL) sobre la disolución celular sin eliminar el medio anterior en el que se encontraban las células. Una vez adicionado el MTT se incuba durante 4 horas en oscuridad. Pasado este tiempo, se elimina el medio de los 96 pocillos y se adiciona 200 μL de DMSO puro y se deja reposar 5 min a temperatura ambiente antes de su medición con el software Microplate Analyst del MTT BIO-RAD modelo 680. Es importante tener en cuenta que cuando el MTT se encuentra en su forma reducida, es decir, como formazán, la intensidad que se obtiene es máxima en el interior de las células vivas. Sin embargo, si la coloración es amarilla implica que el formazán no se ha reducido en el medio mitocondrial y las células están muertas, siendo su intensidad mínima. El equipo que se utiliza para determinar la viabilidad celular es el MTT-BioRAD modelo 680-Microplate Analyzer.

2.3.10 Microscopia de fluorescencia y microscopia confocal de fluorescencia (MCF).

Fundamento

La microscopía de fluorescencia es una herramienta que permite estudiar materiales fluorescentes, ya sea de manera natural (materiales autofluorescentes) o tratados con sondas fluorescentes. La principal diferencia de un microscopio de fluorescencia es que permite irradiar a la muestra con una longitud de onda deseada y después separar mediante el uso de filtros la luz fluorescente emitida (la cual es mucho más débil que la luz de excitación). De esta forma el ojo o el detector (usualmente una cámara digital) solo detecta la luz emitida. Como resultado, la parte de la muestra que presenta fluorescencia brilla contra un fondo oscuro con el suficiente contraste como para permitir su detección. El límite de detección del instrumento esta

principalmente determinado por el grado de oscuridad del fondo. La microscopía de fluorescencia permite alcanzar altos niveles de sensibilidad y resolución microscópica, por lo que es una herramienta muy poderosa y muy utilizada en la biología celular. En esta tesis doctoral se utilizó esta técnica para visualizar la expresión de la proteína GFP en las células transfectadas y de esta forma observar los niveles de transfección.

La microscopía confocal de fluorescencia (CFM) es otra potente herramienta de precisión para evaluar los niveles de transfección celular. Se trata de una técnica no destructiva que se engloba dentro de la microscopía de fluorescencia, que permite el estudio de muestras con marcaje fluorescente, haciendo secciones ópticas de las mismas, mediante la excitación de la muestra con un láser punto a punto por medio de un barrido. Su principal ventaja es que permite obtener imágenes de mayor calidad mediante técnicas de filtrado espacial que eliminan la luz que proviene de planos fuera de foco. Esto permite controlar la profundidad de campo y, además, obtener series de imágenes de la muestra cambiando el plano de foco. Se pueden obtener secciones ópticas de 0.5 a 1.5 micras de muestras fluorescentes de un espesor de aproximadamente 50 micras o más.

Son numerosas las aplicaciones de la microscopía confocal dentro de las ciencias biológicas (biología celular y molecular, fisiología, microbiología, etc.) ya que permite identificar y localizar componentes celulares *in vivo*. En particular, el uso de la microscopía confocal de fluorescencia, CFM, en esta investigación tiene por objetivo discernir si en las células transfectadas se ha liberado el plásmido de DNA y se ha expresado, produciendo en el citoplasma celular la proteína para la que está codificado (que en el caso que nos ocupa es la proteína GFP). Permite, por tanto, confirmar la liberación del pDNA en el interior celular y valorar la eficiencia del proceso de transfección. Los experimentos se realizan en las mismas condiciones que los llevados a cabo en el estudio de transfección anteriormente descrito. Previamente a la observación, los núcleos celulares se tiñen con yoduro de propidio, PI, y posteriormente se observan bajo microscopio confocal utilizando filtros

coloreados sensibles al rojo (PI) para los núcleos o al verde para el pDNA (GFP). Cuando se observa solo la coloración roja de los núcleos, significa que no se ha liberado ni expresado el plásmido. Sin embargo, si la célula posee una coloración verde implica que la mayor parte del plásmido ha sido liberado y expresado produciendo la proteína GFP. Cuando presentan una coloración amarillenta o anaranjada significa que no todo el plásmido ha sido liberado y expresado debido a que parte ha sido destruido por las DNAsas que se encuentran en el medio celular. Gracias a este estudio colorimétrico podemos, por tanto, dilucidar si un vector génico es o no eficiente como transportador y liberador del plásmido de DNA en el citoplasma celular.

Por otra parte, la MCF también se ha usado para determinar el papel que desempeña la corona de proteínas en la captación celular de liposomas catiónicos mixtos marcado fluorescentemente.

Metodología

El protocolo de preparación de muestras para evaluar los niveles de transfección mediante la técnica de microscopia de fluorescencia y MCF son los mismos que para los estudios de FACS descritos en la sección 2.4.7.

En el caso de hacer el análisis de transfección mediante la microscopia de fluorescencia, una vez pasadas las 48 h de incubación, se coge la placa y se observa directamente al microscopio y se realizan las fotografías pertinentes.

Para la MCF, después de las 48 h de incubación, se retira el medio de los pocillos y se lavan las células con 500 μ L de la disolución reguladora DPBS, se dejan reposar durante 10 min en total oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se elimina el medio y se adicionan a cada pocillo otros 500 μ L de p-formaldehído al 4% y se incuba durante 10 min (tapado con papel de aluminio). Con objeto de aumentar la permeabilización de la membrana y permitir la entrada de la sonda PI, las células se lavan de nuevo con DPBS durante 10 min; posteriormente, se incuban con 500 μ L de Triton-X-100 al 0.1% durante 5 min y se repite el lavado. Transcurrido este tiempo, las células

se incuban durante 5 min con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI para teñir de manera específica el núcleo de las mismas. Pasado este tiempo, las células se lavan de nuevo con DPBS eliminar el exceso de PI.

Finalizado todo el proceso de preparación, incubación y tinción de las células, se procede a observar, medir y digitalizar la emisión de fluorescencia en el microscopio confocal. Para ello, se preparan cubreobjetos con las células procedentes de cada uno de los pocillos, y se procede a su medición con el microscopio confocal de fluorescencia Zeiss LSM 510-META.

Para la determinación de la internalización y localización celular de los liposomas mixtos en presencia de la corona de proteínas, se utilizan las líneas celulares PC3 sembradas en placas redondas de vidrio de 24mm. Para éste estudio se utilizan liposomas mixtos marcados fluorescentemente con NBD-DOPE (sección 2.2.1). Una vez preparados los complejos liposoma mixto:HP de acuerdo al protocolo descrito en la sección 2.2.3, éstos se añaden a las células y se dejan incubar durante 3h. Posteriormente, las células se fijan en PBS con paraformaldehído al 4% durante 20 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se observan en el microscopio Leica TCS SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemania).

2.4 Bibliografía

- 1 A. Colomer, A. Pinazo, M. A. Manresa, M. P. Vinardell, M. Mitjans, M. R. Infante and L. Perez, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 989-1002.
- 2 S. Bhattacharya and A. Bajaj, *Chem. Commun.*, 2009, 4632-4656.
- 3 E. Feitosa, F. R. Alves, A. Niemiec, M. Oliveira, E. M. S. Castanheira and A. L. F. Baptista, *Langmuir*, 2006, **22**, 3579-3585.
- 4 D. D. Lasic, *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997.
- 5 A. Rodriguez-Pulido, F. Ortega, O. Llorca, E. Aicart and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 12555-12565.
- 6 A. Rodriguez-Pulido, E. Aicart, O. Llorca and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 2187-2197.
- 7 A. Rodriguez-Pulido, A. Martin-Molina, C. Rodriguez-Beas, O. Llorca, E. Aicart and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 15648-15661.
- 8 A. L. Capriotti, G. Caracciolo, C. Cavaliere, P. Foglia, D. Pozzi, R. Samperi and A. Lagana, *J. Proteomics*, 2012, **75**, 1924-1932.
- 9 G. Caracciolo, D. Pozzi, S. C. De Sanctis, A. L. Capriotti, G. Caruso, R. Samperi and A. Lagana, *Appl. Phys. Lett.*, 2011, **99**.
- 10 G. Caracciolo, D. Pozzi, A. L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Foglia, H. Amenitsch and A. Lagana, *Langmuir*, 2011, **27**, 15048-15053.
- 11 A. L. Capriotti, G. Caracciolo, G. Caruso, P. Foglia, D. Pozzi, R. Samperi and A. Lagana, *Proteomics*, 2011, **11**, 3349-3358.
- 12 A. L. Capriotti, G. Caracciolo, G. Caruso, P. Foglia, D. Pozzi, R. Samperi and A. Lagana, *Anal Biochem*, 2011, **419**, 180-189.
- 13 G. Caracciolo, L. Callipo, S. C. De Sanctis, C. Cavaliere, D. Pozzi and A. Lagana, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 536-543.
- 14 J. W. W. Pollard, John M. , *Basic Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 1997.
- 15 H. Ohshima and K. Furusawa, *Electrical Phenomena at Interfaces. Fundamentals, Measurements, and Applications*, Marcel Dekker, New York, 1998.
- 16 M. von Smoluchowski, *Zeitschrift für Physikalische Chemie (Munich)*, 1918, **92**, 129.
- 17 P. d. P. Atkins, Julio, *Química Física*, Editorial Panamericana, 2008.
- 18 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Acad./Plenum, New York, 1999.
- 19 V. Borenstain and Y. Barenholz, *Chem. Phys. Lipids*, 1993, **64**, 117-127.
- 20 A. Rodriguez-Pulido, E. Aicart and E. Junquera, *Langmuir*, 2009, **25**, 4402-4411.
- 21 C. Gómez-Moreno Calera and J. Sancho Sanz, *Estructura de Proteínas*, Ariel, Barcelona, 2003.
- 22 J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell and P. Schultz, *Q. Rev. Biophys.*, 1988, **21**, 129-228.
- 23 J. Bednar, V. M. , S. A. Studitsky, G. Grigoryev, Felsenfeld and C. L. Woodcock, *Mol Cell*, 1999, **4**, 377-386.
- 24 J. Bednar and C. L. Woodcock, *Methods Enzymol*, 1999, **304**, 191-213.
- 25 O. Llorca, E. McCormack, G. Hynes, J. Grantham, J. Cordell, J. L. Carrascosa, K. R. Willison, J. J. Fernández and J. M. Valpuesta, *Nature*, 1999, **402**, 693-696.
- 26 D. Roux and C. R. Safinya, *J. Physiol.*, 1988, **49**, 307-313.
- 27 R. Podgomik, D. C. Rau and V. A. Parsegian, *Macromolecules*, 1989, **22**.
- 28 A. D. Cooper and T. M. Jefferies, *J. Chromatogr.*, 1993, **637**, 137-143.
- 29 Y. Ishihama, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1067**, 73-83.
- 30 J. H. Fentem, *Human Experimental Toxicology*, 1994, **13**, 445-449.
- 31 N. Jiménez, M. González, C. Fernández and J. López, *Biomecánica*, 2007, **15**, 63-71.
- 32 T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55-63.
- 33 F. L. Denizot, R., *J. Immunol. Methods*, 1986, **89**, 271-277.

Capítulo 3. Resultados

Capítulo 3. Resultados

Entre los distintos métodos para transfectar material genético al interior celular, los nanoagregados coloidales y/o supramoleculares se han revelado en los últimos tiempos como una alternativa plausible a los vectores víricos, habitualmente utilizados en el pasado. En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo una amplia caracterización biofísica y bioquímica de distintos vectores no virales, con el objetivo de encontrar agentes de transfección que ofrezcan altos rendimientos y bajos niveles de toxicidad. De esta forma, se han caracterizados diversos lípidos catiónicos gémini (GCLs) constituidos por grupos catiónicos de diversa naturaleza (lisina, amonio e imidazol) unidos a cadenas hidrofóbicas de variada longitud. De igual forma, se han caracterizado dos lípidos aniónicos (ALs) en presencia de entidades catiónicas di y/o multivalentes, así como de vectores supramoleculares con matriz lipídica de la familia de los calixarenos (CXs).

Con el fin de comprender un poco más acerca de las interacciones de los vectores no virales con los fluidos biológicos, adicionalmente a la caracterización biofísica y bioquímica de dichos vectores, se ha llevado a cabo un estudio de la evolución temporal de la corona de proteínas sobre un liposoma mixto formado por el lípido catiónico DC-Chol y el lípido zwitteriónico DOPE.

Todas las caracterizaciones se han realizado mediante las diferentes técnicas descritas en la sección experimental de esta tesis, seleccionando las más adecuadas para cada uno de los sistemas estudiados.

3.1 Vectores lipídicos basados en lípidos catiónicos gémmini (GCLs).

3.1.1 GCL derivado del aminoácido lisina: C₆(LL)₂/DOPE en ausencia y presencia de DNA (plásmido pEGFP-C3 y/o ctDNA).

Los vectores lipídicos formados a diferentes composiciones de GCL, C₆(LL)₂ y de fosfolípido zwitteriónico, DOPE, se han caracterizado en ausencia y en presencia de dos tipos de DNA (plásmido pEGFP-C3 y ctDNA). Tal y como se ha comentado en el capítulo previo, el C₆(LL)₂ posee dos cadenas hidrofóbicas saturadas y dos grupos catiónicos derivados del aminoácido lisina (Figura 2.1), mientras que el lípido coadyudante DOPE contiene dos cadenas hidrofóbicas con una insaturación en cada una de ellas y un grupo zwitteriónico de fosfoetanolamina (Figura 2.2). La elección de los liposomas mixtos C₆(LL)₂/DOPE se ha debido al interés en encontrar vectores lipídicos más biocompatibles, es decir, que mejoren la eficiencia de transfección y reduzcan los niveles de toxicidad. De hecho, el lípido catiónico gémmini C₆(LL)₂ ofrece un importante potencial al poseer dos grupos catiónicos derivados de lisina altamente biocompatibles.

Con objeto de conseguir lipoplejos potencialmente aptos para transfección, es necesario que presenten una carga neta positiva (es decir, que el total de cargas del GCL sea mayor a la carga del DNA) ya que los lipoplejos deben ser capaces de atravesar la membrana celular, también cargada negativamente. Tal y como se ha visto en el apartado 1.2.2.2 de la introducción, existe un valor de L/D que define la electroneutralidad del lipoplejo, $(L/D)_\phi$, donde las cargas positivas aportadas por el lípido catiónico se igualan a las cargas negativas del DNA ($\rho = 1$). Conocer el valor de este parámetro, característico de cada sistema, adquiere singular importancia dado que constituye el punto de inflexión en el que cambian muchas propiedades de los nanoagregados y el lipoplejo se convierte en un potencial agente de transfección. El valor de $(L/D)_\phi$ puede estimarse mediante las cargas y pesos moleculares de los lípidos y del pDNA haciendo uso de la ecuación 1.7 de la introducción, o bien determinarse experimentalmente mediante diferentes técnicas, como el

potencial zeta, la electroforesis en gel de agarosa y/o un ensayo de intercalación de bromuro de etidio. De todos ellos, el potencial zeta es la técnica más precisa y por ello la más ampliamente usada para determinar los valores de electroneutralidad.

Los valores de $(L/D)_\phi$ para los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -ctDNA y $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA se han estimado mediante la ecuación 1.7 y determinado experimentalmente a partir de la movilidad electroforética, que permite obtener el potencial zeta. La Figura 3.1 muestra el potencial zeta frente a diferentes relaciones de masa, L/D , para ambos lipoplejos a diferentes composiciones de GCL, α . Todas las gráficas presentan un patrón sigmoideal y una inversión del potencial zeta a una relación L/D que corresponde a $\rho = 1$, lo que ha permitido la determinación del valor de la electroneutralidad $(L/D)_\phi$ para los lipoplejos (Tabla 3.1). A partir de $(L/D)_\phi$ de cada lipoplejo formado con ctDNA, a dos valores de $\alpha = 0.2$ y 0.6 , y haciendo uso del protocolo detallado en la introducción, es posible determinar con la ecuación 1.8^{1,2} la carga efectiva del GCL, $q_{L^+}^+$. Los resultados revelan que el lípido catiónico $C_6(LL)_2$ presenta el total de su carga nominal disponible ($q_{L^+}^+ = 2$).

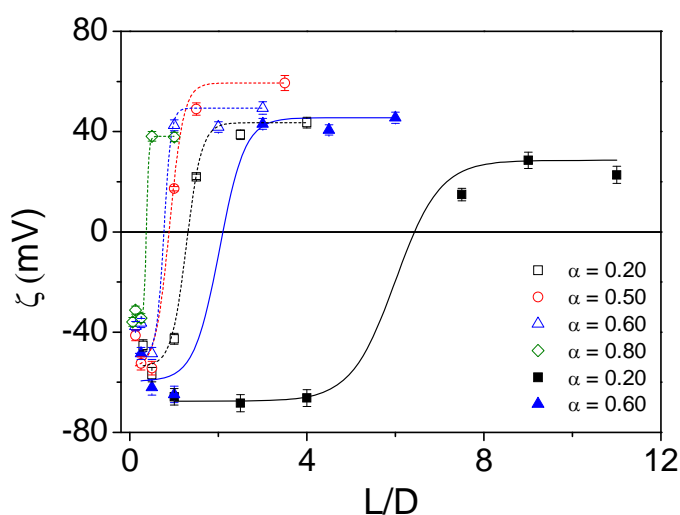


Figura 3.1 Valores de potencial zeta, ζ , frente a la relación L/D , para los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -ctDNA (símbolos sólidos) y $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA (símbolos vacíos) a diferentes composiciones de GCL, α .

Tabla 3.1 Valores de $(L/D)_{\phi, ctDNA}$, $(L/D)_{\phi, pDNA}$ y carga efectiva del pDNA, q_{pDNA}^- , para los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA a diferentes valores de α .

α	$(L/D)_{\phi, ctDNA}$	$(L/D)_{\phi, pDNA}$	q_{pDNA}^-
0.2	5.99	1.32	-0.45
0.25		0.84	-0.36
0.4		0.82	-0.55
0.5		0.9	-0.75
0.6	2.02	0.77	-0.77
0.8		0.37	-0.49

Los valores de electroneutralidad de los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA son considerablemente menores que los encontrados en los lipoplejos formados por ctDNA (Tabla 3.1). Como ya se ha comentado en la introducción de la tesis, la razón de estos valores más bajos está relacionada con la disminución de la carga efectiva del pDNA, ya que cuando el pDNA es compactado por liposomas catiónicos un porcentaje importante de sus contraiones sodio se mantiene asociado al plásmido.³ Una vez determinada la carga del GCL, el siguiente paso ha sido la determinación de la carga efectiva del pDNA, q_{pDNA}^- . Dicha carga se ha obtenido siguiendo el procedimiento detallado en la introducción, haciendo uso de los valores de electroneutralidad de los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA y de la ecuación 1.9.³ Los valores de la carga efectiva del pDNA a diferentes α se presentan en la Figura 3.2 y la Tabla 3.1. El valor promedio de la carga de pDNA, q_{pDNA}^- , es de -0.56 ± 0.15 por par de bases, es decir, aproximadamente un 25% de su carga nominal, e independientemente de α . Estos resultados están en concordancia con los valores del mismo pDNA en otros lipoplejos formados por lípidos comerciales, de síntesis, que posean un solo grupo catiónico o dos, como es el caso de otros lípidos gémmini.¹⁻³ La baja carga efectiva del pDNA ofrece una clara ventaja en términos de la cantidad de lípido catiónico requerida, es decir, se necesitará mucho menos lípido para compactar el pDNA, lo que a su vez se traducirá en una reducción de costes y sobre todo de la toxicidad celular generada por el vector.

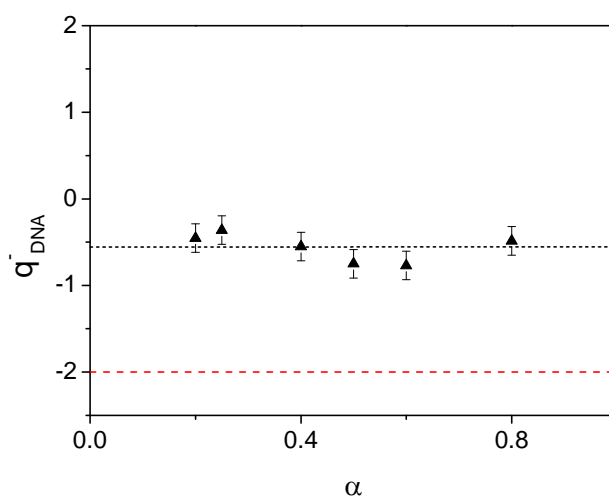


Figura 3.2 Carga efectiva del pDNA de los lipoplejos mixtos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA en función de α . La línea roja punteada corresponde a la carga nominal del ctDNA ($q_{\text{linearDNA}}^- = -2$ por par de bases).

De esta forma, podemos ver la gran importancia que tienen los estudios fisicoquímicos, ya que antes de realizar cualquier ensayo biológico, es necesario determinar la carga efectiva, tanto del GCL como del pDNA, a fin de optimizar los protocolos de preparación de lipoplejos, y trabajar con las relaciones de carga efectiva, ρ_{eff} , correctas.

Por otro lado, es bien sabido que la estructura y morfología de los lipoplejos juega un papel importante en la eficiencia de transfección.⁴⁻⁹ Por ello, con objeto de obtener el tipo de estructura y la morfología que presentan los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA se han realizado estudios de TEM (NS-TEM y Crio-TEM) y de SAXS. Los experimentos de Crio-TEM se han llevado a cabo con lipoplejos cargados positivamente a $\alpha = 0.2$ y 0.5 , mientras que las micrografías de NS-TEM se han obtenido con lipoplejos cargados positivamente a $\alpha = 0.5$. Una selección de las micrografías obtenidas mediante los ensayos de crio-TEM y NS-TEM se presentan en las figuras 3.3 y 3.4.

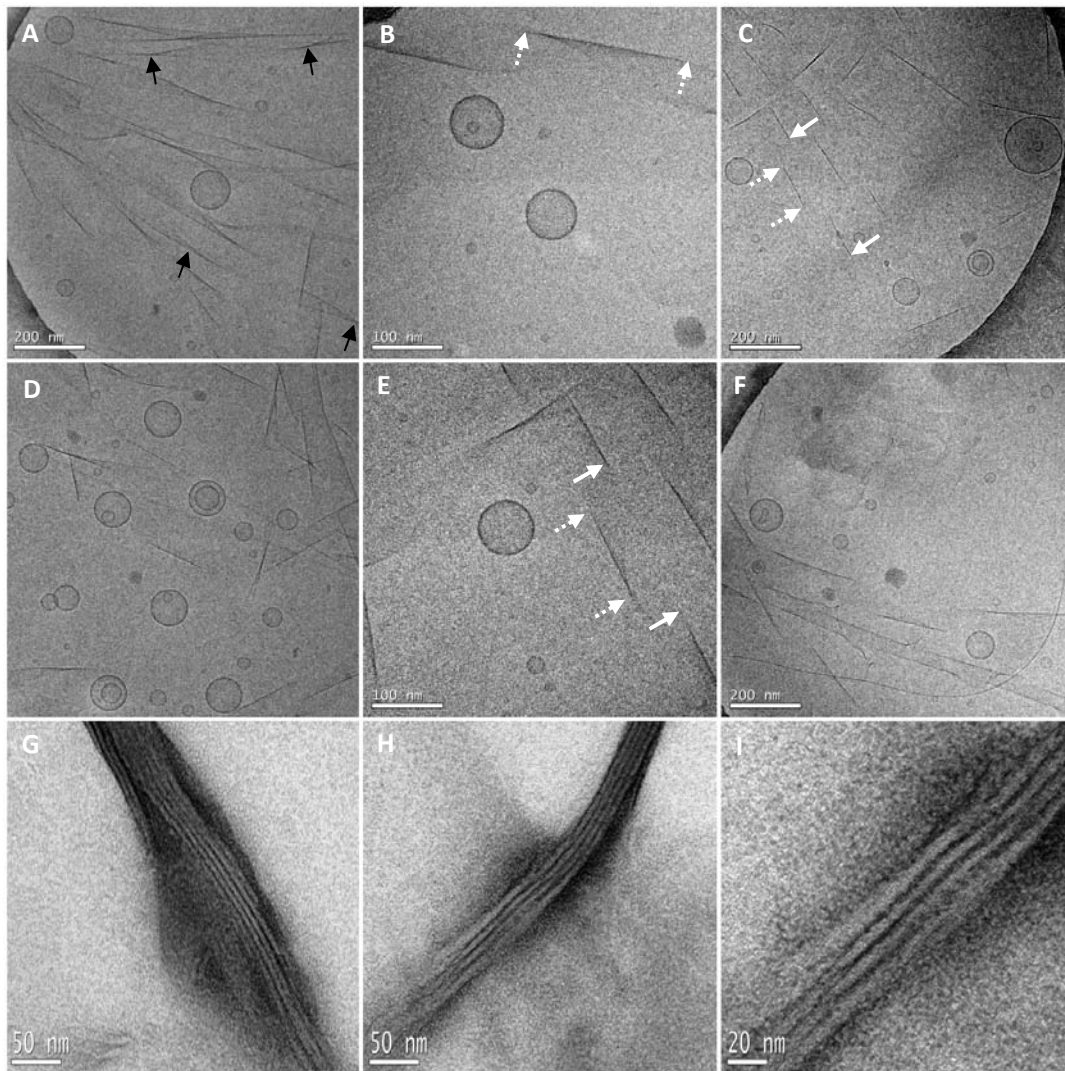


Figura 3.3 Selección de micrografías obtenidas mediante crio-TEM (paneles A-F) y NS-TEM (G-I) donde se muestra una visión general de los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE-pDNA$ a $\alpha = 0.5$. En los paneles A-F, las flechas negras indican el grado de torsión, t , de las estructuras tipo *t-ribbons*; las flechas blancas sólidas y punteadas indican el grado de torsión, P , y anchura de las estructuras tipo *c-ribbons* respectivamente.

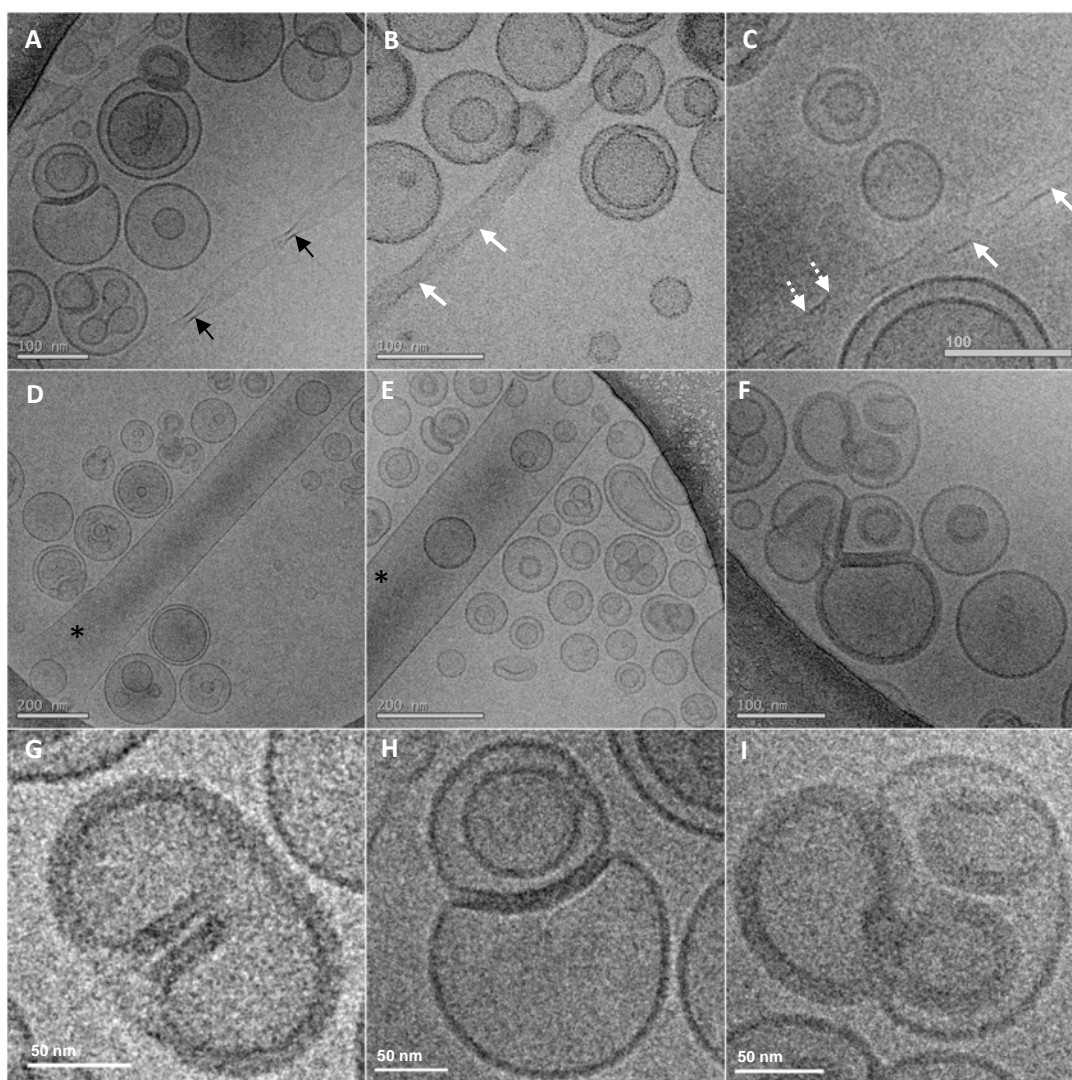


Figura 3.4 Selección de micrografías obtenidas mediante crio-TEM donde se muestra una visión general de los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE-pDNA$ a $\alpha = 0.2$. Se observa la presencia de estructuras tipo *ribbon type*, RB, (A-E) en coexistencia con las estructuras típicas CT de lipoplejos (F-I). En los paneles A-F, las flechas negras indican el grado de torsión, t , de las estructuras *t-ribbons*; las flechas blancas sólidas y punteadas indican el grado de torsión, P , y anchura de las estructuras *c-ribbons*, respectivamente; y con un asterisco se identifican los nanotubos.

Como se muestra en las micrografías existe un rico escenario de nanoestructuras, de modo que el contenido de lípido zwitteriónico DOPE desempeña un papel fundamental. Por un lado, se ha encontrado la presencia de una gran variedad de estructuras tipo *ribbon type*, RB, en un exceso de liposomas mixtos esféricos tanto a $\alpha = 0.2$ como a $\alpha = 0.5$. Dentro de las estructuras tipo RB podemos encontrar tres tipos diferentes: i) *twisted ribbons*, *t-ribbons*, ii) *coiled ribbons*, *c-ribbons*, y iii) nanotubos. Cada una de estas

estructuras presenta parámetros característicos que pueden relacionarse con la composición (Figura 3.5). Así, las *t-ribbons* presentan un grado de torsión *pitch*, t , que varía ligeramente con el contenido de $C_6(LL)_2$ (ver flechas negras). Las *c-ribbons* están caracterizadas por un grado de torsión, P y una anchura, δ (flechas blancas sólidas para P y punteadas para δ), con valores de $P = (100 \pm 20)$ nm y $\delta = (40 \pm 8)$ nm para $\alpha = 0.2$, y $P = (340 \pm 30)$ nm y $\delta = (190 \pm 50)$ nm para $\alpha = 0.5$. Como era de esperar, la anchura de las cintas, δ , es mayor cuando el contenido de CL se incrementa, es decir, cuando el valor α aumenta, lo que a su vez provoca una disminución en la curvatura de la torsión, induciendo un incremento en P . Finalmente, los nanotubos presentan un diámetro promedio, $w = (190 \pm 15)$ nm (asteriscos negros).

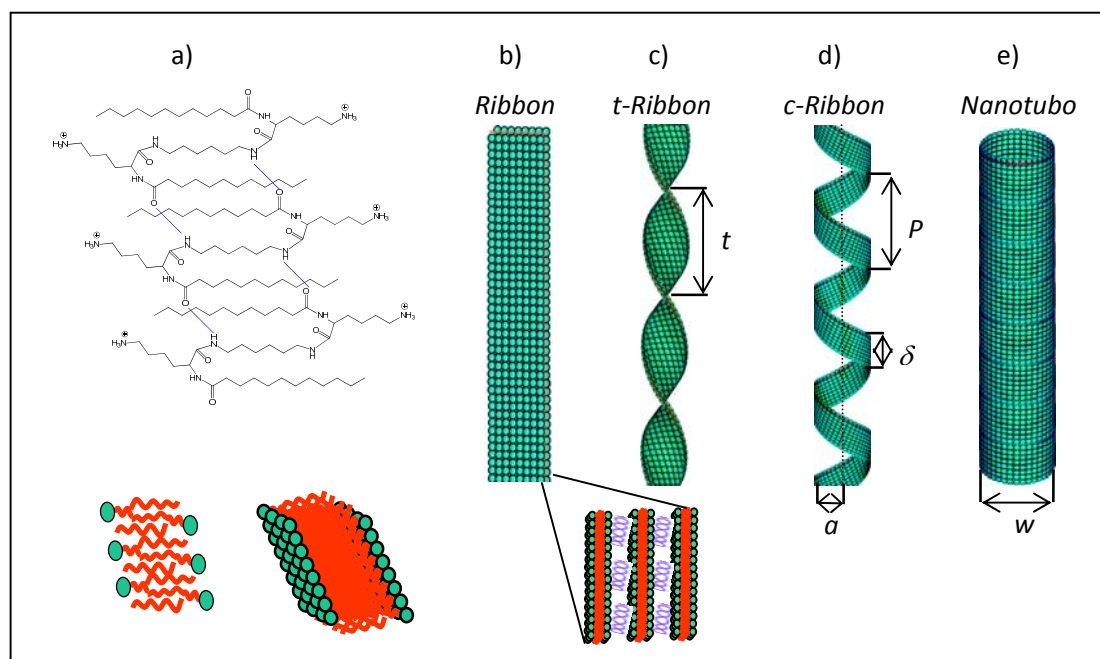


Figura 3.5 Representación gráfica del proceso de agregación en nanoestructuras tipo RB: a) Modelo para la agregación de $C_6(LL)_2$ mediante enlaces de hidrógeno que favorecen la aparición de estructuras tipo *ribbon type*, RB; b) Estructura básica de las *ribbons*, mostrando una vista ampliada de su forma multilamelar con el pDNA compactado entre las monocapas lipídicas. Esta morfología multilamelar permanece en el resto de nanoestructuras *t-ribbons*, *c-ribbons* y nanotubos; c) Estructura *t-ribbons*, mostrando el grado de torsión, t ; d) Estructura *c-ribbons* mostrando sus parámetros característicos: torsión, P ; anchura, δ , y el radio de la hélice, a ; y e) Nanotubo con diámetro, w .

Es de resaltar, que esta no es la primera vez que se encuentran estructuras tipo RB, ya que existen diversos trabajos en la bibliografía¹⁰⁻¹³ que documentan

este tipo de agregación para diferentes lípidos puros con grupos catiónicos quirales como es el caso de este GCL derivado de lisina $C_6(LL)_2$. Sin embargo, esta sí es la primera vez que estas estructuras se encuentran en una mezcla de lípidos y en presencia de pDNA, condiciones que obviamente amplían la variedad y morfología de las estructuras. También se ha observado que la unidad fundamental de cualquiera de las estructuras tipo RB (*t-ribbons*, *c-ribbons* o nanotubos) es una multicapa formada por varias monocapas lipídicas con el pDNA intercalado entre ellas. Esta estructura se produce debido a las fuertes interacciones electrostáticas provocadas por las cargas del GCL y del pDNA (Figura 3.5b). Con el fin de aclarar esta particular morfología, se han llevado a cabo experimentos de NS-TEM a $\alpha = 0.5$ (3.3 G-I). Los resultados muestran claramente el patrón multilamelar anteriormente mencionado, con una separación promedio entre las monocapas lipídicas de (5.9 ± 0.5) nm.

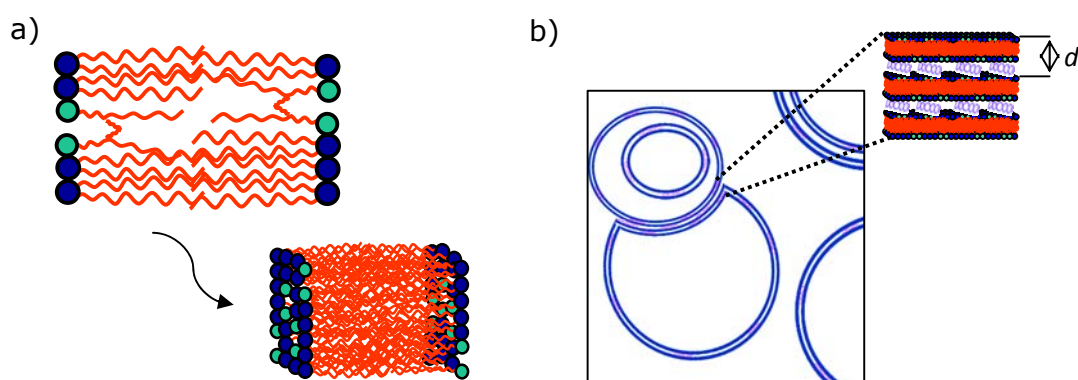


Figura 3.6 Representación gráfica del proceso de agregación en nanoestructuras tipo CT: a) Modelo para la agregación de $C_6(LL)_2$ en presencia de un contenido medio-alto de DOPE. La presencia de DOPE entre $C_6(LL)_2$ evita la formación de enlaces de hidrógeno haciendo que en lugar de formar las estructuras tipo RB, se formen las de tipo CT; y b) Representación de estructuras tipo CT mostrando, en vista ampliada, su carácter multilamelar con el pDNA compactado entre las bicapas lipídicas.

Cuando el contenido de GCL es bajo ($\alpha = 0.2$), adicionalmente a las estructuras multilamelares tipo RB también se observa una importante población de nanoestructuras que presentan un engrosamiento y deformación de las paredes. Esta característica apunta a la formación de los bien conocidos lipoplejos multilamelares tipo *cluster-type*, CT,¹⁴⁻¹⁶ constituidos por bicapas lipídicas mixtas con pDNA superficialmente compactado e intercalado entre las bicapas, donde los liposomas deforman su superficie sin llegar a romperse en

contacto con liposomas adyacentes. La Figura 3.6 muestra un esquema del patrón de agregación de las mezclas $C_6(LL)_2$ y DOPE, así como la estructura de los lipoplejos cuando está presente el pDNA.

Adicionalmente, se ha hecho un análisis de los patrones de periodicidad de las estructuras multilamelares tipo CT de algunas de las micrografías. Como ejemplo, la Figura 3.7 muestra un gráfico de los diferentes niveles de grises frente a distancia obtenidos para los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA a $\alpha = 0.2$. La presencia de varios picos en el gráfico revela la existencia de una serie de capas con un patrón de periodicidad, de modo que se ha podido calcular la distancia promedio entre picos, obteniendo un espacio promedio interlamelar de (6.2 ± 0.5) nm. Esta distancia confirma que en dicha estructura multilamellar existe suficiente espacio para albergar el pDNA.

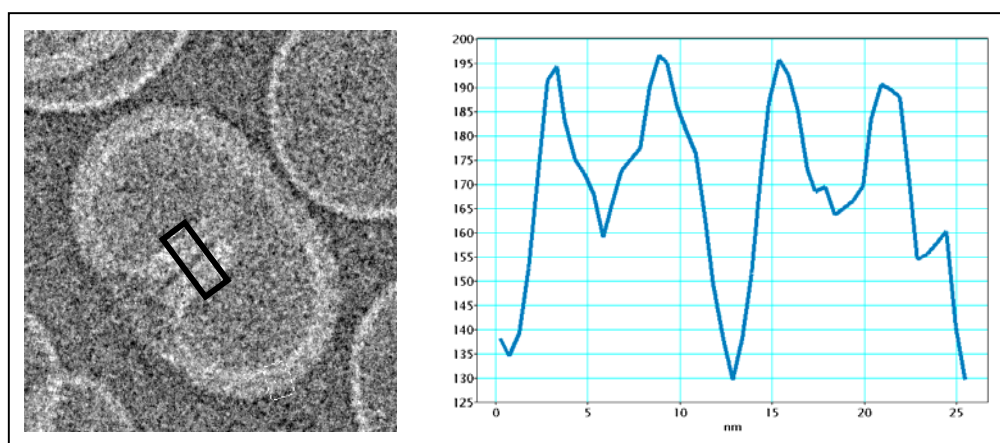


Figura 3.7 Detalles extraídos de las micrografías originales de crio-TEM de lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA a $\alpha = 0.2$. La figura de la derecha muestra la escala de grises en función de la distancia de la región seleccionada con el recuadro negro de la figura de la izquierda.

Los resultados de crio-TEM permiten concluir que la composición del liposoma mixto, es decir el contenido de DOPE, tiene un claro efecto en el proceso de agregación del $C_6(LL)_2$ y en consecuencia en la estructura final del lipoplejo. En concordancia con los datos publicados en la bibliografía¹⁰⁻¹³ para otros lípidos con grupos quirales, cuando la cantidad de DOPE es baja (valores medios-altos de α para el liposoma mixto) el $C_6(LL)_2$ tiende a agregarse esencialmente en estructuras tipo RB. En tales casos, el proceso de formación de *c-ribbons* o *t-ribbons* está principalmente gobernado por la presencia de enlaces de

hidrógeno entre los grupos NH-CO presentes en las unidades de lisina, lo que está en concordancia con los resultados de FTIR obtenidos por Danino^{12,13} para otros lípidos quirales similares (Figura 3.5).

Por otro lado, las moléculas de DOPE (a bajos α) se agregan principalmente en forma de liposoma (en las bicapas lipídicas) si bien un pequeño porcentaje participa en la formación de estructuras tipo RB. En las estructuras tipo RB, la presencia de DOPE junto con $C_6(LL)_2$ evita la formación enlaces de hidrógeno entre los grupos NH y CO, lo que provoca un diferente grado de torsión en las estructuras. Sin embargo, cuando el $C_6(LL)_2$ se mezcla con una cantidad apreciable de DOPE (bajos α), se observa la formación de liposomas mixtos y su agregación como lipoplejos con una estructura tipo CT, en coexistencia con agregados tipo RB. Por tanto, se puede deducir que la mayor parte de las moléculas de DOPE forman parte de las estructuras tipo CT. Los argumentos antes mencionados justifican la razón por la que a bajos α se pueden encontrar tanto estructuras tipo CT como las tipo RB, mientras que a mayores contenidos de GCL ($\alpha = 0.5$) sólo se encuentran estructuras tipo RB. Esta información es crucial para una correcta interpretación de los resultados obtenidos mediante SAXS que se mostrarán más adelante.

Adicionalmente tal como se observa en las figuras 3.5 y 3.6, la forma en la que se organizan las moléculas de $C_6(LL)_2$ dentro de la "pared" lipídica es considerablemente diferente según sea el tipo de estructura formada por el lipoplejo. De hecho, en los lipoplejos que forman las estructuras tipo RB, las moléculas de $C_6(LL)_2$ se organizan con sus grupos catiónicos apuntando a posiciones opuestas en las caras de una monocapa. Por otro lado, en los lipoplejos que forman las estructuras tipo CT, las moléculas de $C_6(LL)_2$ y DOPE forman la clásica bicapa lipídica, donde ambos grupos catiónicos de GCL se encuentran en la misma cara de la bicapa, unas moléculas en la cara interior y otras en la exterior. De acuerdo a esto, los espesores de la monocapa de $C_6(LL)_2$ y de la bicapa $C_6(LL)_2$ /DOPE se han podido estimar en 3 y 4 nm respectivamente. Considerando que la distancia interlamelar, d , determinada para estos lipoplejos es de 5.9 nm para la estructura tipo RB y de 6.2 nm para

la estructuras tipo CT, queda suficiente espacio (2.9 nm y de 2.2 nm para las estructuras tipo RB y CT, respectivamente) para albergar al pDNA.

A fin de obtener más información sobre la estructura de los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA, se ha llevado a cabo una serie de experimentos de SAXS, cubriendo un amplio intervalo de composiciones molares, α , y de relaciones de carga efectiva ($\rho_{eff} > 1$) a partir de la cual los lipoplejos son potencialmente activos como vectores en terapia génica. Como ejemplo, la Figura 3.8 muestra los difractogramas (intensidad frente a factor q) a $\rho_{eff} = 1.8$, para diferentes α (el resto de difractogramas para otros ρ_{eff} se presentan en la Figura A1 del Anexo 2). La correlación entre los máximos de difracción indica que los lipoplejos forman una fase lamelar, L_{α} , caracterizada por capas alternas de lípido mixto y pDNA, con una distancia interlamelar, d , (Figura 3.6) directamente relacionada con el factor q de los máximos de difracción ($d = 2\pi/q_{100}$). Esta distancia, d ($= d_m + d_w$) es la suma del espesor de la bicapa lipídica, d_m , y de la capa acuosa que contiene el pDNA, d_w .

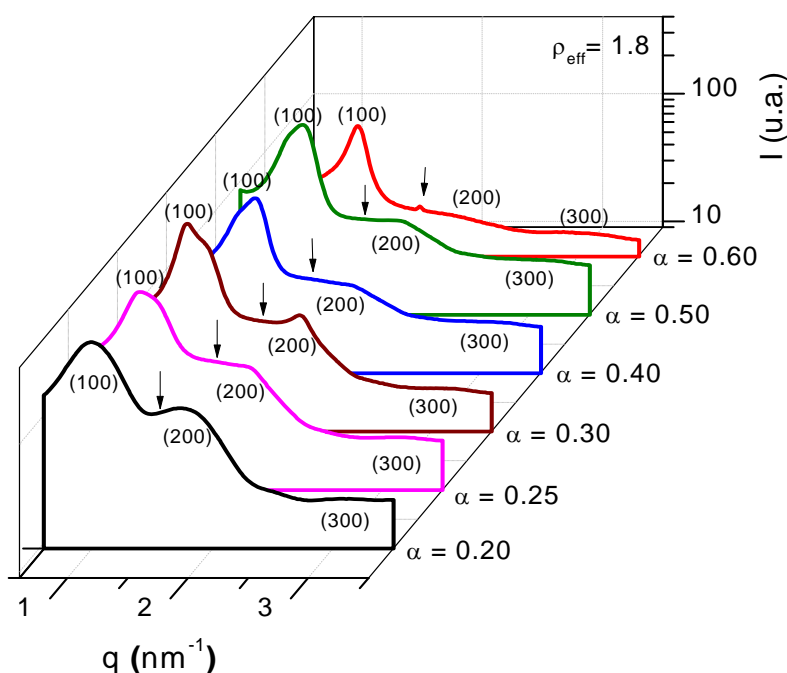


Figura 3.8 Difractogramas de SAXS para los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA a diferentes composiciones de GCL, α , y a una relación de carga efectiva, $\rho_{eff} = 1.8$.

Como se muestra en la Figura 3.8, los máximos de difracción son muy anchos, no son simétricos y presentan un desplazamiento hacia la derecha cuando α aumenta, lo que sugiere que cada pico es el resultado de al menos dos estructuras con parámetros de empaquetamiento muy similares. Por ello, el primer máximo de difracción de cada difractograma se ha interpretado como dos picos con valores de q cercanos, atribuidos a las dos estructuras multilamelares encontradas con crio-TEM y NS-TEM: estructura tipo CT para los lipoplejos formados principalmente por $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA y estructuras tipo RB para los lipoplejos $C_6(LL)_2$ -pDNA. Por consiguiente, el primer máximo de los difractogramas ha sido deconvolucionado en dos bandas superpuestas, y para ello se ha usado el software comercial Origin V.8 que permite aplicar un ajuste no lineal. La Figura 3.9 presenta las deconvoluciones para todas las α a una relación de carga efectiva $\rho_{eff} = 1.8$. Los resultados muestran que: (i) El máximo que aparece a bajos q , se encuentra a $q \approx 1.0 \text{ nm}^{-1}$ a todas las α y ρ_{eff} , por lo que debe ser asignado a la estructura tipo CT formada por los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA, ya que el valor de q es muy similar al encontrado en lipoplejos formados por una bicapa lipídica con DOPE;¹⁷⁻¹⁹ mientras que (ii) el pico encontrado a mayor q , que aparece a un valor $\approx 1.17 \text{ nm}^{-1}$ para diferentes α y ρ_{eff} , se ha asignado a la estructura tipo RB del lipoplejo $C_6(LL)_2$ -pDNA, ya que, al estar formada por una monocapa de GCL, los valores de q deben ser mayores (menor d) que los de la estructura tipo CT. La asignación de ambas estructuras es consistente con el hecho de que el área ocupada por el primer máximo disminuye cuando α aumenta, mientras que el segundo aumenta, es decir, la proporción de lipoplejos con estructura tipo CT disminuye con α mientras que los que poseen estructura tipo RB aumenta.

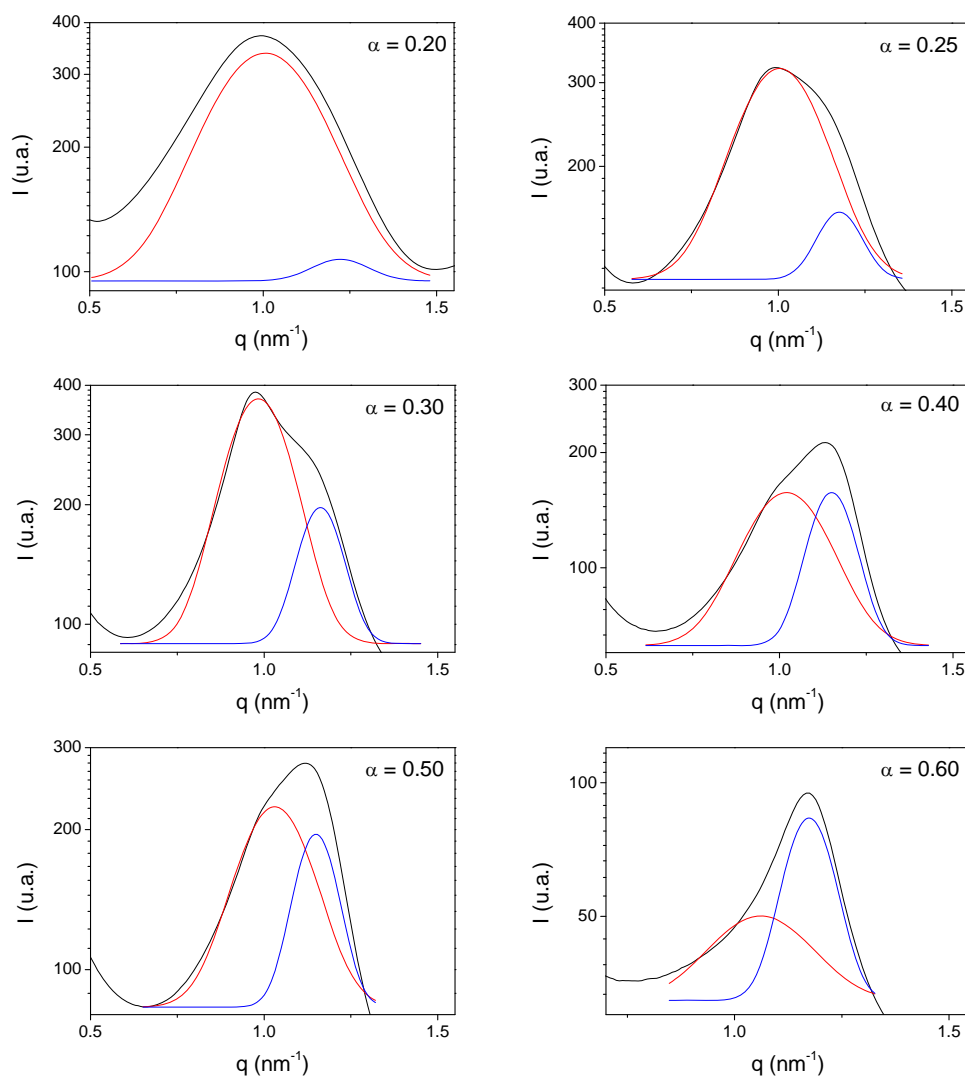


Figura 3.9 Deconvolución en dos bandas del primer pico de cada difractograma de los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE-pDNA$ a diferentes α y $\rho_{eff} = 1.8$

Una vez identificadas las dos estructuras lamelares, a partir de la ecuación 2.9 de la sección experimental se ha determinado la periodicidad interlamelar, d , de cada una de ellas. En la Figura 3.10 se muestran los valores de d en función de α para todos los ρ_{eff} . Los valores promedio de d , obtenidos para las estructuras tipo CT (Figura 3.10a) y tipo RB (Figura 3.10b), ha sido (6.3 ± 0.2) nm y (5.4 ± 0.2) nm, respectivamente, ambos resultados en buen acuerdo con los determinados mediante TEM.

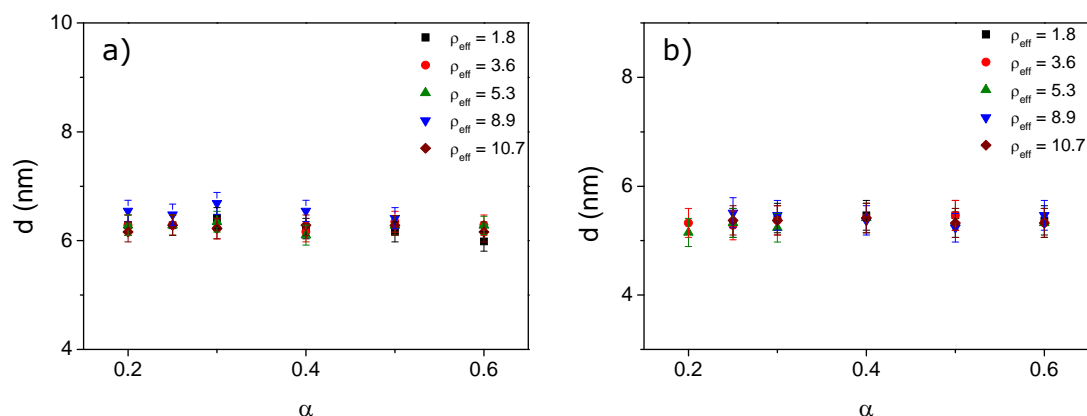


Figura 3.10 Distancia interlamelar calculada para cada una de las estructuras lamelares en función de α a diferentes relaciones de carga efectiva, ρ_{eff} , para a) lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA que forman estructura lamelar tipo CT; y b) lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA que forman estructura lamelar tipo RB.

El máximo de difracción ancho que no corresponde a ninguna de las fases lamelares, se debe a la interacción pDNA-pDNA. El valor del factor q_{pDNA} de dicho pico permite determinar la separación entre las hélices pDNA intercaladas en la monocapa acuosa ($d_{\text{pDNA}} = 2\pi/q_{\text{pDNA}}$). Sin embargo, como se han encontrado dos estructuras lamelares que contienen pDNA, la indexación de este máximo es compleja ya que, además, el pico es ancho y difuso. Por esta razón, no ha sido posible determinar la separación entre el pDNA en cada una de las dos estructuras lamelares de modo que se ha determinado un único valor de d_{pDNA} ($\approx 3.9 \pm 0.3$) nm (Figura 3.11), independiente de α y de ρ_{eff} .

Finalmente, los resultados de los experimentos de TEM y SAXS han permitido concluir que: (i) los valores del espaciado interlamelar, d , para las estructuras tipo CT presentan parámetros similares a los de lipoplejos formados por otros GCLs, DOPE y pDNA;³ (ii) El espaciado interlamelar en ambas estructuras es suficiente para poder albergar el pDNA entre las monocapas (estructuras tipo RB) y también entre las bicapas de lípidos (estructura tipo CT); y (iii) el promedio de los valores de d_{pDNA} es similar al encontrado en otros lipoplejos.¹⁴

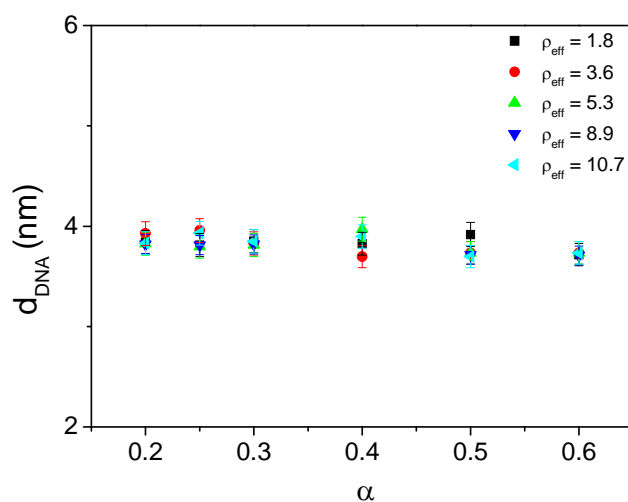


Figura 3.11 Valores de correlación DNA-DNA, d_{pDNA} , en función de α , para los lipoplejos $\text{C}_6(\text{LL})_2/\text{DOPE-pDNA}$.

Completada la caracterización biofísica experimental, se ha considerado conveniente aplicar al lipoplejo $\text{C}_6(\text{LL})_2/\text{DOPE-pDNA}$ diversos modelos teóricos y/o semiempíricos, tales como los modelos de Nguyen y Sennato, también conocidos como de agregación-desagregación, y/o la teoría de condensación de Manning (renormalización de cargas) usando el modelo *Jellium*. Estos modelos han sido desarrollados y adaptados recientemente por nuestro grupo para su aplicación en lipoplejos.^{14,15,19-24} A partir de dichos modelos, se ha determinado: (a) la carga neta de los lipoplejos, Q_c , formados por una molécula de DNA con carga, $-q$, y la carga positiva del liposoma mixto, Q ; y (b) la carga renormalizada, Q_{ren} , de los lipoplejos. De igual forma, se han obtenido las variaciones de la carga neta de los lipoplejos, ΔQ_c , en función de la composición del liposoma mixto, así como el valor de la carga del lipoplejo en los límites del régimen inestable, Q^* . En la Tabla 3.2 se presentan los resultados para los lipoplejos $\text{C}_6(\text{LL})_2/\text{DOPE-pDNA}$ y $\text{C}_6(\text{LL})_2/\text{DOPE-ctDNA}$ en función de α . Los resultados encontrados están en concordancia con los obtenidos mediante las medidas experimentales de potencial zeta.

Tabla 3.2 Cargas renormalizadas obtenidas mediante el modelo *Jellium*, Q_{ren} , parámetros fenomenológicos S_0 y E_0 y valores de Q^*/Q_{ren} y ΔQ_c para el lipoplejo $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA y $C_6(LL)_2/DOPE$ -ctDNA a diferentes α , haciendo uso de la capacitancia eléctrica, $C = 4.51 \times 10^{-14} C^2J^{-1}$.

Lipoplejo	α	$10^{15} Q_{ren}$ (C)	$10^{-14} S_0$ (part/l)	$10^{26} E_0$ (J)	$10^5 Q^*/Q_{ren}$	$10^{33} \Delta Q_c$ (C l/part)
$C_6(LL)_2/DOPE$ - pDNA	0.2	2.57	2.8	4.76	9.10	3.21
	0.5	2.74	2.74	3.99	8.05	3.30
	0.6	2.77	2.47	4.29	8.31	3.65
	0.8	2.8	1.41	2.28	6.02	6.45
Lipoplejo	α	$10^{15} Q_{ren}$ (C)	$10^{-14} S_0$ (part/l)	$10^{26} E_0$ (J)	$10^5 Q^*/Q_{ren}$	$10^{34} \Delta Q_c$ (C l/part)
$C_6(LL)_2/DOPE$ - ctDNA	0.2	2.57	12.7	1.85	3.99	3.47
	0.6	2.77	6.40	2.80	4.69	6.40

Como anteriormente se ha demostrado, la carga efectiva del pDNA es menor que su carga nominal y por ello para compactar el pDNA se requiere menos liposomas catiónicos mixtos que para compactar el ctDNA.³ Con el fin de profundizar en esta idea, el modelo de complejación también se ha aplicado a los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -ctDNA a $\alpha = 0.2$ y 0.6 . Para ello, se ha calculado el valor de q_{ren} del ctDNA (4.14×10^{-16} C) siendo aproximadamente el doble del obtenido para el pDNA (2.02×10^{-16}). Por otro lado, los valores de Q^*/Q_{ren} para los lipoplejos formados con ctDNA (Tabla 3.2) son menores que los de los lipoplejos con pDNA. Además, en dicha tabla también se observa que ΔQ_c es mayor con ctDNA que con pDNA. Estas características apuntan a que el proceso de complejación de los liposomas mixtos $C_6(LL)_2/DOPE$ con DNA depende fuertemente de la naturaleza del DNA. En particular, el proceso de complejación es más acusado con pDNA ya que la carga resultante es mucho mayor en lipoplejos con pDNA que con ctDNA, en contraste al valor de sus cargas renormalizadas en ausencia de liposomas (la del pDNA menor que la del ctDNA). Estos resultados pueden explicarse en términos de la diferente geometría que presentan ambos DNAs y de la forma en que interactúan con los liposomas catiónicos. Así, mientras que con el ctDNA se esperaría tener un lipoplejo en la forma tradicional (pelota de tenis),²¹ para el caso del pDNA se debe obtener una estructura más densa. Por otra parte, las repulsiones electroestáticas con cada tipo de DNA deberían dar lugar a diferentes

conformaciones en los lipoplejos resultantes. En resumen, la menor carga efectiva del pDNA, comparada con la del ctDNA, se traduce en una mejora de los procesos de complejación.³

Adicionalmente a la determinación de las propiedades biofísicas de los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA, es necesario llevar a cabo experimentos de transfección y viabilidad celular, para así determinar su eficiencia como potenciales vectores en terapia génica. Para ello, se han utilizado los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA a diferentes relaciones de α y ρ_{eff} para realizar experimentos de transfección y viabilidad celular del pDNA en presencia de suero, usando la línea celular HEK293T. Los resultados revelan que, a pesar de que los liposomas $C_6(LL)_2/DOPE$ compactan eficientemente el pDNA y que los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA presentan unos niveles de viabilidad celular comparables a los del control positivo Lipofectamina 2000 en presencia de suero, Lipo2000* (Figura 3.12), desafortunadamente no son capaces de producir un nivel significativo de transfección y, por tanto, puede concluirse que no son buenos candidatos como vectores no virales de pDNA. Estos resultados hasta cierto punto no son sorprendentes, ya que estudios previos han mostrado que los sistemas que presentan estructuras tipo RB no son los agentes más adecuados para transfectar el DNA.²⁵⁻²⁷

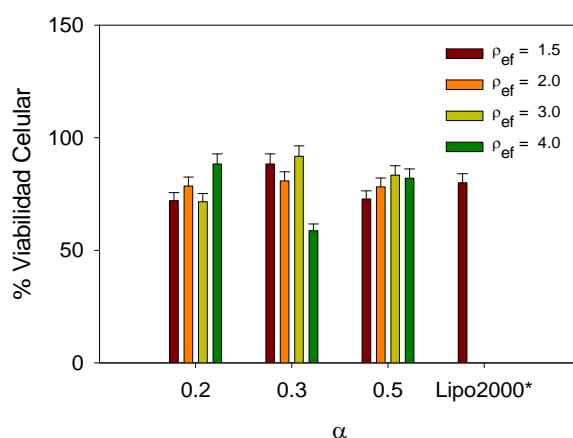


Figura 3.12 Viabilidad celular de los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA en función de α y ρ_{eff} y el control positivo Lipo2000*.

3.1.2 Lípidos catiónicos gémini con espaciadores oligo-oxietileno como vectores no virales.

Los lípidos catiónicos géminis (GCLs) usados en este apartado son dos series de compuestos que presentan dos grupos catiónicos separados por un espaciador oligo-oxietileno (Figura 2.1). La primera serie está integrada por tres GCLs, cada uno formado por dos grupos catiónicos amonio, dos cadenas hidrofóbicas de 16 átomos de carbono y un espaciador con diferentes número de oligo-oxietilenos en su estructura, referida como $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$, donde n indica la longitud del espaciador ($n = 1, 2$ ó 3). En la segunda serie de GCLs, referida como $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$, los dos grupos catiónicos son imidazol en lugar de amonio, siendo idéntico el resto de componentes (dos cadenas hidrofóbicas C_{16} y el espaciador oligo-oxietileno $(C_2O)_n$).

Por tanto, los lipoplejos estudiados en este apartado están formados por un liposoma mixto (integrado por una mezcla binaria de uno de los GCLs previamente descritos y el lípido zwiteriónico DOPE) y DNA (plásmido pEGFP-C3 o ctDNA).

La hipótesis de partida que justifica el uso de GCLs con espaciadores hidrofílicos es que estos lípidos pueden propiciar una mejora en la interacción de los lipoplejos con el DNA y con la membrana celular a fin de obtener mejores niveles de transfección del DNA.

3.1.2.1 Liposomas mixtos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$ /DOPE en ausencia y presencia de dos tipos de DNA (pDNA y ctDNA).

La serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$ /DOPE en ausencia y presencia de dos tipos de DNA (plásmido y ctDNA) se ha caracterizado electroquímicamente mediante experimentos de potencial zeta y gel electroforesis. El primer paso para la caracterización electroquímica de estos sistemas fue la determinación de la carga efectiva de cada uno de los GCLs de la serie. Para ello, inicialmente se midió el potencial zeta de los lipoplejos formados por liposomas mixtos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$ /DOPE en presencia de ctDNA a diferentes relaciones L/D (ver Figura 3.13). A partir de las curvas de la figura, se ha obtenido el valor de la

electroneutralidad, $(L/D)_\phi$, para cada sistema, en presencia de ctDNA, a $\alpha = 0.5$, recogido en la Tabla 3.3 y a partir de él y según el protocolo detallado en la introducción, se ha determinado la carga efectiva de cada GCL, $q_{L^+}^+$, valores que se recogen también en la Tabla 3.3. En promedio, la carga de los tres GCLs de la serie es 1.8 ± 0.1 , ligeramente inferior a su carga nominal ($q_{L^+}^+ = 2$), si bien se ha observado un ligero incremento de la carga efectiva con la longitud de la cadena espaciadora.

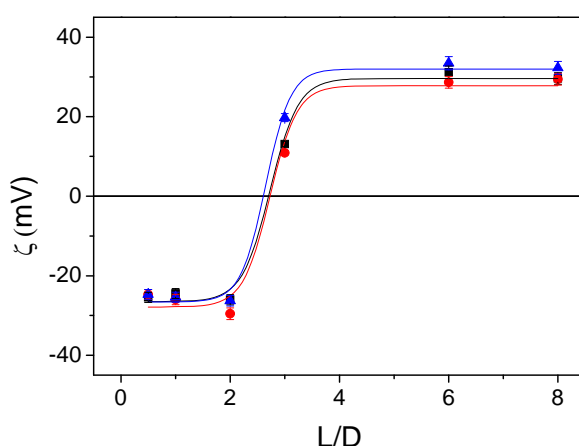


Figura 3.13 Valores del potencial zeta, ζ , frente L/D , a $\alpha = 0.5$, de los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -ctDNA, siendo $n = 1$ (cuadros negros); $n = 2$ (círculos rojos); y $n = 3$ (triángulos azules).

Tabla 3.3 Valores de $(L/D)_\phi$, cargas efectivas de los GCLs, $q_{L^+}^+$, y del pDNA, q_{pDNA}^- , para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, a diferentes valores de α .

GCL	n	α	$(L/D)_{\phi, ctDNA}$	$(L/D)_{\phi, pDNA}$	$q_{L^+}^+$	q_{pDNA}^-
$(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA	1	0.2	2.73	1.25	1.70	-0.37
		0.4		0.88	1.70	-0.52
		0.5		0.81	1.70	-0.59
		0.7		0.76	1.70	-0.77
	2	0.2	2.74	0.96	1.75	-0.29
		0.4		0.59	1.75	-0.35
		0.5		0.57	1.75	-0.42
		0.7		0.40	1.75	-0.40
	3	0.2	2.69	0.79	1.80	-0.25
		0.4		0.49	1.80	-0.30
		0.5		0.39	1.80	-0.30
		0.7		0.21	1.80	-0.29

Una vez obtenido $q_{L^+}^+$ para cada uno de los GCLs, se procedió a la determinación de los valores de electroneutralidad, $(L/D)_\phi$, de los lipoplejos formados por los liposomas mixtos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ y el plásmido pEGFP-C3 (pDNA) a diferentes composiciones α . La Figura 3.14 muestra las curvas de potencial zeta para cada uno de los sistemas que permiten obtener los valores de $(L/D)_\phi$ para los lipoplejos mixtos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA. Como era de esperar, estos valores son menores que los encontrados para los lipoplejos con ctDNA. Finalmente, a partir de estos valores de $(L/D)_\phi$, y siguiendo el protocolo descrito en la introducción,¹⁻³ se procedió a determinar la carga efectiva del pDNA, q_{pDNA}^- , en lipoplejos formados con cada GCL de la serie, a diferentes composiciones α . Dichos valores se recogen en la Tabla 3.3 y se muestran en función de α en la Figura 3.14d.

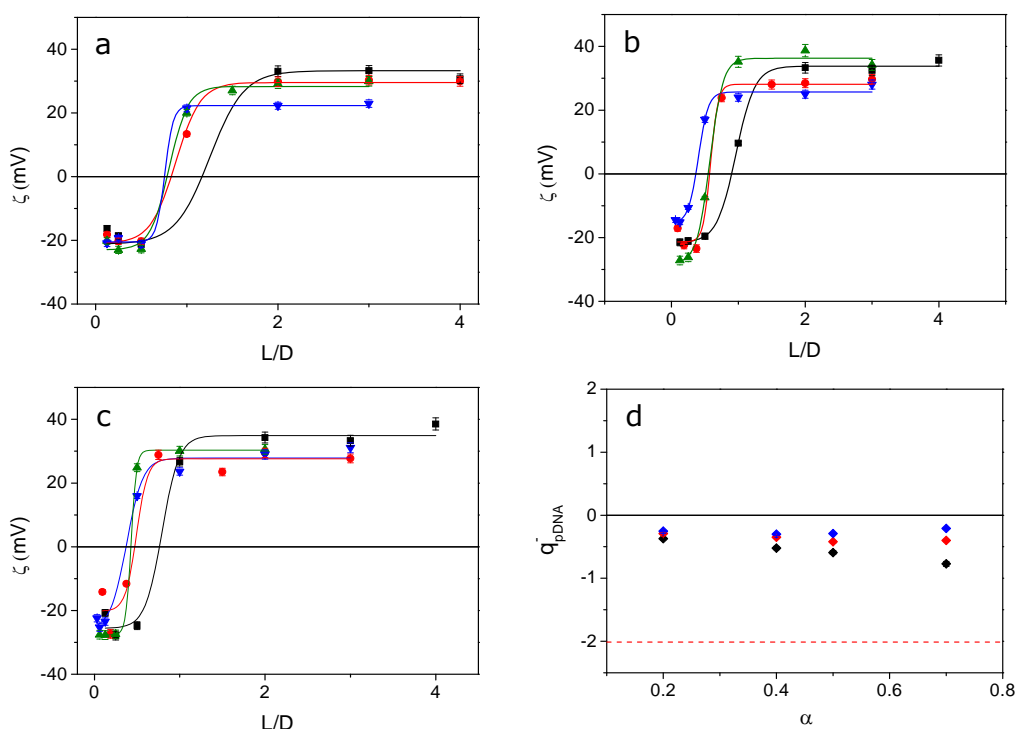


Figura 3.14. (a-c) Valores del potencial zeta, ζ , frente L/D , para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, donde a) $n = 1$; b) $n = 2$; y c) $n = 3$. A diferentes composiciones: $\alpha = 0.2$ (cuadros negros); $\alpha = 0.4$ (círculos rojos); $\alpha = 0.5$ (triángulos verdes); y $\alpha = 0.7$ (triángulos azules). d) Valores de la carga efectiva del pDNA, q_{pDNA}^- , para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA frente a α , siendo $n = 1$ (rombos negros); $n = 2$ (rombos rojos); y $n = 3$ (rombos azules), la línea roja discontinua corresponde a la carga nominal del ctDNA, $q_{ctDNA}^- = -2$.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que la carga efectiva del pDNA es solo un 15-30 % de su carga nominal (-2 por par de bases).¹⁻³ Para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, cuando $n = 1$ los valores de q_{pDNA}^- muestran una ligera disminución con α , mientras que para $n = 2$ ó 3 q_{pDNA}^- es aproximadamente constante. Además, a α constante, q_{pDNA}^- disminuye ligeramente con la longitud del espaciador. Estos resultados apuntan a que la carga efectiva del pDNA es dependiente de la carga del liposoma mixto, de modo que cuando α disminuye y/o el espaciador aumenta²⁸ la capacidad del liposoma mixto para acceder a las cargas del pDNA se ve comprometida, y por tanto se reduce la carga efectiva del pDNA (Figura 3.15). En cualquier caso, como ya se ha comentado previamente, estos resultados corroboran que, debido a la menor carga efectiva del pDNA, se requerirá también una menor cantidad de lípido catiónico para compactar el pDNA, lo que es muy beneficioso cara a su potencial uso en terapia génica, puesto que también se reducirá la citotoxicidad provocada por el lipoplejo durante el proceso de transfección.

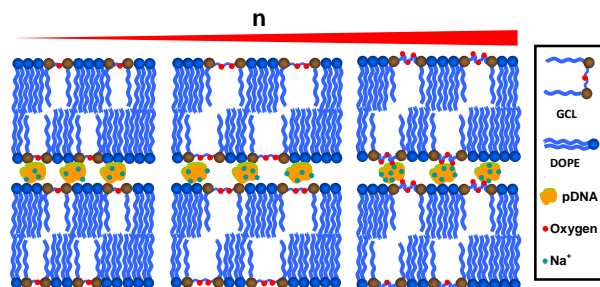


Figura 3.15 Esquema los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ con $n = 1, 2$ ó 3 .

Con objeto de corroborar los resultados obtenidos con potencial zeta, también se llevaron a cabo experimentos de electroforesis en gel de agarosa. A modo de ejemplo, en la Figura 3.16a se muestran los resultados obtenidos con el lipoplejo $(C_{16}Am)_2(C_2O)/DOPE-pDNA$. Se observa que, a valores de $\rho_{eff} \geq 1.5$, el pDNA se encuentra compactado de modo que la banda de pDNA se mantiene en el pocillo superior. Sin embargo, con el lipoplejo $(C_{16}Am)_2(C_2O)/DOPE-ctDNA$ (Figura 3.16b) se requiere una mayor cantidad de lípido mixto para compactar el ctDNA, ya que la banda en el gel aún se ve a valores de $\rho_{eff} = 2.0$.

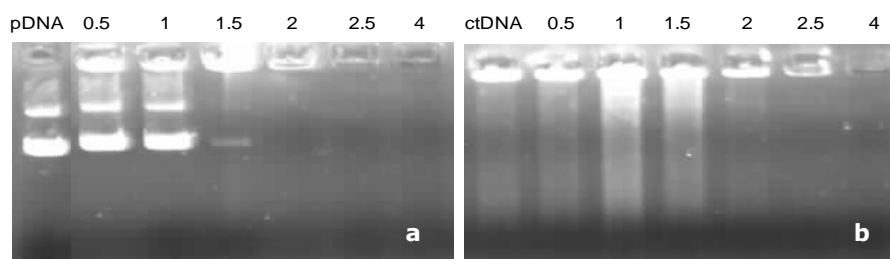


Figura 3.16 Resultados de electroforesis en gel de agarosa con los lipoplejos a) $(C_{16}Am)_2(C_2O)/DOPE$ -pDNA y b) $(C_{16}Am)_2(C_2O)/DOPE$ -ctDNA, a $\alpha = 0.7$ y a diferentes relaciones molares de carga $\rho_{eff} = 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5$ y 4.0 .

El tamaño de los liposomas $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ a diferentes composiciones α para cada uno de los GCLs ha sido analizado por medio del equipo zetaPALS. La Tabla 3.4 presenta los resultados del tamaño promedio y la polidispersidad para estos liposomas. Los resultados de la Tabla 3.4 indican que, a pesar de haber seguido el mismo protocolo de hidratación y extrusión para todos los sistemas, el tamaño de los liposomas mixtos con cualquier GCL de esta serie disminuye con α , a la vez que la polidispersidad se incrementa ligeramente. Estos resultados pueden atribuirse al distinto parámetro de empaquetamiento, P , de los GCLs con respecto al DOPE.^{29,30}

Tabla 3.4. Tamaño de partícula y polidispersidad de los liposomas mixtos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ con $n = 1, 2$ ó 3 , a diferentes composiciones, α , determinados por medio del equipo ZetaPALS.

n	α	$(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$	
		Tamaño /nm	Polidispersidad
1	0.2	103	0.05
	0.5	90	0.13
	0.7	75	0.16
2	0.2	107	0.04
	0.5	89	0.09
	0.7	72	0.26
3	0.2	106	0.04
	0.5	91	0.10
	0.7	79	0.21

La morfología y estructura de los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA se han estudiado mediante SAXS y crio-TEM. Los experimentos de SAXS se llevaron a cabo a diferentes composiciones α (0.2, 0.4, 0.5 ó 0.7) y ρ_{eff} (1.5, 2.0, 2.5, 3.0 ó 5), mientras que los experimentos de crio-TEM se llevaron a cabo a α (0.2, 0.5 ó 0.7) y ρ_{eff} (1.5).

Los resultados obtenidos mediante SAXS con los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA ($n = 1, 2$ ó 3), a diferentes α (0.2, 0.4, 0.5 ó 0.7) y $\rho_{eff} = 1.5$, se muestran en la Figura 3.17. El resto de difractogramas para los demás valores de ρ_{eff} se presentan en las figuras A2-A4 del anexo 2. Los máximos de difracción encontrados para cada uno de los compuestos a diferentes α y ρ_{eff} (Figura 3.17) indican que todos los sistemas se ajustan a una fase lamelar (L_α). La presencia de un máximo de difracción ancho y difuso entre los dos primeros máximos de difracción se corresponde con la interacción pDNA-pDNA.

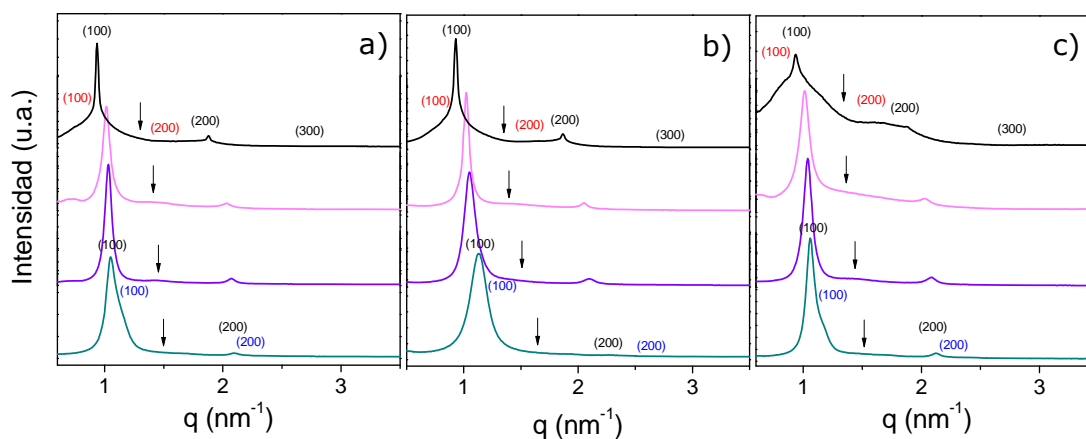


Figura 3.17. Difractogramas de SAXS de los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA a diferentes α y relación de carga $\rho_{eff} = 1.5$. a) $n = 1$; b) $n = 2$; y c) $n = 3$. Línea negra, $\alpha = 0.2$; rosa, $\alpha = 0.4$; morada, $\alpha = 0.5$; y verde, $\alpha = 0.7$. Los índices de Miller (hkl) corresponden a las diferentes estructuras lamelares: rojo (L_α , rica en DOPE); negro (L_α , principal); y azul (L_α , rica en GCL). Las flechas indican la posición del máximo de difracción correspondiente a la correlación pDNA-pDNA.

Para algunos valores de α se observa la presencia de máximos de difracción adicionales, como es el caso de lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA con $n = 1$ a $\alpha = 0.2, 0.4$ ó 0.7 , y con $n = 2$ ó 3 a $\alpha = 0.2$ y 0.7 que se corresponden con otra fase lamelar. Por tanto, los resultados globales indican la presencia de al menos dos fases lamelares coexistentes a dichas composiciones, de modo que a todas las α está presente una fase lamelar (L_α , principal), y que en ocasiones, cuando la cantidad de DOPE es alta ($\alpha = 0.2$ y 0.4), se observa también la presencia de una segunda fase con alto contenido de DOPE (L_α , rica en DOPE). Por otro lado, cuando el contenido de GCL es elevado ($\alpha = 0.7$) se observa una tercera fase lamelar formada principalmente por GCL (L_α , rica en GCL).

Esta coexistencia de fases, conocida como el fenómeno de *demixing*, no es exclusiva de estos sistemas³¹ sino que también se ha encontrado en lipoplejos que contienen otros GCLs y DOPE.^{1,2} Cabe destacar que al aumentar α los máximos de difracción de la fase lamelar $L_{\alpha, \text{principal}}$ se desplazan ligeramente a valores mayores de q , lo que ya apunta a una disminución de la distancia interlamelar en el lipoplejo. A partir de dichos máximos se ha determinado la distancia interlamelar periódica, d , para cada una de las fases. Los parámetros estructurales de las tres fases lamelares obtenidos a diferentes α y ρ_{eff} se recogen en las tablas A1-A3 del anexo 2 y se presentan en la Figura 3.18.

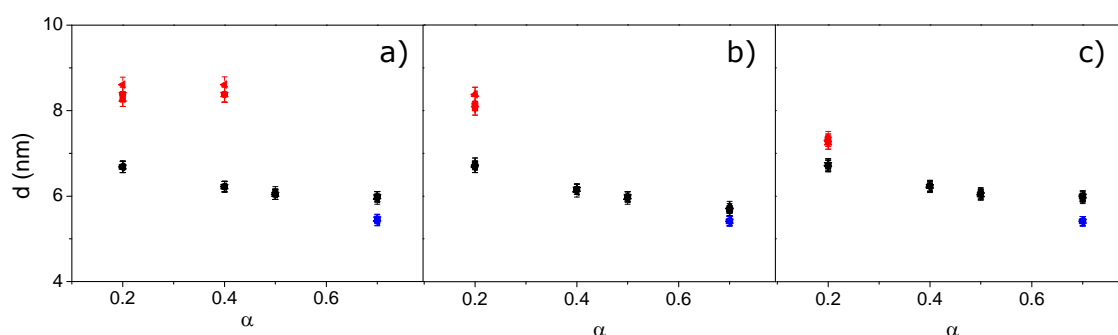


Figura 3.18. Distancia periódica, d , de las distintas estructuras lamelares de lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)/DOPE$ -pDNA, donde a) $n = 1$; b) $n = 2$; y c) $n = 3$. $L_{\alpha, \text{rica en DOPE}}$ (rojo); $L_{\alpha, \text{principal}}$ (negro); y $L_{\alpha, \text{rica en GCL}}$ (azul).

La Figura 3.18 muestra que, en todos los casos, los valores de d de la fase lamelar principal, disminuyen ligeramente ($d = 7$ a 6 nm) cuando α aumenta, lo que está de acuerdo con lo encontrado para otros lipoplejos formados con diferentes tipos de lípidos catiónicos.^{2,31,32} Estos resultados pueden atribuirse a la combinación de dos factores: i) una disminución del espesor de la bicapa lipídica, d_m , cuando α aumenta debido a la menor longitud de las cadenas hidrofóbicas de los GCLs (16 C) que la de las cadenas de DOPE (18 C); y/o ii) una disminución de la monocapa acuosa, d_w , a mayores α debido a que la superficie cargada en el liposoma mixto aumenta, lo que provoca una mayor compactación del pDNA. Para las otras dos fases lamelares observadas a ciertos valores de α se ha encontrado que la fase rica en DOPE, presenta una mayor distancia interlamelar ($L_{\alpha, \text{rica en DOPE}} \approx 8.7 - 7.3$ nm), mientras que la fase rica en GCL, tiene una menor distancia periódica ($L_{\alpha, \text{rica en GCL}} \approx 5.5$ nm). A partir de los valores de la fase lamelar principal y del espesor de la bicapa

lipídica, d_m ($\approx 4.0 - 4.5$ nm), estimado a partir de la estructura molecular de los GCLs y del DOPE, se ha obtenido un espesor de la monocapa acuosa, $d_w \approx 2.0 - 2.5$ nm, espacio suficiente para alojar las hélices superenrolladas de pDNA, si bien a mayores contenidos de GCL este espacio se reduce en parte porque la estructura se vuelve más compacta.^{1,2,31,32}

Por otra parte, la correlación entre las hélices del plásmido, d_{pDNA} , ha sido determinada a partir del valor de q_{pDNA} . Debido a que el máximo de difracción relacionado a la correlación pDNA-pDNA en todos los difractogramas es ancho y poco intenso, éste ha sido asignado conjuntamente a las estructuras lamelares L_{α} , principal y L_{α} , rica en GCL (flechas negras en la Figura 3.17). Los resultados obtenidos con los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, a todas las α y ρ_{eff} estudiadas, se presentan en la Figura 3.19 y en las tablas A1-A3 del anexo 2.

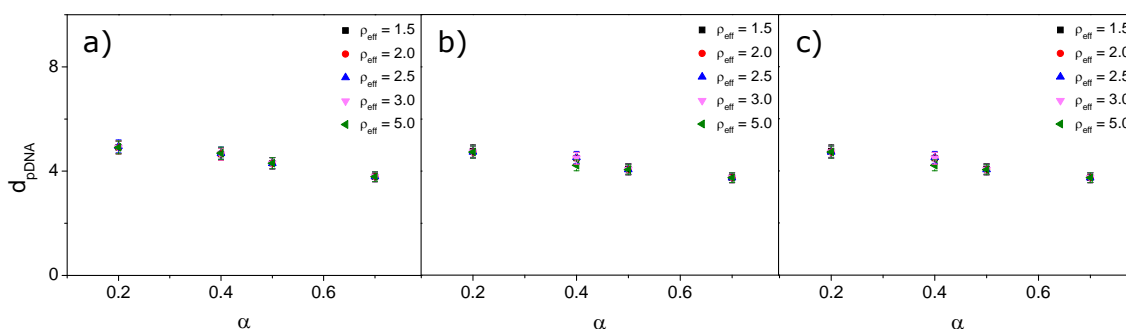


Figura 3.19. Valores de la correlación DNA-DNA, d_{pDNA} , en función de α , en lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, donde a) $n = 1$; b) $n = 2$; y c) $n = 3$. A diferentes relaciones de carga efectiva ρ_{eff} .

Los valores de d_{pDNA} muestran una ligera disminución (5-3 nm) con el aumento de α , a todos los ρ_{eff} , lo que indica que la distancia entre las hélices del pDNA se reduce cuando el contenido de GCL en el liposoma mixto aumenta. Este hecho, que se debe al aumento del área superficial cargada en el liposoma, se encuentra en concordancia con resultados previos de lipoplejos que contienen otras series de GCLs no muy diferentes de las estudiadas en esta tesis.¹⁻³

A fin de tener una idea más clara de la morfología de los liposomas mixtos y lipoplejos conteniendo un GCL de la serie también se han realizado estudios de crió-TEM. Los resultados obtenidos con los liposomas mixtos

$(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$, que se muestran en la Figura 3.20, indican que éstos consisten mayoritariamente en estructuras unilamelares esféricas. Los tamaños determinados mediante crio-TEM muestran que los liposomas disminuyen ligeramente su tamaño cuando aumenta α , es decir, la proporción de GCL en el liposoma mixto, lo cual está en buen acuerdo con los resultados obtenidos mediante el equipo zetaPALS. Además, a partir de las micrografías de los compuestos puros y con la ayuda del software ImageJ, también se ha determinado el espesor de la bicapa lipídica, d_m , de los liposomas unilamelares mixtos. Los valores promedio obtenidos disminuyen en un intervalo de 5.5 a 3.5 nm.

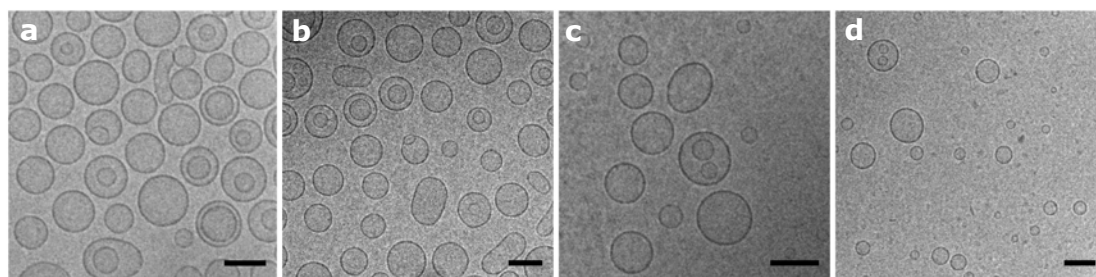


Figura 3.20. Micrografías de liposomas mixtos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$: (a-b), $\alpha = 0.2$; y (c-d), $\alpha = 0.5$. Escala 100 nm.

Por otra parte, en la Figura 3.21 se muestra una selección de micrografías de los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, a varias composiciones de GCL ($\alpha = 0.2, 0.5$ ó 0.7). Los resultados revelan que los nanoagregados formados se caracterizan por un patrón de compactación multilamelar similar a los obtenidos en estudios previos con otros GCLs.^{1,2,33} También puede observarse que, independientemente de la longitud del espaciador del GCL, n , se pueden distinguir dos tipos de nanoestructuras multilamelares: tipo CT y tipo FP. La estructura tipo CT se caracteriza por la presencia de liposomas organizados y desorganizados formando multicapas con el pDNA intercalado, mientras que la estructura tipo FP muestra una desorganización completa de los liposomas que ha dado lugar a multilamelas continuas.

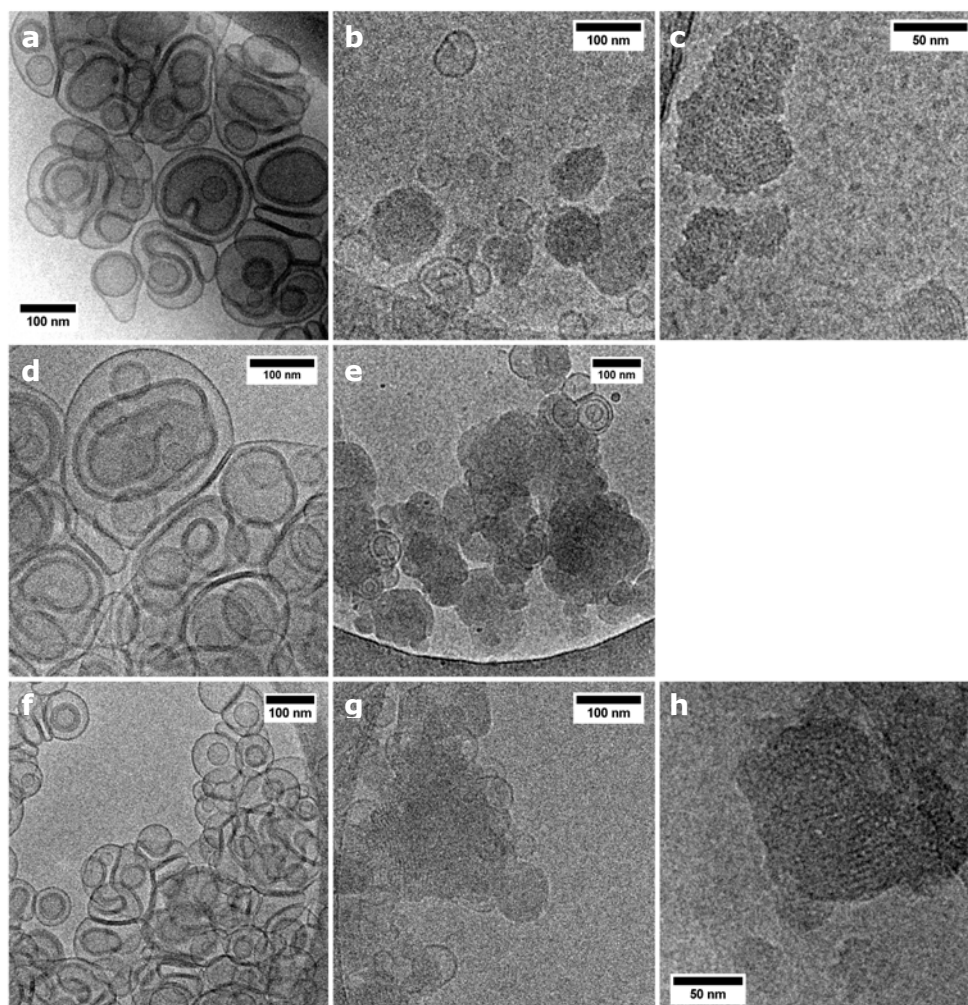


Figura 3.21. Micrografías de los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA: (a-c), $n = 1$; (d-e), $n = 2$; y (f-h), $n = 3$; a varias composiciones molares: (a, d y f), $\alpha = 0.2$; (b, e y g), $\alpha = 0.5$; y (c y h), $\alpha = 0.7$.

Las micrografías obtenidas también muestran que, en los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, un alto contenido de DOPE ($\alpha = 0.2$) provoca la formación de nanoagregados tipo CT. Sin embargo, cuando el contenido de GCL aumenta ($\alpha = 0.5$), además de los nanoagregados tipo CT, también se forma una estructura multilamelar continua tipo FP de liposomas mixtos con pDNA intercalado. Finalmente, cuando el contenido de GCL es elevado ($\alpha = 0.7$), las nanoestructuras tipo CT desaparecen y solo permanecen las de tipo FP. En resumen, cuando el contenido de DOPE es alto, los liposomas mixtos compactan el pDNA manteniendo esencialmente su morfología formando las estructuras tipo CT en las bicapas lipídicas se vuelven más densas y se pliegan,

si bien muchos de los lipomas conservan su estructura original. Sin embargo, cuando se incrementa el contenido de GCL las interacciones liposoma-pDNA se ven claramente favorecidas y los liposomas tienden a desorganizarse formando nanoagregados tipo FP. Ésta última característica ya ha sido encontrada en otros lipoplejos formados por GCLs.¹ Estos resultados están en concordancia con los obtenidos mediante SAXS en los que también se encontró coexistencia de fases.

A fin de determinar la fluidez de la bicapa de los lipoplejos (la cual está relacionada con su eficiencia de transfección) también se han llevado a cabo estudios de anisotropía de fluorescencia, r , para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA. Cuando una bicapa se vuelve más fluida, el grado de rotación de la sonda fluorescente aumenta lo que provoca una disminución de la anisotropía.

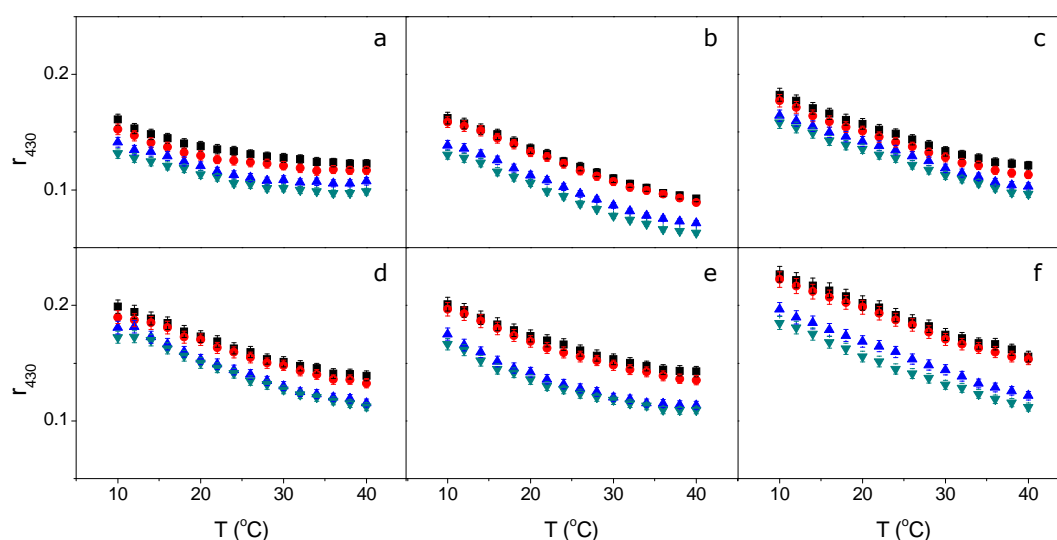


Figura 3.22. Resultados de anisotropía de fluorescencia para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA: (a y d) $n = 1$; (b y e) $n = 2$ y (c y f) $n = 3$; a diferentes composiciones molares: (a-c) $\alpha = 0.2$ y (b-f) $\alpha = 0.5$ y relaciones molares de carga: $\rho_{eff} = 1.5$ (cuadros negros); $\rho_{eff} = 2.0$ (círculos rojos); $\rho_{eff} = 5.0$ (triángulos azules); y $\rho_{eff} = \infty$ (triángulos verdes).

La Figura 3.22 muestra los resultados de anisotropía de la sonda fluorescente DPH localizada en la bicapa de los liposomas $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ ($\rho_{eff} = \infty$) y lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA ($\rho_{eff} = 1.5, 2.0$ ó 5) a dos composiciones diferentes ($\alpha = 0.2$ ó 0.5) en función de la temperatura. Los resultados indican

que la anisotropía de fluorescencia disminuye con la temperatura en todos los casos, lo que implica que la fluidez de la membrana aumenta. La presencia de DOPE disminuye la temperatura de transición gel-fluido, T_m , y por ello, a mayor contenido de DOPE ($\alpha = 0.2$) la fluidez de los lipoplejos aumenta. Los valores de anisotropía a temperatura fisiológica (37 °C) determinados para los lipoplejos formados por cada uno de los tres GCLs son muy bajos (0.07-0.15), lo que indica que la fluidez de los nanoagregados formados es apropiada para considerarlos como vectores potenciales para su uso en terapia génica.¹

Finalmente, la capacidad de transfección de las formulaciones lipídicas de los liposomas mixtos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ ($n = 1, 2$ ó 3) ha sido investigada mediante la transfección del plásmido pEGFP-C3 (pDNA) en ausencia, -FBS, y presencia (+FBS) de suero en varias líneas celulares. El plásmido pEGFP-C3 codifica la expresión de la proteína verde fluorescente GFP. La cuantificación de los niveles de transfección se ha realizado mediante citometría de flujo, y los resultados obtenidos han sido analizados en términos de %GFP (porcentaje de células que expresan la proteína GFP) y mediante la intensidad media de fluorescencia (MFI) correspondiente a los niveles de expresión de la GFP por célula. Para este estudio, se han preparado cuatro composiciones molares del liposoma mixto GCL/DOPE ($\alpha = 0.2, 0.4, 0.5$ y 0.7) y, en cada una de ellas, cinco relaciones de carga efectiva entre el GCL y el pDNA ($\rho_{eff} = 1.5, 2.0, 2.5, 3.0$ ó 5). Todos los experimentos han sido acompañados del control comercial Lipofectamina 2000 (referido como Lipo2000 y Lipo2000* en ausencia y presencia de suero, respectivamente).

Como caso ilustrativo, en la Figura 3.23 se presentan los resultados de transfección obtenidos, en presencia de suero, para los tres sistemas $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA a las condiciones de α y ρ_{eff} encontradas óptimas en ausencia de suero, para el proceso de transfección de la línea celular HEK293T. Cabe mencionar que aunque los niveles de transfección del pDNA son mayores en ausencia de suero, los resultados aquí presentados son lo más interesantes ya que en condiciones fisiológicas reales la transfección siempre se realiza en presencia de suero.

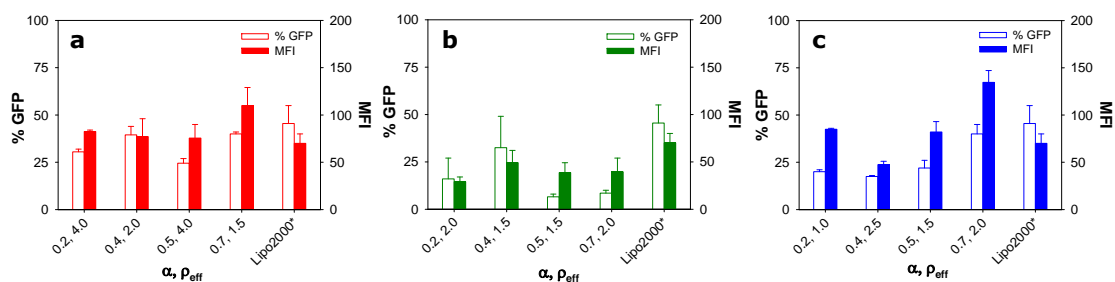


Figura 3.23. Eficiencias de transfección de los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ en términos de %GFP y MFI para la línea celular HEK293T en presencia de suero (+FBS). a) $n = 1$; b) $n = 2$; y c) $n = 3$. En cada caso se encuentra el control comercial Lipo2000*.

Los resultados de transfección con los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ muestran que los máximos de transfección se observan para los GCLs con $n = 1$ y 3 a una alta composición molar de GCL ($\alpha = 0.7$) y a relaciones de carga entre $\rho_{eff} = 1.5-2.0$. Por otro lado, para el GCL con espaciador $n = 2$, los mejores resultados se tienen a $\alpha = 0.4$ y $\rho_{eff} = 1.5$. Aunque todas las formulaciones de los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ y $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$, en condiciones óptimas, presentan mejor TE que el control Lipo2000*, es destacable que el lipoplejo con el GCL que presenta el espaciador más largo $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ ($n = 3$) es el que ha mostrado los mayores niveles de transfección. Estos resultados de transfección en células HEK293T han sido confirmados mediante estudios similares realizados en otras 4 líneas celulares cancerígenas (CaCO-2, HeLa, Hep3B y MDA-MB321) no recogidos en esta memoria.

Los niveles de expresión de la proteína GFP, también han sido evaluados mediante microscopía de fluorescencia. A modo ilustrativo, la Figura 3.24 presenta la expresión de GFP en la línea celular HEK293T para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ en presencia de suero en condiciones óptimas ($\alpha = 0.7$ y $\rho_{eff} = 2.0$). Como puede apreciarse en la figura, las células transfectadas con el lipoplejo $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ presentan mayor fluorescencia (3.24c) que las transfectadas con el control Lipo2000* (3.24b). Estos resultados corroboran los resultados de FACS y confirman que el lipoplejo $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ a $\alpha = 0.7$ y $\rho_{eff} = 2.0$ es un buen agente

de transfección, y supera los niveles de transfección del control Lipo2000* en la línea celular HEK293T.

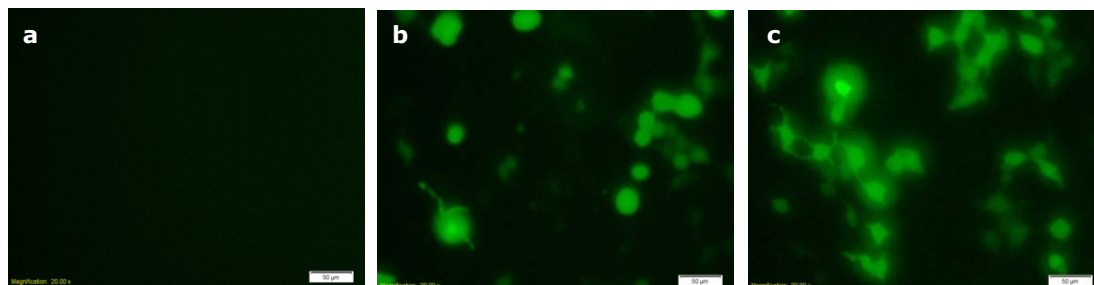


Figura 3.24. Imágenes de microscopía de fluorescencia de: (a) la línea celular HEK293T sin transfección; (b) transfectadas con el control comercial Lipo2000*; y (c) transfectadas con los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE$ -pDNA a la formulación óptima de $\alpha = 0.7$ y $\rho_{eff} = 2$. Escala 50 μm .

Los estudios de microscopía de fluorescencia se han complementado con estudios de colocalización celular mediante microscopía confocal de fluorescencia. El porcentaje de expresión de la proteína GFP y su localización en las células HEK293T, se ha visualizado 48 h después de la transfección. En este estudio, el núcleo de las células se marca con yoduro de propidio (PI) marcador fluorescente en rojo que se une al DNA endógeno presente en las células.

En la Figura 3.25b-c, se muestran las micrografías con los resultados de transfección para control Lipo2000* y el lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE$ -pDNA. Los resultados muestran que la expresión de la proteína GFP se encuentra localizada en el interior celular y descarta que los resultados de FACS fueran un falso positivo. También se observa que no existe ninguna fluorescencia residual en las células sin transfectar (Figura 3.25a1-a4) y se corrobora que el % GFP es mayor para el lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE$ -pDNA a las condiciones óptimas $\alpha = 0.7$ y $\rho_{eff} = 2$ (Figura 3.25c1-c4) que para el control Lipo2000* (Figura 3.25b1-b4).

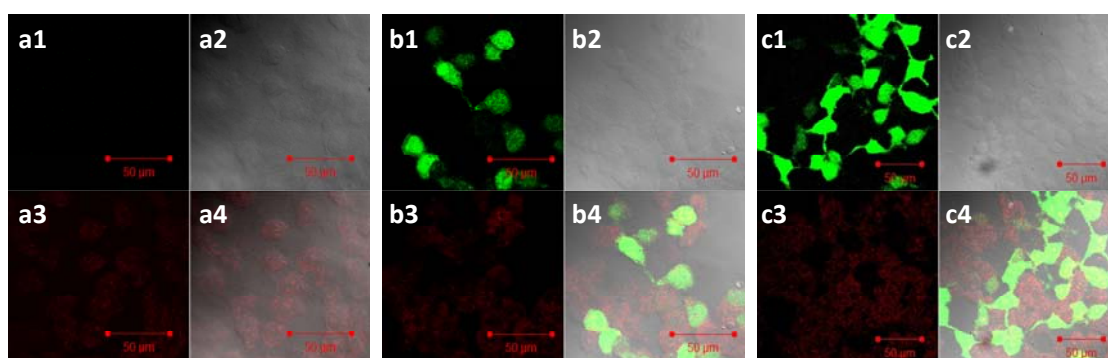


Figura 3.25. Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia para la línea celular HEK293T. (a1-a4) Células sin transfectar; (b1-b4) Células transfectadas con Lipo2000*; y (c1-c4) Células transfectadas con $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ a las condiciones óptimas ($\alpha = 0.7$ y $\rho_{eff} = 2$) en presencia de suero (+FBS). Paneles (a1-c1) muestran la expresión de la GFP en las células; (a2-c2) campo claro; (a3-c3) tinción PI y (a4-c4) superposición de imágenes. Escala = 50 μm .

Para su posible uso efectivo en terapia génica, la capacidad de transfección de los vectores lipídicos tiene que estar complementada con bajos niveles de toxicidad. Por ello, además de los estudios de transfección, se han realizado estudios de viabilidad celular de los tres GCLs $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ mediante el ensayo MTT.

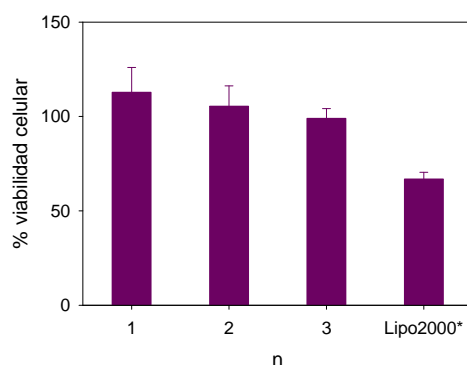


Figura 3.26. Resultados de viabilidad celular de la línea celular HEK293T incubadas con los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ ($n = 1, 2$ ó 3) a las condiciones óptimas y el control Lipo2000*.

La Figura 3.26 muestra los porcentajes de viabilidad celular obtenidos, en presencia de suero, a las condiciones óptimas de transfección para cada uno de los tres GCLs. Como se puede observar, los tres GCLs muestran un porcentaje considerablemente alto de células viables después de ser tratadas con los lipoplejos. Independientemente de la longitud del espaciador, los tres GCLs presentan una menor inhibición de la viabilidad celular que el control Lipo2000*. Además, también es interesante destacar que estos lipoplejos

presentan niveles de viabilidad celular considerablemente mayores que los obtenidos para GCLs con cadenas espaciadoras alquílicas,^{1,2} de forma que, la introducción de oxígenos en la cadena espaciadora provoca un claro aumento de la viabilidad celular.

3.1.2.2 Liposomas mixtos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ en ausencia y presencia de dos tipos de DNA (plásmido y ctDNA).

Al igual que en la serie anterior, primeramente, las medidas de potencial zeta (Figura 3.27) de los liposomas mixtos ($\alpha = 0.5$) con ctDNA ($(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -ctDNA) con $n = 1, 2$ o 3 , permitieron determinar los valores de electroneutralidad, $(L/D)_\phi$, y a partir de ellos la carga efectiva, $q_{L^+}^+$, de cada GCL (Tabla 3.5). De la misma forma que en la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$, los GCLs de esta serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$ ofrecen una carga promedio de 1.8 ± 0.1 , muy próxima a su carga nominal ($q_{L^+}^+ = 2.0$) y, análogamente a la serie anterior, esta carga efectiva aumenta ligeramente con la longitud de la cadena espaciadora.

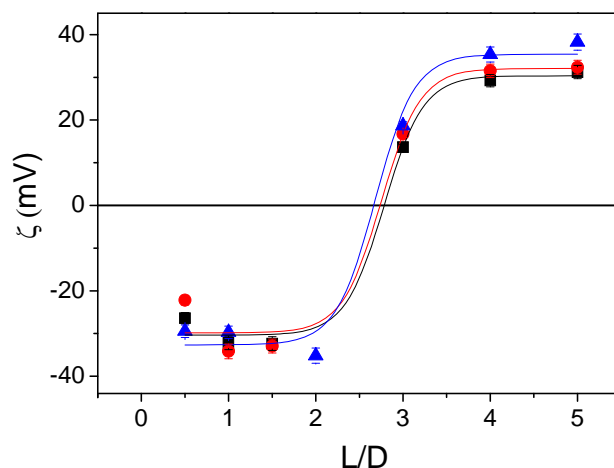


Figura 3.27 Gráficas de potencial zeta, ζ , frente L/D , a $\alpha = 0.5$, para los lipoplejos formados por $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -ctDNA, siendo $n = 1$ (cuadros negros); $n = 2$ (círculos rojos); y $n = 3$ (triángulos azules).

Las medidas de potencial zeta para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA ($n = 1, 2$ ó 3) se presentan en la Figura 3.28a-c. Los valores de q_{pDNA}^- , calculados a partir de los valores $(L/D)_\phi$ para los lipoplejos

$(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, recogidos en la Tabla 3.5 y Figura 3.28d, indican que la carga disponible del plásmido q_{pDNA}^- es solo un $\sim 25\%$ de su valor nominal (-2 por par de bases) lo cual esta en concordancia con los resultados previos obtenidos para la carga del pDNA.¹⁻³ Sin embargo, a diferencia de la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, el q_{pDNA}^- de la serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ se mantiene aproximadamente contante, siendo independiente de la composición del liposoma mixto y de la longitud del espaciador de cada uno de los GCLs.

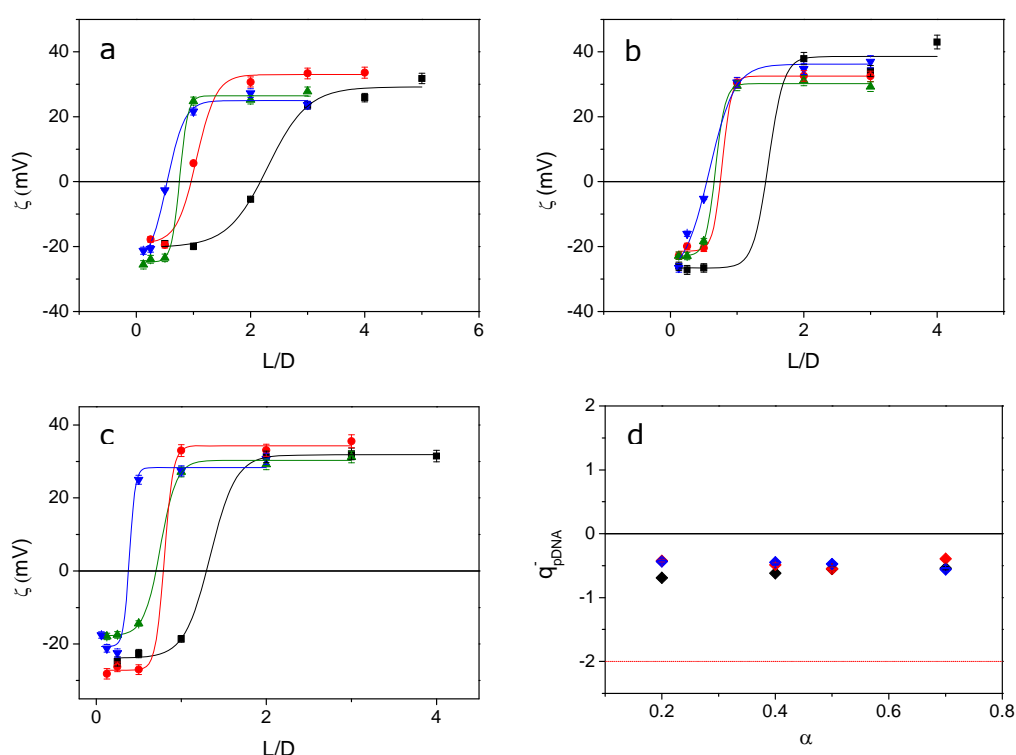


Figura 3.28. (a-c) Gráficas de potencial zeta, ζ , frente L/D , para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ donde a) $n = 1$; b) $n = 2$; y c) $n = 3$. A diferentes composiciones: $\alpha = 0.2$ (cuadros negros); $\alpha = 0.4$ (círculos rojos); $\alpha = 0.5$ (triángulos verdes); y $\alpha = 0.7$ (triángulos azules). d) Gráfico de las cargas efectivas del pDNA, q_{pDNA}^- , para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ frente a α . Siendo $n = 1$ (rombos negros); $n = 2$ (rombos rojos); y $n = 3$ (rombos azules). La línea roja discontinua corresponde a la carga nominal del ctDNA $q_{ctDNA}^- = -2$.

Tabla 3.5 Valores de $(L/D)_{\phi}$, cargas efectivas del GCL, $q_{L^+}^+$, y cargas efectivas del pDNA, q_{pDNA}^- , para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA diferentes valores de α .

GCL	n	α	$(L/D)_{\phi, ctDNA}$	$(L/D)_{\phi, pDNA}$	$q_{L^+}^+$	q_{pDNA}^-
$(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA	1	0.2	2.73	2.29	1.70	-0.69
		0.4		1.05	1.70	-0.62
		0.5		0.76	1.70	-0.55
		0.7		0.54	1.70	-0.54
	2	0.2	2.74	1.47	1.80	-0.44
		0.4		0.78	1.80	-0.45
		0.5		0.67	1.80	-0.47
		0.7		0.58	1.80	-0.56
	3	0.2	2.71	1.34	1.90	-0.42
		0.4		0.80	1.90	-0.49
		0.5		0.74	1.90	-0.55
		0.7		0.39	1.90	-0.39

Los tamaños de los liposomas mixtos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ obtenidos mediante zetaPALS, se presentan en la Tabla 3.6. Al igual que para los liposomas $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$, el tamaño de los liposomas mixtos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$, independientemente de la longitud del espaciador, disminuye cuando el contenido de GCL en el liposoma mixto aumenta.

Tabla 3.6. Tamaño de partícula y polidispersidad de los liposomas mixtos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ con $n = 1, 2$ ó 3 , a diferentes composiciones, α , determinados por medio del equipo ZetaPALS.

n	α	$(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$	
		Tamaño /nm	Polidispersidad
1	0.2	108	0.10
	0.5	89	0.12
	0.7	79	0.16
2	0.2	110	0.07
	0.5	107	0.15
	0.7	94	0.17
3	0.2	106	0.11
	0.5	94	0.12
	0.7	86	0.17

Los difractogramas obtenidos mediante SAXS de los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, a diferentes valores de α se presentan en la Figura 3.29 (a $\rho_{eff} = 1.5$) y en las figuras A5-A7 del anexo 2 (para el resto de ρ_{eff}). La correlación de los máximos de difracción indica que, independientemente de α o ρ_{eff} , todos los lipoplejos forman una fase lamelar

($L_{\alpha, \text{principal}}$). Adicionalmente, a $\alpha = 0.2$ se observa la coexistencia de una segunda fase lamelar ($L_{\alpha, \text{rica en DOPE}}$) con un factor q ligeramente menor y por tanto con una mayor distancia interlamelar, d . En los difractogramas también se ha indicado la correlación pDNA-pDNA (flecha negra). Los valores de todos los parámetros q , d y d_{pDNA} se recogen en las tablas A4-A6 del anexo 2.

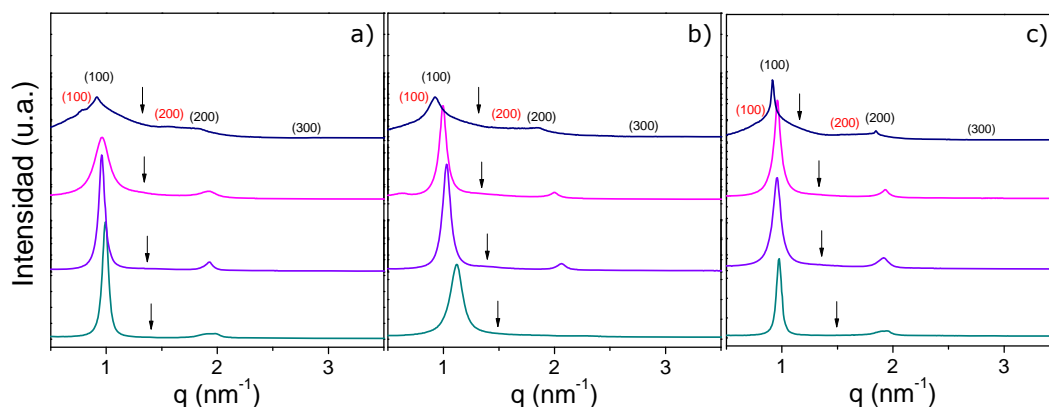


Figura 3.29. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos $(C_{16}\text{Im})_2(C_2\text{O})_n/\text{DOPE-pDNA}$ a diferentes α y relación de carga $\rho_{\text{eff}} = 1.5$. a) $n = 1$; b) $n = 2$; y c) $n = 3$. Línea negra corresponde a $\alpha = 0.2$; rosa a $\alpha = 0.4$; morada $\alpha = 0.5$; y verde $\alpha = 0.7$. Índices de Miller (hkl) corresponden a las diferentes estructuras lamelares: rojos ($L_{\alpha, \text{rica en DOPE}}$) y negros ($L_{\alpha, \text{principal}}$). Las flechas indican la posición del máximo de difracción correspondiente a la correlación pDNA-pDNA.

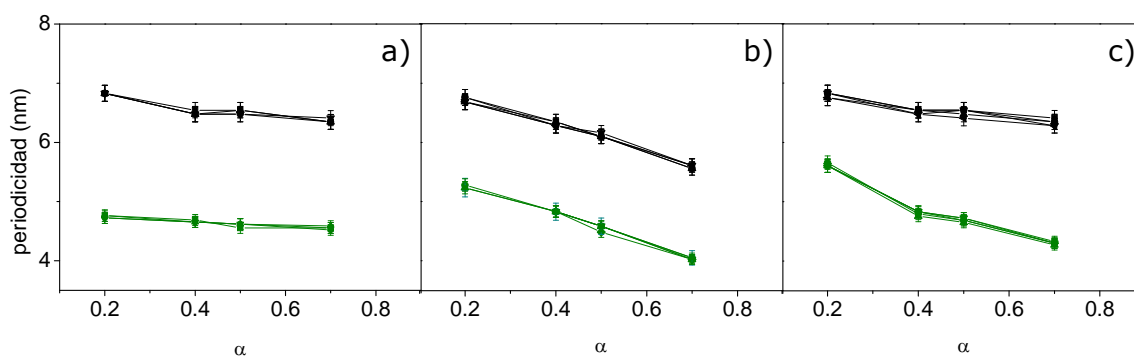


Figura 3.30. Gráfico de la distancia periódica, d , (símbolos negros) y correlación DNA-DNA, d_{pDNA} , (símbolos verdes) para los lipoplejos $(C_{16}\text{Im})_2(C_2\text{O})_n/\text{DOPE-pDNA}$, donde a) $n = 1$; b) $n = 2$; y c) $n = 3$.

La Figura 3.30 muestra los valores de la distancia interlamelar, d , y la correlación DNA-DNA, d_{pDNA} , en función de α , a diferentes valores de ρ_{eff} , para los tres sistemas de la serie $(C_{16}\text{Im})_2(C_2\text{O})_n/\text{DOPE-pDNA}$. Al igual que para la serie $(C_{16}\text{Am})_2(C_2\text{O})_n/\text{DOPE-pDNA}$, en todos los casos, independientemente del ρ_{eff} , los valores de d y d_{pDNA} obtenidos para la fase $L_{\alpha, \text{principal}}$ disminuyen

ligeramente con el aumento de α , de modo que la periodicidad d está comprendida en un intervalo de 6.7-5.7 nm y d_{pDNA} lo está en el intervalo de 4.5-5.0 nm. Por otra parte, la fase L_{α} , rica en DOPE se encuentra menos compactada ya que presenta valores de d en el intervalo de 9.4-7.4 nm (tablas A4-A6 del Anexo 2).

Los experimentos de crio-TEM para los lipoplejos $(C_{16}\text{Im})_2(C_2\text{O})_n/\text{DOPE-pDNA}$ a $\alpha = 0.2$ y 0.5 se presentan en la Figura 3.31. En las micrografías se observan resultados similares a los de la serie $(C_{16}\text{Am})_2(C_2\text{O})_n/\text{DOPE-pDNA}$, con dos tipos de nanoagregados multilamelares dependientes de α . De hecho, a altos contenidos de DOPE ($\alpha = 0.2$) se encuentra una estructura tipo CT, mientras que cuando se incrementa el contenido de GCL ($\alpha = 0.5$) se encuentra una estructura tipo FP. Sin embargo, a diferencia de la serie $(C_{16}\text{Am})_2(C_2\text{O})_n/\text{DOPE-pDNA}$, en la serie $(C_{16}\text{Im})_2(C_2\text{O})_n/\text{DOPE-pDNA}$, a $\alpha = 0.5$ y valores de $n = 1$ y 3 , no se observa la coexistencia de ambas estructuras, sino sólo la presencia del tipo FP.

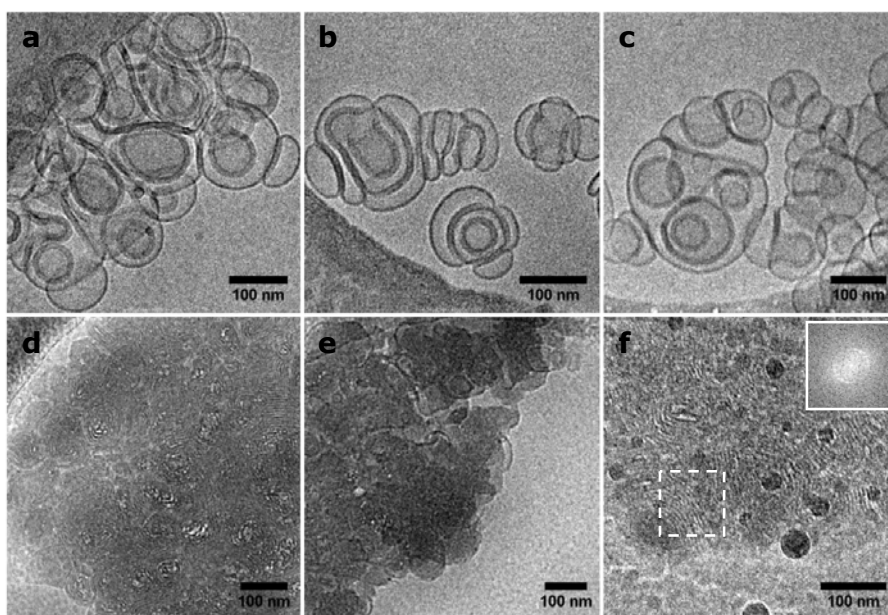


Figura 3.31. Micrografías de los lipoplejos $(C_{16}\text{Im})_2(C_2\text{O})_n/\text{DOPE-pDNA}$: (a-d) $n = 1$; (b-e) $n = 2$ y (c-f) $n = 3$; a diferentes composiciones molares: (a-c) $\alpha = 0.2$ y (d-f) $\alpha = 0.5$. El recuadro superior de la figura (f) representa la FFT de la sección señalada con el recuadro inferior de líneas discontinuas de la misma imagen.

A fin de determinar la periodicidad de las estructuras, se ha realizado una transformación de Fourier (FFT) a una serie de micrografías. En la Figura 3.31f se muestra, como ejemplo, la imagen de una FFT. Como era de esperar, el patrón de difracción corresponde a una estructura lamelar. A partir de dichas transformadas se ha determinado la periodicidad en los dos tipos de nanoagregados, obteniéndose valores de (6.6 ± 0.4) nm y (6.4 ± 0.4) nm para las estructuras tipo CT y FP, respectivamente. Dichos valores están en concordancia a los obtenidos mediante la técnica de SAXS.

La anisotropía de fluorescencia, determinada para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ a $\alpha = 0.2$ y 0.5 (Figura 3.32), muestra el mismo comportamiento que para la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$. De esta forma se ha encontrado que los lipoplejos con cada uno de los 3 GCLs poseen mayor fluidez a menores composiciones de GCL ($\alpha = 0.2$) y que los valores de anisotropía son lo suficientemente bajos ($0.07-0.15$), a temperaturas fisiológicas, como para considerar estos lipoplejos como vectores potenciales de transfección.

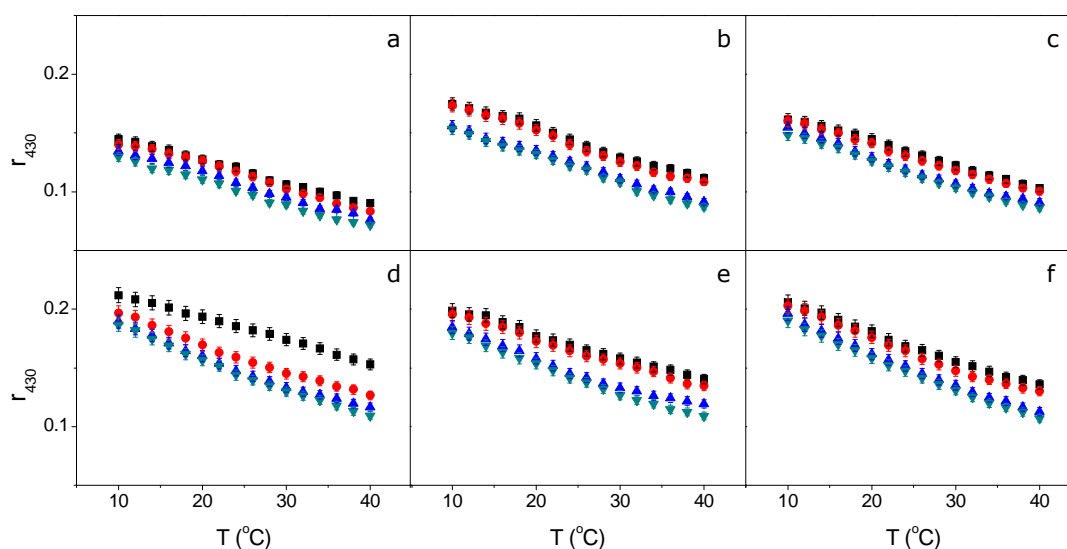


Figura 3.32. Anisotropía de fluorescencia, r , para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$: (a-d) $n = 1$; (b-e) $n = 2$; y (c-f) $n = 3$; a diferentes composiciones molares: (a-c) $\alpha = 0.2$ y (b-f) $\alpha = 0.5$ y ρ_{eff} : $\rho_{eff} = 1.5$ (cuadros negros); $\rho_{eff} = 2.0$ (círculos rojos); $\rho_{eff} = 5.0$ (triángulos azules); y $\rho_{eff} = \infty$ (triángulos verdes).

Los resultados de transfección de los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ en la línea celular HEK293T, en presencia de suero, se presentan en la Figura

3.33. En dicha figura se observa que las máximas eficiencias de transfección se obtienen a elevados contenidos de DOPE ($\alpha = 0.2$), aunque también se observan altos niveles de transfección a composiciones intermedias ($\alpha = 0.4$ y 0.5) para cada uno de los GCLs de esta serie ($n = 1, 2$ ó 3). En cambio, cuando se incrementa el contenido de GCL ($\alpha = 0.7$) se observa una drástica disminución de los niveles de transfección. Es destacable reseñar que a valores de α bajos-intermedios, los lipoplejos con los 3 GCLs presentan niveles similares de transfección y en todos los casos muy superiores a los observados con el control Lipo2000*. Es de resaltar que, para estos sistemas, la eficiencia de transfección a altos niveles de DOPE ($\alpha = 0.2$) es mayor cuando ρ_{eff} es ligeramente superior a 1, mientras que para $\alpha \geq 0.4$, se necesita una ρ_{eff} mas alta para alcanzar mejores niveles de transfección. Este hecho podría ser debido a que cuando α se incrementa la cantidad de lípido mixto total disminuye, y por tanto se requiere una mayor cantidad de liposoma mixto para transportar el pDNA.

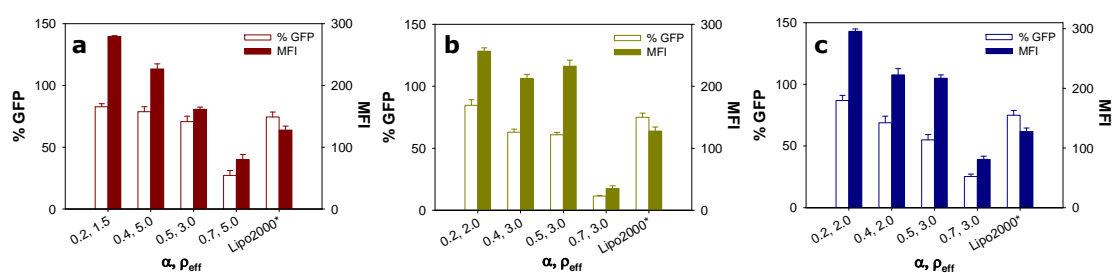


Figura 3.33. Eficiencias de transfección de los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA en términos de %GFP y MFI para la línea celular HEK293T en presencia de suero (+FBS). a) $n = 1$; b) $n = 2$; y c) $n = 3$, en todos los casos comparados con el control comercial Lipo2000*.

Si comparamos las eficiencias de transfección determinadas mediante citometría de flujo de las dos series de este apartado $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA y $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, podemos observar algunas diferencias: i) para la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA las máximas TE se obtienen a altos contenidos de GCL ($\alpha = 0.7$) mientras que para la serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, las máximas TE se obtienen a altos contenidos de DOPE ($\alpha = 0.2$); ii) Los niveles de transfección son similares para los tres sistemas de la serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA, mientras que para la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -

pDNA los mejores niveles se observan para los GCLs con espaciadores $n= 1$ y 3 ; y iii) las TE son bastante superiores para la serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA respecto a la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA.

Adicionalmente a los resultados de TE obtenidos para estas dos series, se ha realizado una comparativa con otros GCLs investigados previamente por nuestro grupo a fin de lograr una mejor comprensión del papel que desempeña un espaciador de tipo oligo-oxietileno en la TE.^{1,2} De esta forma, los resultados de las 2 series de GCLs conteniendo un espaciador tipo oligo-oxietileno de longitud variable, se han comparado con los resultados previos obtenidos para 2 series de GCLs con un espaciador tipo metilenos, a saber: i) 1,2 bis(hexadecildimetilamonio)(CH₂)_n, $(C_{16}Am)_2C_n$, siendo $n = 2, 3, 5$ ó 12 y; ii) bis(hexadecilimidazol)(CH₂)_n, $(C_{16}Im)_2C_n$, siendo $n = 2, 3, 5$ ó 12 el número de metilenos de la cadena alquílica espaciadora. En la Figura 3.34, se presentan los resultados a las condiciones óptimas, en presencia de suero, para cada lipoplejo que conforma cada una de las 4 series.

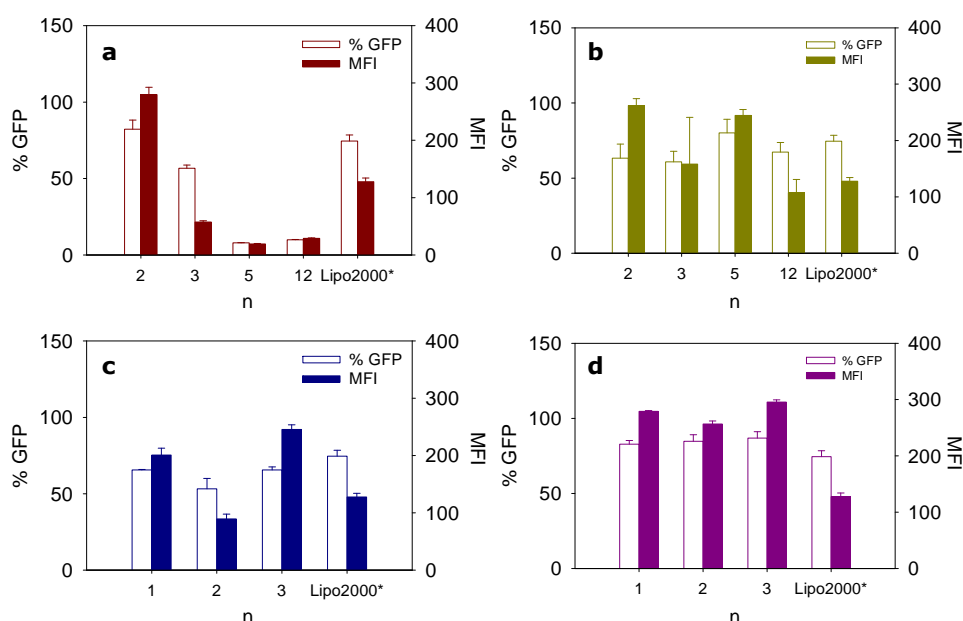


Figura 3.34 Eficiencias de transfección en términos de %GFP y MFI para la línea celular HEK293T en presencia de suero (+FBS) para cuatro diferentes series GCL/DOPE-pDNA en función de la longitud del espaciador, n , del GCL: a) $(C_{16}Am)_2C_n/DOPE$ -pDNA; b) $(C_{16}Im)_2C_n/DOPE$ -pDNA; c) $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA; y d) $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA. n . También se presenta los resultados obtenidos con el control positivo Lipo2000*.

De acuerdo a los resultados presentados en la figura se observa que al menos un compuesto de cada serie supera la TE del control Lipo2000*. Además los resultados muestran dos patrones interesantes: i) La TE mejora considerablemente con los diferentes espaciadores cuando el grupo catiónico amonio es sustituido por una grupo catiónico imidazol; ii) La introducción de oxígenos en la cadena espaciadora del GCL mejora considerablemente la eficiencia de transfección (ver comparativa entre Figura 3.34a-c y 3.34b-d), especialmente si se tiene en cuenta que la longitud del espaciador $n = 1$ de la serie oligo-oxietileno es similar en longitud al espaciador $n = 5$ para la serie con espaciador alquil. Por tanto, se puede concluir que la introducción de oxígenos en la cadena espaciadora y grupos imidazol en el GCL (serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$) conduce a los valores más altos de transfección.

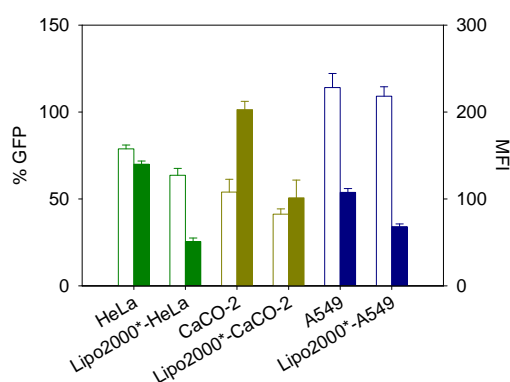


Figura 3.35. Eficiencias de transfección para la serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ en términos de %GFP y MFI para diferentes líneas celulares (HeLa, CaCO-2 y A549) en presencia de suero (+FBS). Para cada línea celular los resultados de transfección han sido comparados con los del control Lipo2000*.

Sin embargo, los niveles de transfección en una sola línea celular no permiten concluir, sin lugar a dudas, si un sistema es mejor en términos de eficiencia de transfección que un control comercial. Para ello es necesario confirmar esta TE usando los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ para transfectar el pDNA en otras líneas celulares cancerígenas. A modo de ejemplo, en la Figura 3.35 se presentan los niveles de transfección obtenidos en diferentes líneas celulares (HeLa, CaCO-2 y A549, etc.) con el lipoplejo $(C_{16}Im)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ a las condiciones óptimas de α y ρ , donde se observa claramente la mejora en la transfección respecto a la Lipo2000* para las tres líneas celulares. En general, los resultados obtenidos para las diferentes líneas celulares están en

concordancia con los obtenidos con la línea celular HEK293T, ya que a las condiciones óptimas de cada lipoplejo, la TE es mejor que para el control Lipo2000*.

A modo ilustrativo, la expresión de la proteína GFP originada por la transfección con los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, a las condiciones óptimas en la línea celular HEK293T en presencia de suero, ha sido analizada mediante microscopia de fluorescencia (Figura 3.36). En estas imágenes se observan altos niveles de fluorescencia para las células transfectadas con cualquiera de los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ a las condiciones óptimas ($\alpha = 0.2$ y $\rho_{eff} = 2$) y que el nivel de expresión es muy superior al obtenido para las células transfectadas con Lipo2000*. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos mediante la técnica de citometría de flujo.

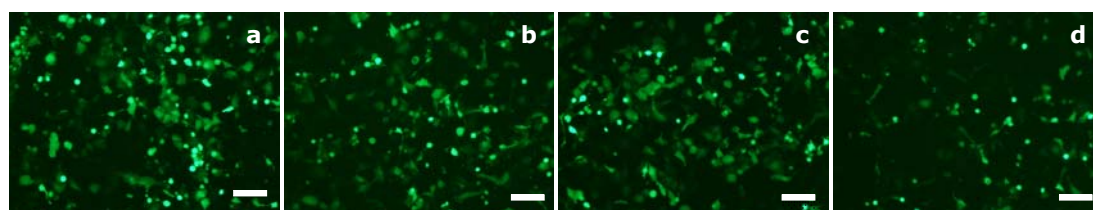


Figura 3.36. Imágenes representativas de microscopia de fluorescencia de la expresión de GFP en la línea celular HEK293T transfectadas con: a) el lipoplejo $(C_{16}Im)_2(C_2O)/DOPE-pDNA$; b) el lipoplejo $(C_{16}Im)_2(C_2O)_2/DOPE-pDNA$; c) el lipoplejo $(C_{16}Im)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$; y (d) el control Lipo2000* en presencia de suero (+FBS). Escala = 100 μM

Por otra parte, debido a la elevada capacidad de transfección de los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, también se han llevado a cabo estudios de internalización celular para investigar si dicha capacidad de transfección está ligada a una mayor internalización efectiva de los lipoplejos. Para dicho estudio, el pDNA fue etiquetado con el marcador fluorescente Cy-5. Después de 6 h de incubación de las células con el lipoplejo en presencia de suero, las células fueron observadas en el microscopio confocal de fluorescencia. Los resultados presentados en la Figura 3.37, muestran que el nivel de internalización de los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ es considerablemente mayor que el obtenido mediante el control Lipo2000* y confirma que la TE de estos lipoplejos está determinada por su alto grado de internalización celular.

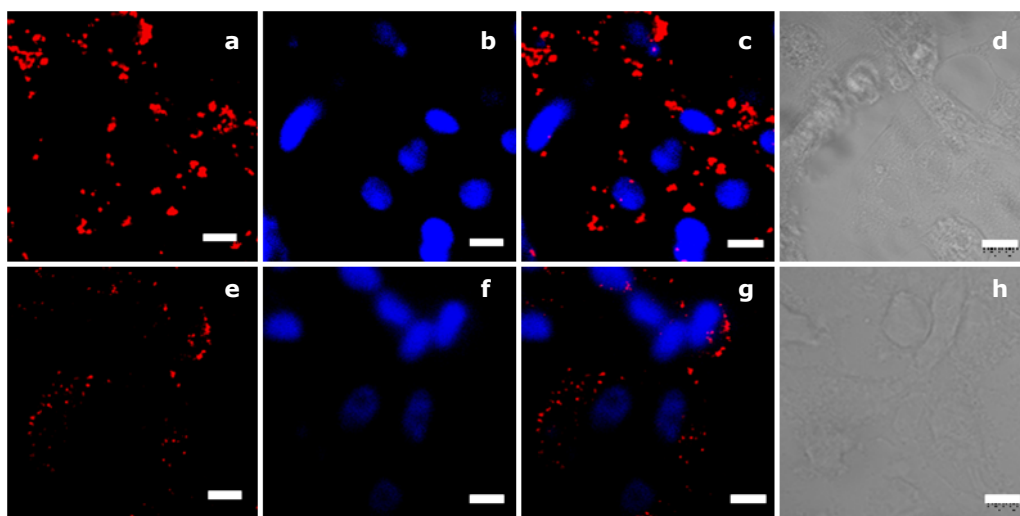


Figura 3.37. Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia sobre la internalización celular del pDNA en la línea celular HEK293T después de 6 h de incubación con el lipoplejo $(C_{16}Im)_2(C_2O)/DOPE-pDNA$ (a-d) y Lipo2000* (e-h) en presencia de suero (+FBS). Las micrografías corresponden a: (a y e) plásmido etiquetado con Cy5; (b y f) núcleos celulares teñidos con DAPI; (c y g) superposición de las dos anteriores; y (d y h) campo claro. Escala = 10 μM .

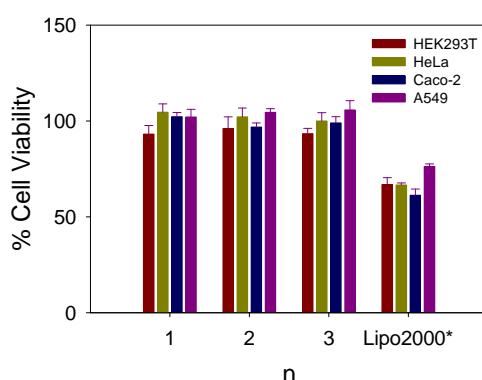


Figura 3.38. Viabilidad celular de cuatro diferentes líneas celulares transfectadas con los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ ($n = 1, 2$ ó 3) a las condiciones óptimas ($\alpha = 0.2$ a $\rho_{eff} = 2.0$) en presencia de suero (+FBS). Usando como control positivo Lipo2000*.

Finalmente y con objeto de analizar el grado de citotoxicidad de los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, también se han llevado a cabo estudios de viabilidad celular de los lipoplejos de esta serie a las condiciones óptimas de transfección en las diferentes líneas celulares estudiadas. Los resultados, presentados en la Figura 3.38, muestran que todos los sistemas presentan excelentes valores de viabilidad celular, muy superiores a los encontrados para el control Lipo2000*.

Una vez presentados los resultados de los sistemas $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ y $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, se ha estimado necesario realizar la correlación entre la estructura de los nanoagregados y su actividad biológica. Cuando el DNA es inicialmente compactado por los liposomas catiónicos mixtos, es de esperar que la estructura resultante dependa de las características de los tres componentes del sistema (GCL, DOPE y DNA). Como ya se ha demostrado en estudios anteriores, el tipo de nanoagregado que forman los lipoplejos tiene una clara influencia sobre la eficiencia de la transfección.^{1,2,19} Por ello en esta tesis, la determinación de la estructura de los lipoplejos en ausencia de células ha recibido particular atención. Los estudios previos han mostrado que, lipoplejos que presentan una fase hexagonal invertida, H_{II}^c , se caracterizan por ofrecer mejor TE respecto a los que presentan una fase lamelar, L_{α} .^{4,6,34} Este hecho se atribuye a dos características, i) las fases H_{II}^c son más fusogénicas que las fases L_{α} , y ii) que una vez los lipoplejos han sido endocitados, los que presentan fase H_{II}^c , interactúan mejor con la membrana celular liberando el DNA más fácilmente y escapando del endosoma al citosol. Por otra parte, los estudios sistemáticos de la estructura y de la TE de varios lipoplejos que contienen GCLs han permitido demostrar que lipoplejos que presentan polimorfismos estructurales, es decir coexistencia de fases, ya sea una fase hexagonal invertida, H_{II}^c , y una lamelar, L_{α} ,¹ o incluso de dos fases lamelares,² provocan una sinergia en la TE. Uno de los objetivos de esta tesis ha sido establecer una correlación entre las estructuras del lipoplejo y su actividad biológica, y por ello se han llevado a cabo diferentes estudios biofísicos y bioquímicos basados en distintas técnicas experimentales.

Ningún lipoplejo de las series $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ y $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, analizado mediante la técnica SAXS a diferentes composiciones, α , o relaciones de carga, ρ_{eff} , muestra la presencia de fases hexagonales pero sí la coexistencia de dos o incluso tres fases lamelares (L_{α} , rica en DOPE, L_{α} , principal y L_{α} , rica en GCL). En la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ se ha encontrado coexistencia de las fases L_{α} , rica en DOPE y L_{α} , principal a bajos contenidos

de GCL ($\alpha = 0.2$) y de L_{α} , principal y L_{α} , rica en GCL a altos contenidos de GCL ($\alpha = 0.7$) en todos los lipoplejos de la serie. Por otra parte, el sistema $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, presenta coexistencia de fases a bajos contenidos de GCL ($\alpha = 0.2$). Además, la TE es mejor a altos contenidos de GCL ($\alpha = 0.7$) para la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ donde hay coexistencia de fases (L_{α} , principal y L_{α} , rica en GCL), mientras que en la serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ la TE es mejor a bajos contenidos de GCL ($\alpha = 0.2$). En cualquier caso, los óptimos niveles de TE se encuentran a valores de α en las que hay coexistencia de fases. Estos resultados junto con otros previos obtenidos para otros GCLs, están acuerdo con el efecto sinérgico sobre la transfección debido a la coexistencia de fases.^{1,2,35} Por otro lado, es destacable que esta es la primera vez que se encuentran mejor TE a altos contenidos de GCL ($\alpha = 0.7$), especialmente porque la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ muestra también coexistencia de fases a $\alpha = 0.2$. Este hecho parece indicar que debe haber otros factores no considerados que también intervienen en el proceso que lo convierten en un sistema especialmente interesante.

Los resultados de crio-TEM muestran que la estructura tipo CT, presente a baja composición de GCL ($\alpha = 0.2$) en las dos series $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ y $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, está formada por un menor número de multilamelas que la estructura tipo FP, presente a mayor composición de GCL ($\alpha \geq 0.5$), y por tanto ofrece mayores posibilidades de liberar el pDNA. De esta forma, las mayor TE no sólo está mediada por la coexistencia de fases sino también por el tipo de nanoagregado, siendo generalmente las estructuras tipo CT los que muestran mayor TE, lo cual se cumple para la serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ pero no para no para la $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$. Para poder analizar esta discrepancia se han comparado las morfologías de ambas series encontrando varias diferencias. i) Mientras que la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ con $n = 1, 2$ y 3 , a una composición de GCL intermedia ($\alpha = 0.5$) muestra la presencia de dos nanoestructuras, CT y FP (Figura 3.21b, e y g), para la serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ prácticamente solo se observa una nanoestructura FP (Figura 3.31d-f). ii) El tipo de nanoestructura FP no es igual en las dos series, es decir, para la serie

$(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ la nanoestructura FP a $\alpha = 0.7$ muestra pequeños nanoagregados (Figura 3.21c y h) mientras que la nanoestructura FP de la serie $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, se muestra como un gran bloque (Figura 3.31d-f), por lo que es posible que los nanoagregados tipo FP de la serie $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ posean una mayor capacidad para penetrar en las células, lo que permite que se obtenga una mayor TE para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)/DOPE-pDNA$ y $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ a altos valores de α ($= 0.7$).

A diferencia de lo encontrado previamente en lipoplejos conteniendo un GCL con un espaciador alquílico ($n = 2, 3, 5$ ó 12), otra novedad de las series $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ y $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ es que la TE no es dependiente de la longitud del espaciador. De hecho, los lipoplejos $(C_{16}Am)_2C_n/DOPE-pDNA$ y $(C_{16}Im)_2C_n/DOPE-pDNA$ muestran los mejores niveles TE cuando la longitud del espaciador alquil del GCL es más corto,^{1,2} mientras que para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ estudiados en esta tesis las mejores TE se encuentran con espaciadores ($n = 1$ ó 3) y para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ se obtienen buenas eficiencias de transfección para todos los espaciadores. Estos resultados aclaran y confirman la gran importancia del tipo de espaciador en la TE: por una parte, el espaciador alquílico (C_n) es hidrofóbico por lo que tenderá a localizarse en el interior de la bicapa del liposoma mixto, mientras que el espaciador oligo-oxietileno $(C_2O)_n$, es más polar y puede permanecer en la superficie de la bicapa del liposoma mixto y por lo tanto interactuar con el DNA. Además, la orientación del espaciador oligo-oxietileno largo ($n = 3$) puede ser tal que la distancia entre los grupos catiónicos se reduzca y termine siendo menor que para el espaciador intermedio ($n = 2$) e incluso similar a la del espaciador más corto ($n = 1$). Este comportamiento es consistente con lo observado en trabajos previos referente a la relación entre distancias cortas entre las grupos catiónicos y altos niveles de transfección.^{1-3,35}

Finalmente los bajos niveles de anisotropía permiten dilucidar el alto grado de fluidez de los seis lipoplejos que componen las dos series,

$(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ y $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$, lo cual confirma que estos lipoplejos son adecuados para su uso como vectores de pDNA. Nótese que el contenido de DOPE incrementa la fluidez del lipoplejo en todos los casos, y sin embargo no siempre repercute en una mayor eficiencia de transfección.

Considerando conjuntamente los resultados de transfección junto con los de viabilidad celular podemos concluir que las dos series de GCLs basados en espaciadores oligo-oxietilenos son buenos candidatos para su uso como vectores génicos, si bien la serie que posee los grupos catiónicos de imidazol es considerablemente mejor que la de grupos amonio, y por tanto, los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE-pDNA$ son los mejores candidatos encontrados en este estudio para futuras aplicaciones *in vivo*.

3.2 Vectores lipídicos basados en lípidos aniónicos (ALs)

La transfección empleando liposomas aniónicos mediada por cationes ha sido establecida como una alternativa al uso de liposomas catiónicos,³⁶⁻³⁹ encaminada a mejorar la eficiencia de transfección y reducir sus niveles de citotoxicidad. Ello se debe a la biocompatibilidad característica de los ALs, derivada del hecho de estar constituidos en su mayor parte por fosfolípidos de la misma naturaleza que los que se encuentran en las membranas celulares. Además, la fagocitosis por macrófagos de lipoplejos con potenciales de membrana negativos, es comparativamente menor que la de sus análogos catiónicos. Es por ello que los ALs se han postulado como sistemas potencialmente más seguros para vectorizar y transfectar material genético a las células.^{36,40} Sin embargo, esta misma carga negativa, ventajosa respecto a la reducción de la tendencia a la fagocitosis, es una desventaja importante respecto a la capacidad de interaccionar, por una parte, con el DNA, a fin de compactarlo, y, por otra parte, con las membranas celulares, cargadas también negativamente. Con el objetivo de solventar dicho problema, es necesario emplear cationes que permitan compactar adecuadamente el DNA, y, posteriormente, cruzar efectivamente dicha barrera biológica. En la bibliografía, se pueden encontrar ejemplos de una gran variedad de cationes divalentes empleados como puentes catiónicos, tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , y Zn^{2+} .^{36,41} De entre ellos, el que ha mostrado mayor eficiencia en la compactación del DNA y mejores prestaciones como promotor de la internalización del lipoplejo por parte de las células, es el Ca^{2+} .^{36,42} Sin embargo, la eficiencia de transfección no ha logrado superar, por el momento, los niveles encontrados en algunos sistemas catiónicos. Es por ello que parte de esta tesis doctoral se ha dedicado a intentar mejorar las prestaciones de estos vectores aniónicos como potenciales agentes de transfección alternativos a los CLs.

En particular, en esta tesis se ha trabajado con lípidos aniónicos en presencia del cation divalente Ca^{2+} , y, adicionalmente, como novedad, y con la hipótesis de que una mayor carga efectiva de los puentes catiónicos puede mejorar la

transfección mediada por lipoplejos aniónicos, se empleó en lugar de cationes divalentes clásicos, el macrociclo lipídico catiónico pilar[5]areno (P^{10+}) (ver Figura 2.3), con el objeto de incrementar el número de cargas positivas capaces de compactar eficientemente el pDNA.

En la presente tesis doctoral se ha realizado una completa caracterización biofísica y bioquímica de los lipoplejos formados por los lípidos aniónicos (DOPG o DOPS, (ver Figura 2.2) y el lípido zwitteriónico DOPE y el plásmido pEGFP-C3, en presencia del catión Ca^{2+} o del macrociclo lipídico catiónico P^{10+} .

3.2.1 Liposomas aniónicos mixtos DOPG/DOPE y DOPS/DOPE en presencia del catión divalente Ca^{2+} y pDNA.

Como en las secciones precedentes, la caracterización de los liposomas aniónicos mixtos DOPG/DOPE y DOPS en presencia del catión divalente Ca^{2+} y pDNA, comenzó con los estudios de movilidad electroforética, a fin de determinar el potencial zeta, de los lipoplejos formados. La Figura 3.39 (a y b) muestra el potencial zeta para los lipoplejos DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA y DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA a una composición molar del liposoma mixto de $\alpha = 0.2$, y a varias relaciones molares AL/pDNA en función de la $[Ca^{2+}]$. Cada una de estas figuras presenta, además, una gráfica control de los sistemas AL/DOPE- Ca^{2+} , en ausencia de pDNA.

En contraste con los resultados típicos de potencial zeta para lipoplejos catiónicos, en los que se observa siempre un hábito típicamente sigmoideal con una inversión total de carga,^{1,3,15} los lipoplejos aniónicos muestran un patrón diferente. A bajas $[Ca^{2+}]$, se obtienen potenciales negativos (entre -50 y -60 mV) y, conforme la $[Ca^{2+}]$ aumenta, los valores de potencial zeta se incrementan hasta alcanzar la electroneutralidad ($\zeta \sim 0$ mV). Sin embargo, una vez alcanzada la electroneutralidad (a $[Ca^{2+}]$ entre 15-20 mM), un incremento posterior en la $[Ca^{2+}]$ no resulta en un aumento del potencial zeta. Este fenómeno ha sido observado tanto para el DOPG como para el DOPS a todas las relaciones de AL/pDNA, lo que indica que la carga negativa de los liposomas aniónicos puede neutralizarse con la adición de calcio, pero una vez alcanzada

la neutralidad, el resto del calcio permanece en disolución sin contribuir al potencial zeta de los nanoagregados (Figura 3.39).

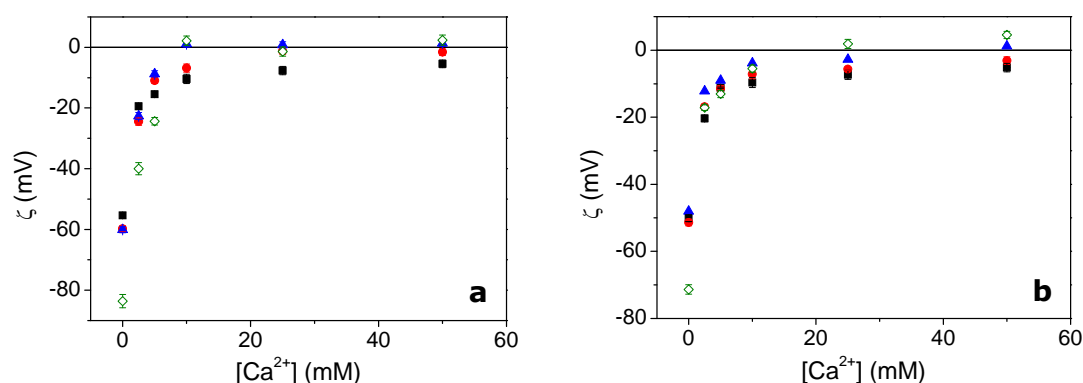


Figura 3.39. Valores de potencial zeta, ζ , en función de la $[Ca^{2+}]$ para los sistemas: (a) DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA; y (b) DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA a $\alpha = 0.20$ y diferentes relaciones molares AL/pDNA: 10 (cuadros negros); 15 (círculos rojos); y 20 (triángulos azules). La grafica con los rombos verdes corresponde a los controles DOPG/DOPE- Ca^{2+} y DOPS/DOPE- Ca^{2+} en ausencia de pDNA.

Por otra parte, el aumento de la relación molar AL/pDNA, para una $[Ca^{2+}]$ dada, produce un ligero efecto sobre el potencial zeta del sistema y el punto en el que se alcanza la electroneutralidad, dicho efecto es más notorio cuando se incrementa la $[Ca^{2+}]$. Este comportamiento puede explicarse en base a que cuando el contenido de AL se incrementa en el sistema, una mayor cantidad de calcio puede asociarse entre la superficie negativa de los liposomas aniónicos y del pDNA, lo que produciría un incremento en los valores de potencial zeta.

Por otra parte, los resultados de potencial zeta para los complejos AL/DOPE- Ca^{2+} (sin pDNA) no presentan diferencias significativas respecto a las muestras que contienen pDNA. Dichos resultados eran de esperar, ya que el potencial zeta es una propiedad interfacial, por lo que con estos experimentos, se mide el potencial (o carga neta) de las partículas en el plano de corte cuando se mueven por la acción de un campo eléctrico. Cuando los liposomas mixtos (en exceso), Ca^{2+} , y pDNA están juntos, el pDNA es compactado dentro de estructuras que presentan una superficie formada principalmente de liposomas aniónicos mixtos y calcio; por ello se obtienen valores muy similares de potencial zeta en los sistemas tanto en ausencia como en presencia de pDNA.

Con el fin de obtener las condiciones óptimas de compactación del pDNA, como complemento a los estudios de potencial ζ , se han realizado experimentos de gel electroforesis, para los lipoplejos DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA y DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA a diferentes composiciones molares $\alpha = 0.20, 0.25$ y 0.50 , cada uno de ellos a tres relaciones AL/pDNA = 10, 15 y 20, y un intervalo de $[\text{Ca}^{2+}]$ de entre 10 y 100 mM (Figura A8 del anexo 2). A partir de éstos estudios se encontró que para valores intermedios de composiciones molares ($\alpha = 0.5$) el pDNA se compacta sólo a altas $[\text{Ca}^{2+}]$ (= 100 mM) a todas las relaciones de carga. Por otra parte, a un $\alpha = 0.25$ el pDNA era compactado únicamente a una relación AL/pDNA = 20 y una $[\text{Ca}^{2+}] = 100$ mM. Las condiciones óptimas se encontraron a un $\alpha = 0.20$ y una relación molar AL/pDNA de 20 donde el pDNA es compactado a partir de una $[\text{Ca}^{2+}] = 25$ mM. Una vez optimizadas la composición molar y la relación AL/pDNA, se procedió a las repetir los experimentos a diferentes concentraciones de Ca^{2+} (5-75 mM), los resultados se presentan en la Figura 3.40.

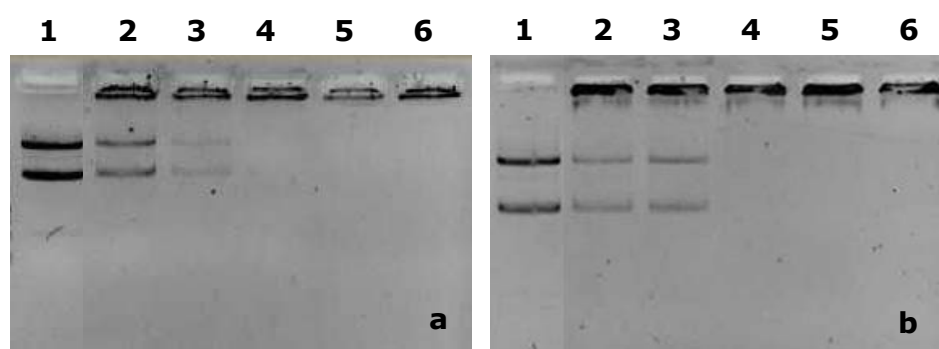


Figura 3.40. Gel electroforesis para los sistemas (a) DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA y (b) DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA a $\alpha = 0.20$ y una relación molar AL/pDNA de 20. Línea 1: pDNA. Línea 2-6: lipoplejos en presencia de diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$: 5 mM (línea 2); 10 mM (línea 3); 25 mM (línea 4); 50 mM (línea 5); y 75 mM (línea 6).

Para concentraciones de calcio entre 5 y 10 mM, gran parte del pDNA permanece sin compactar (ya que se mueve a lo largo del carril). Cuando se incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]$, la cantidad de pDNA libre va disminuyendo hasta lograr que todo el pDNA se mantenga en el pocillo a $[\text{Ca}^{2+}] \geq 25$ mM (líneas 4-6), lo que indica que el pDNA se encuentra completamente compactado. Esto muestra como era de esperar, que la compactación del pDNA, se realiza por el sistema AL/DOPE vía puentes de Ca^{2+} , es decir, los cationes Ca^{2+} hacen posible

la interacción entre las dos entidades cargadas negativamente (plásmido y liposomas aniónicos mixtos), favoreciendo la compactación del pDNA y dejando al sistema AL/DOPE-Ca²⁺-pDNA eléctricamente neutro, lo que implica su baja o nula movilidad electroforética. Estos resultados, corroboran lo determinado mediante potencial zeta, confirmando que la electroneutralidad se alcanza a [Ca²⁺] de entre 20-25 mM. Como es sabido para tener una eficiente transfección, el pDNA debe estar protegido y compactado por el vector, de ésta forma, para el resto de caracterizaciones se trabajo en las condiciones donde el se observo que el pDNA se encontraba completamente compactado.

El tamaño determinado mediante el equipo ZetaPALS para los liposomas mixtos AL/DOPE, indica que los liposomas presentan diámetros hidrodinámicos promedio de (119 ± 10) nm y (117 ± 9) nm para el sistema DOPG/DOPE y DOPS/DOPE respectivamente, siendo dichos tamaños consistentes con el protocolo de extrusión utilizado.

Con el objeto de conocer el tipo de estructura que presentan los lipoplejos formados a partir de los liposomas aniónicos mixtos AL/DOPE, se llevaron a cabo una serie de estudios mediante SAXS. La Figura 3.41 muestra los difractogramas de los liposomas mixtos, tanto en ausencia como en presencia de pDNA. Cada uno de los difractogramas presenta los índices de Miller que corresponden a cada máximo de difracción. El patrón de difracción encontrado para el sistema DOPG/DOPE-Ca²⁺, tanto en presencia como en ausencia de pDNA, muestra un ordenamiento que se corresponde a una fase hexagonal de micelas cilíndricas inversas, H_{II}^c. Por otra parte, para el sistema DOPS/DOPE-Ca²⁺, tanto en presencia como ausencia de pDNA, se observa una coexistencia de dos fases, una fase lamelar, L_α, y otra a una H_{II}^c. En ambos sistemas, se observa que la [Ca²⁺] no parece tener ningún efecto significativo en el tipo de fase encontrada. Los máximos de difracción de cada fase se pueden observar más claramente en la Figura 3.42, que presenta en escala logarítmica, los difractogramas para los lipoplejos DOPG/DOPE-Ca²⁺-pDNA y DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA, a una composición molar α = 0.20, una relación AL/pDNA = 20 y [Ca²⁺] = 25 mM.

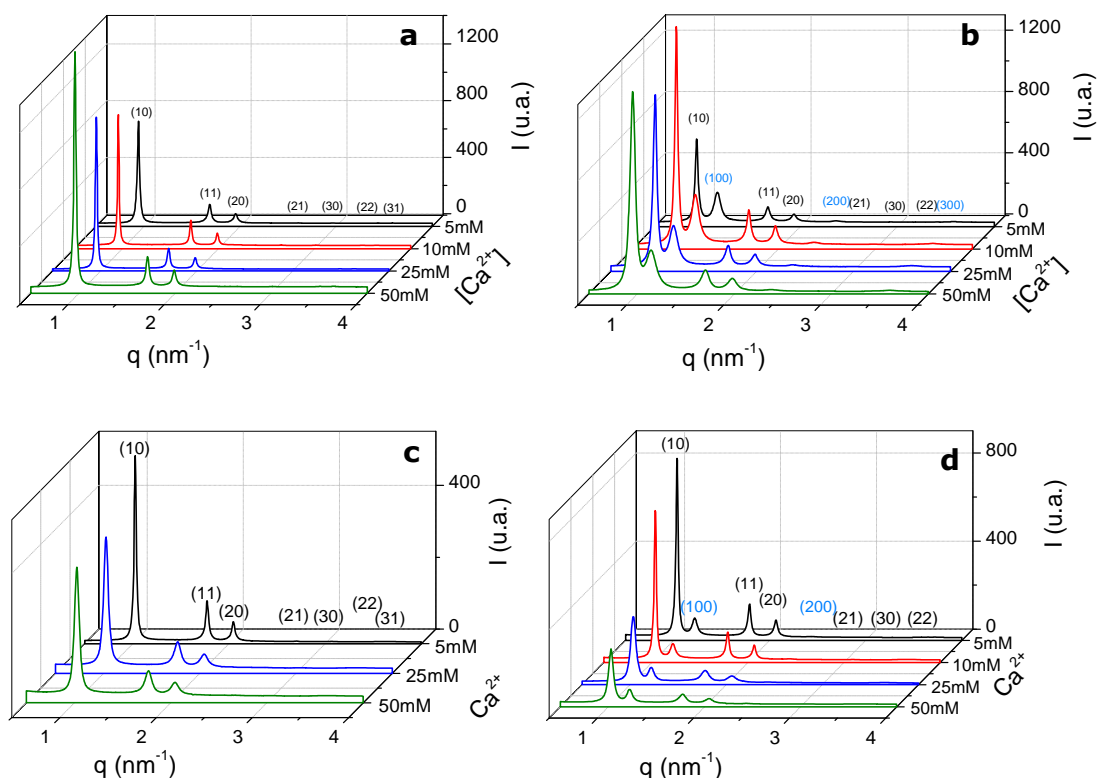


Figura 3.41. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos (a) DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA y (b) DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA a $\alpha = 0.20$, una relación molar AL/pDNA = 20 y diferentes concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]$. Controles de los sistemas en ausencia de pDNA: (c) DOPG/DOPE- Ca^{2+} y (d) DOPS/DOPE- Ca^{2+} .

La razón por la que los lipoplejos formados por DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA sólo presenten una fase $\text{H}_{\text{II}}^{\text{c}}$ y los formados por DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA presentan una mezcla de fases ($\text{H}_{\text{II}}^{\text{c}}$ y L_{α}), está directamente relacionado con el parámetro de empaquetamiento de los lípidos, P . Debido a que los tres lípidos (DOPG, DOPS y DOPE) presentan una región hidrofóbica idéntica, la diferencia en el P debe estar gobernada por una diferencia en el área ocupada por el grupo polar, a_0 . A este respecto, el DOPG al igual que el DOPE, presentan un grupo polar ligeramente más pequeño que el del DOPS ($P > 1$), por lo que presentan una mayor tendencia a formar agregados con fases hexagonales inversas. En consecuencia, el sistema mixto DOPG/DOPE- Ca^{2+} presentan solo una fase $\text{H}_{\text{II}}^{\text{c}}$, mientras que el sistema mixto DOPS/DOPE- Ca^{2+} presentan una coexistencia de fases: una fase $\text{H}_{\text{II}}^{\text{c}}$ como de una L_{α} . Cabe destacar que la coexistencia de fases

(Figura 3.41), se presenta tanto en el liposoma mixto (en ausencia de DNA) como en el lipoplejos (en presencia de pDNA), lo que indica que el tipo de fase encontrada depende solamente de la composición lipídica y el calcio.

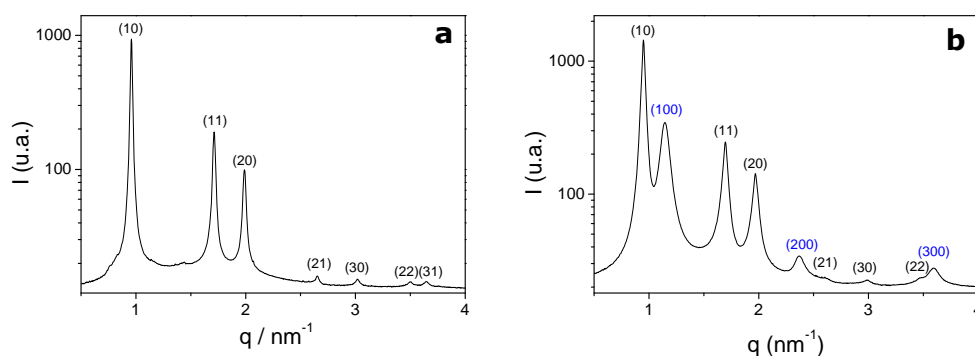


Figura 3.42. Difractogramas de los lipoplejos (a) DOPG/DOPE-Ca²⁺-pDNA y (b) DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA a $\alpha = 0.20$, una relación molar AL/pDNA = 20 y [Ca²⁺] = 25 mM, a) El patrón de difracción muestran la presencia de una fase hexagonal invertida H_{II}^c; b) El patrón de difracción muestra la presencia de una coexistencia fases: una fase hexagonal invertida H_{II}^c (índices Miller en negro) y una fase lamelar L _{α} (Índices de Miller en azul).

Una vez distinguidas las fases, el siguiente paso ha sido determinar la distancia interlamelar a partir de los difractogramas de SAXS, tanto para la fase L _{α} como para la fase H_{II}^c. La distancia interlamelar, d , en la fase H_{II}^c para ambos lipoplejos DOPG/DOPE-Ca²⁺-pDNA y DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA en función de la [Ca²⁺] (Tabla 3.7 y Figura 3.43) es muy similar (7.6 - 7.7) nm, mientras que la distancia calculada para la fase lamelar del sistema DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA es tan solo de 5.5 nm. De acuerdo a la Figura 3.43 se muestra que la d en cada sistema se mantiene prácticamente constante a las diferentes [Ca²⁺].

Tabla 3.7. Valores de las distancias interlamelares, d , encontrados en los sistemas DOPG/DOPE-Ca²⁺ en presencia y ausencia de pDNA.

Sistema	Fase	d (nm)
DOPG/DOPE/Ca ²⁺ -pDNA	H _{II} ^c	7.6
	H _{II} ^c	7.7
DOPS/DOPE/Ca ²⁺ -pDNA	L _{α}	5.5
DOPG/DOPE/Ca ²⁺	H _{II} ^c	7.1
	H _{II} ^c	7.0
DOPS/DOPE/Ca ²⁺	L _{α}	5.2

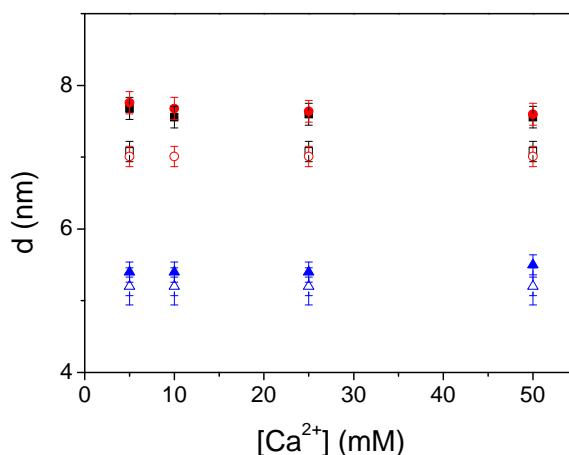


Figura 3.43. Valores de la distancia interlamelar, d , en función de la concentración de calcio para los lipoplejos DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA (fase $\text{H}_{\text{II}}^{\text{C}}$, cuadros negros) y para los lipoplejos DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA (fase $\text{H}_{\text{II}}^{\text{C}}$, círculos rojos; fase L_{α} , triángulos azules) a un $\alpha = 0.20$ y una relación molar AL/pDNA = 20. De igual forma, se incluyen los valores de las distancias determinadas en los controles formados por liposomas mixtos en presencia de calcio y ausencia de pDNA (símbolos abiertos).

Con relación a las distancias determinadas para la fase hexagonal invertida, los valores encontrados ($d_{\text{H}_{\text{II}}^{\text{C}}} = 7.6 - 7.7 \text{ nm}$) son similares a los obtenidos para otros sistemas formados por lípidos catiónicos (ya sean lípidos con una cabeza polar y dos colas hidrofóbicas o un GCL) en presencia de DOPE y DNA (tanto DNA lineal como circular pDNA).^{30,37,45-46} En ausencia de pDNA, se observa una ligera disminución de la $d_{\text{H}_{\text{II}}^{\text{C}}}$, en ambos sistemas (DOPG o DOPS), siendo para el sistema DOPG/DOPE- Ca^{2+} , $d_{\text{H}_{\text{II}}^{\text{C}}} \approx 7.1 \text{ nm}$, y para el sistema DOPS/DOPE- Ca^{2+} , $d_{\text{H}_{\text{II}}^{\text{C}}} \approx 7.0 \text{ nm}$. Por otra parte, la distancia interlamelar del sistema DOPS/DOPE- Ca^{2+} , tanto en presencia como ausencia de pDNA para la fase L_{α} , es prácticamente idéntica ($d_{\text{L}_{\alpha}} \approx 5.5 \text{ nm}$). Es de resaltar que este valor es consistente con el encontrado por el grupo de Raviv et al. (= 5.14 nm), para el DOPS en presencia de Ca^{2+} ,⁴³ así como el encontrado para el lípido neutro DPPC en presencia de calcio (= 5.6 nm).⁴⁴ A fin de explicar estos comportamientos se han tomado en cuenta varias consideraciones. Tal como se expresa en la ecuación 2.8, la distancia interlamelar, d , puede ser expresada como la suma del espesor de la región lipídica, d_m , y la región acuosa, d_w . Para este tipo de sistemas, en la región acuosa debería estar contenido tanto el pDNA

superenrollado como los cationes Ca^{2+} . Considerando que los tres lípidos (DOPG, DOPS y DOPE) muestran una región hidrofóbica idéntica (Figura 2.2 sección experimental), se puede estimar que el valor de d_m tiene que estar en torno a los 4.5 nm para todos los sistemas, lo que significa que para las fases H_{II}^c , donde la d es aproximadamente 7.6 nm, el diámetro interno de los cilindros es de ≈ 3.1 nm, mientras que para las fases L_α ($d = 5.5$ nm) la región acuosa es de ≈ 1 nm de espesor. Considerando, por otra parte, que el catión Ca^{2+} tiene un radio iónico de 0.4 nm,⁴⁵ la región acuosa de la fase hexagonal es capaz de albergar tanto el pDNA superenrollado como los cationes Ca^{2+} , que mediarían la interacción y compactación del pDNA con la superficie lipídica negativa. Esto podría explicar por qué los valores de la distancia interlamelar en la fase hexagonal invertida, son ligeramente mayores en presencia de pDNA para ambos lipoplejos (AL/DOPE- Ca^{2+} -pDNA). De esta forma y asumiendo que d_m es constante, se espera que el incremento total de la d , esté provocado por un ligero incremento en el diámetro interno del cilindro de las micelas invertidas que conforman la fase H_{II}^c , provocado por la presencia del pDNA. Por otra parte, la distancia d_w estimada para la fase L_α de los lipoplejos DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA (≈ 1 nm) no es lo suficientemente grande para albergar tanto las hélices de pDNA y los iones calcio. Tomando en cuenta que el valor de d , determinado para la fase L_α en el liposoma mixto DOPS/DOPE- Ca^{2+} es prácticamente igual al determinado para los lipoplejos DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA y que valores de $d \approx 5.5$ nm son característicos de membranas aniónicas y neutras apiladas por la presencia de cationes divalentes en ausencia de DNA,^{43,44} se sugieren que la fase lamelar formada en el sistema no presenta pDNA entre las bicapas lipídicas. Es decir, que esta fase lamelar, a diferencia de las que encontramos en los sistemas CLs-pDNA, está formada por bicapas lipídicas unidas solamente por puentes de Ca^{2+} . Otra evidencia que confirma que el pDNA no está presente en la estructura lamelar, es que a través de un cuidadoso análisis de los difractogramas de los lipoplejos DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA (Figura 3.42b) no se ha observado la presencia del máximo de difracción correspondiente a la interacción pDNA-pDNA de la fase L_α . Esto permite concluir que los lipoplejos DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA se agregan

dentro de fases hexagonales, mientras que los lipoplejos DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA presentan la coexistencia de dos fases, una fase $\text{H}_{\text{II}}^{\text{c}}$, la cual contienen todo o parte del pDNA y otra fase L_{α} que no presenta pDNA (Figura 3.44).

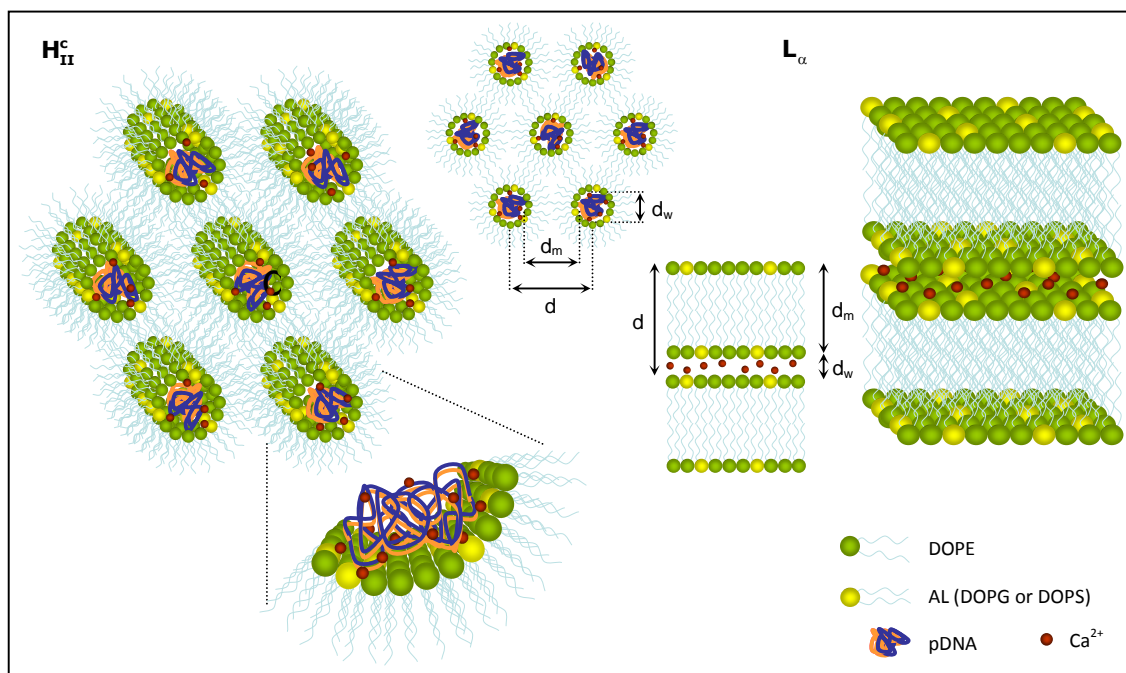


Figura 3.44. Esquema de las vistas 2D y 3D de la fase $\text{H}_{\text{II}}^{\text{c}}$ y L_{α} de los lipoplejos AL/DOPE- Ca^{2+} -pDNA y DOPS/DOPE- Ca^{2+} , respectivamente. Donde AL es puede ser el lípido aniónico DOPG o DOPS.

La correlación entre las hélices de pDNA, d_{pDNA} , para las fases hexagonales, es igual a la distancia interlamelar, d (7.6 - 7.7) nm, ya que el pDNA se encuentra contenido en el interior de las micelas invertidas.^{1,14,19} Por lo que se obtienen conclusiones similares.

Una vez hecho el estudio electroquímico y estructural de los lipoplejos, se procedió a determinar su capacidad de transfección en las células humanas, así como sus niveles de citotoxicidad. Para ello, se ha llevado a cabo estudios de transfección y viabilidad celular en presencia de suero en las líneas celulares HEK293T y HeLa, a las condiciones óptimas de compactación del pDNA encontrados en los estudios electroquímicos, ($\alpha = 0.20$ y 0.25 , relaciones AL/pDNA = 15 y 20, y diferentes $[\text{Ca}^{2+}] = 10, 25, 50$ y 75 mM).

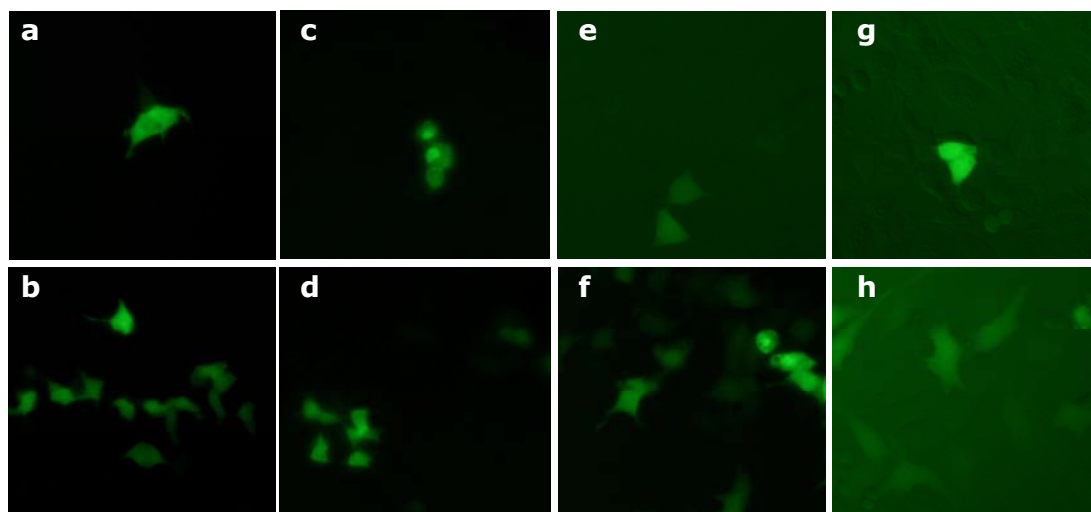


Figura 3.45. Micrografías de fluorescencia que muestran la expresión de la proteína GFP en las líneas celulares HEK293T (paneles a-d y f) y HeLa (paneles e, g y h) mediante la transfección con los lipoplejos DOPG/DOPE-Ca²⁺-pDNA a una [Ca²⁺] = 25 mM (a y e) y 50 mM (panel b); así como para los lipoplejos DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA a una [Ca²⁺] = 25 mM (c y g) y 50 mM (d). A un $\alpha = 0.2$ y una relación AL/pDNA = 20. Los paneles f y h corresponden a los resultados del control positivo (Lipofectamina 2000*) para las líneas celulares HEK293T y HeLa respectivamente.

La Figura 3.45 muestra las micrografías de fluorescencia de los resultados de transfección encontrados en las líneas celulares HEK293T y HeLa a las formulaciones óptimas ($\alpha = 0.20$ y AL/pDNA = 20 y [Ca²⁺] = 25 y 50) para los lipoplejos DOPG/DOPE-Ca²⁺-pDNA y DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA, así como para el control positivo Lipo2000*, en presencia de suero (+FBS). A simple vista, las micrografías revelan que los lipoplejos DOPG/DOPE-Ca²⁺-pDNA y DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA son capaces de transfectar el plásmido pEGFP-C3 en las dos líneas celulares empleadas. Un análisis más detallado en la línea celular HEK293T, permite observar que los mejores resultados de transfección se obtienen a una [Ca²⁺] = 50 mM (paneles b y d) para los dos sistemas de lipoplejos (DOPG y DOPS). Comparando los niveles de expresión de los paneles b y d, también se puede concluir que el lipoplejos formado por el lípido aniónico DOPG presenta resultados de transfección ligeramente mejores respecto al DOPS. Sin embargo, en ninguno de los casos los resultados de transfección superan a los obtenidos por el control comercial Lipofectamina 2000* (panel f). Aunque los resultados obtenidos en la línea celular HeLa (paneles e y g) fueron peores que los obtenidos en HEK293T, se pueden obtener conclusiones similares respecto a las tendencias de los dos tipos de lípidos.

Los resultados de FACS (Figura 3.46) indican que el % de proteína GFP expresada presenta, en todos los casos, valores bajos-moderados (siempre menores a un 20%), y por debajo de los obtenidos por el control Lipo2000*, corroborando los resultados obtenidos por microscopia confocal. De nuevo, se puede observar que las eficiencias de transfección son ligeramente mejores para la línea celular HEK293T que para HeLa, y que los lipoplejos DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA son sutilmente mejores que los lipoplejos DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA.

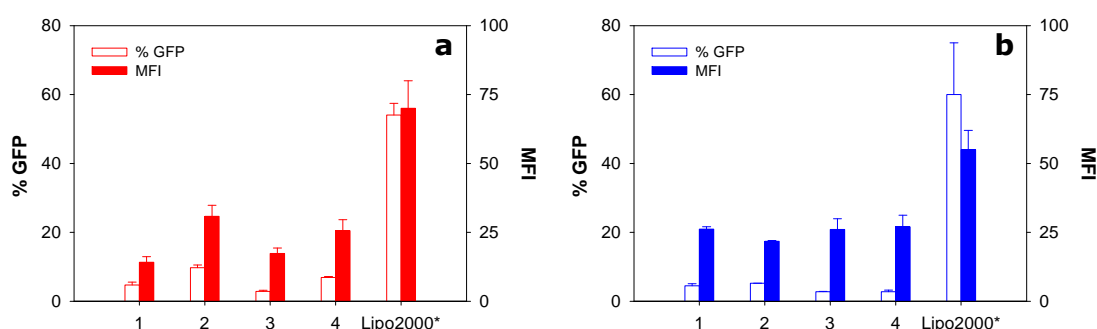


Figura 3.46. Eficiencias de transfección en términos de %GFP y MFI de los lipoplejos 1) DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA [Ca^{2+}] = 25 mM; 2) DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA [Ca^{2+}] = 50 mM; 3) DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA [Ca^{2+}] = 25 mM; 4) DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA [Ca^{2+}] = 50 mM, en presencia de suero (+FBS). Para las líneas celulares (a) HEK293T y (b) HeLa. Control comercial Lipo2000*.

Los resultados de transfección encontrados en esta tesis para el sistema DOPG/DOPE en presencia de Ca^{2+} , difieren de los obtenidos por el grupo de Burgess et al. para la línea celular CHO-K1 (en el que emplean el plásmido pCMV-GFP o pEGFP-N3)^{36,38,39}. Burgess y col. encuentran niveles de transfección comparables a los encontrados por el control Lipo2000 para sistemas DOPG/DOPE en presencia de Ca^{2+} , tanto en presencia como en ausencia de suero. Un factor importante que puede estar entre las posibles causas de tales diferencias, puede ser el hecho de que los estudios de transfección se han realizado con líneas celulares diferentes y con plásmidos diferentes. Como ya se ha visto anteriormente el nivel de transfección varía de una línea celular a otra, debido a la variabilidad intrínseca de los sistemas biológicos.

Por otra parte, en la Figura 3.47 se presentan los resultados del ensayo de viabilidad celular para ambas líneas celulares para los lipoplejos DOPG/DOPE-

Ca²⁺-pDNA y DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA a las formulaciones óptimas ($\alpha = 0.20$ y AL/pDNA = 20) y diferentes [Ca²⁺]. Los resultados muestran que los lipoplejos DOPG/DOPE-Ca²⁺-pDNA son ligeramente más tóxicos para la línea celular HEK293T que el control Lipo2000*, sobre todo a una [Ca²⁺] = 50 mM, donde se ha obtenido las mejores eficiencias de transfección. Para el caso de los lipoplejos DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA, los resultados de viabilidad celular son comparables a los del control y en algunos casos ([Ca²⁺]= 15 mM), incluso se encuentran mejores resultados de viabilidad celular. Sin embargo, a mayores concentraciones de calcio los niveles de viabilidad celular se reducen a un 80 y 75 % para una [Ca²⁺] de 25 y 50 Mm, respectivamente. Ambos lipoplejos presentan niveles de toxicidad similares en las dos líneas ensayadas.

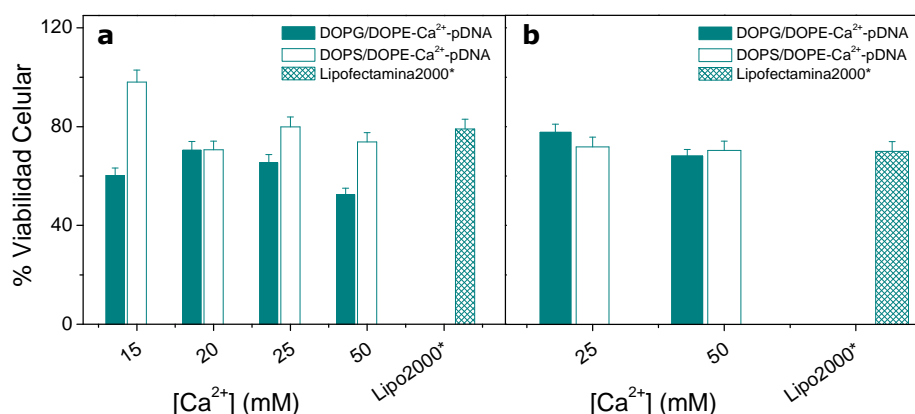


Figura 3.47. Viabilidad celular en las líneas celulares a) HEK293T y b) HeLa; transfectadas con los lipoplejos DOPG/DOPE-Ca²⁺-pDNA y DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA a un $\alpha = 0.20$, una relación AL/pDNA = 20 y diferentes [Ca²⁺]. Se ha usado como control positivo Lipo2000*.

En cualquier caso, a pesar de que los niveles de viabilidad celular son moderados para las [Ca²⁺] en las que se consiguió transfección, es de resaltar que dichas concentraciones de calcio son muy superiores a los niveles intracelulares encontrados de forma natural "in vivo", lo que hace poco viable su aplicación como vectores de terapia génica en seres humanos. Además, ninguna de las formulaciones estudiadas en este apartado, han mostrado niveles comparables de transfección a los encontrados en los vectores lipídicos formados por GCLs, como los presentados anteriormente. Estos resultados, junto con la observación de que, desde del primer estudio realizado por

Burgess et al. en 2004, el número de publicaciones sobre ALs como vectores de transfección es muy reducido (menos del 1 % de las encontradas para CLs), hace pensar que la vía de la transfección con ALs mediada por cationes divalentes, siendo una opción viable con ciertas ventajas potenciales, necesita todavía optimizar y mejorar sus protocolos y los parámetros que afectan de forma directa en los niveles de transfección celular.

3.2.2 Liposoma aniónico mixto DOPG/DOPE en presencia del macrociclo catiónico multivalente P^{10+} y pDNA.

Una nueva aproximación en el uso de ALs podría consistir en utilizar como entidad catiónica una molécula multivalente de mayor tamaño que el Ca^{2+} , como es el caso de un pilarareno. El pilar[5]areno empleado en esta tesis para evaluar dicha hipótesis (Figura 2.3) es un macrociclo muy soluble en agua, que presenta 5 cargas positivas en cada extremo de la molécula (es decir un total de 10 cargas). Dado que se tratan de grupos trimetilamonio, es plausible admitir que las cargas efectivas se pueden aproximar sin cometer prácticamente error a las cargas nominales.² De hecho, es esta gran cantidad de cargas la responsable de que esta molécula no forme agregados supramoleculares en medio acuoso, sino que tienda a disolverse con gran facilidad, lo que permite que pueda usarse como sustituyente del catión divalente Ca^{2+} en los lipoplejos formados por liposomas aniónicos. Así, en este apartado, se han caracterizado los liposomas aniónicos mixtos conformados por DOPG/DOPE en presencia del macrociclo pilar[5]areno, P^{10+} , y pDNA, a diferentes composiciones molares DOPG/DOPE ($\alpha = 0.2, 0.5, 1.0$), a una relación AL/pDNA = 1 y a diferentes concentraciones de P^{10+} .

Respecto a la caracterización electroquímica, los resultados de potencial zeta obtenidos para los lipoplejos DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA y DOPG/DOPE- P^{10+} -ctDNA en función de la concentración de P^{10+} , presentan un comportamiento similar al obtenido con los lipoplejos formados por CL (Figura 3.48). Es decir, en contraste con los lipoplejos DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA, donde nunca se observa una inversión clara de carga, la sustitución de Ca^{2+} por P^{10+} como entidad catiónica provoca en el sistema una fuerte inversión de carga a determinada concentración de P^{10+} . Esto es sumamente interesante, ya que, al tener lipoplejos cargados positivamente, la interacción lipoplejo-membrana celular podría verse favorecida. La razón por la que los lipoplejos mediados por P^{10+} presenten una inversión a diferencia de los mediados por Ca^{2+} , puede deberse al exceso de cargas positivas del P^{10+} unidas al liposoma aniónico, que

contrarrestarían las cargas negativas tanto del liposoma aniónico como del pDNA (Figura 3.48).

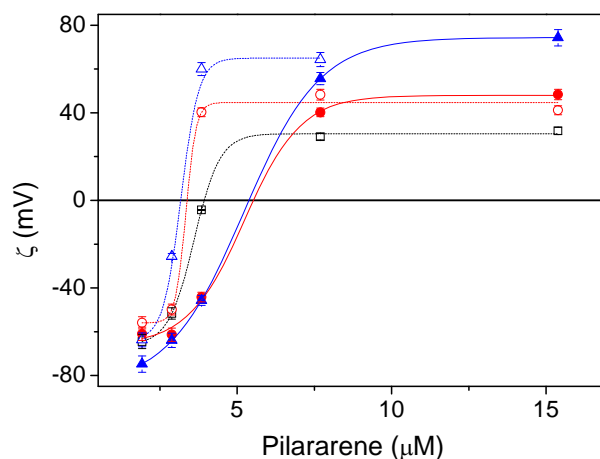


Figura 3.48. Valores de potencial ζ frente a concentración de pilar[5]areno para los lipoplejos DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA (símbolos abiertos) y DOPG/DOPE- P^{10+} -ctDNA (símbolos sólidos) a diferentes composiciones de lípido DOPG/DOPE, α : Cuadros ($\alpha = 0.2$); círculos ($\alpha = 0.5$) y triángulos ($\alpha = 1.0$). Relación AL/pDNA = 1.

Además, puede observarse en la Figura 3.48 que las curvas de potencial zeta del lipoplejo DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA se encuentran desplazadas a la izquierda de las curvas del lipoplejo formado a partir del ctDNA. Es decir que la electroneutralidad se alcanza a menores $[P^{10+}]$ para el pDNA, corroborando que en este tipo de sistemas la carga efectiva del plásmido es menor que la del ctDNA, como se ha encontrado también para los vectores lipídicos catiónicos.

Por otra parte, los resultados de gel electroforesis (Figura 4.49) muestran que el pDNA es completamente compactado a una composición de AL $\alpha = 0.2$ y una concentración de $[P^{10+}] \geq 30 \mu\text{M}$, mientras que a mayores contenidos de AL $\alpha = 0.5$ y 1.0 , se necesita una menor concentración de $[P^{10+}] \geq 15 \mu\text{M}$ para compactar el pDNA. Es de resaltar que a diferencia de los vectores lipídicos aniónicos mediados por Ca^{2+} , donde se requiere una alta relación AL/pDNA para tener compactado el pDNA, para el sistema DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA, una relación de AL/pDNA = 1 es suficiente para lograr condiciones de compactación.

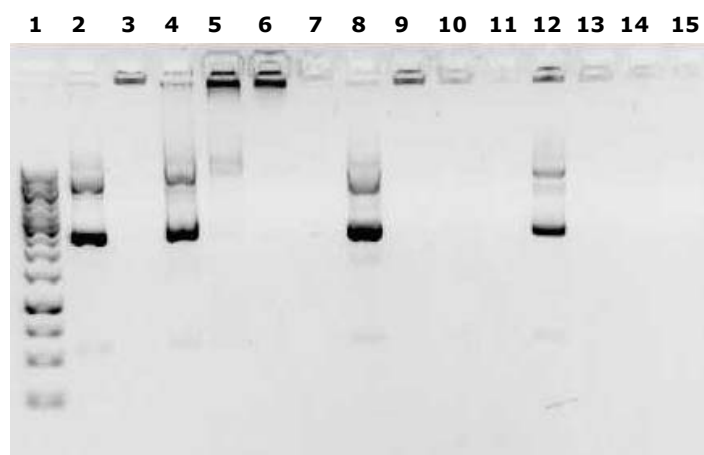


Figura 3.49. Gel electroforesis de los lipoplejos DOPG/DOPE-P¹⁰⁺-pDNA a diferentes composiciones molares AL/DOPE: (líneas 4-7) $\alpha = 0.2$; (líneas 8-11) $\alpha = 0.5$; (líneas 12-15) $\alpha = 1.0$. Concentraciones de pilar[5]areno: [P¹⁰⁺] = 8 μM (líneas 4, 8 y 12); [P¹⁰⁺] = 15 μM (líneas 5, 9 y 13); [P¹⁰⁺] = 30 μM (líneas 6, 10 y 14) y [P¹⁰⁺] = 60 μM (líneas 7, 11 y 15).

Sin embargo, los resultados de gel electroforesis (Figura 3.49) contrastan con los obtenidos a partir de potencial zeta, ya que apuntan a que la compactación total del pDNA ocurre a [P¹⁰⁺] superiores a las que se alcanza la electroneutralidad (Figura 3.48). Esto puede deberse a que, a pesar de tener lipoplejos electroneutros a esas concentraciones de P¹⁰⁺, parte del pDNA puede no estar totalmente compactado. Es por ello que la aplicación conjunta de la técnica de potencial zeta y gel electroforesis nos ha permitido dilucidar la interacción electroquímica de los lipoplejos DOPG/DOPE-P¹⁰⁺-pDNA, y establecer las condiciones óptimas de compactación de pDNA para el resto de caracterizaciones (dos composiciones molares $\alpha = 0.2$ y 0.5 ; relación AL/pDNA = 1 y [P¹⁰⁺] $\geq 15 \mu\text{M}$).

El tipo de estructura y morfología de los lipoplejos DOPG/DOPE-P¹⁰⁺-pDNA se evaluó mediante las técnicas de SAXS y crio-TEM. Los estudios de SAXS para los lipoplejos DOPG/DOPE-P¹⁰⁺-pDNA se realizaron a dos composiciones molares ($\alpha = 0.2$ y 0.5) y diferentes concentraciones de P¹⁰⁺ (15, 30 y 60 μM). Los difractogramas muestran un patrón diferente, dependiente de la composición molar, α (Figura 3.50). Cuando el contenido de DOPE es mayor ($\alpha = 0.2$), los máximos de difracción muestran un ordenamiento correspondiente a una fase hexagonal invertida, H_{II}^c (Figura 3.50a), mientras que cuando se

incrementa el contenido de DOPG en la composición ($\alpha = 0.5$), los máximos se corresponden a una fase lamelar, L_α (Figura 3.50b). En ninguno de los casos se observa que la $[P^{10+}]$ influya en el tipo de fase encontrada ya que a todas las $[P^{10+}]$ estudiadas la fase se mantiene para cada composición. Cabe destacar que la presencia de la fase H_{II}^c , a bajas composiciones de AL ya fue observada para los lipoplejos DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA, lo que nos permite confirmar que el tipo de fase encontrada depende únicamente del parámetro de empaquetamiento de los lípidos presentes en el liposoma mixto, y no del tipo "catión" utilizado ni de la concentración de éste.

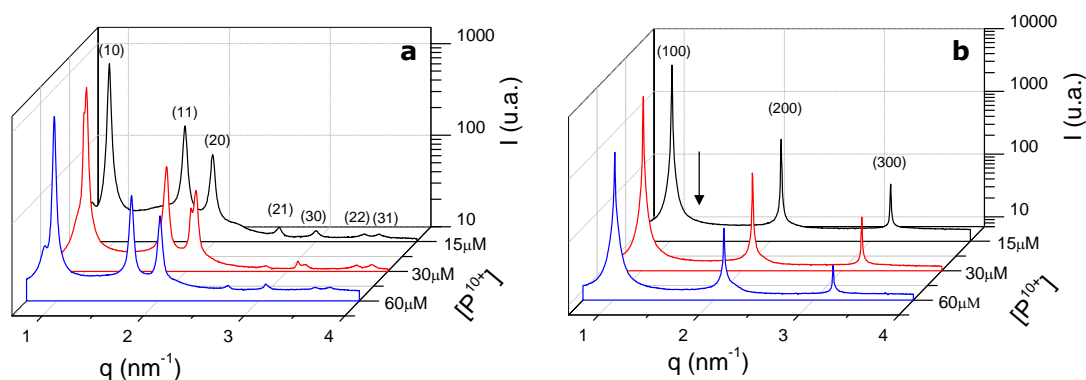


Figura 3.50. Difractogramas correspondientes a los lipoplejos DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA a dos composiciones molares: a) $\alpha = 0.20$; y b) $\alpha = 0.50$. A una relación molar AL/pDNA = 20 y diferentes $[P^{10+}]$: 15, 30 y 60 μM .

Las distancia interlamelar, d , tanto para la fase H_{II}^c como la L_α (Figura 3.51), muestran que los valores se mantienen prácticamente constantes a diferentes $[P^{10+}]$. En el caso de la fase hexagonal, la d está en torno a (7.5 ± 0.2) nm, siendo estos valores similares a los determinados para el sistema DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA (7.6 nm) y otros sistemas formados por CL.^{30,37,45-46} Por otra parte, la d para la fase lamelar L_α está en torno a los (6.2 ± 0.1) nm. Tomando en cuenta que el espesor de la bicapa lipídica es d_m es aproximadamente 4.5 nm, se puede obtener la d_w , donde se alberga tanto el pDNA como el P^{10+} : i) para la fase H_{II}^c , $d_w \approx (3.0 \pm 0.2)$ nm, y ii) para la fase L_α , $d_w \approx (1.7 \pm 0.1)$ nm.

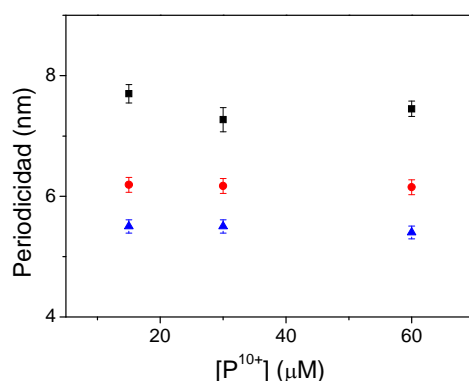


Figura 3.51. Distancia periódica, d , en función de la $[P^{10+}]$ para los lipoplejos DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA: fase H_{II}^c (cuadros negros); y fase L_α (círculos rojos). Correlación DNA-DNA, d_{pDNA} (triángulos azules).

Es de destacar que el valor obtenido para el espesor de la región acuosa, d_w , en la fase L_α resulta intermedio entre el encontrado cuando el pDNA está compactado por liposomas catiónicos ($d_w \approx 2.0-2.5$ nm),^{1,2} y el obtenido para las fases lamelares de AL en presencia de Ca^{2+} y ausencia de pDNA ($d_w \approx 1.0$).⁴¹ Este hecho, junto con que el valor de d_w para la fase H_{II}^c sea el mismo que para el sistema DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA (3.0 ± 0.1) nm, podría indicar que el P^{10+} se encuentra ligeramente intercalado en la bicapa lipídica como se muestra en la Figura 3.52

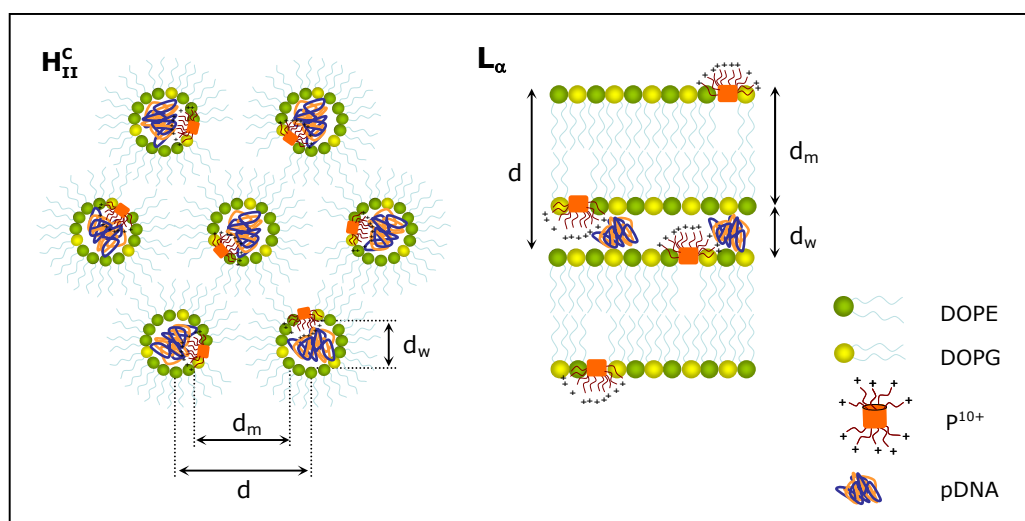


Figura 3.52. Esquema 2D de las fases H_{II}^c y L_α de los lipoplejos AL/DOPE- P^{10+} -pDNA. Donde el P^{10+} se organiza de tal forma que queda ligeramente intercalado en la bicapa con las cargas positivas expuestas a la superficie.

En relación a la correlación pDNA-pDNA, d_{pDNA} , se ha encontrado que para la fase H_{II}^c el valor es el mismo que la distancia, d (7.3-7.7 nm), ya que el pDNA se encuentra en el interior de las micelas cilíndricas inversas (Figura 3.52), mientras que para la fase lamelar se ha obtenido una distancia de 5.5 nm entre las hélices de pDNA a todas las concentraciones de P^{10+} , lo cual está en concordancia a lo encontrado para lipoplejos formados por CLs.

El estudio estructural se completó con experimentos de crio-TEM, tanto de los liposomas aniónicos mixtos en presencia de P^{10+} (DOPG/DOPE- P^{10+}), como de los lipoplejos DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA. La morfología de los sistemas en ausencia de pDNA se estudió a una composición molar de $\alpha = 0.5$, mientras que para los sistemas en presencia de pDNA se analizaron dos composiciones diferentes, $\alpha = 0.2$ y 0.5 . En ambos casos, los estudios se llevaron a cabo a una $[P^{10+}] = 30 \mu\text{M}$, concentración a la que el pDNA se encuentra completamente compactado (Figura 3.49).

Las micrografías de crio-TEM de liposomas mixtos DOPG/DOPE- P^{10+} (Figura 3.53) muestran la presencia de nanoagregados multilamelares muy compactos. Dicha estructura multilamelar ha sido confirmada a través del patrón de difracción determinado mediante FFT (Figura 3.53c). Estas estructuras parecen indicar que los liposomas aniónicos mixtos DOPG/DOPE interaccionan electrostáticamente con la molécula catiónica multivalente P^{10+} , provocando la aparición de este tipo característico de nanoagregados. De esta forma, al contrario de los lipoplejos de CL y pDNA para los que una de las fases más encontradas se caracteriza por el apilamiento de bicapas lipídicas catiónicas con el pDNA aniónico en una disposición tipo "sándwich", este sistema se encuentra organizado por bicapas aniónicas apiladas por la acción mediadora del P^{10+} (Figura 3.54).

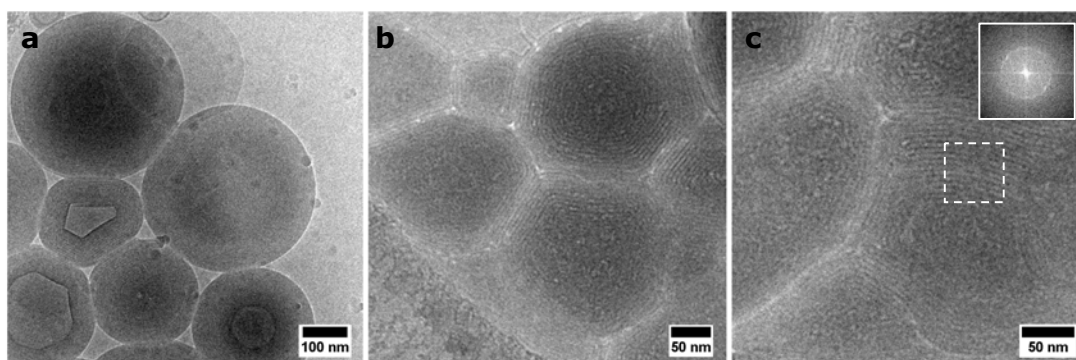


Figura 3.53. Micrografías de crio-TEM para liposomas mixtos DOPG/DOPE en presencia de P^{10+} a una composición molar $\alpha = 0.5$ y una $[P^{10+}] = 30 \mu\text{M}$ (a-c). El recuadro superior de la figura (c) representa la FFT de la sección señalada con el recuadro inferior de líneas discontinuas de la misma imagen.

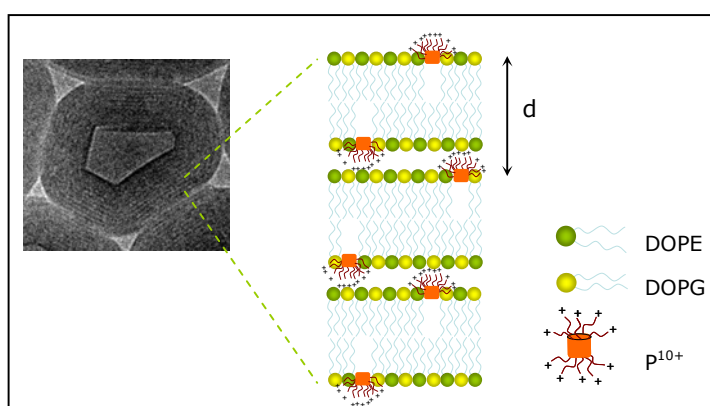


Figura 3.54. Esquema 2D de los agregados multilamelares encontrados para el sistema DOPG/DOPE- P^{10+} en ausencia de pDNA.

Además, se ha hecho un análisis de los patrones de periodicidad de los nanoagregados multilamelares del sistema DOPG/DOPE- P^{10+} . Como ejemplo, la Figura 3.55 muestra un gráfico de los diferentes niveles de grises, indicativos de los distintos niveles de densidad electrónica, frente a la distancia a lo largo de una línea perpendicular a las multilamelas. A partir de los máximos encontrados se ha podido calcular la distancia promedio entre picos, obteniendo un espaciado interlamelar promedio de $(5.2 \pm 0.2) \text{ nm}$. Teniendo en cuenta que la distancia interlamelar es ligeramente menor a la encontrada para el sistema DOPG/DOPE- Ca^{2+} ($\approx 5.5 \text{ nm}$), y que el P^{10+} es una molécula de mayor volumen que el catión divalente Ca^{2+} , se confirma que el P^{10+} se encuentra ligeramente intercalado en la bicapa lipídica (Figura 3.54).

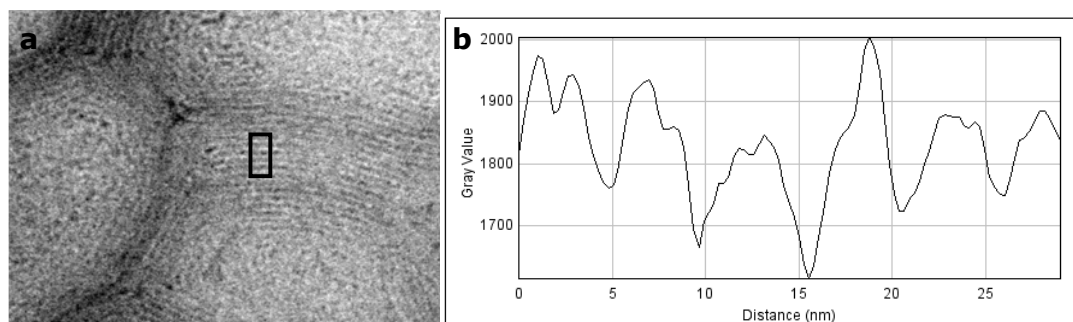


Figura 3.55. (a) Detalles extraídos de las micrografías originales de crio-TEM del sistema DOPG/DOPE-P¹⁰⁺ en ausencia de pDNA. (b) Escala de grises en función de la distancia de la región seleccionada con el recuadro negro de la figura (a).

Los resultados de crio-TEM encontrados para los lipoplejos DOPG/DOPE-P¹⁰⁺-pDNA se presentan en la Figura 3.56 y 3.57 para las composiciones molares $\alpha = 0.2$ y $\alpha = 0.5$, respectivamente. A simple vista, resulta difícil determinar el tipo de nanoagregado presente en las micrografías para los lipoplejos a una composición $\alpha = 0.2$ (Figura 3.56); sin embargo, sometiendo ciertas zonas de las imágenes (ver recuadro blanco en panel a de la Figura 3.56, a modo de ejemplo) a un proceso de optimización de la imagen y cálculo FFT, puede observarse la aparición (dentro del ruido de la señal) de seis *spots* de difracción (ver recuadro negro en la esquina superior derecha del panel a) que apuntan inequívocamente a la existencia de fases hexagonales, en concordancia con los resultados de SAXS.

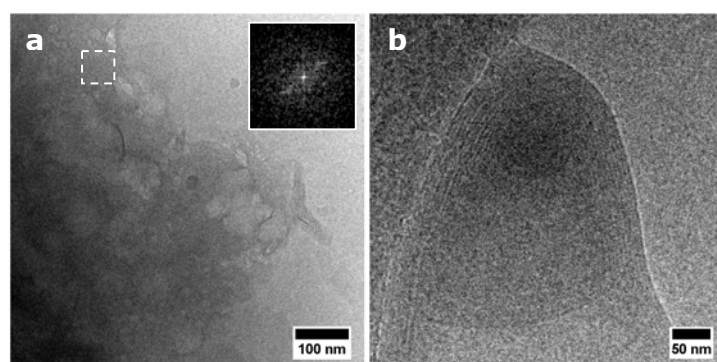


Figura 3.56. Micrografías de crio-TEM de los lipoplejos DOPG/DOPE-P¹⁰⁺-pDNA a una composición molar $\alpha = 0.2$ y una $[P^{10+}] = 30 \mu M$. El recuadro superior del panel a representa el cálculo FFT de la sección señalada con el recuadro de líneas discontinuas.

Por otra parte, a una composición molar de $\alpha = 0.5$, se observa la presencia de nanoagregados multilamelares tipo CT (Figura 3.57), comúnmente encontrados

en lipoplejos formados por lípidos catiónicos.^{1,2,46} Estos resultados, de nuevo, están en concordancia con los obtenidos mediante la técnica de SAXS, en los que, a una composición $\alpha = 0.5$, se encontró la existencia de una fase lamelar L_{α} .

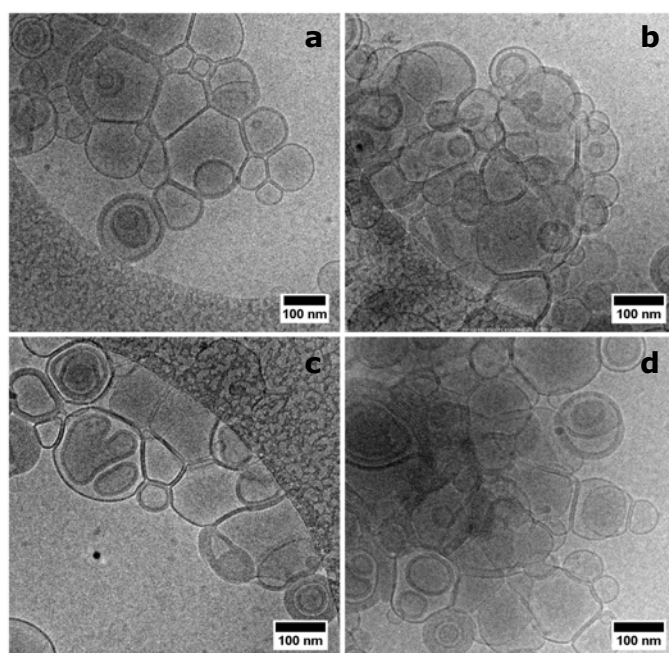


Figura 3.57. Micrografías de crio-TEM de los lipoplejos DOPG/DOPE-P¹⁰⁺-pDNA a una composición molar $\alpha = 0.5$ y una $[P^{10+}] = 30 \mu\text{M}$.

Es destacable que la morfología del nanoagregado multilamelar encontrado en los lipoplejos DOPG/DOPE-P¹⁰⁺-pDNA no tiene nada que ver con el tipo de nanoagregado observado en ausencia de pDNA: en ausencia de pDNA, la nanoestructura presentan multilamelas delgadas y mucho más compactas, mientras que en presencia de pDNA se observa un engrosamiento de las paredes de las bicapas, así como multilamelas menos compactas. Para verificar esta diferencia, se ha llevado a cabo un análisis de patrones de periodicidad a fin de obtener los valores de distancia interlamelar (Figura 3.58), aplicando el procedimiento explicado anteriormente a las micrografías de lipoplejos. Los valores de $d = (6.4 \pm 0.3)$ nm resultantes, están en muy buen acuerdo con lo obtenido mediante SAXS. El incremento en la distancia interlamelar de los sistemas que presentan pDNA ($d = 6.4 \pm 0.3$ nm) respecto a los que no lo

presentan ($d = 5.2 \pm 0.2$ nm), indica que el pDNA debe encontrarse compactado entre las bicapas, como se muestra en la Figura 3.58.

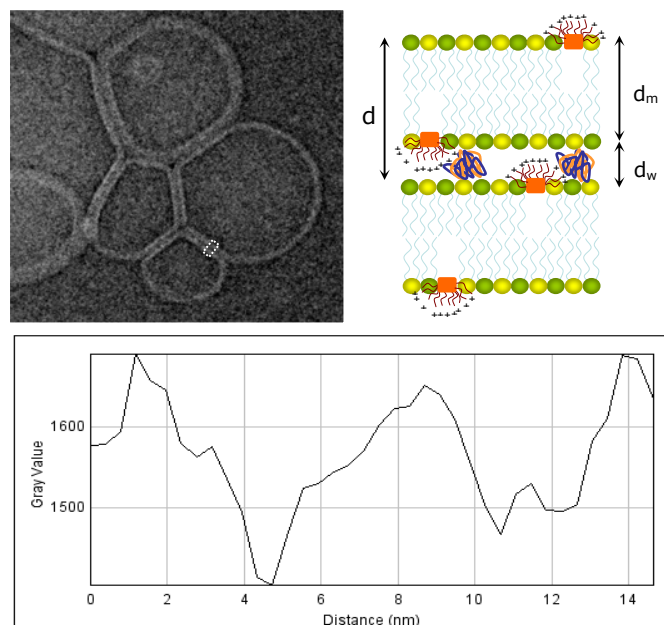


Figura 3.58. Detalles extraídos de las micrografías originales de crio-TEM de los lipoplejos DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA $\alpha = 0.5$ y una $[P^{10+}] = 30 \mu\text{M}$. La figura de abajo muestra una representación de la escala de grises (niveles de densidad electrónica) en función de la distancia en la región seleccionada con el recuadro blanco de la micrografía.

Una vez hecha la caracterización biofísica, se llevaron a cabo experimentos de transfección y viabilidad celular en las líneas celulares HEK293T, a dos relaciones molares $\alpha = 0.2$ y 0.5 , así como a diferentes $[P^{10+}] = 15, 30$ y $60 \mu\text{M}$, en presencia de suero (+FBS). Los resultados de transfección analizados mediante microscopia de fluorescencia no mostraron niveles significativos de transfección (datos no mostrados). Por otra parte, los resultados de citotoxicidad, indican que los lipoplejos DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA presentan buenos niveles de viabilidad celular, comparables al control positivo Lipo2000* (Figura 3.59).

A pesar de que la caracterización biofísica ha aportado evidencias de que los lipoplejos DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA presentan propiedades supramoleculares consideradas positivas o incluso determinantes de potenciales altas capacidades de transfección (inversión de carga, compactación efectiva del

pDNA, formación de fases hexagonales, etc.), su nula capacidad de transfección nos lleva a pensar que algún otro factor no considerado, que pueda intervenir en el complejo proceso de la internalización celular, ha impedido que este sistema haya sido capaz de introducir, liberar ó expresar el plásmido pEGFP-C3.

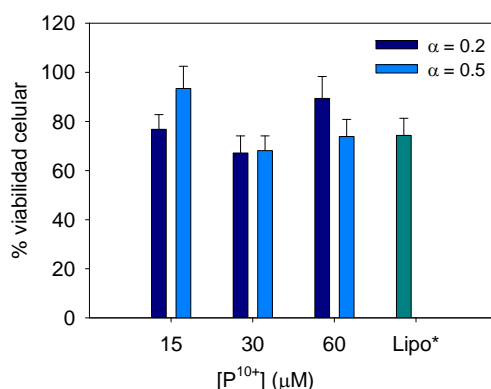


Figura 3.59 Viabilidad celular de las líneas celulares HEK293T con los lipoplejos DOPG/DOPE-P¹⁰⁺-pDNA a $\alpha = 0.2$ y 0.5 ; y diferentes [P¹⁰⁺] en presencia de suero, +FBS. Control positivo Lipo2000*.

En conclusión, los resultados de transfección obtenidos con los ALs mediados tanto con el catión divalente Ca²⁺, como el macrociclo multivalente P¹⁰⁺, indican que su potencial como vectores no virales de transfección, como alternativa a los vectores basados en CLs no es aún tan exitosa como prometía inicialmente. De hecho, el número de publicaciones en la actualidad, relativas al uso de ALs como vectores no virales es muy reducido, comparado con la cantidad total de publicaciones generadas cada año basadas en el uso de CLs. De las publicaciones sobre ALs, destacan las del grupo de Burgess et al., donde se demuestra que el sistema DOPG/DOPE-Ca²⁺ es capaz de transfectar eficientemente el plásmido pCMV-GFP o pEGFP-N3 en la línea celular CHO-K1, con resultados de TE y viabilidad celular comparables a los del control comercial Lipofectamina 2000. Sin embargo, estos estudios se han realizado sólo para una línea celular, y, de acuerdo a nuestros resultados, no son extrapolables si se utiliza otra línea celular u otro plásmido. Ciertamente, a pesar de que una primera aproximación era que los ALs podrían ser óptimos agentes de transfección debido a su baja toxicidad, lo cierto es el avance en el diseño de

CLs ha permitido obtener compuestos que presentan altos niveles de transfección y viabilidad celular, en más de una línea celular, como los GCL presentados previamente y otros publicados por nuestro grupo. Por todo ello, aunque se podría entender que la línea de investigación de los ALs como vectores génicos no virales haya sido prácticamente abandonada por algunos grupos de investigación, en nuestro entendimiento, sigue siendo una potencial vía alternativa a la lipofección catiónica, que, obviamente, necesita un rodaje en tiempo y experimentos aún mayor.

3.4. Lipoplejos basados en lípidos catiónicos multivalentes con estructura macrocíclica.

Otro enfoque diferente supone trabajar con vectores catiónicos multivalentes que contienen macrociclos supramoleculares en su estructura. Ciertamente, este tipo de compuestos incorporan también en su molécula cadenas hidrofóbicas de mayor o menor longitud, por lo que, a la postre, se espera que se auto-organicen con esquemas análogos a los vectores lipídicos antes descritos y utilizados en esta tesis doctoral. Dentro de este apartado específico, han despertado gran interés los vectores catiónicos tipo calixareno (CxCLs), caracterizados, como se ha descrito previamente en esta memoria, por una anfifilicidad facial que les convierte en vectores génicos alternativos potencialmente eficientes. En este apartado, se presenta la caracterización biofísica y bioquímica de los lipoplejos formados por el calixareno TMAC4 (con 4 cargas positivas por molécula, ver Figura 2.3), el lípido zwitteriónico DOPE, y DNA (pDNA y ctDNA).

Estos sistemas han sido caracterizados electroquímicamente mediante experimentos de potencial zeta y gel electroforesis. La Figura 3.60 muestra las medidas de potencial zeta en función de la composición de lipoplejo, para los sistemas TMAC4/DOPE-ctDNA y TMAC4/DOPE-pDNA a diferentes composiciones molares de la mezcla CxCL/DOPE ($\alpha = 0.2, 0.5$ ó 0.7). La composición de los lipoplejos se expresa en términos de relaciones de masa m_{GV}/m_{DNA} , donde m_{GV} ($= m_{CxCL^+} + m_{L_0}$) corresponde a la masa total de vector génico catiónico (suma de la masa del vector lipídico calixareno, m_{CxCL^+} , y la masa del lípido zwitteriónico DOPE, m_{L_0}) y la masa total del DNA, m_{DNA} . Como usualmente se ha observado, lipoplejos constituidos por plásmidos alcanzan los valores de electroneutralidad a menores relaciones m_{GV}/m_{DNA} que para los lipoplejos constituidos por DNA lineal (ctDNA). A partir de los valores de electroneutralidad obtenidos para los lipoplejos TMAC4/DOPE-ctDNA ($\alpha = 0.5$ y 0.7), y siguiendo el protocolo anteriormente descrito, se ha determinado que la carga efectiva del TMAC4 es $q_{L^+}^+ = 4$ (con una incertidumbre experimental de

menos del 10%), mientras que la carga efectiva del plásmido es aproximadamente un 10% de la carga nominal ($q_{\text{pDNA}}^- = -0.25 \pm 0.03$), lo cual está en concordancia con los resultados previamente obtenidos para lipoplejos formados por lípidos catiónicos (CLs) y DOPE.

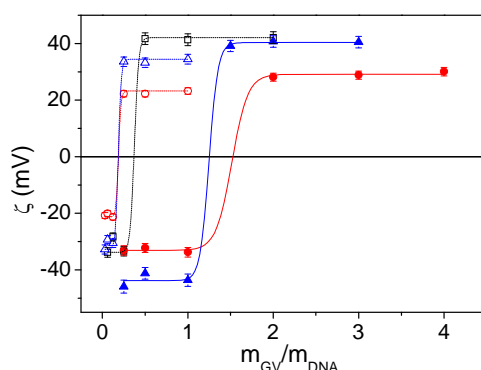


Figura 3.60 Valores de potencial zeta, ζ , frente $m_{\text{GV}}/m_{\text{DNA}}$, para los lipoplejos formados por TMAC4/DOPE-ctDNA (símbolos sólidos) y TMAC4/DOPE-pDNA (símbolos abiertos), a diferentes composiciones molares de la mezcla CxCL/DOPE: $\alpha = 0.2$ (cuadros negros); $\alpha = 0.5$ (círculos rojos) y $\alpha = 0.7$ (triángulos azules).

Como se ha comentado anteriormente, este comportamiento tiene consecuencias muy importantes sobre el potencial de estos sistemas como vectores no virales más seguros y eficientes, ya que si la carga disponible del pDNA es menor, se requiere una menor cantidad de vector, lo que se traduce en una reducción de la citotoxicidad.

A partir del conocimiento de las cargas efectivas de los componentes del lipoplejo, se determinaron las relaciones de carga efectivas, ρ_{eff} , según la ecuación 1.6, particularizada para este sistema.

El nivel de compactación del pDNA por el sistema CxCL/DOPE, ha sido evaluado mediante experimentos de electroforesis en gel. Los estudios se llevaron a cabo a diferentes composiciones molares de la mezcla CxCL/DOPE ($\alpha = 0.2, 0.5, 0.7$ y 1) y relaciones molares de carga efectiva ($\rho_{\text{eff}} = 2, 5$ y 20). Los resultados mostrados en Figura 3.61 revelan que el pDNA es compactado eficientemente por los vectores catiónicos mixtos TMAC4/DOPE, ya que las bandas fluorescentes correspondientes al pDNA, desaparecen a medida que se

incrementa tanto el ρ_{eff} como α . A bajas composiciones de CxCL ($\alpha = 0.2$), el pDNA no es completamente compactado hasta valores de $\rho_{\text{eff}} > 5$, mientras que para altas composiciones de CxCL ($\alpha = 0.7$), el pDNA se compacta a partir de $\rho_{\text{eff}} = 2$, lo cual indica que a mayores contenidos de CxCL, se requiere una menor cantidad total de vector para compactar el pDNA. Este comportamiento es consistente con el reportado por Rodik et al. para lipoplejos similares formados por calixareno y pDNA,⁴⁷ donde el pDNA es compactado por el CxCL a una relación de carga alrededor de 0.5. Nótese que dicha relación de carga ha sido calculada con la carga nominal del pDNA (-2 por bp) en lugar de la carga efectiva, la cual es alrededor de 8 veces menos negativa ($q_{\text{pDNA}}^- = -0.25$); por consiguiente, la relación de carga usada por Rodik et al. para la compactación del pDNA es, en realidad, un orden de magnitud mayor a lo reportado en gel electroforesis, lo cual es consistente con nuestros resultados. Los resultados de gel electroforesis indican que: (i) un mayor contenido del vector catiónico en la mezcla (un incremento de α o ρ_{eff}), provoca una compactación más eficiente del pDNA, en concordancia con los resultados obtenidos mediante potencial zeta; y (ii) a pesar de que el lipoplejo presente una carga total positiva ($\rho_{\text{eff}} > 1$), un cierto porcentaje de pDNA permanece sin compactar, ya que, aunque con una intensidad de emisión mucho menor, se pueden observar bandas de fluorescencia a lo largo de algunos carriles del gel.

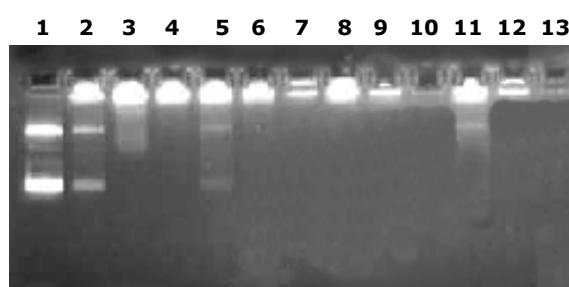


Figura 3.61. Gel electroforesis de los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA a diferentes composiciones molares: (2-4) $\alpha = 0.2$; (5-7) $\alpha = 0.5$; (8-10) $\alpha = 0.7$ y (11-13) $\alpha = 1.0$, y a diferentes relaciones molares de carga efectiva: (2, 5, 8 y 11) $\rho_{\text{eff}} = 2.0$; (3, 6, 9 y 12) $\rho_{\text{eff}} = 5.0$ y (4, 7, 10 y 13) $\rho_{\text{eff}} = 20$.

Como ya se ha comentado, el patrón de agregación, tamaño y estructura del vector juegan un papel importante en el proceso de compactación del pDNA. Por esta razón, se ha llevado a cabo la caracterización estructural de estos

sistemas. Está documentado en la literatura por Rodik et al. que los vectores lipídicos con macrociclos tipo calixareno en su estructura forman micelas en medios acuosos.⁴⁷ Sin embargo, en no hay ninguna información sobre el tipo de agregación de sistemas mixtos, como el estudiado en esta tesis doctoral, en donde el calixareno se mezcla con el lípido zwitteriónico DOPE, habitualmente incluido en nuestros lipoplejos por su carácter fusogénico y coadyuvante de la transfección celular. Curiosamente, Rodik et al. concluyen en esta misma publicación que la presencia de DOPE en la mezcla mejora sustancialmente los niveles de transfección del vector catiónico tipo CxCL utilizado.⁴⁷ Por ello, es interesante y necesario caracterizar estructuralmente los agregados mixtos TMAC4/DOPE.

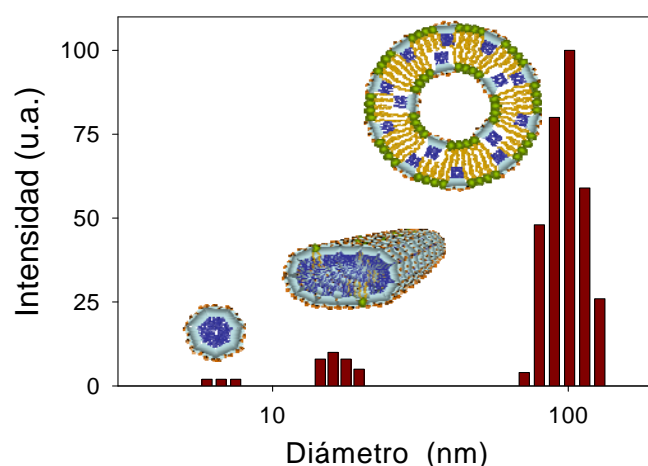


Figura 3.62. Distribución de poblaciones y de los tres tipos de nanoagregados TMAC4/DOPE a $\alpha = 0.5$ obtenidos mediante el equipo zetaPALS.

En este sentido, el primer paso ha sido la determinación del tamaño de los vectores catiónicos mixtos TMAC4/DOPE mediante el equipo zetaPALS a diferentes composiciones de la mezcla TMAC4/DOPE ($\alpha = 0.2, 0.5$ ó 0.7). La Figura 3.62 muestra, como ejemplo, la distribución de tamaños obtenidos a $\alpha = 0.5$. Como se muestra en dicha figura, la mezcla TMAC4/DOPE presenta una población mayoritaria de agregados con diámetros alrededor de 100 nm, y otras dos poblaciones minoritarias con diámetros de 20 y 6 nm. Estos tamaños son compatibles con la presencia de tres tipos de nanoagregados: liposomas esféricos mixtos (~ 100 nm); micelas tipo oblate (~ 20 nm); y micelas esféricas

(~ 6 nm), los cuales se encuentran representados esquemáticamente en la misma figura.

Los valores de los diámetros promedio de estos nanoagregados a diferentes composiciones ($\alpha = 0.2, 0.5$ y 0.7) se resumen en la Tabla 3.8. Es destacable que las dos poblaciones de micelas desaparecen a bajas composiciones, α , donde el DOPE es el componente mayoritario ($\alpha = 0.2$), mientras que cuando el contenido de TMAC4 se incrementa ($\alpha = 0.7$), la proporción de éstas se vuelve más relevante, lo cual esta en buen acuerdo con lo encontrado en la bibliografía.⁴⁷⁻⁵⁰

Tabla 3.8. Diámetro hidrodinámico de los tres tipos de nanoagregados TMAC4/DOPE a diferentes composiciones, α , determinados por medio del equipo ZetaPALS.

α	ϕ_1 (nm)	ϕ_2 (nm)	ϕ_3 (nm)
0.2	-	-	120
0.5	6-7	16-17	100
0.7	7	20-25	150-160

Por otra parte, a fin de conocer la morfología de los nanoagregados TMAC4/DOPE, se llevaron a cabo experimentos de crio-TEM a un $\alpha = 0.5$. En la Figura 3.63 se muestran tres micrografías representativas, escogidas entre las obtenidas para este sistema. Estas micrografías indican que, cuando el CxCL TMAC4 se mezcla con DOPE, tiende a agregarse esencialmente en forma de liposomas unilamelares esféricos (paneles a y b), con diámetros promedio de (90 ± 8) nm. Sin embargo, algunas micrografías (Figura 3.63c) muestran una población de pequeños agregados con tamaños cercanos a los 20 nm, que corresponderían a la presencia de micelas tipo oblate (ver flechas blancas de la Figura 3.63c). Los paneles de la derecha de la Figura 3.63 muestran un esquema 2D de ambos tipos de nanoagregados mixtos: liposomas y micelas tipo oblate. La presencia de ambos nanoagregados en las micrografías y sus tamaños son consistentes con lo encontrado mediante el equipo zetaPALS, sobre todo teniendo en cuenta que esta técnica suministra información de tamaños hidrodinámicos. Sin embargo, las micelas esféricas (con diámetros de alrededor de 6 nm) caracterizadas mediante zetaPALS, no han sido detectadas

mediante crio-TEM. Todos estos tamaños son consistentes con el protocolo de extrusión utilizado, ampliamente descrito en una sección anterior de esta tesis doctoral (extrusión secuencial con membranas de policarbonato con tamaño de poro de 400, 200 y 100 nm).

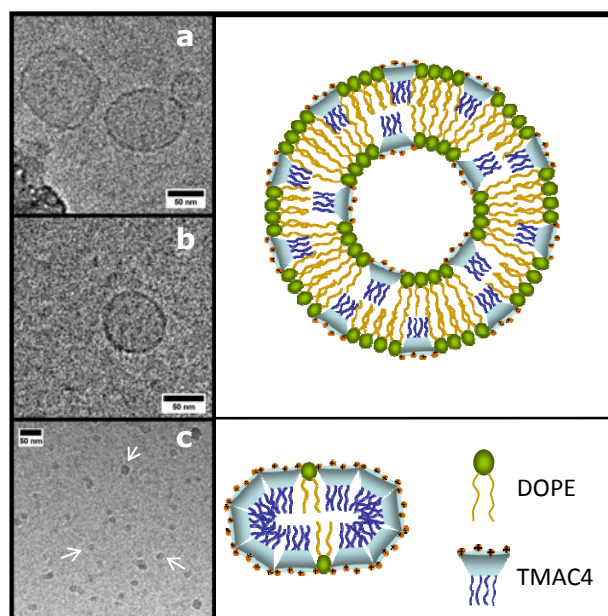


Figura 3.63. Selección de micrografías de nanoagregados TMAC4/DOPE a $\alpha = 0.5$ correspondientes a: (a-b) liposomas mixtos; y (c) micelas tipo oblate (señaladas con flechas blancas). Se adjunta dibujo 2D de estos nanoagregados.

Una vez determinada el tipo de agregación del vector catiónico TMAC4/DOPE, se procedió a estudiar la morfología y estructura de estos nanoagregados en presencia de pDNA. De esta forma, los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA fueron caracterizados estructuralmente mediante SAXS y crio-TEM, a diferentes relaciones de carga efectiva, ρ_{eff} , donde los lipoplejos son vectores génicos potencialmente efectivos ($\rho_{\text{eff}} > 1$), y a diferentes composiciones molares, α .

Los resultados obtenidos mediante SAXS para los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA a diferentes relaciones de carga ($\rho_{\text{eff}} = 1.5, 2.0$ y 4), y diferentes composiciones molares de la mezcla TMAC4/DOPE ($\alpha = 0.2, 0.4, 0.5$ ó 0.7), se presentan en la Figura 3.64.

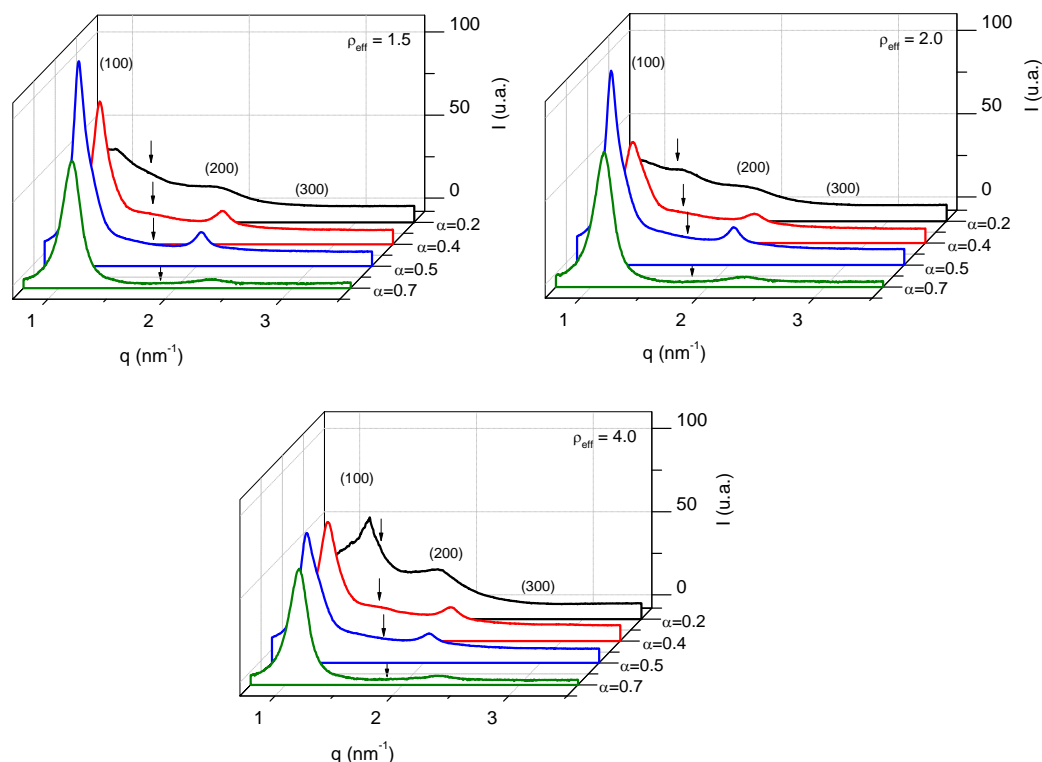


Figura 3.64. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA a diferentes composiciones molares ($\alpha = 0.2, 0.4, 0.5$ ó 0.7) y diferentes relaciones molares de carga efectiva ($\rho_{\text{eff}} = 1.5; 2.0$ y 4.0).

Los índices de Miller asignados a los máximos de difracción encontrados en los difractogramas (Figura 3.64), indican que el sistema se ajusta a una fase tipo lamelar, L_{α} , en cada una de las composiciones estudiadas. La fase L_{α} de cristal líquido liotrópico ya ha sido descrita y comentada en anteriores secciones de esta tesis. No obstante, la Figura 3.65 muestra de nuevo un corte 2D de esta estructura, particularizada para el sistema TMAC4/DOPE-pDNA, presentado en esta sección. Sin embargo, es destacable que a bajas composiciones de CxCL ($\alpha = 0.2$), los difractogramas presentan máximos de difracción muy anchos y de muy baja intensidad. La formación de una fase lamelar en lugar de la fase hexagonal H_{II}^C , habitualmente encontrada en composiciones donde el DOPE es mayoritario, puede estar justificada por el hecho de que los parámetros de empaquetamiento del TMAC4 y del DOPE son complementarios, ya que por un lado el TMAC4 presenta un $P < 1/3$, mientras que el DOPE tiene un $P > 1$. Por otra parte, en los difractogramas se observa la presencia de un pico ancho y

difuso entre los máximos q_{100} y q_{200} , correspondiente a la correlación DNA-DNA (q_{pDNA}); este máximo se puede observar más claramente en la Figura 3.65a donde se ha representado, a modo de ejemplo, un difractograma en escala logarítmica ($\alpha = 0.4$ y $\rho_{eff} = 1.5$). También se perciben con más claridad los picos de menor intensidad de la fase L_{α} . Es destacable que ésta es la primera vez que se realizan estudios estructurales de este tipo en lipoplejos, formados por un CxCL. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los lipoplejos formados por un CxCL, DOPE y pDNA presentan un comportamiento muy similar al encontrado en los lipoplejos formados por CLs.

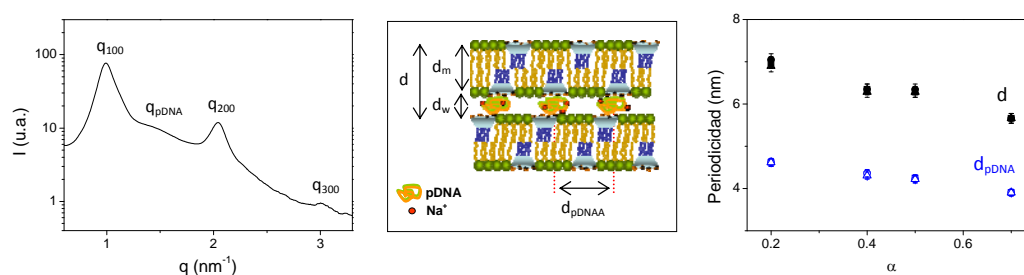


Figura 3.65. (Izquierda) Difractograma para el lipoplejo TMAC4/DOPE-pDNA a $\alpha = 0.4$ y $\rho_{eff} = 1.5$ en escala logarítmica. (Centro) Esquema 2D de una fase lamelar, L_{α} , mostrando las distancias características. (Derecha) Gráfica de la distancia interlamelar de la fase lamelar, d , y de la correlación pDNA-pDNA, d_{pDNA} , en función de la composición de la mezcla TMAC4/DOPE, α , para los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA a diferentes ρ_{eff} : 1.5 (cuadros); 2.0 (círculos); y 4 (triángulos).

A fin de conocer la periodicidad de las bicapas en el lipoplejo, se ha determinado la distancia interlamelar, d ($d = 2\pi/q_{100}$), así como la distancia entre las hélices de pDNA en la monocapa, d_{pDNA} (Figura 3.65b). Los resultados de la periodicidad d y d_{pDNA} respecto a la composición α , se presentan en la Figura 3.65c. Cuando el contenido de CxCL se incrementa, la distancia interlamelar, d , disminuye de 7 a 5.5 nm, lo cual es provocado principalmente por el incremento en la densidad de carga superficial, lo que conduce a un mayor nivel de compactación para el pDNA, es decir una disminución de la d_w . Otro factor que influye en la disminución de la d se puede deber a que la región hidrofóbica del TMAC4 es más corta que la del DOPE, por lo que cuando α aumenta, el espesor de la bicapa, d_m , puede experimentar una ligera disminución.

Por otra parte, la distancia entre las hélices de pDNA en la monocapa acuosa, d_{pDNA} , se hace menor cuando α se incrementa, disminuyendo de 4.5 a 4 nm (Figura 3.65c). Este hecho, al igual que la disminución de d_w , está directamente relacionado con el aumento de la densidad de carga superficial de la bicapa, y corrobora que el nivel de compactación del pDNA mejora con el incremento de CxCL en la bicapa.

Los experimentos de crio-TEM para los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA se llevaron a cabo a dos composiciones diferentes, $\alpha = 0.2$ y 0.5 . Una selección de los resultados se presentan en las micrografías de la Figura 3.66, donde se pueden distinguir dos patrones de compactación diferentes: (i) nanoestructuras con un perfil multilamelar bien definido tipo *cluster type*, CT (paneles a-b) y (ii) regiones con un patrón multilamelar continuo tipo *fingerprint* FP (paneles e-f). Ambos escenarios ya han sido encontrados para otros lipoplejos tanto en la literatura como los presentados previamente.^{1,2} Como ya se ha descrito anteriormente, los lipoplejos tipo CT se caracterizan por presentar una serie de bicapas lipídicas catiónicas con pDNA compactado entre ellas, este tipo de estructura se encuentra usualmente a altos contenidos de DOPE (bajos α). Lo que indica que cuando el contenido de DOPE es alto, los lipoplejos tienden a agregarse en nanoestructuras tipo CT, donde las bicapas lipídicas a pesar de presentar cierta deformación provocada por la compactación del pDNA con otras bicapas adyacentes, esencialmente mantienen su morfología. En efecto se puede observar como las bicapas se pliegan y deforman pero no se rompen. En contraste con los nanoagregados tipo CT, en los nanoagregados tipo FP los liposomas tienden a romperse, probablemente debido a que la interacción liposoma-pDNA es claramente más favorable.

Analizando la Figura 3.66, se puede concluir que a $\alpha = 0.2$ principalmente se encuentran nanoagregados tipo CT (Figura 3.66a-b), mientras que a $\alpha = 0.5$ esencialmente se observa la presencia de nanoagregados tipo FP (Figura 3.66e-f). Sin embargo, a $\alpha = 0.2$, se advierte la coexistencia de nanoagregados tipo CT con ciertas poblaciones de nanoagregados tipo FP (c-

d). Esta coexistencia de fases, encontrada ya en lipoplejos formados por GCLs ha demostrado tener un efecto sinérgico sobre la transfección.^{1,2} Por otra parte, la coexistencia de fases es probablemente la responsable de que los difractogramas de SAXS a $\alpha = 0.2$ presenten máximos de difracción muy anchos, los cuales, mediante un proceso de deconvolución podría demostrar la presencia de otro componente (un *demixing*).^{1,2} En cualquier caso, los valores promedio de la distancia interlamelar tanto de la estructura tipo CT como tipo FP indican que, a pesar de que los nanoagregados tipo FP presente una mayor cantidad de lamelas respecto a los nanoagregados tipo CT, no se aprecia ningún cambio apreciable en el grado de compactación del pDNA en ninguno de los dos patrones multilamelares.

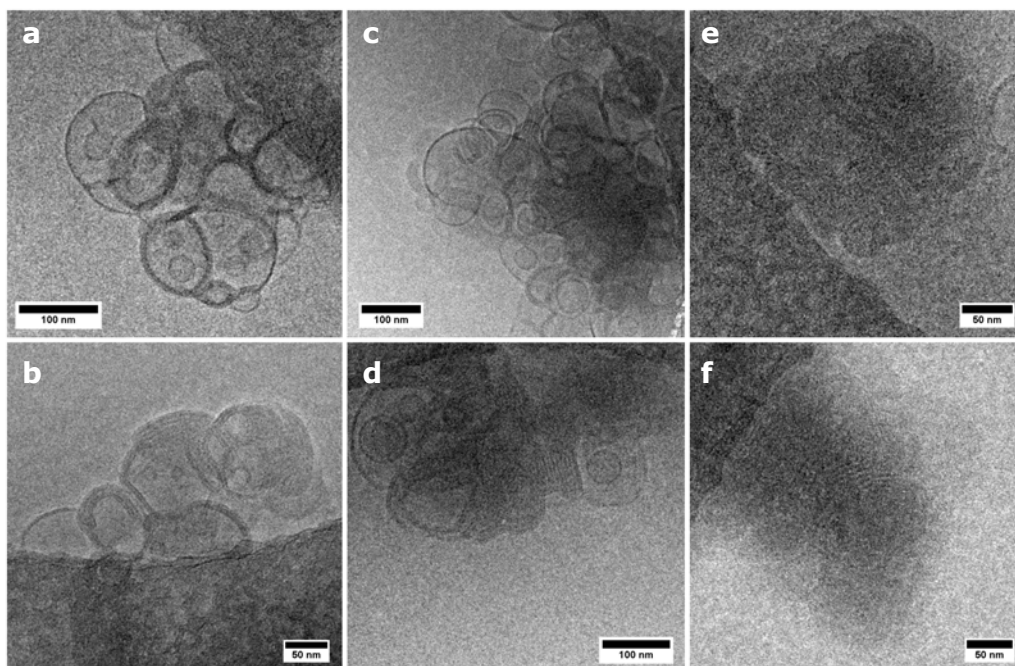


Figura 3.66. Selección de micrografías de nanoagregados TMAC4/DOPE-pDNA a dos composiciones $\alpha = 0.2$ (a-d) y $\alpha = 0.5$ (e-f).

A fin de determinar la potencialidad de los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA como vectores de transfección, además del estudio electroquímico y estructural, es necesario realizar una completa evaluación bioquímica que permita determinar tanto su capacidad de transfección como su grado de toxicidad. Un vector génico óptimo, como se ha ido viendo a lo largo de esta tesis doctoral, es aquel que presenta altos niveles de transfección, conjugados con bajos niveles de

citotoxicidad. Los estudios de transfección se llevaron a cabo en la línea celular HEK293T, en presencia de suero (+FBS), a diferentes composiciones de la mezcla CxCL/DOPE, α , y relaciones de carga efectiva, ρ_{eff} . La eficiencia de transfección fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia a dos composiciones de CxCL ($\alpha = 0.2$ y 0.5) y diferentes relaciones de carga efectiva ($\rho_{\text{eff}} = 10, 20, 40$ y 80). La Figura 3.67 muestra, a modo de ejemplo, la expresión de la proteína GFP a las condiciones en las que se encontraron los mejores niveles de transfección $\alpha = 0.2$ y $\rho_{\text{eff}} = 20$ y 40 . La figura incluye también, a modo de comparación, los resultados obtenidos para el control positivo Lipo2000*. Cabe destacar que a otras composiciones no se encontraron niveles significativos de transfección. De acuerdo a las micrografías presentadas, se deduce que el lipoplejo TMAC4/DOPE es capaz de compactar, proteger y transfectar el plásmido pEGFP-C3 en la línea celular HEK293T, en presencia de suero (+FBS), con eficiencias de transfección comparables en dos valores de ρ_{eff} (20 y 40), siendo un $\rho_{\text{eff}} = 20$ el que presenta sutilmente mejores niveles de transfección. En ambos casos los niveles de transfección son ligeramente menores a los encontrados para el control Lipofectamina 2000* (Figura 3.67c).

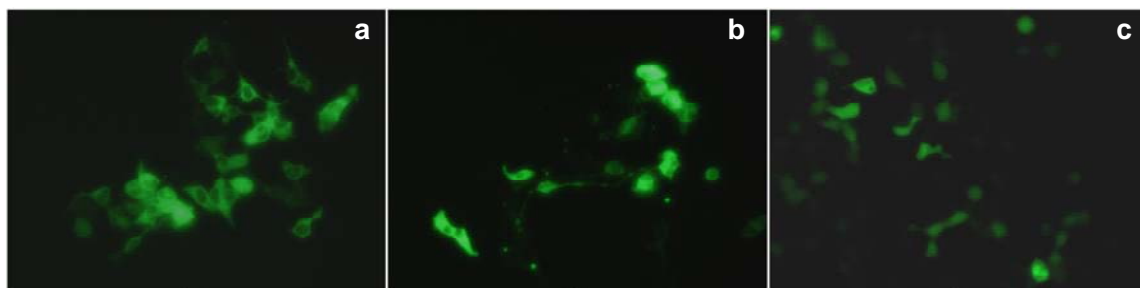


Figure 3.67. Micrografías de microscopía de fluorescencia donde se muestra la expresión de la proteína GFP en la línea celular HEK293T transfectadas con los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA a $\alpha = 0.2$ y una relación de carga: (a) $\rho_{\text{eff}} = 20$; y (b) $\rho_{\text{eff}} = 40$. (c) Control positivo Lipo2000*. Estudio realizado en presencia de suero (+FBS).

Tomando en cuenta que en el presente estudio se ha encontrado que el pDNA presenta una carga efectiva de -0.25 por par de bases, se puede concluir que los valores de $\rho_{\text{eff}} = 20$ y 40 son equivalentes a un $\rho = 2.5$ y 5 , obtenidos en otras publicaciones donde se asumen una carga de -2 por par de bases para el

pDNA. Por consiguiente, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral están en consistencia o algo inferiores a los reportados para sistemas similares.^{50,51}

Es remarcable que los mejores niveles de transfección se han encontrado a composiciones donde el DOPE es mayoritario ($\alpha = 0.2$) y, además, se ha observado una coexistencia de fases multilamelares tipo CT y FP. A esta misma conclusión se ha llegado previamente en lipoplejos constituidos por GCLs con espaciadores oligo-oxietilenos, así como otros sistemas presentes en la bibliografía.^{1,2} Por otra parte, resultados similares han sido encontrados por el grupo de Rodik et al,⁴⁷ donde un CxCL similar al estudiado en este apartado, sólo es capaz de transfectar en presencia del lípido coadyudante DOPE, como ya se ha comentado anteriormente. De esta forma, se puede concluir que, al igual que para la mayoría de los sistemas estudiados en esta tesis doctoral, el lípido DOPE tiene un papel fundamental en la capacidad de transfección de los vectores lipídicos.

Por último, la Figura 3.68 muestra los resultados del ensayo MTT (viabilidad celular) llevado a cabo para los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA a una composición $\alpha = 0.2$ y diferentes relaciones de carga ($\rho_{\text{eff}} = 10, 20, 40$ y 80). La figura incluye también los valores de viabilidad celular medidos para el control Lipofectamina 2000*. Se puede concluir, a la vista de la figura, que la viabilidad celular en presencia de los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA es comparable, en términos generales, a la observada en presencia del control, siendo, las condiciones de $\alpha = 0.2$ y $\rho_{\text{eff}} = 20$ las que mostraron una mayor viabilidad celular. No obstante, un análisis más detallado de la figura pone de manifiesto que la viabilidad celular decrece a mayores relaciones de carga efectiva, lo que a su vez puede estar provocando la disminución de la expresión de la proteína GFP ($\rho_{\text{eff}} \geq 40$), debido a que hay un menor número de células viables capaces de ser transfectadas. Por lo tanto, en términos de eficiencia de transfección así como de viabilidad celular la formulación óptima es un $\alpha = 0.2$ y una $\rho_{\text{eff}} = 20$, ya se obtienen niveles moderados de transfección con buenos niveles de viabilidad celular.

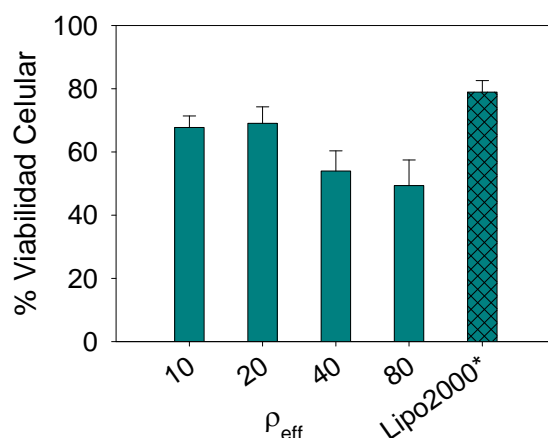


Figura 3.68. Viabilidad celular de la línea celular HEK293T incubadas con los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA a las condiciones óptimas ($\alpha = 0.2$) y el control Lipo2000*.

En cualquier caso, comparando tanto los niveles de transfección como de viabilidad celular de las formulaciones lipídicas basadas en el CxCL TMAC4, con respecto al control positivo Lipofectamina 2000*, es posible concluir que, a pesar de que los lipoplejos TMAC4/DOPE-pDNA puedan transfectar moderadamente el plásmido pEGFP-C3, en ningún caso logran superar los niveles de transfección y viabilidad celular del control positivo Lipofectamina 2000* basado en CLs. Sin embargo, el hecho de haber detectado cierta eficiencia de transfección en este vector macrocíclico y en otros similares reportados por otros grupos,^{47,50-55} nos permiten concluir que los CxCLs pueden ser una posible vía alternativa de transfección en la que queda mucho camino por recorrer. Posiblemente sea en la etapa de síntesis donde hay que insistir, con el objeto de conseguir CxCLs con diferentes funcionalizaciones más biocompatibles.

3.5 Interacciones de liposomas catiónicos mixtos DC-Chol/DOPE con las proteínas presentes en el suero humano: Formación de la corona de proteínas.

Durante el proceso de transfección ocurren una serie de eventos que determinan la eficiencia de ésta. Uno de esos procesos es la interacción de los nanovectores con las proteínas presentes en los fluidos biológicos. Una vez administrados los nanovectores, éstos quedan expuestos a los fluidos biológicos de los que adsorben proteínas y otras biomoléculas, para formar la corona de proteínas. Como ya se comentó en la introducción, la corona de proteínas juega un papel importante en el reconocimiento celular y el tiempo de circulación del nanovector en la sangre. De igual forma, se ha visto que la composición de la corona de proteínas es dependiente del tiempo, debido a los diversos eventos de adsorción y desorción que se tienen lugar en la superficie del nanovector.⁵⁶⁻⁵⁸ Como se señala en la literatura, la adsorción competitiva de las proteínas presentes en el suero sobre el nanovector puede durar desde unos pocos minutos hasta varias horas. Por esto, la comprensión de la evolución de la corona de proteínas en el tiempo es fundamental para hacer frente a los desafíos del uso de vectores no virales en estudios *in vivo*.

Debido a la gran importancia de los liposomas catiónicos mixtos como vectores no virales, en esta tesis doctoral se ha llevado a cabo una primera aproximación para determinar la composición de su corona de proteínas en función del tiempo, en un sistema modelo ampliamente utilizado como vector de transfección y en estudios de la corona de proteínas: los liposomas catiónicos mixtos formados por el lípido catiónico derivado del colesterol 3β-[N(N',N'-dimetilaminoetano) carbamoil]-colesterol, DC-Chol, y DOPE, usando suero humano (HP) como medio fisiológico.

Teniendo en cuenta que unos pocos minutos de incubación son suficientes para imitar las interacciones que tienen lugar entre los componentes de la sangre y los liposomas cuando éstos son administrados localmente en tumores, un máximo de 60 min de exposición es un tiempo razonable para estudiar el

efecto de dichas interacciones en el tratamiento de una enfermedad. De acuerdo a estas indicaciones, en este estudio investigamos la evolución temporal de la corona de proteínas formada alrededor de los liposomas mixtos DC-Chol/DOPE incubados en suero humano al 10%, durante 1, 30 y 60 min.

Como se ha dicho en la introducción, la corona de proteínas está formada tanto por proteínas asociadas fuertemente al nanovector (*hard corona*), como por proteínas que interaccionan con la *hard corona* (*soft corona*). Debido a que antes de llevar a cabo cualquier caracterización es necesario someter la muestra a un proceso de lavados y centrifugados a fin de eliminar el exceso de suero, sólo permanece unida al nanovector la *hard corona*, mientras que la *soft corona* se pierde en el sobrenadante. De esta forma, todos los resultados que se presentan a continuación sólo son representativos de la *hard corona*.

Los resultados de potencial zeta a los diferentes tiempos de incubación (1, 30 y 60 min), así como el potencial de la muestra control (liposoma catiónico mixto en ausencia de suero, $t = 0$) se presentan en la figura 3.69a. Los valores de potencial zeta para los complejos DC-Chol/DOPE-HP muestran que hay una fuerte inversión de carga desde +55 mV a $t = 0$ hasta aproximadamente -14 mV a $t \geq 1$ min. Esto ocurre incluso a tiempos de incubaciones cortos, lo que sugiere que el recubrimiento por parte de las proteínas del suero sobre la superficie del nanovector tiene lugar muy rápidamente. Estos resultados indican que el tiempo de incubación más corto ($t = 1$ min) es suficiente para formar la *hard corona*,⁵⁹⁻⁶² es decir, una capa de proteínas fuertemente unida que no se remueve del liposoma durante el lavado de la muestra y que se mantiene a los diferentes tiempo de incubación.

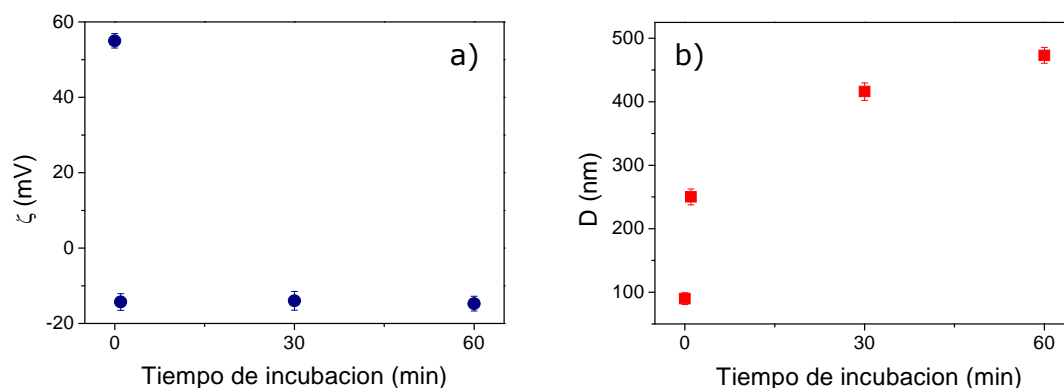


Figura 3.69. a) Resultados de potencial zeta, ζ ; y b) Tamaño de los liposomas DC-Chol/DOPE ($t=0$) y complejos DC-Chol/DOPE-HP en función del tiempo de incubación.

Se sabe que el tamaño de los nanovectores ejerce una importante influencia en las aplicaciones *in vivo*. Por ejemplo, las células reconocen y eliminan más rápidamente nanovectores con tamaños mayores a ~ 300 nm, mientras que cuanto éstos son más pequeños, permanecen durante más tiempo en el torrente sanguíneo y son capaces de cruzar las barreras biológicas. Además, es sabido que el tamaño del nanovector determina fuertemente la vía de internalización a las células.⁶³ Cuando existe una interacción superficial de los liposomas catiónicos mixtos con las proteínas del suero, es muy probable que el tamaño de los liposomas se vea afectado. A fin de corroborar dicho efecto, se determinaron los tamaños de los liposomas DC-Chol/DOPE en ausencia (control) y presencia de suero (HP) a distintos tiempos de incubación a partir de medidas de DLS, como se describió en la Sección Experimental. Los resultados presentados en la figura 3.69b muestran que los liposomas presentan un tamaño próximo a los 100 nm a $t = 0$, y que al tiempo de incubación más corto ($t = 1$ min) la formación inicial de la *hard corona* conduce a un diámetro hidrodinámico significativamente mayor (~ 250 nm). Este incremento se mantiene hasta alcanzar los ~ 470 nm a los 60 min de incubación. De acuerdo con medidas puntuales realizadas por medio de un estudio hecho a 24 h de incubación de los liposomas con el HP, se encontró que el tamaño de los complejos se mantenía aproximadamente a partir de 1 h.

La evolución temporal del tamaño y del potencial zeta de los complejos DC-Chol/DOPE-HP son consistentes con la agregación de los liposomas inducida por las proteínas presentes en el suero. En efecto, cuando la corona de proteínas se adsorbe sobre la superficie del liposoma provoca una disminución en el potencial zeta lo que a su vez debilita las repulsiones electrostáticas, dando como resultado la agregación del complejo, y por lo tanto mayores tamaños de partícula. Estos resultados confirman que cuando los liposomas están en presencia de suero, se producen interacciones liposoma-proteína que conducen a la formación de la corona de proteínas.⁶⁴

Una vez realizados los estudios de potencial zeta y DLS, los cuales han confirmado la formación de una corona de proteínas sobre los liposomas catiónicos mixtos, se ha llevado a cabo una caracterización proteómica, mediante las técnicas de gel electroforesis 1D SDS-PAGE y nanocromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas tándem (nanoLC-MS/MS) con el fin de determinar la composición la corona de proteínas formada sobre los liposomas DC-Chol/DOPE a diferentes tiempos de incubación con el HP.

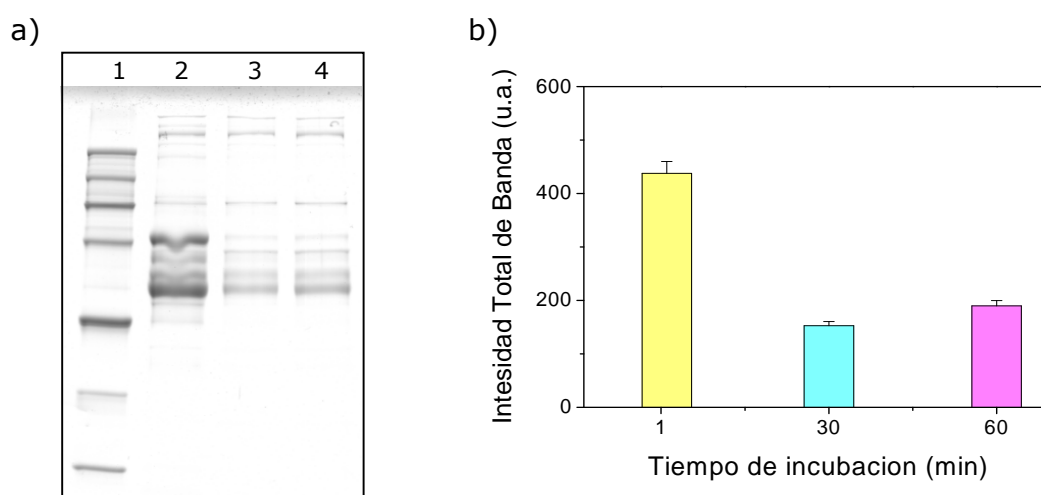


Figura 3.70. a) Gel 1D SDS-PAGE donde los diferentes carriles corresponden a (1) Marcador de peso molecular (MW); y a los complejos DC-Chol/DOPE-HP a diferentes tiempos de incubación (2) 1 min; (3) 30 min; y (4) 60 min. b) Histograma de intensidades totales de bandas de las proteínas recuperadas a los distintos tiempos de incubación (1, 30 y 60 min).

Los resultados de 1D SDS-PAGE se muestran en la figura 3.70a, donde los carriles 2, 3 y 4 corresponden a los tiempos de incubación 1, 30 y 60 min respectivamente, mientras que el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (MW). Los resultados indican que existe una diferencia significativa entre las muestras incubadas a 30 y 60 min, respecto a la que se incubó por 1 min. La posición de las bandas en el carril, permite diferenciar el peso molecular de las diferentes proteínas presentes, mientras que la intensidad y anchura de las bandas informan de la concentración en la que se encuentran dichas proteínas. Por ello, a fin de poder estimar de una manera semicuantitativa la cantidad total de proteínas a los diferentes tiempos de incubación, se calculó la intensidad total del carril del gel con el software Kodak y el control de peso molecular (figura 3.70.b).⁶⁴ Esta metodología de semicuantificación presenta el inconveniente de subestimar la cantidad de proteína de las bandas que presentan mayor abundancia de proteínas (caracterizadas por una mayor intensidad), debido a la saturación de la tinción. A pesar de ello, la determinación de la intensidad total de banda es una buena forma de comparar el contenido aproximado de las proteínas presentes. De acuerdo a esta semicuantificación, la cantidad total de proteínas en 1 min de exposición es mayor que la encontrada a 30 y 60 min de tiempo de incubación. En general, las intensidades totales de carril proporcionan una buena estimación del espesor de la corona de proteínas; sin embargo, éstos resultados parecen contradecir lo obtenido mediante DLS, ya que al menor tiempo de incubación $t = 1$ min (donde los complejos presentan el menor tamaño) la intensidad de línea es mucho mayor que para $t = 60$ min (donde los complejos presentan el mayor tamaño). Esta aparente contradicción puede ser explicada si se tiene en cuenta que el tamaño de los complejos no sólo depende de la formación de la corona de proteínas, sino que es un fenómeno colectivo de agregación. Desde este punto de vista, se sugiere que los complejos que presentan mayores tamaño (a tiempos más largos de incubación) son agregados de liposomas cubiertos de una corona de proteínas de pequeño espesor.⁶⁴

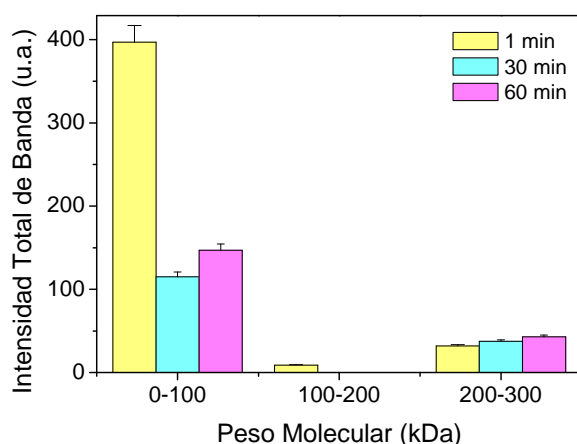


Figura 3.71. Intensidad total de banda de las proteínas recuperadas para los complejos DC-Chol/DOPE-HP a los diferentes tiempos de incubación. Las proteínas están agrupadas por rangos del peso molecular.

Por otra parte, la evolución temporal de las bandas individuales no sigue exactamente la misma tendencia general. Por ello, se decidió realizar una comparación de la intensidad relativa de las bandas en base a sus pesos moleculares. En la figura 3.71 se muestra los resultados de la intensidad total de las bandas más relevantes del gel de la figura 3.70a. A fin de obtener un mejor análisis, la intensidad total de las proteínas recobradas se dividió en tres grupos de acuerdo a su peso molecular, 0-100, 100-200 y 200-300 kDa. De acuerdo a este análisis, independientemente del tiempo de incubación, la abundancia de las proteínas es la siguiente 1-100 KDa > 200-300 kDa > 200-100 kDa. Estos resultados sugieren que los complejos DC-Chol-DOPE/HP son ricos en proteínas de bajo peso molecular. Por otra parte, el primer grupo de proteínas (0-100 kDa) muestra una disminución de intensidad a 30 min de incubación seguido por un ligero incremento a los 60 min de incubación. Este comportamiento en el tiempo es típico de este tipo de proteínas, ya que son las más abundantes en el suero. De hecho, cuando los nanovectores son expuestos a fluidos biológicos, las proteínas más abundantes y con mayor movilidad son las primeras en cubrir la superficie del liposoma, pero posteriormente son reemplazadas por proteínas con menor movilidad pero mayor afinidad superficial (efecto Vroman).⁶⁵

Por otro lado, las proteínas con peso molecular entre 200-300 kDa mostraron un ligero aumento en la intensidad de banda, en función del tiempo. Este comportamiento se encuentra, generalmente, para proteínas que son poco abundantes en los fluidos biológicos, con bajas movilidades, pero que presentan gran afinidad por la superficie del nanovector. Por ello, al aumentar el tiempo de incubación estas proteínas van desplazando a las proteínas con menor afinidad pero más abundantes.

En resumen, la combinación de resultados de tamaño, potencial zeta y geles de 1D SDS-PAGE pone de manifiesto que: i) la adsorción de las proteínas del suero dan como resultado la inmediata formación de una corona de proteínas en la superficie del liposoma, cuyo espesor disminuye con el tiempo de incubación; ii) los complejos DC-Chol/DOPE-HP se van agregando para formar nanoagregados cuyo tamaño alcanza su equilibrio a partir de 1 h de incubación; iii) el patrón de las proteínas cambia cuando se incrementa el tiempo de incubación, lo que sugiere que las proteínas menos abundantes pero con mayor afinidad por la superficie del liposoma, facilitan la desorción de las que, siendo más abundantes, presentan menores afinidades.

Los resultados mostrados hasta el momento son un buen indicador de que la adsorción de las proteínas presentes en los fluidos biológicos sobre los nanovectores es dependiente del tiempo. Sería, por tanto, interesante realizar un análisis más preciso a fin de identificar las proteínas presentes a los diferentes tiempos, y así descifrar el papel de la composición de la corona de proteínas a nivel biológico. Por ello, se decidió realizar un estudio mediante nanoLC-MS/MS, una técnica altamente sensible que permite realizar una identificación y cuantificación precisa de las proteínas del suero adsorbidas en la superficie del nanovector y que está ampliamente descrita en la Sección Experimental. Se encontró que el número total de proteínas identificadas fue de 160, 200 y 134 para 1, 30 y 60 min de incubación de los liposomas catiónicos mixtos con HP, respectivamente. Estos datos resultan un tanto sorprendentes teniendo en cuenta que es un número bastante reducido en comparación con la cantidad total de proteínas presentes en el suero. En la

tabla A7 del anexo 2 se muestra un listado exhaustivo de todas las proteínas que conforman la corona de proteínas de los liposomas DC-Chol/DOPE, identificadas a los diferentes tiempos de incubación.

A fin de aclarar la evolución en el tiempo de la corona de proteínas, se consideró el número de proteínas comunes y las que solo estaban presentes en uno de los tiempo de incubación. Esto se puede observar mejor en el diagrama de Venn de la figura 3.72, donde se muestra que la mayor cantidad de proteínas que conforman la corona de proteínas del complejo DC-Chol/DOPE-HP (127) se une a la superficie del liposoma de manera inmediata, ya que se encuentran desde el primer minuto de incubación. Después, a los 30 min de incubación, 46 nuevas proteínas son adsorbidas, cinco de las cuales permanecen después de 30 min más de incubación (t = 60 min).

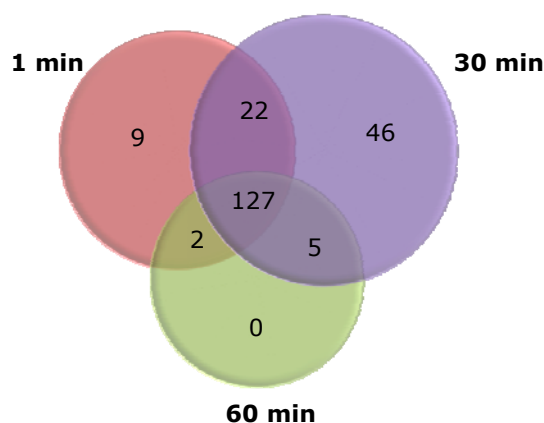


Figura 3.72. Diagrama de Venn del número total de proteínas identificadas por nanoLC-MS/MS en la superficie de los liposomas DC-Chol/DOPE a los diferentes tiempos de incubación.

Después de tener una visión general de la cantidad total de proteínas presentes a los diferentes tiempos de incubación, se procedió a determinar la abundancia relativa (RPA) de cada una de ellas mediante la ecuación 2.9 de la sección experimental (tabla A7 del anexo 2). Una vez calculada la RPA de cada una de las proteínas identificadas mediante nanoLC-MS/MS, se estimó la carga aproximada de la corona de proteínas. Dicho cálculo consta de tres partes: i) primero se determina la carga de todas las proteínas asociadas, a pH 7.4, mediante el software de la página web:

<http://protcalc.sourceforge.net/>; ii) segundo, se calcula la carga relativa de cada proteína, multiplicando la carga total de la proteína k , q_k , por su RPA;⁶⁶ iii) tercero, la carga total de la corona de proteínas se calcula con la ecuación 5.1 donde N es el número de proteínas identificadas. Los valores de carga calculados (tabla A8 del anexo 2) muestran una evolución temporal similar a la encontrada mediante los experimentos de potencial zeta.

$$Q = \sum_{k=1}^N q_k \quad (5.1)$$

Del total de proteínas identificadas y a fin de simplificar el análisis, este estudio se restringió a algunas clases de proteínas como son las apolipoproteínas, inmunoglobulinas y proteínas del complemento (siendo las proteínas con mayores RPA), así como a proteínas individuales que presentan una $RPA \geq 1$ en al menos uno de los tiempos de incubación (tabla 3.9). Se encontró que las proteínas más abundantes presentes en la corona formada en los liposomas DC-Chol/DOPE son la apolipoproteínas, inmunoglobulinas, Ig, proteínas del complemento, fibrinógeno, serum albúmina, HSA, y vitronectina (figura 3.73). En particular, las apolipoproteínas son la clase más abundante de proteínas presentes en la corona de proteínas a todos los tiempos de incubación.

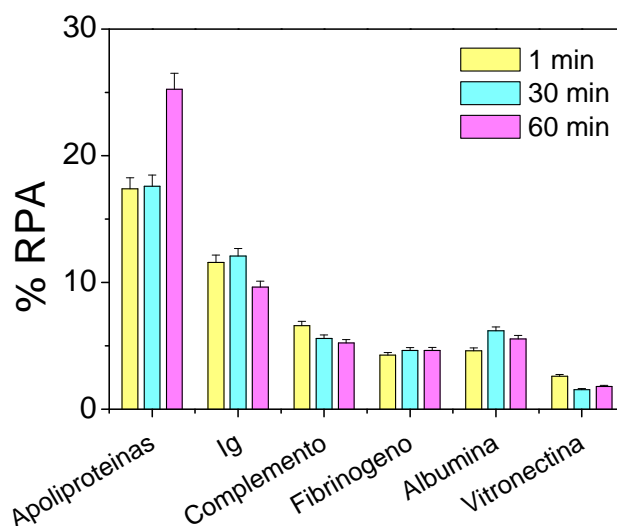


Figura 3.73. Abundancia relativa de las proteínas (RPA) más abundantes encontradas a los diferentes tiempos de incubación (1, 30 y 60 min).

Tabla 3.9. Proteínas representativas de la corona de proteínas asociada a los liposomas DC-Chol/DOPE a los diferentes tiempo de incubación con suero humano (1, 30, 60 min) identificadas por nanoLC-MS/MS.

Proteínas identificadas	RPA		
	1 min	30 min	60 min
Apolipoproteína A-I GN=APOA1 PE=1 SV=1	3.08	3.35	4.09
Apolipoproteína A-II GN=APOA2 PE=1 SV=1	1.55	1.12	2.97
Apolipoproteína A-IV GN=APOA4 PE=1 SV=3	0.98	1.13	1.24
Apolipoproteína B-100 GN=APOB PE=1 SV=2	1.25	1.21	1.61
Apolipoproteína C-I GN=APOC1 PE=1 SV=1	0.33	1.62	2.73
Apolipoproteína C-II GN=APOC2 PE=1 SV=1	2.37	1.33	2.85
Apolipoproteína C-III GN=APOC3 PE=1 SV=1	2.10	2.37	3.10
Apolipoproteína C-IV GN=APOC4 PE=1 SV=1	0.27	0.36	0.36
Apolipoproteína D GN=APOD PE=1 SV=1	2.77	2.16	2.73
Apolipoproteína E GN=APOE PE=1 SV=1	1.95	2.20	2.69
Apolipoproteína F GN=APOF PE=1 SV=2	0.06	0.31	0.35
Apolipoproteína L1 GN=APOL1 PE=1 SV=5	0.34	0.26	0.37
Apolipoproteína M GN=APOM PE=1 SV=2	0.19	0.07	0.00
Apolipoproteína (a) GN=LPA PE=1 SV=1	0.14	0.12	0.15
	17.39	17.59	25.24
Complemento C1q subcomponente subunidad A GN=C1QA PE=1 SV=2	0.15	0.00	0.00
Complemento C1q subcomponente subunidad B GN=C1QB PE=1 SV=3	0.22	0.23	0.00
Complemento C1q subcomponente subunidad C GN=C1QC PE=1 SV=3	0.23	0.30	0.10
Complemento C1r subcomponente subunidad GN=C1R PE=1 SV=2	0.06	0.07	0.00
Complemento C1s subcomponente subunidad GN=C1S PE=1 SV=3	0.03	0.02	0.00
Complemento C3 GN=C3 PE=1 SV=2	2.27	1.77	2.30
Complemento C4-B GN=C4B PE=1 SV=1	0.91	0.72	0.56
Complemento C5 GN=C5 PE=1 SV=4	0.36	0.42	0.41
Complemento componente C6 GN=C6 PE=1 SV=3	0.19	0.16	0.18
Complemento componente C7 GN=C7 PE=1 SV=2	0.13	0.17	0.14
Complemento componente C8 cadena alfa GN=C8A PE=1 SV=2	0.06	0.17	0.15
Complemento componente C8 cadena beta GN=C8B PE=1 SV=3	0.16	0.07	0.10
Complemento componente C8 cadena gamma GN=C8G PE=1 SV=3	0.96	0.66	0.56
Complemento componente C9 GN=C9 PE=1 SV=2	0.67	0.50	0.61
Complemento factor B GN=CFB PE=1 SV=2	0.06	0.16	0.06
Complemento factor H GN=CFH PE=1 SV=4	0.07	0.14	0.05
Complemento factor I GN=CFI PE=1 SV=2	0.06	0.02	0.00
	6.59	5.58	5.23
Fibrinogeno cadena alfa GN=FGA PE=1 SV=2	0.89	1.11	1.12
Fibrinogeno cadena beta GN=FGB PE=1 SV=2	1.88	1.89	1.58
Fibrinogeno cadena gamma GN=FGG PE=1 SV=3	1.49	1.62	1.94
	4.26	4.63	4.64
Ig alfa-1 cadena C region GN=IGHA1 PE=1 SV=2	0.74	0.59	0.47
Ig gamma-1 cadena C region GN=IGHG1 PE=1 SV=1	1.48	1.62	1.86
Ig gamma-2 cadena C region GN=IGHG2 PE=1 SV=2	0.64	1.22	0.76
Ig cadena pesada V-III region VH26 PE=1 SV=1	0.54	0.65	0.42
Ig kappa cadena C region GN=IGKC PE=1 SV=1	2.43	2.75	2.39
Ig kappa cadena V-I region AG PE=1 SV=1	0.50	0.13	0.00
Ig kappa cadena V-II region GM607 (fragmento) PE=4 SV=1	0.00	0.41	0.21
Ig kappa cadena V-III region HAH PE=2 SV=1	0.72	0.77	0.58
Ig kappa cadena V-IV region B17 PE=2 SV=1	0.33	0.26	0.00
Ig lambda cadena V-I region AH PE=1 SV=1	0.00	0.13	0.00
Ig lambda cadena V-III region LOI PE=1 SV=1	0.17	0.00	0.00
Ig lambda-2 cadena C regions GN=IGLC2 PE=1 SV=1	2.92	2.65	2.23
Ig mu cadena C region GN=IGHM PE=1 SV=3	1.11	0.91	0.72
Ig lambda- <i>like</i> polipeptido 5 GN=IGLL5 PE=2 SV=2	0.52	0.87	0.30
	12.09	12.96	9.93
Albúmina GN=ALB PE=1 SV=2	4.61	6.19	5.55
Seritranferrina GN=TF PE=1 SV=3	0.77	1.36	0.97
Vitronectina GN=VTN PE=1 SV=1	2.60	1.55	1.79

Estos resultados sugieren que la disminución de la intensidad de bandas de las proteínas de 0-100 kDa (figura 3.71) a los 30 minutos de incubación es producida por una disminución en el contenido tanto de Apo C-II y Apo D, así como de las proteínas de unión C4-b, protrombina, vitronectina y vitamina K. Por otro parte, el ligero aumento en la intensidad de las bandas que corresponden a proteínas con un peso molecular entre 200-300 kDa (figura 3.71) con el tiempo de incubación se debe esencialmente a un aumento en el contenido de Apo B. Como se muestra en la tabla 3.9 y figura 3.73, se encontró que el contenido total de apolipoproteínas es relevante (siendo Apo AI, Apo C-II, Apo D, y Apo-E las más abundantes) y que aumenta con el tiempo de incubación (RPA \approx 18 y 25 % para 1 y 60 min de incubación respectivamente). De la misma forma, el contenido de HSA también incrementa ligeramente su contenido con el tiempo de incubación. Por otra parte, la RPA de la IgG y proteínas del complemento disminuye ligeramente en función del tiempo de incubación, mientras que la RPA del fibrinógeno se mantiene aproximadamente constante en el tiempo. Es notable que aunque el fibrinógeno es una de las proteínas más abundantes en el suero (10-27 mol/L), su adsorción se ve menos favorecida que la de otras proteínas presentes en concentraciones significativamente menores. Un claro ejemplo es el caso de la vitronectina, cuya concentración en el suero humano es de aproximadamente 5.3 mmol/L y en el $t = 1$ min presenta mayor abundancia (\sim 2.6 %) que cualquier cadena de fibrinógeno ($<$ 1.9 %).

De acuerdo a los resultados de nanoLC-MS/MS, el porcentaje de proteínas del tipo de las dis-opsoninas tales como HSA y apolipoproteínas aumenta con el tiempo, mientras el de opsoninas, tales como las inmunoglobulinas y proteínas complemento, disminuye. Este hallazgo puede ofrecer una serie de ventajas para el diseño racional de nanovectores, a fin de incrementar su tiempo de circulación en la sangre disminuyendo su capacidad de eliminación por parte del sistema inmunológico, así como mejorar la captación celular a través de interacciones específicas ligando-receptor.

Dado que la formación de la corona de proteínas sobre las superficies de los liposomas es inevitable, recientemente se ha planteado que la corona de proteínas pueda ser explotada a fin de mejorar las propiedades de captación celular de cualquier tipo de nanovector. Esta idea se basa en utilizar las proteínas del suero que se asocian a los nanovectores como ligandos que se unen a receptores específicos en las células.^{67,68} Esta nueva estrategia requiere trabajar en los siguientes aspectos: i) la determinación cuantitativa de la composición de la corona de proteínas, ii) la identificación de las proteínas con mayor afinidad por las superficies de los liposomas con diferentes composiciones o características de superficie; iii) la comprensión de qué proteínas presentes en el suero son las que participan en el direccionamiento y la eficiente liberación de los nanovectores en las células. De esta forma, se podrían utilizar nanovectores con una corona de proteínas que favoreciera la endocitosis mediada por receptores, lo cual permitiría obtener mejores resultados de transfección. Por ejemplo, una corona rica en apolipoproteínas puede afectar la interacción de los nanovectores con las células, ya que las apolipoproteínas desempeñan un papel clave en el metabolismo celular del colesterol; de hecho, nótese que las células presentan una gran cantidad de receptores de apolipoproteínas en sus superficies. De acuerdo a este hecho y a diversos trabajos publicados, las apolipoproteínas pueden favorecer la interacción de los liposomas a las células.^{60,69,70} Las apolipoproteínas se unen selectivamente a receptores expresados en órganos y células. El receptor más común es el receptor *scavenger* clase B tipo 1 (SR-BI), el cual se encarga de mediar la transferencia bidireccional de lípidos entre las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las proteínas de alta densidad (HDL).^{71,72} El SR-BI se expresa principalmente en el hígado y glándulas andrógenas, pero también en cerebro, intestino, y placenta, y en células tales como macrófagos y células endoteliales.

De esta forma, nanovectores recubiertos con un porcentaje considerable de apolipoproteínas puede interaccionar con los receptores de lipoproteínas situados en las membranas plasmáticas de las células de interés. Dado que el contenido total de apolipoproteínas en la corona formada en el complejo DC-Chol/DOPE-HP

(Tabla 3.9) es significativo (17 - 25%), se ha realizado un estudio sobre la forma en que la corona de proteínas interviene en el reconocimiento celular de las células PC3 (células de cáncer de próstata) que expresan altos niveles de receptor SR-BI.^{73,74} Para ello, se llevaron a cabo experimentos de internalización celular de los liposomas DC-Chol/DOPE en ausencia y presencia de corona de proteínas (usando los complejos DC-Chol/DOPE-HP formados a 1 y 60 min de incubación). Los resultados de internalización fueron analizados mediante microscopia confocal y, como se detalla en la sección experimental, se utilizó la sonda fluorescente NBD-DOPE para poder seguir la ubicación de los liposomas en la célula.

Los resultados de internalización celular de los liposomas DC-Chol/DOPE (figura 3.74) indican que existen marcadas diferencias entre los liposomas que no presentan corona de proteínas, y los que sí la presentan. Como puede observarse en las micrografías de la figura 3.74A, la fluorescencia proveniente de los liposomas DC-Chol/DOPE marcados en ausencia de HP pone de manifiesto que éstos se encuentran mayoritariamente en la superficie apical de las células, aunque se observa cierta emisión fluorescente en el citoplasma de algunas células. Nótese que, en cualquier caso, nunca se ve fluorescencia en los núcleos. Estas evidencias sugieren que los liposomas DC-Chol/DOPE se fusionan mayoritariamente a la membrana plasmática, mientras que sólo una pequeña proporción de ellos entra a través de la vía endocítica, ya que cuando ocurre la endocitosis (explicada en la sección experimental) los liposomas catiónicos son internalizados por las células provocando que las moléculas fluorescentes se difundan y observen en el citoplasma.

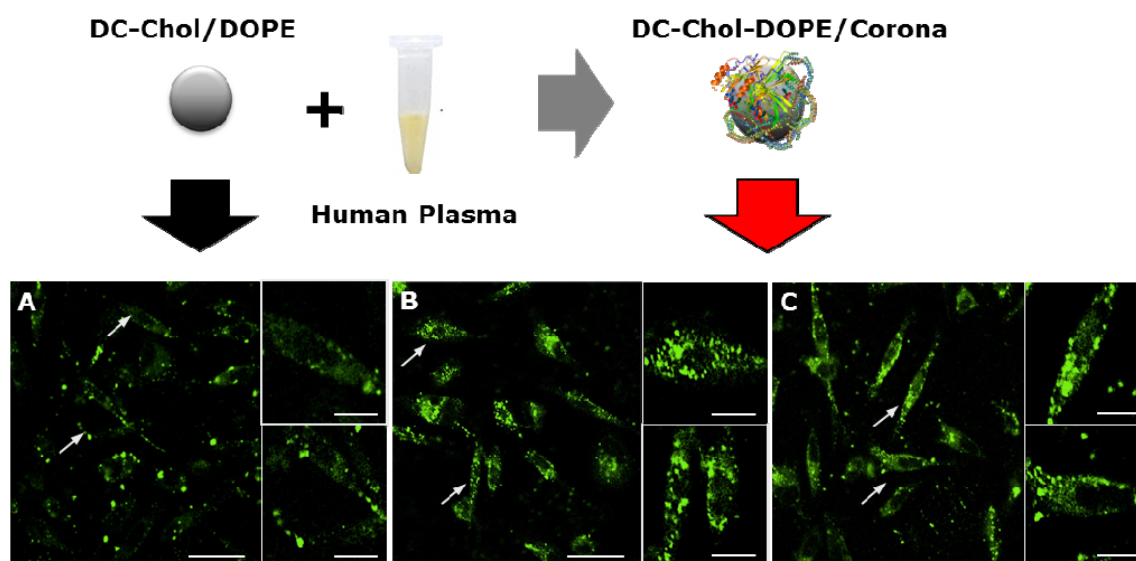


Figura 3.74. Imágenes de microscopía confocal de la captación celular en la línea celular PC3 de (A) liposomas DC-Chol/DOPE en ausencia de corona de proteínas; (B) complejo DC-Chol/DOPE-HP formado en 1 min; y (C) complejo DC-Chol/DOPE-HP formado en 60 min. La escala corresponde a 50 μM . Una magnificación de las áreas marcadas con las flechas blancas se presentan a la derecha de cada imagen (escala 10 μM).

En contraste, los complejos DC-Chol/DOPE-HP entran a la célula PC3 como liposomas intactos (figura 3.74B y C). Estas micrografías indican que la adsorción de la corona de proteínas en la superficie del nanovector, induce una alta actividad de internalización de los complejos. Sin embargo, estos resultados son aparentemente contradictorios debido a dos factores: i) Los complejos que presentan carga positiva como los liposomas catiónicos mixtos en ausencia de HP (+55 mV) deberían presentar mejores propiedades de captación celular en comparación con los complejos cargados negativamente como los obtenidos después de ser incubados con el HP (-14 mV); ii) La pérdida de especificidad de los complejos causada por la adsorción de proteínas podría provocar que los liposomas fueran reconocidos por el sistema inmune, provocando su rápida degradación.^{75,76} Por ello, se esperaba que el potencial negativo de los complejos NP-HP dieran como resultado una directa reducción de la interacción del nanovector con la membrana plasmática y posiblemente una inhibición en la captación celular. Particularmente y, en oposición a esta suposición, como se observa en la figura 3.74, los niveles de captación celular de los complejos DC-Chol/DOPE-HP en las líneas celulares

PC3 han mejorado respecto a los liposomas DC-Chol/DOPE, es decir en ausencia de corona de proteínas. Sin embargo, no se puede distinguir si: i) la corona de proteínas se une a otros receptores a parte de los SR-BI o ii) la corona de proteínas en su conjunto puede alterar algunos factores de complejos (por ejemplo el tamaño) regulando sus interacciones con la célula (figura 3.69b). No obstante, dada la gran abundancia de apoliproteínas que conforman la corona de proteínas del complejo DC-Chol/DOPE-HP, y su gran captación celular en células que presentan el receptor SR-BI, lo más probable es que la unión de los complejos a las células, esté favorecido por la existencia de interacciones específicas corona-receptor.

De los experimentos de microscopia confocal se desprenden las siguientes conclusiones: i) en ausencia de la corona de proteínas, los liposomas quedan fusionados principalmente en la membrana plasmática permaneciendo así incluso después de haber sido internalizados; ii) cuando los liposomas presentan una corona de proteínas, son captados como vesículas intactas y iii) la captación celular parece ser independiente del tiempo de incubación de los liposomas con el suero humano.

Una de las cuestiones aún por responder es si la capa de proteínas en la superficie del liposoma media la unión a las células a través de un mecanismo activo específico, o a través de interacciones no específicas con la superficie celular, comportándose como un simple recubrimiento. A fin de responder esta pregunta, nuestra estrategia fue encontrar una correlación entre el RPA de las apoliproteínas y el nivel de captación celular en las células PC3 usando la técnica de citometría de flujo. Para este fin, se ha utilizado el complejo DC-Chol/HP como referencia (liposoma catiónico en ausencia de DOPE), ya que exhiben propiedades como tamaño, potencial zeta y composición de la corona de proteínas prácticamente iguales que los complejos DC-Chol/DOPE-HP, pero con un constante nivel bajo de apoliproteínas (RPA < 8%). Los resultados muestran que el nivel de captación celular en las células PC3 es mayor para los complejos DC-Chol/DOPE-HP, en comparación con los complejos DC-Chol-HP (figura 3.75 a y b). Además la intensidad media de fluorescencia (figura 3.75b)

del complejo DC-Chol/DOPE-HP mostró un incremento de aproximadamente un 44 % en la intensidad con respecto al complejo DC-Chol-HP. Esta evidencia confirma que la internalización de los complejos DC-Chol/DOPE-HP está mediada esencialmente por la corona de proteínas compuesta principalmente por Apolipoproteínas.

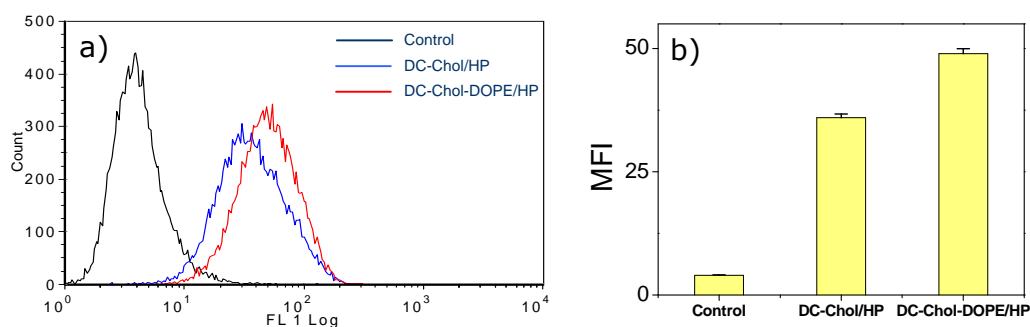


Figura 3.75. a) Número de cuentas de citometría de flujo para la captación celular PC3 de los complejos DC-Chol-HP y DC-Chol/DOPE-HP en la línea celular PC3; b) Intensidad de fluorescencia media en cada sistema. Control se refiere a las células sin tratar.

Los resultados indican que, en efecto, la capacidad de internalización de un nanovector puede ser modificada por la corona de proteínas que se forma en su superficie cuando entra en un medio fisiológico. Ello pone de manifiesto que la corona de proteínas puede y debe ser explotada adecuadamente a fin de conseguir mejores eficiencias de transfección en los vectores no virales.

Bibliografía

- 1 S. K. Misra, M. Muñoz-Ubeda, S. Datta, A. L. Barran-Berdon, C. Aicart-Ramos, P. Castro-Hartmann, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *Biomacromolecules*, 2013, **14**, 3951-3963.
- 2 M. Muñoz-Ubeda, S. K. Misra, A. L. Barran-Berdon, S. Data, C. Aicart-Ramos, P. Castro-Hartmann, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 3926-3937.
- 3 M. Muñoz-Ubeda, S. K. Misra, A. L. Barran-Berdon, C. Aicart-Ramos, M. B. Sierra, J. Biswas, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 18014-18017.
- 4 K. Ewert, N. L. Slack, A. Ahmad, H. M. Evans, A. J. Lin, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *Curr. Med. Chem.*, 2004, **11**, 133-149.
- 5 G. Caracciolo, D. Pozzi, H. Amenitsch and R. Caminiti, *Langmuir*, 2005, **21**, 11582-11587.
- 6 G. Caracciolo, D. Pozzi, R. Caminiti, C. Marchini, M. Montani, A. Amici and H. Amenitsch, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 11298-11304.
- 7 B. C. Ma, S. B. Zhang, H. M. Jiang, B. D. Zhao and H. T. Lv, *J. Control. Rel.*, 2007, **123**, 184-194.
- 8 C. R. Safinya, K. Ewert, A. Ahmad, H. M. Evans, U. Raviv, D. J. Needleman, A. J. Lin, N. L. Slack, C. George and C. E. Samuel, *Philos. Trans. R. Soc., A*, 2006, **364**, 2573-2596.
- 9 K. K. Ewert, H. M. Evans, A. Zidovska, N. F. Bouxsein, A. Ahmad and C. R. Safinya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 3998-4006.
- 10 R. Oda, I. Huc, M. Schmutz, S. J. Candau and F. C. MacKintosh, *Nature*, 1999, **399**, 566-569.
- 11 R. Oda, I. Huc, J.-C. Homo, B. Heinrich, M. Schmutz and S. Candau, *Langmuir*, 1999, **15**, 2384-2390.
- 12 L. Ziserman, A. Mor, D. Harries and D. Danino, *Phys. Rev. Lett.*, 2011, **106**, 238105.
- 13 L. Ziserman, H. Y. Lee, S. R. Raghavan, A. Mor and D. Danino, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 2511-2517.
- 14 M. Muñoz-Ubeda, A. Rodriguez-Pulido, A. Nogales, O. Llorca, M. Quesada-Perez, A. Martin-Molina, E. Aicart and E. Junquera, *Soft Matter*, 2011, **7**, 5991-6004.
- 15 A. Rodriguez-Pulido, A. Martin-Molina, C. Rodriguez-Beas, O. Llorca, E. Aicart and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 15648-15661.
- 16 A. Rodriguez-Pulido, E. Aicart, O. Llorca and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 2187-2197.
- 17 J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt and C. R. Safinya, *Science*, 1997, **275**, 810-814.
- 18 G. Caracciolo, C. Marchini, D. Pozzi, R. Caminiti, H. Amenitsch, M. Montani and A. Amici, *Langmuir*, 2007, **23**, 4498-4508.
- 19 M. Muñoz-Ubeda, A. Rodriguez-Pulido, A. Nogales, A. Martin-Molina, E. Aicart and E. Junquera, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 3332-3340.
- 20 A. L. Barran-Berdon, M. Muñoz-Ubeda, C. Aicart-Ramos, L. Perez, M. R. Infante, P. Castro-Hartmann, A. Martin-Molina, E. Aicart and E. Junquera, *Soft Matter*, 2012, **8**, 7368-7380.
- 21 T. T. Nguyen and B. I. Shklovskii, *Physica A*, 2001, **293**, 324-338.
- 22 T. T. Nguyen and B. I. Shklovskii, *J. Chem. Phys.*, 2001, **114**, 5905-5916.
- 23 T. T. Nguyen and B. I. Shklovskii, *J. Chem. Phys.*, 2001, **115**, 7298-7308.
- 24 T. T. Nguyen, I. Rouzina and B. I. Shklovskii, *J. Chem. Phys.*, 2000, **112**, 2562-2568.
- 25 Y. Obata, D. Suzuki and S. Takeoka, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1055-1063.

- 26 A. J. Kirby, P. Camilleri, J. Engberts, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, O. Soderman, M. Bergsma, P. C. Bell, M. L. Fielden, C. L. G. Rodriguez, P. Guedat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin and M. C. P. van Eijk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 1448-1457.
- 27 Petrus J. J. A. Buijnsters, Cristina L. García Rodríguez, Egon L. Willighagen, Nico A. J. M. Sommerdijk, A. Kremer, P. Camilleri, Martinus C. Feiters, Roeland J. M. Nolte and B. Zwanenburg, *European Journal of Organic Chemistry*, 2002, **2002**, 1397-1406.
- 28 S. De, V. K. Aswal, P. S. Goyal and S. Bhattacharya, *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, **102**, 6152-6160.
- 29 Y. Han and Y. Wang, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 1939-1956.
- 30 X. Wang, J. Wang, Y. Wang, H. Yan, P. Li and R. K. Thomas, *Langmuir*, 2004, **20**, 53-56.
- 31 I. Koltover, T. Salditt and C. R. Safinya, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 915-924.
- 32 G. Caracciolo, D. Pozzi, A. Amici and H. Amenitsch, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 2028-2032.
- 33 C. L. Pizzey, C. M. Jewell, M. E. Hays, D. M. Lynn, N. L. Abbott, Y. Kondo, S. Golan and Y. Tahnou, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 5849-5857.
- 34 I. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler and C. R. Safinya, *Science*, 1998, **281**, 78-81.
- 35 M. Foldvari, I. Badea, S. Wettig, R. Verrall and M. Bagonluri, *J. Exp. Nanosci.*, 2006, **1**, 165-176.
- 36 C. Srinivasan and D. J. Burgess, *J. Control. Rel.*, 2009, **136**, 62-70.
- 37 S. D. Patil, D. G. Rhodes and D. J. Burgess, *AAPS Journal*, 2005, **7**, E61-77.
- 38 S. D. Patil, D. G. Rhodes and D. J. Burgess, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1711**, 1-11.
- 39 S. D. Patil, D. G. Rhodes and D. J. Burgess, *AAPS Journal*, 2004, **6**.
- 40 A. Martín-Molina, G. Luque-Caballero, J. Faraudo, M. Quesada-Pérez and J. Maldonado-Valderrama, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2014, **206**, 172-185.
- 41 H. Liang, D. Harries and G. C. L. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, **102**, 11173.
- 42 V. I. Kulkarni, V. S. Shenoy, S. S. Dodiya, T. H. Rajyaguru and R. R. Murthy, *Expert opinion on drug delivery*, 2006, **3**, 235-245.
- 43 M. Nadler, A. Steiner, T. Dvir, O. Szekely, P. Szekely, A. Ginsburg, R. Asor, R. Resh, C. Tamburu, M. Peres and U. Raviv, *Soft Matter*, 2011, **7**, 1512-1523.
- 44 J. J. McManus, J. O. Rädler and K. A. Dawson, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**, 9869-9875.
- 45 L. Rattan, *Encyclopedia of Soil Science*, CRC Pres, Boca Raton, 2006.
- 46 E. Junquera and E. Aicart, *Curr. Topics Med. Chem.*, 2014, **14**, 649-663.
- 47 R. V. Rodik, A. S. Klymchenko, N. Jain, S. I. Miroshnichenko, L. Richert, V. I. Kalchenko and Y. Mely, *Chemistry*, 2011, **17**, 5526-5538.
- 48 Y. Aoyama, *Chemistry – A European Journal*, 2004, **10**, 588-593.
- 49 O. Hayashida, K. Mizuki, K. Akagi, A. Matsuo, T. Kanamori, T. Nakai, S. Sando and Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **125**, 594-601.
- 50 R. Rodik, A. Klymchenko, Y. Mely and V. Kalchenko, *J. Incl. Phenom. Macrocyc. Chem.*, 2014, 1-12.
- 51 V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati and R. Ungaro, *Nature communications*, 2013, **4**, 1721.
- 52 V. Bagnacani, V. Franceschi, L. Fantuzzi, A. Casnati, G. Donofrio, F. Sansone and R. Ungaro, *Bioconjug Chem*, 2012, **23**, 993-1002.
- 53 C. Ortiz Mellet, J. M. Benito and J. M. Garcia Fernandez, *Chemistry*, 2010, **16**, 6728-6742.
- 54 L. Nault, A. Cumbo, R. F. Pretot, M. A. Sciotti and P. Shahgaldian, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 5581-5583.
- 55 V. Bagnacani, F. Sansone, G. Donofrio, L. Baldini, A. Casnati and R. Ungaro, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 3953-3956.

- 56 M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggard, M. B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia and K. Dawson, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7503-7509.
- 57 D. Dell'Orco, M. Lundqvist, C. Oslakovic, T. Cedervall and S. Linse, *PLoS One*, 2010, **5**, e10949.
- 58 E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G. J. Oostingh and V. Puentes, *ACS Nano*, 2010, **4**, 3623-3632.
- 59 M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati and K. A. Dawson, *Nature nanotechnology*, 2012, **7**, 779-786.
- 60 M. P. Monopoli, F. B. Bombelli and K. A. Dawson, *Nature nanotechnology*, 2011, **6**, 11-12.
- 61 I. Lynch and K. A. Dawson, *Nano Today*, 2008, **3**, 40-47.
- 62 T. Cedervall, I. Lynch, M. Foy, T. Berggard, S. C. Donnelly, G. Cagney, S. Linse and K. A. Dawson, *Angewandte Chemie*, 2007, **46**, 5754-5756.
- 63 G. Caracciolo, L. Callipo, S. C. De Sanctis, C. Cavaliere, D. Pozzi and A. Lagana, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 536-543.
- 64 M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. B. Bombelli and K. A. Dawson, *J Am Chem Soc*, 2011, **133**, 2525-2534.
- 65 M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. H. Yahia and M. Mahmoudi, in *Protein-Nanoparticle Interactions*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 21-44.
- 66 A. L. Capriotti, G. Caracciolo, C. Cavaliere, P. Foglia, D. Pozzi, R. Samperi and A. Lagana, *J. Proteomics*, 2012, **75**, 1924-1932.
- 67 E. Mahon, A. Salvati, F. Baldelli Bombelli, I. Lynch and K. A. Dawson, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2012, **161**, 164-174.
- 68 G. Caracciolo, in *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, 2013, pp. 54-57.
- 69 S. I. Kim, D. Shin, H. Lee, B. Y. Ahn, Y. Yoon and M. Kim, *Journal of hepatology*, 2009, **50**, 479-488.
- 70 C. L. Bisgaier, M. V. Siebenkas and K. J. Williams, *The Journal of biological chemistry*, 1989, **264**, 862-866.
- 71 E. Hellstrand, I. Lynch, A. Andersson, T. Drakenberg, B. Dahlback, K. A. Dawson, S. Linse and T. Cedervall, *The FEBS journal*, 2009, **276**, 3372-3381.
- 72 V. I. Zannis, A. Chroni and M. Krieger, *Journal of molecular medicine*, 2006, **84**, 276-294.
- 73 J. Ni, S. T. Pang and S. Yeh, *The Prostate*, 2007, **67**, 463-471.
- 74 A. G. Lacko, M. Nair, S. Paranjape, S. Johnso and W. J. McConathy, *Anticancer Res*, 2002, **22**, 2045-2049.
- 75 A. Salvati, A. S. Pitek, M. P. Monopoli, K. Prapainop, F. B. Bombelli, D. R. Hristov, P. M. Kelly, C. Aberg, E. Mahon and K. A. Dawson, *Nature nanotechnology*, 2013, **8**, 137-143.
- 76 A. Lesniak, A. Salvati, M. J. Santos-Martinez, M. W. Radomski, K. A. Dawson and C. Aberg, *J Am Chem Soc*, 2013, **135**, 1438-1444.

Capítulo 4. Relevant Aspects and Conclusions

Relevant aspects and Conclusions

The promise of gene therapy for future medical applications is reflected in the large amount of research in this field. Cationic lipids (CLs) are common non-viral gene vectors used to compact and introduce nucleic acids into the mammalian cell in order to express specific proteins. Although CLs are less effective transfecting DNA than viral vectors, they have biocompatibility characteristics that make them the preferred option for gene delivery. Therefore, efforts have been focused on the improvement of their transfection efficiency. Regarding this improvement, it is important to understand the different complex steps involved in the transfection process. During the development of this PhD thesis, several potential non-viral vectors formed from different lipidic building blocks have been characterized from the biophysical and biochemical perspectives to improve our understanding of the transfection process. Morphological and structural properties of supramolecular nanoaggregates formed between the lipidic vectors and DNA have been characterized with the objective of finding an adequate relationship between lipoplex structure and biological activity. This ultimately allows finding and designing better candidate compounds to improve the transfection efficiency and reduce cytotoxicity of non-viral gene delivery systems.

Biophysical and biochemical studies of lipoplexes $C_6(LL)_2/DOPE$ -ctDNA and $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA. It has been found that mixed liposomes consisting of $C_6(LL)_2$ (a chiral lysine based gemini cationic lipid) and the helper lipid DOPE properly condense and compact both plasmid DNA pEGFP-C3 (pDNA), or linear double-stranded calf thymus DNA (ctDNA). Furthermore, liposome and lipoplex compositions seem to be key factors in the properties and structure of the resulting lipoplexes. The electrochemical study has confirmed our previous results: when plasmid DNA is compacted, it retains a significant number of Na^+ counterions in its vicinity. This evidence contrasts with what is usually found

for linear DNA, and results in a lower effective negative charge ($q_{\text{pDNA}}^- = -0.56$ per bp) than ctDNA ($q_{\text{ctDNA}}^- = 2$ per bp). This finding is potentially significant for both *in vitro* and *in vivo* transfection studies because, for a DNA transfection process to be effective, CL is needed, and the smaller the amount of the CL the lower the cytotoxicity. TEM experiments, both cryo-TEM and NS-TEM, have revealed a complex scenario of multilamellar nano-aggregates, from ribbon-type (RB, typically present for chiral lipids) to cluster-type structures (CT, usually found in cationic lipid/DOPE systems). It has been found that the composition of the mixed liposome, α , plays a key role in the final morphology of the lipoplex. Twisted ribbons, coiled ribbons, and nanotubes, together with cluster-type lipoplex structures, are found at low α values, while only the ribbon-type structures are present at higher α values. SAXS diffractograms have confirmed the existence of these two types of multilamellar structures through a deconvolution process of the first peak of diffractograms into two overlapping bands, that yield interlamellar separation values of around 6.3 and 5.4 nm for cluster-type and ribbon-type structures, respectively. The theoretical complexation model, working with the renormalized charges of liposomes, plasmid DNA, linear DNA and lipoplexes, indicates that when the surface charge of a liposome is large enough, an increase in the cationic/zwitterionic lipid ratio does not imply an enhancement in the DNA complexation, which confirms the crucial role played by the zwitterionic helper lipid. The analysis of the electrochemical behaviour of lipoplexes containing linear DNA and/or supercoiled pDNA, based on the theoretical model, indicates that, although the effective charge of plasmid DNA is smaller than that of linear DNA, the former enhances the complexation process, which has been attributed to the dissimilar geometry of both DNAs (a "tennis ball" conformation for linear DNA lipoplexes, or a more dense structure for plasmid DNA lipoplexes). Regarding the final biochemical characteristics of the $\text{C}_6(\text{LL})_2/\text{DOPE-pDNA}$ nanoaggregates, despite these lipoplexes have good cell viability levels, they have not shown any significant level of transfection. This may suggest that liposomes that promote the formation of ribbon-type structures are not adequate DNA vectors for gene therapy.

Biophysical and biochemical studies of lipoplexes formed by GCL with oligoxyethylene spacer, DOPE and either ctDNA and pDNA. The biophysical and biological experiments have confirmed that lipoplex nano-aggregates of DOPE and a gemini cationic lipid (GCL) with two ammonium head groups separated by a polyoxyethylene spacer ($(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$) compact and transfect pEGFP-C3 plasmid DNA efficiently. The spacer length between the two head groups, the mixed lipid compositions, and the lipoplex effective charge ratio hold the key that determines the properties, structure, and transfection efficiency of the resulting nano-aggregates. The three gemini lipids $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$ with $n = 1, 2$ or 3 have a lower effective charge $q_{L^+} = (1.75 \pm 0.05)$ than its nominal one (+2), while pDNA is compacted yielding only a 10-30% effective negative charge (q_{pDNA}^-) than that of the linear DNA (-2 per bp). Cryo-TEM micrographs have shown two types of lamellar packing (cluster-type CT, and fingerprint-type FP). The cluster-type are observed at low $\alpha = 0.2$; both, cluster and fingerprint type, coexist at $\alpha = 0.5$; and only the fingerprint-type is present at high $\alpha = 0.7$. SAXS diffractograms of the $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplexes reveal the presence of three lamellar structures, two of them coexisting at low and high GCL compositions, α . At all the lipid compositions, a lamellar structure, $L_{\alpha, main}$, is present. At the DOPE rich region ($\alpha = 0.2$ and 0.4), a second structure, $L_{\alpha, DOPE\ rich}$, coexists with the $L_{\alpha, main}$. At higher GCL compositions ($\alpha = 0.7$), a third structure ($L_{\alpha, CL\ rich}$), coexisting with the $L_{\alpha, main}$, is found. The optimized transfection efficiency of pDNA was higher for lipoplexes containing GCLs with longer ($n = 3$) or shorter ($n = 1$) polyoxyethylene spacer, at high GCL composition ($\alpha = 0.7$) and low charge ratio ($\rho_{eff} = 2$) in all cancer cell lines studied. Their transfection efficiency was much better than both Lipo2000* and lipoplexes with GCLs of the 1,2-bis(hexadecyl dimethyl ammonium) alkane series, previously reported by our group. As a cause of the improvement, we hypothesized that, (a) the coexistence of two lamellar structures at high GCL composition synergizes the TE of these lipidic vectors, (b) the orientation of polyoxyethylene region in $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE$ may occur in such a way that distance between two cationic heads becomes lesser than that in $(C_{16}Am)_2(C_2O)_2/DOPE$, which is poor

in terms of TE, and (c) the synergistic interactions between serum proteins and $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplexes containing a polyoxyethylene spacer improve TE, especially at high GCL content. Finally, lipoplexes have shown very low levels of toxicity *in vitro*, confirming them as improved vectors for pDNA, and, in turn, potentially adequate for gene therapy studies *in vivo*.

On the other hand, the mixed liposome nano-aggregates of DOPE and GCLs with two cationic imidazolium groups separated by an oligo-oxyethylene spacer $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ with $n = 1, 2$ or 3 , compact and transfect pEGFP-C3 plasmid DNA significantly. The GCL composition and the lipoplex effective charge ratio (ρ_{eff}) are shown to be important factors that determine their properties, structure, and transfection efficiency. The three GCLs yield a lower effective charge ($q_L^+ = 1.8$) than its nominal one (2 per bp), while pDNA is compacted yielding an effective negative charge which is only 25% of its nominal one ($q_{pDNA}^- = -0.5$ per bp). SAXS studies have revealed the presence of two lamellar structures, one ($L_{\alpha, main}$) in the whole GCL composition range, and another one ($L_{\alpha, DOPE\ rich}$) that coexists with the previous one at low GCL composition ($\alpha = 0.2$). The cryo-TEM analysis for the three $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplexes have shown a multilamellar pattern consisting of series of cationic lipidic bilayers with pDNA sandwiched between them, with two types of lamellar packing: CT-type and a FP-type, both with similar interlamellar spacing. These evidences are consistent with the $L_{\alpha, main}$ structure revealed by SAXS. Only CT-type is observed at low $\alpha = 0.2$, while the FP-type is present at moderate to high ($\alpha \geq 0.5$) values. However, in the $(C_{16}Im)_2(C_2O)_2/DOPE$ -pDNA lipoplex at $\alpha = 0.5$, both lamellar patterns coexist. The *in vitro* transfection studies and cytotoxicity analysis revealed that the three lipoplex nano-aggregates reported in this section ($(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA with $n = 1, 2$ or 3) are efficient gene transfection vectors, even better than the standard Lipo2000*, and superior than $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$ series and others previously studied containing other cationic head groups or spacers. The optimum formulations for all the four cell lines tested are those with lower GCL composition ($\alpha = 0.2$), and at low effective charge ratio $\rho_{eff} = 2.0$. Additionally,

the length of the spacer in the GCL seems to have lesser importance in the present case than in previous studies, although the $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplex with $n = 1$ or 3 shows slightly higher GFP expression than the formulation with $n = 2$. These features for the optimized formulations, have been attributed to the combination of several factors, as follows: (a) the fusogenic character of DOPE, which is predominant at $\alpha = 0.2$, (b) the higher fluidity of the lipoplexes at $\alpha = 0.2$ and at physiological temperature, (c) the coexistence of two lamellar structures at $\alpha = 0.2$ that synergizes the TE of these lipidic vectors, and (d) the higher biocompatibility of the GCLs reported in this work due the presence of both, two imidazolium cationic groups together with an oligo-oxyethylene spacer of short-to-medium length. In any case, all the optimum formulations reported here are highly efficient with negligible levels of toxicity, and thus, they may be considered promising gene transfection vectors for further biological applications.

Characterization of lipoplexes formed by anionic lipids (DOPG or DOPS), DOPE, divalent cation Ca^{2+} , and pDNA. Several general conclusions can be drawn regarding lipofection using AL vectors for plasmid DNA, in the presence of Ca^{2+} , from both the physicochemical and biochemical results reported in this section. DOPG/DOPE and DOPS/DOPE anionic liposomes are able to compact pDNA by means of Ca^{2+} -bridges. This compaction is fulfilled at a Ca^{2+} concentration ≈ 15 - 20 mM, as confirmed by both zeta potential and agarose gel electrophoresis. Zeta potential profiles are quite different from those of CL based lipoplexes, characterized by a typical sigmoidal fit. In the present case, lipoplexes are never positively charged, the net charge of the complex being around zero when pDNA is totally compacted. An excess of Ca^{2+} remains in the bulk and does not contribute to zeta potential of the nanoaggregates. From a structural view-point, when pDNA is compacted, it is allocated together with the divalent cations inside the inverted micellar cylinders that characterize the H_{II}^c phases found in both DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA and DOPS/DOPE- Ca^{2+} -pDNA lipoplexes. In addition, a lamellar L_α phase, without pDNA sandwiched in between the lipidic lamellae, has been also found in the DOPS/DOPE- Ca^{2+} -

pDNA lipoplex. It is remarkable that this phase does not have an analogue in the CL based lipoplexes. The Ca^{2+} mediated lipoplexes reported in this work show low-to-moderate transfection levels combined with moderate-to-high cell viability, comparable with those of the control Lipofectamine2000*, which is a cationic lipid standard formulation. However, none of the AL- Ca^{2+} -pDNA lipoplexes studied in this work improve the output of recently synthesized CLs gen vectors, specially considering that the Ca^{2+} concentrations at which AL based vectors yields best performances are significantly higher than *in vivo* cellular levels. It may indicate that, lipofection via anionic lipids and divalent cations as mediators, still needs to enhance transfection levels to be considered as a plausible general alternative to lipofection through improved CLs based lipoplexes.

Characterization of lipoplexes formed by anionic lipids DOPG, DOPE, multivalent cation P^{10+} , and pDNA. The ζ potential studies of DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA lipoplexes shows a typical sigmoidal profile, as that usually found for lipoplexes formed by CLs. It means that at a certain $[\text{P}^{10+}]$, the negative charge of lipoplexes is inverted. Accordingly, it can be concluded that multivalent cationic entities P^{10+} are better than Ca^{2+} as mediators, because they allow reaching positive lipoplexes. Gel electrophoresis results are in good agreement with ζ potential, indicating that pDNA is efficiently compacted by DOPG/DOPE lipoplexes with P^{10+} cations acting as effective bridges, at concentration $\approx 15\text{-}30 \mu\text{M}$. SAXS diffractograms and cryo-TEM micrographs of DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA lipoplexes show two kinds of structures depending on AL composition: $\text{H}_{\text{II}}^{\text{C}}$ at $\alpha = 0.2$ and L_{α} structure at $\alpha = 0.5$. The micrographs also reveal that lipoplexes at $\alpha = 0.5$ are organized in CT-type nanoaggregates, with an aggregation pattern completely different than that one found in the absence of pDNA, confirming that pDNA is compacted between DOPG/DOPE- P^{10+} multilayers. However, transfection efficiency values were not significant in HEK293T cell lines. On the other hand, the lipoplexes present cell viability values similar to those of the positive control Lipo2000*. Accordingly, it can be concluded that DOPG/DOPE- P^{10+} -pDNA lipoplexes show

very interesting biophysical results; however, these results do not seem to be correlated with an appreciable performance on transfection.

Characterization of lipoplexes formed by calixarene cationic lipid, DOPE, and either ctDNA or pDNA. The characterization of TMAC4/DOPE-pDNA lipoplexes confirm that the CxCL is able to compact and transfect pEGFP-C3 plasmid efficiently. The ζ potential study of TMAC4/DOPE-ctDNA shows that TMAC4 has 100% of its nominal charge available ($q_{L^+}^+ = 4$), while pDNA for TMAC4/DOPE-pDNA lipoplexes presents an effective negative charge that is only 10 % of its nominal one, all this data being confirmed by gel electrophoresis experiments. PALS studies indicate the presence of three populations of nanoagregates for TMAC4/DOPE lipid mixtures without pDNA, with size around ~ 100 nm, ~ 20 nm and ~ 6 nm, compatible with liposomes, oblate micelles, and spherical micelles, respectively. The presence of liposomes and oblate micelles was confirmed by cryo-TEM studies, as well. SAXS diffractograms show that TMAC4/DOPE-pDNA lipoplexes are organized in lamellar structures at all CxCL compositions. Cryo-TEM micrographs show two types of multilamellar nanoagreggates (CT-type and FP-type). At low CxCL compositions ($\alpha = 0.2$), the coexistence of both nanostructures is observed, while at the intermediate composition ($\alpha = 0.5$), only CT-type nanoagreggates are found. The best transfection efficiency of pDNA has been obtained for lipoplexes formed at low CxCL compositions ($\alpha = 0.2$) and $\rho_{\text{eff}} = 20$. Probably, the coexistence of two lamellar phases is the responsible of this better TE performance at low α , as also found in other GCL based lipoplexes. TMAC4/DOPE-pDNA lipoplexes show good percentage of cell viability at the optimized transfection conditions. Nonetheless, the transfection efficiencies of TMAC4/DOPE-pDNA lipoplexes is lower than that of the control Lipo2000* and also lower than those of some of the GCL formulations studied in the thesis. However, the fact that some transfection capacity has been observed and also the promising cell viabilities measured for TMAC4/DOPE-pDNA lipoplexes open the way for improvement of this new kind of non-viral gene vectors involving macrocyclic policationic lipid based molecules.

Time evolution of DC-Chol/DOPE-protein corona in human plasma. Finally, in this thesis it has been undertaken a first insight to the emerging idea that the protein corona formed around gene vectors in contact with biological fluids may be linked to its biological impacts and properties. For this reason, the time evolution of nanovectors–protein corona in human plasma, together with its resulting effects on the targeting of nanovectors to overexpressed receptors in cancer cells have been investigated. Upon interaction with human plasma, positively charged lipid nanoaggregates with a lipid envelope made of DC-Chol and DOPE are covered by a protein corona resulting in negatively charged aggregates. Identification and quantification of human plasma proteins associated with the protein corona has allowed us to demonstrate that the nanovectors–protein corona around DC-Chol–DOPE liposomes is extremely rich in apolipoproteins that are major ligands for the lipoproteins cell receptors. These results suggest that, in the presence of the protein corona, apolipoproteins direct a receptor-mediated uptake of DC-Chol–DOPE liposomes into PC3 prostate carcinoma target cells expressing high levels of the SR-BI receptor. In addition, the relative abundance of opsonin proteins (e.g., immunoglobulins and complement proteins) decreases with time, while that of typical dysopsonins, such as serum albumin, is found to increase. The specific role played by other biologically relevant proteins, such as intrinsically disordered proteins, ferritin, fibrinogen, and amyloidogenic proteins, etc. is not clear so far. This aspect of nanovectors research needs further investigation to predict the actual biological identity of nanovector–protein complex as far as the protein layer is built up. These results set the basis for a rational exploitation of the protein corona formation for targeted drug/gene delivery.

In summary, the present thesis is focused on the rational biophysical and biochemical characterization of a wide variety of lipid formulations in order to find improved non-viral gene vectors. The selection of the studied lipidic vectors was based on their expected capacity for compacting pDNA by electrostatic interactions, and their expected biocompatibility, based on the introduction of “bio friendly groups” such: gemini lipids lysine derived, gemini lipids with oligo-oxiethylene groups, anionic lipids and macrocyclic polycationic

lipids. The combined information resulting from this thesis allows us to find important correlations between biophysical aspects and biochemical results. Electrochemical characterizations identify the available charge of pDNA, allowing to perform subsequent studies at effective molar charge ratios and to rationally optimize the amount of gene cationic vectors used to compact the pDNA. This resulted in a subsequent improvement of cell viabilities. The structural studies by cryo-TEM and SAXS let us understand that the transfection efficiency is improved by the coexistence of different structures (such as two different lamellar structures). Similarly, it seems that, in general, CT-type nanoaggregates structures are better than FP-type ones, and that RB-type nanoaggregates are not able to transfect cells. In general, biochemical studies reveal that the presence of DOPE improves the transfection capacities of gene vectors, in agreement with previous literature. In addition, they show that GCL based on imidazolium head groups and oxyethylene spacers are the best gene vectors studied. This family of compounds result in significantly higher TE than that of control Lipo2000*. This is true even for several cancer cell lines that are historically difficult to transfect. Finally, advance biochemical studies shows that protein corona has significant impacts on the cellular uptake of nanoaggregates and the transfection process. These results suggest that it should be taken into account as a consistent research line in which understanding of main processes and drivers may result in significant improvements in gene delivery efforts. Therefore, this PhD thesis can be understood as a compendium of systematic analysis of several relevant non-viral gene vector families which provide significant information in support of future rational strategies for gene therapy development.

Conclusions

In the present thesis, a complete physicochemical and biochemical characterization of a new generation of non-viral gene vectors has been performed. The work undertaken has allowed establishing empirical correlations among electrochemical and structural properties, and the resulting transfection capacities of the different non-viral gene vectors.

The following specific conclusions can be remarked:

1. The electrochemical studies allow finding the optimized formulations of the non-viral vectors at which they are able to compact efficiently pDNA. In all the cases, pDNA presents a much lower effective negative charge, only 10 - 25 % of its nominal one (-2 per bp).
2. These results confirm that it is absolutely necessary to work with effective charges of both the vector and the plasmid, and, accordingly, with effective charge ratios, which can be determined from the physicochemical experiments, and not directly with nominal ones as normally appears in the literature.
3. Structural and morphological studies of the different non-viral vectors has revealed a rich scenario of nanoaggregate types, ranging from ribbon-type (RB) structures of chiral lipids (such lysine derived), to the typical cluster-type (CT) and fingerprint-type (FP) structures usually reported for CL-formed lipoplexes. These structures are formed by the supramolecular self-organization of lipids and pDNA in lamellar or inverted hexagonal lyotropic liquid crystal phases depending on the system and/or DOPE content.
4. It is remarkable that in some cases a coexistence of phases has been found, and that the resulting demixing phases are linked to empirical improvement of transfection levels.
5. Among the studied non-viral vectors, it can be concluded that gemini cationic lipids are the best ones in terms of transfection efficiency and cell viability. Among them, the imidazolium heads and oxyethylene

spacers has revealed as a quite adequate structural combination in what regards to the biological outcomes of the lipidic vector. The helper lipid DOPE, of known fusogenic character, also plays a key role in the resulting transfection capacity of the studied gene vectors.

6. The introduction of "bio-friendly" groups in the lipidic molecules of GCLs, such as oligo-oxyethylene spacers, has demonstrated to improve the performances of the non-viral gene vectors, increasing both transfection efficiency levels and cell viability values for several cancer cell lines.
7. The lipofection via anionic lipids with divalent or polyvalent cations as mediators, still needs to enhance transfection levels to be considered as a plausible general alternative to lipofection through improved CLs based lipoplexes, specially considering the high amount of Ca^{2+} required to transfect cells.
8. The use of non-viral gene vectors involving macrocyclic policationic lipid based molecules may be considered as a new transfection methodology using preorganized scaffolds as a promising biomimetic alternative for gene vectors design. This is because of their interesting properties, such as their facial amphiphilicity, and their capacity to incorporate a variety of functional elements. However, transfection efficiencies of lipoplexes consisting on a calixarene based policationic lipidic vector, studied in this thesis, is lower than that of the universal control Lipo2000* and the GCLs. Accordingly, this interesting and promising new way of lipofection needs further improvement.
9. A first insight in the nanovectors-biological fluid complex interactions and the protein corona formation has been performed by applying physicochemical, biological and last-generation instrumental techniques (such as nanoCL-MS/MS). A complete picture of nanovectors-biological fluid interaction has been drawn depending on different external parameters. The presence of serum and the incubation time of the vector with the biological fluids were found to be critical parameters

which modified the composition of the formed protein corona and the final transfection efficiencies of DC-Chol/DOPE liposomes.

10. These results point to the study of protein corona of non-viral gene vectors and its dynamic evolution as a promising research line in which understanding of main processes and drivers may result in a rational exploitation of the protein corona formation for targeted gene delivery, and, in turn, in significant improvements in cell transfection *in vitro* and, finally, *in vivo*.

Anexo 1

5.1 Materiales

GelRed. El GelRed se utiliza para analizar las interacciones entre el DNA y los liposomas mixtos por medio de ensayos de intercalación tanto por espectroscopía de fluorescencia como por electroforesis en gel de agarosa. La sonda fue suministrada por Biotium.

1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). Suministrada por Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.) con una pureza superior al 97,5 %. Con esta sonda se puede obtener información acerca de la viscosidad y fluidez de la membrana lipídica, del empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas en la parte más interna de la bicapa, y de su temperatura de transición gel-fluido (T_m).

Azul de comassí G-350. El azul de comassí es un derivado del trimetilfenilmetano. Este colorante se usa en bioquímica principalmente para el análisis y determinación de proteínas tanto en la tinción de geles de acrilamida como en el ensayo de Bradford.

1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina - 7 Nitrobenzofurazan. (NBD-DOPE). Este lípido etiquetado con el compuesto fluorescente 7-nitrobenzofurazán fue adquirido en Sigma Aldrich.

Cloroformo y etanol. Utilizado como disolvente de los lípidos. Posee una pureza superior al 99,8% y procede de Sigma-Aldrich, Inc. (EE.UU.).

Agua desionizada. Todas las disoluciones se han preparado con agua destilada y desionizada haciendo uso de un sistema Super-Q Millipore (conductividad inferior a $18 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-piperacina-1-etanosulfónico (HEPES-H) ($pK_a=7.66$) y 4-(2-hidroxi-etil)-piperacina-1-etanosulfonato sódico (HEPES-Na). Se han utilizado para preparar las disoluciones reguladoras a $pH=7.4$ con el fin de mantener los lípidos zwitteriónicos con carga neta nula. Los dos reactivos con purzas mínimas de 99,5% y 99,0%, respectivamente, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.).

Cloruro cálcico dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$). En adelante $CaCl_2$, ha sido suministrado por Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.), con una pureza superior al 99,5%. Se ha utilizado junto con los liposomas aniónicos mixtos como puente entre las cargas negativas de los liposomas y las cargas negativas del DNA.

DTT Sirve para abrir los enlaces s-s en la desnaturalización de proteínas y el iodo acetamida elimina los enlaces s-s para facilitar su desnaturalización. Ambos compuestos han sido suministrados por promega.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Es un medio de cultivo celular que permite mantener diferentes tipos de líneas celulares. Contiene una variedad de elementos como son aminoácidos, sales, glucosa y vitaminas. (Sigma Ref. D6546)

FBS (Suero Fetal bovino). El suero es la fracción de la sangre que no contiene globulos rojos y que se obtiene después de la centrifugación de la sangre coagulada. El FBS es el principal sustituto de suero en el cultivo in vitro de células eucariotas. Contiene una gran cantidad de factores de crecimiento como proteínas. (Sigma Ref F7524)

5.2 Disoluciones

HEPES $pH=7.4$ 10mM. Para prepara 500 mL de dicha disolución se pesa 0.0026 mol del componente ácido (HEPES-H) y 0.0023 mol del componente básico (HEPES-Na).

HEPES $pH=7.4$ 40mM. Para preparar 500 mL de dicha disolución se pesa 0.0103mol del componente ácido (HEPES-H) y 0.0096mol del componente básico (HEPES-Na).

Tris-Acetato-EDTA 50X (TAE 50X): Para prepara un 1 L de disolución, disolver en 600 mL de agua destilada 242 g de Tris Base ($M = 121 \text{ g/mol}$), 57.1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0.5 M ($\text{pH} = 8.0$), aforar a 1 L con agua destilada.

Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE 1X) (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM). Se ha utilizado como disolución reguladora a $\text{pH} 7.6$, para usar como medio de preparación de geles de agarosa y como disolución en el proceso de electroforesis. Esta disolución se prepara por dilución a partir de la disolución TAE 50X.

PBS (disolución reguladora de fosfatos). Para preparar 1 L de disolución, pesar 81.8 g de NaCl, 20.1 g de KCl, 14.2 g Na_2HPO_4 y 2.45 KH_2PO_4 . $\text{pH} = 8.0$.

Running buffer. Para prepara 1 L de disolución, pesar 3 g de Tris, 14.4 g de Glicerina y 1 g de SDS y disolver en agua destilada.

Solución fijadora. Esta disolución se prepara con 10 % de ácido acético. Para 1 L de disolución se añade 100 mL de ácido acético y 900 mL de agua destilada.

Disolución reguladora de carga (loading buffer, LB 10X) para geles de agarosa. Esta disolución se prepara con 50 % de glicerol, 0.25% de azul de bromofenol y 0.25% de Xileno cianol en agua miliQ. Se usa para hacer las muestras de lipoplejos más densas para lograr que se hunda en el fondo del pocillo al momento de cargarlas en el gel, por otra parte permite evaluar de forma rápida la velocidad con la que se esta ejecutando el gel.

Disolución reguladora de carga (loading buffer, LB 2X) para geles de poliacrilamida. Para prepara esta disolución se usa 2.5 mL de una disolución de TAE-HCl 0.5 M ($\text{pH}=6.8$), 4 mL de Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, 2.3 mL de glicerol, 0.5 mL de Beta-mercaptoetanol y 0.1 mL de azul de bromofenol, se mezcla todo perfectamente y se lleva a un volumen final de 10 mL con agua miliQ.

UREA 8 mM para la desnaturalización de proteínas. Disolver 1.37 g en $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$ (50mM).

Disolución reguladora de carga (loading buffer, LB 1X) para geles de poliacrilamida. Esta disolución se prepara a partir de la disolución reguladora de carga 2X.

Anexo 2

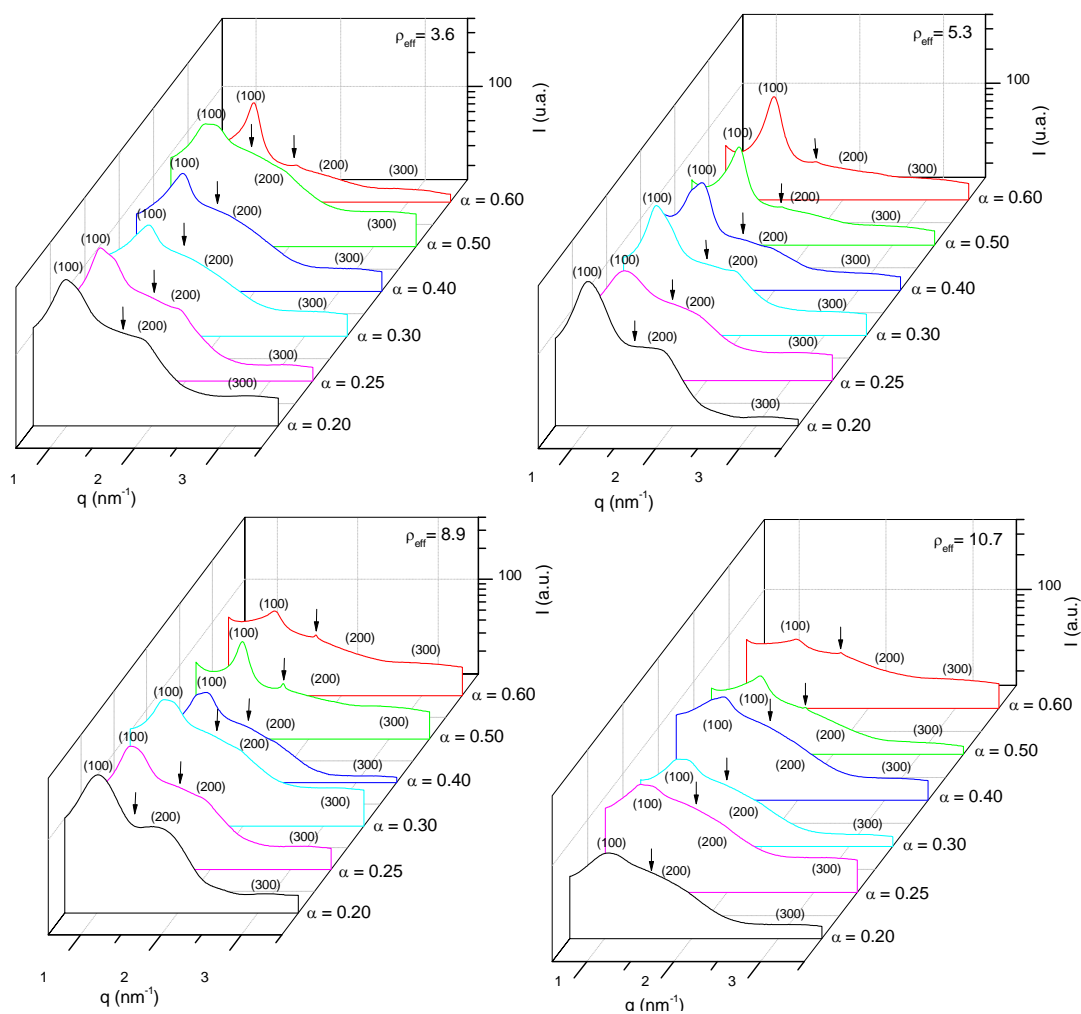


Figura A1. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos $C_6(LL)_2/DOPE$ -pDNA a diferentes α ($\alpha = 0.20, 0.25, 0.30, 0.40, 0.50$ ó 0.60) y relaciones molares de carga efectiva ($\rho_{\text{eff}} = 3.6, 5.3, 8.9$ ó 10.7). Las flechas indican la posición del máximo de difracción correspondiente a la correlación pDNA-pDNA.

Tabla A1 y A2. Valores de q_{100} , d_{100} , q_{pDNA} y d_{pDNA} de las diferentes fases lamelares encontradas para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_1/DOPE-pDNA$ (Tabla A1) y $(C_{16}Am)_2(C_2O)_2/DOPE-pDNA$ (Tabla A2) a diferentes composiciones de GCL (α) en la mezcla de lípidos y a diferentes relaciones de carga efectiva (ρ_{eff}).

Tabla A1. $(C_{16}Am)_2(C_2O)/DOPE-pDNA$								
ρ_{eff}		α						
		0.2		0.4		0.5	0.7	
		L_α <i>rica en DOPE</i>	L_α principal	L_α <i>rica en DOPE</i>	L_α principal	L_α principal	L_α principal	
1.5	q_{100}	0.76	0.94	0.75	1.01	1.03	1.05	1.15
	d_{100}	8.27	6.68	8.38	6.22	6.10	5.98	5.46
	q_{pDNA}		1.3		1.4	1.5	1.7	
	d_{pDNA}		4.9		4.7	4.3	3.8	
2.0	q_{100}	0.75	0.94	0.75	1.01	1.04	1.05	1.16
	d_{100}	8.38	6.68	8.38	6.22	6.04	5.98	5.42
	q_{pDNA}		1.3		1.4	1.5	1.7	
	d_{pDNA}		4.9		4.7	4.3	3.8	
2.5	q_{100}	0.76	0.94	0.75	1.01	1.04	1.05	1.15
	d_{100}	8.27	6.68	8.38	6.22	6.04	5.98	5.46
	q_{pDNA}		1.3		1.4	1.5	1.7	
	d_{pDNA}		4.9		4.7	4.3	3.8	
3.0	q_{100}	0.75	0.94	0.75	1.01	1.04	1.05	1.15
	d_{100}	8.38	6.68	8.38	6.22	6.04	5.98	5.46
	q_{pDNA}		1.3		1.4	1.5	1.7	
	d_{pDNA}		4.9		4.7	4.3	3.8	
5.0	q_{100}	0.73	0.94	0.73	1.01	1.04	1.06	1.16
	d_{100}	8.61	6.68	8.61	6.22	6.04	5.93	5.42
	q_{pDNA}		1.3		1.4	1.5	1.7	
	d_{pDNA}		4.9		4.7	4.3	3.8	

Tabla A2. $(C_{16}Am)_2(C_2O)_2/DOPE-pDNA$								
ρ_{eff}		α						
		0.2		0.4	0.5	0.7		
		L_α <i>rica en DOPE</i>	L_α principal	L_α principal	L_α principal	L_α principal	L_α <i>rica en GCL</i>	
1.5	q_{100}	0.74	0.93	1.01	1.05	1.11	1.16	
	d_{100}	8.49	6.76	6.22	5.98	5.66	5.42	
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.5	1.7		
	d_{pDNA}		4.8	4.5	4.0	3.7		
2.0	q_{100}	0.73	0.94	1.02	1.05	1.11	1.16	
	d_{100}	8.61	6.68	6.16	5.98	5.66	5.42	
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.6	1.7		
	d_{pDNA}		4.7	4.5	4.0	3.7		
2.5	q_{100}	0.74	0.94	1.01	1.05	1.09	1.16	
	d_{100}	8.49	6.68	6.22	5.98	5.76	5.42	
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.6	1.7		
	d_{pDNA}		4.7	4.5	4.0	3.7		
3.0	q_{100}	0.72	0.94	1	1.06	1.11	1.16	
	d_{100}	8.73	6.68	6.28	5.93	5.66	5.42	
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.6	1.7		
	d_{pDNA}		4.7	4.5	4.0	3.7		
5.0	q_{100}	0.72	0.94	1.01	1.06	1.1	1.16	
	d_{100}	8.73	6.68	6.22	5.93	5.71	5.42	
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.6	1.7		
	d_{pDNA}		4.7	4.5	4.0	3.7		

Tabla A3 y A4. Valores de q_{100} , d_{100} , q_{pDNA} y d_{pDNA} de las diferentes fases lamelares encontradas para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ (Tabla A3) y $(C_{16}Im)_2(C_2O)/DOPE-pDNA$ (Tabla A4) a diferentes composiciones de GCL (α) en la mezcla de lípidos y a diferentes relaciones de carga efectiva (ρ_{eff}).

ρ_{eff}		α					
		0.2		0.4	0.5		0.7
		L_α <i>rica en DOPE</i>	L_α principal	L_α principal	L_α principal	L_α principal	L_α <i>rica en GCL</i>
1.5	q_{100}	0.86	0.94	1.01	1.04	1.06	1.16
	d_{100}	7.31	6.71	6.25	6.06	5.94	5.42
	q_{pDNA}		1.3	1.3	1.4	1.7	
	d_{pDNA}		4.9	4.7	4.4	3.7	
2.0	q_{100}	0.85	0.94	1.01	1.03	1.05	1.16
	d_{100}	7.37	6.71	6.24	6.08	5.97	5.42
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.4	1.7	
	d_{pDNA}		4.9	4.7	4.4	3.7	
2.5	q_{100}	0.87	0.93	1.01	1.04	1.05	1.16
	d_{100}	7.25	6.74	6.23	6.03	6.00	5.42
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.4	1.7	
	d_{pDNA}		4.9	4.7	4.4	3.7	
3.0	q_{100}	0.87	0.93	1.01	1.04	1.05	1.16
	d_{100}	7.24	6.74	6.22	6.03	6.00	5.42
	q_{pDNA}		1.3	1.3	1.4	1.7	
	d_{pDNA}		4.9	4.7	4.4	3.7	
5.0	q_{100}	0.86	0.94	1.01	1.04	1.05	1.16
	d_{100}	7.31	6.71	6.21	6.03	6.00	5.42
	q_{pDNA}		1.3	1.3	1.4	1.7	
	d_{pDNA}		4.9	4.7	4.4	3.7	

ρ_{eff}		α				
		0.2		0.4	0.5	0.7
		L_α <i>rica en DOPE</i>	L_α principal	L_α principal	L_α principal	L_α principal
1.5	q_{100}	0.79	0.92	0.96	0.96	0.95
	d_{100}	7.95	6.83	6.54	6.54	6.61
	q_{pDNA}		1.3	1.3	1.4	1.4
	d_{pDNA}		4.8	4.7	4.6	4.6
2	q_{100}	0.79	0.92	0.97	0.97	0.95
	d_{100}	7.95	6.83	6.48	6.48	6.61
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.4	1.4
	d_{pDNA}		4.7	4.7	4.6	4.5
2.5	q_{100}	0.79	0.92	0.97	0.96	0.95
	d_{100}	7.95	6.83	6.48	6.54	6.61
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.4	1.4
	d_{pDNA}		4.8	4.7	4.6	4.6
3	q_{100}	0.8	0.92	0.97	0.97	0.95
	d_{100}	7.85	6.83	6.48	6.48	6.61
	q_{pDNA}		1.3	1.4	1.4	1.4
	d_{pDNA}		4.7	4.7	4.6	4.6

Anexo 2

Tabla A5 y A6. Valores de q_{100} , d_{100} , q_{pDNA} y d_{pDNA} de las diferentes fases lamelares encontradas para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_2/DOPE-pDNA$ (Tabla A5) y $(C_{16}Im)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ (Tabla A6) a diferentes composiciones de GCL (α) en la mezcla de lípidos y a diferentes relaciones de carga efectiva (ρ_{eff}).

Tabla A5. $(C_{16}Im)_2(C_2O)_2/DOPE-pDNA$						
ρ_{eff}		α				
		0.2		0.4	0.5	0.7
		L_{α} rica en DOPE	L_{α} principal	L_{α} principal	L_{α} principal	L_{α} principal
1.5	q_{100}	0.7	0.93	0.99	1.03	1.08
	d_{100}	8.98	6.76	6.35	6.10	5.82
	q_{pDNA}		1.2	1.3	1.4	1.6
	d_{pDNA}		5.2	4.8	4.6	4.1
2	q_{100}	0.69	0.93	1	1.03	1.09
	d_{100}	9.11	6.76	6.28	6.10	5.76
	q_{pDNA}		1.2	1.3	1.4	1.6
	d_{pDNA}		5.3	4.8	4.6	4.1
2.5	q_{100}	0.69	0.94	0.99	1.03	1.09
	d_{100}	9.11	6.68	6.35	6.10	5.76
	q_{pDNA}		1.2	1.3	1.4	1.6
	d_{pDNA}		5.2	4.8	4.6	4.0
3	q_{100}	0.67	0.94	1	1.02	1.09
	d_{100}	9.38	6.68	6.28	6.16	5.76
	q_{pDNA}			1.3	1.4	1.6
	d_{pDNA}			4.8	4.6	4.0

Tabla A6. $(C_{16}Im)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$						
ρ_{eff}		α				
		0.2		0.4	0.5	0.7
		L_{α} rica en DOPE	L_{α} principal	L_{α} principal	L_{α} principal	L_{α} principal
1.5	q_{100}	0.78	0.92	0.96	0.96	0.96
	d_{100}	8.06	6.83	6.54	6.54	6.54
	q_{pDNA}		1.1	1.3	1.3	1.5
	d_{pDNA}		5.6	4.8	4.7	4.3
2	q_{100}	0.78	0.92	0.96	0.96	0.97
	d_{100}	8.06	6.83	6.54	6.54	6.48
	q_{pDNA}		1.1	1.3	1.3	1.5
	d_{pDNA}		5.7	4.8	4.7	4.3
2.5	q_{100}	0.8	0.93	0.96	0.97	0.97
	d_{100}	7.85	6.76	6.54	6.48	6.48
	q_{pDNA}		1.1	1.3	1.4	1.5
	d_{pDNA}		5.6	4.8	4.7	4.3
3	q_{100}	0.78	0.92	0.97	0.96	0.97
	d_{100}	8.06	6.83	6.48	6.54	6.48
	q_{pDNA}		1.1	1.3	1.3	1.5
	d_{pDNA}		5.6	4.8	4.7	4.3

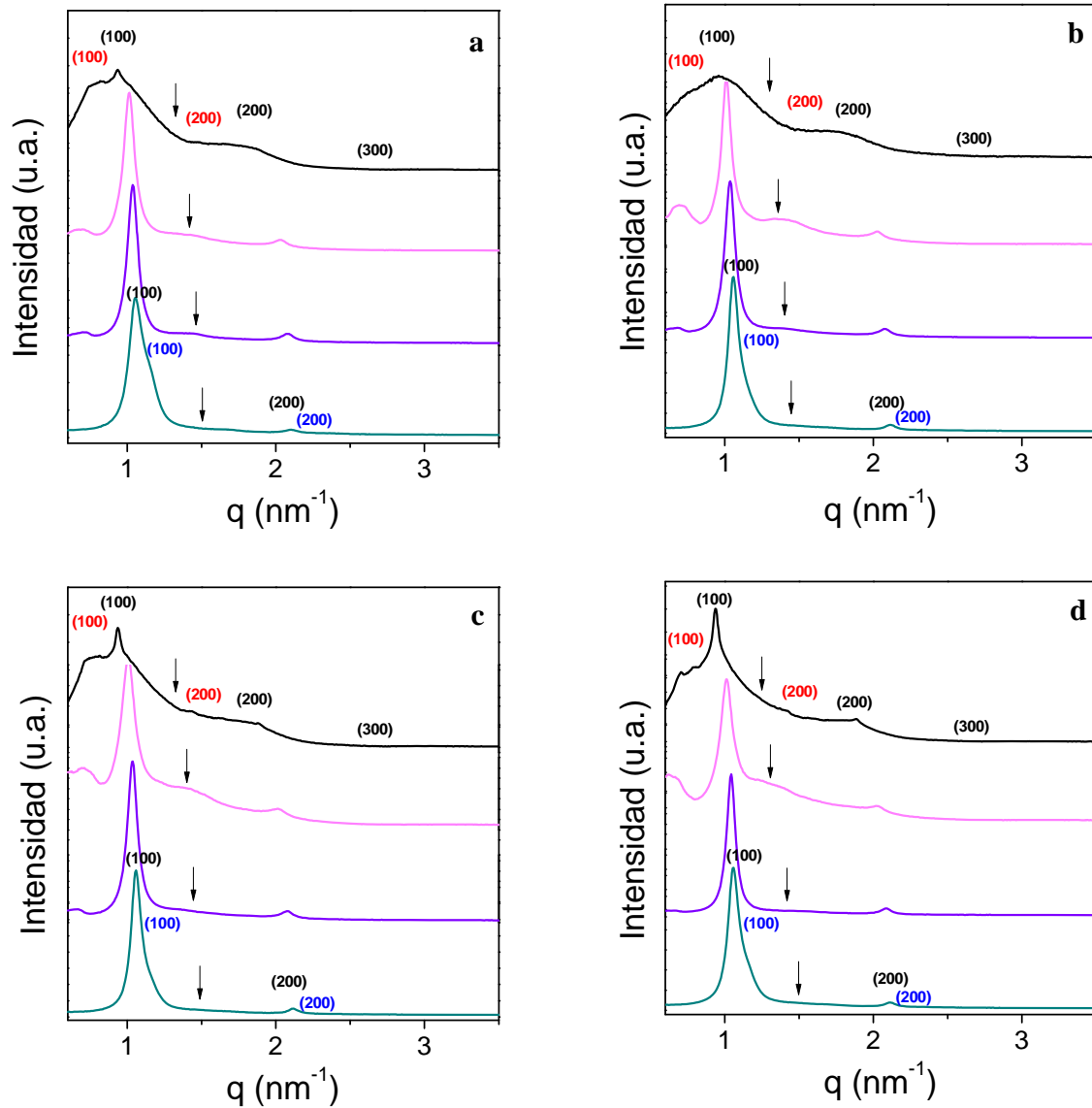


Figura A2. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)/DOPE-pDNA$ a diferentes α y relación de carga: a) $\rho_{eff} = 2.0$; b) $\rho_{eff} = 2.5$; c) $\rho_{eff} = 3.0$ y d) $\rho_{eff} = 5.0$. Línea negra corresponde a $\alpha = 0.2$; rosa a $\alpha = 0.4$; morada $\alpha = 0.5$ y verde $\alpha = 0.7$. Índices de miller (hkl) corresponden a las diferentes estructuras lamelares: rojos (L_{α} , DOPE rich); negros (L_{α} , main) y azul (L_{α} , GCL rich). Las flechas indican la posición del máximo de difracción correspondiente a la correlación pDNA-pDNA.

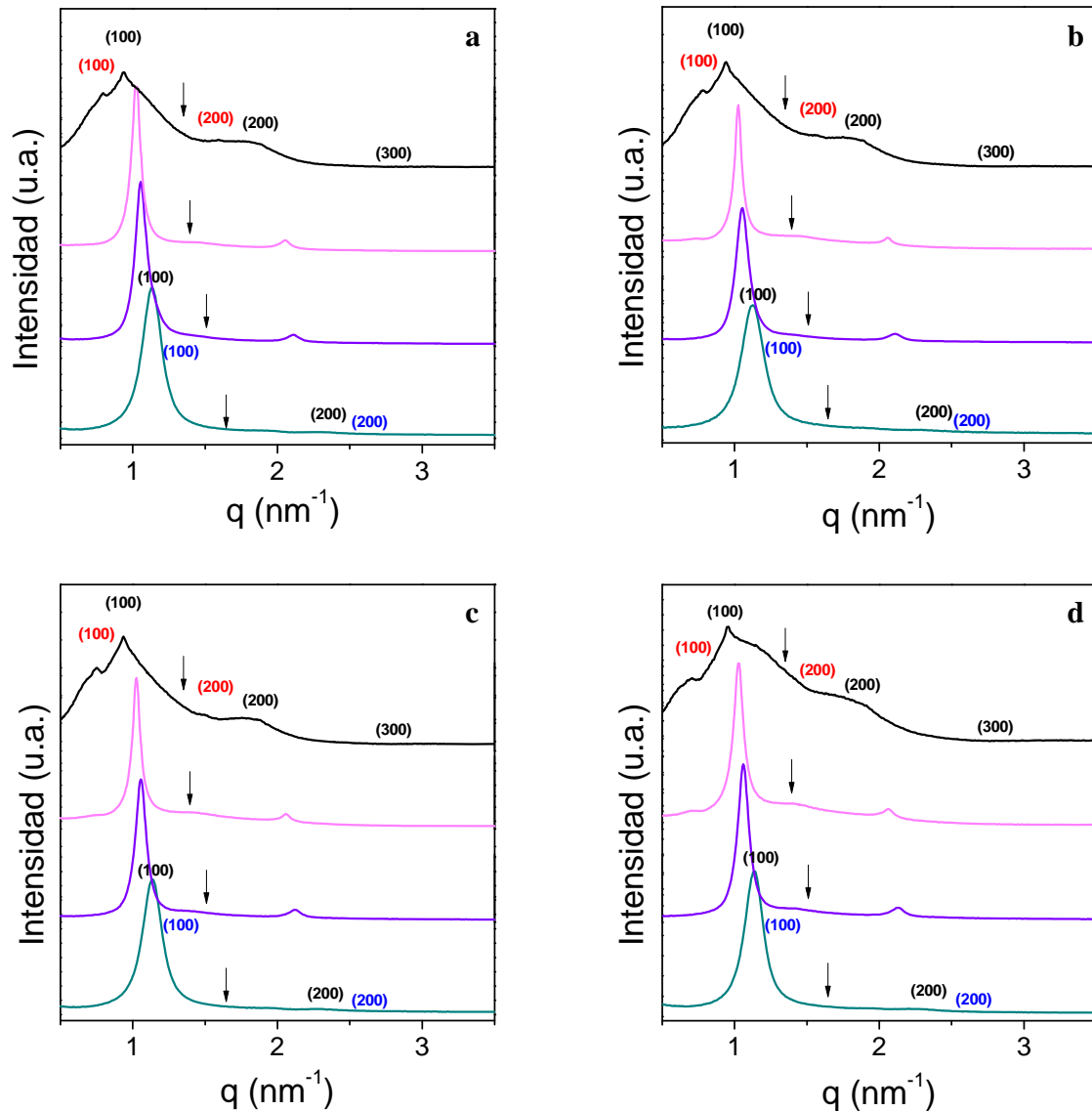


Figura A3. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_2/DOPE$ -pDNA a diferentes α y relación de carga: a) $\rho_{\text{eff}} = 2.0$; b) $\rho_{\text{eff}} = 2.5$; c) $\rho_{\text{eff}} = 3.0$ y d) $\rho_{\text{eff}} = 5.0$. Línea negra corresponde a $\alpha = 0.2$; rosa a $\alpha = 0.4$; morada $\alpha = 0.5$ y verde $\alpha = 0.7$. Índices de miller (hkl) corresponden a las diferentes estructuras lamelares: rojos ($L_{\alpha, \text{DOPE rich}}$); negros ($L_{\alpha, \text{main}}$) y azul ($L_{\alpha, \text{GCL rich}}$). Las flechas indican la posición del máximo de difracción correspondiente a la correlación pDNA-pDNA.

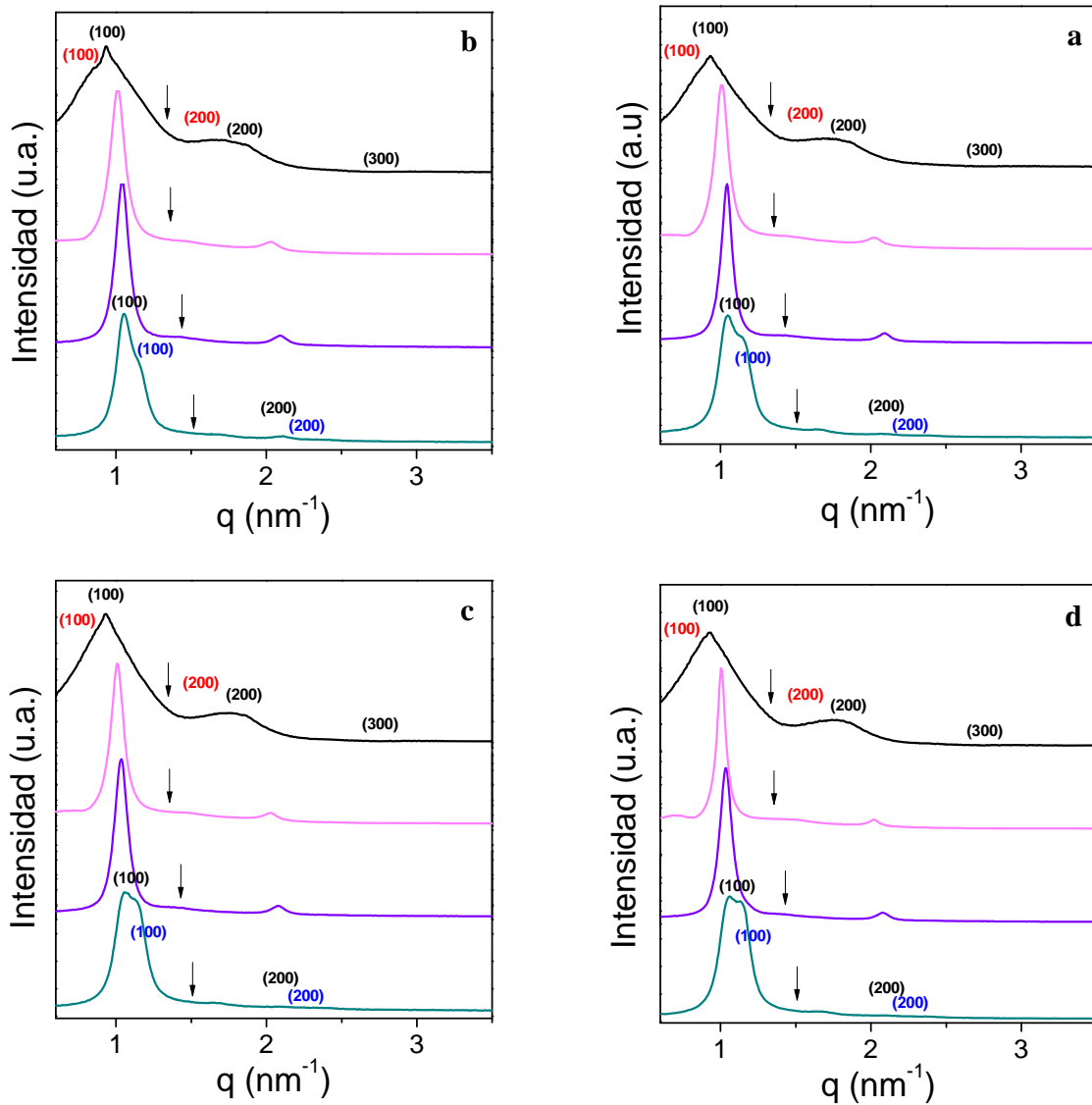


Figura A4. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE$ -pDNA a diferentes α y relación de carga: a) $\rho_{eff} = 2.0$; b) $\rho_{eff} = 2.5$; c) $\rho_{eff} = 3.0$ y d) $\rho_{eff} = 5.0$. Línea negra corresponde a $\alpha = 0.2$; rosa a $\alpha = 0.4$; morada $\alpha = 0.5$ y verde $\alpha = 0.7$. Índices de miller (hkl) corresponden a las diferentes estructuras lamelares: rojos (L_{α} , DOPE rich); negros ($L_{\alpha, main}$) y azul ($L_{\alpha, GCL rich}$). Las flechas indican la posición del máximo de difracción correspondiente a la correlación pDNA-pDNA.

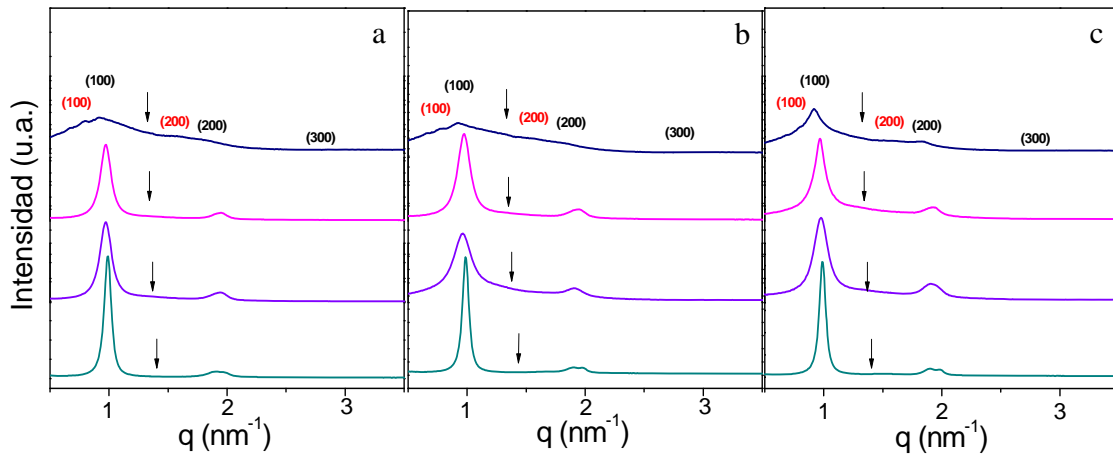


Figura A5. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)/DOPE-pDNA$ a diferentes α y relación de carga: a) $\rho_{eff} = 2.0$; b) $\rho_{eff} = 2.5$; c) $\rho_{eff} = 3.0$ y d) $\rho_{eff} = 5.0$. Línea negra corresponde a $\alpha = 0.2$; rosa a $\alpha = 0.4$; morada $\alpha = 0.5$ y verde $\alpha = 0.7$. Índices de miller (hkl) corresponden a las diferentes estructuras lamelares: rojos ($L_{\alpha, DOPE\ rich}$) y negros ($L_{\alpha, main}$). Las flechas indican la posición del máximo de difracción correspondiente a la correlación pDNA-pDNA.

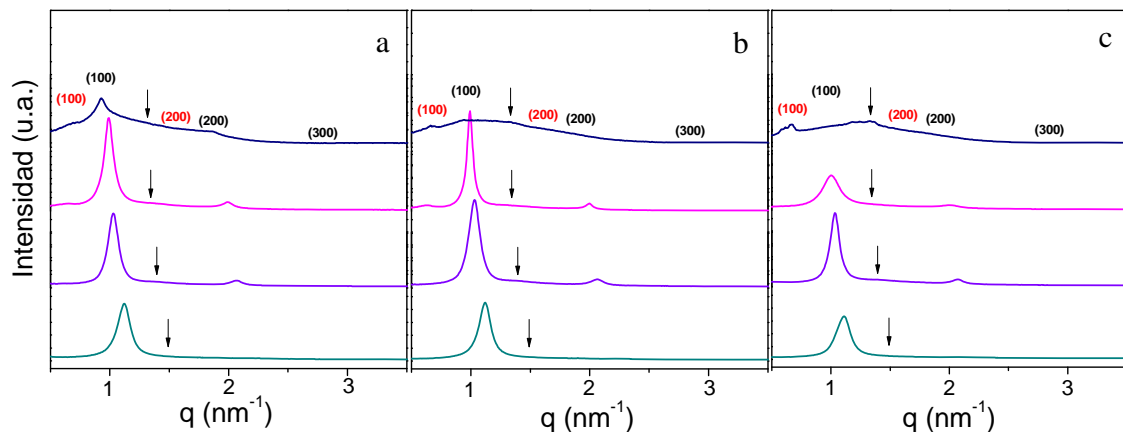


Figura A6. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_2/DOPE-pDNA$ a diferentes α y relación de carga: a) $\rho_{eff} = 2.0$; b) $\rho_{eff} = 2.5$; c) $\rho_{eff} = 3.0$ y d) $\rho_{eff} = 5.0$. Línea negra corresponde a $\alpha = 0.2$; rosa a $\alpha = 0.4$; morada $\alpha = 0.5$ y verde $\alpha = 0.7$. Índices de miller (hkl) corresponden a las diferentes estructuras lamelares: rojos ($L_{\alpha, DOPE\ rich}$) y negros ($L_{\alpha, main}$). Las flechas indican la posición del máximo de difracción correspondiente a la correlación pDNA-pDNA.

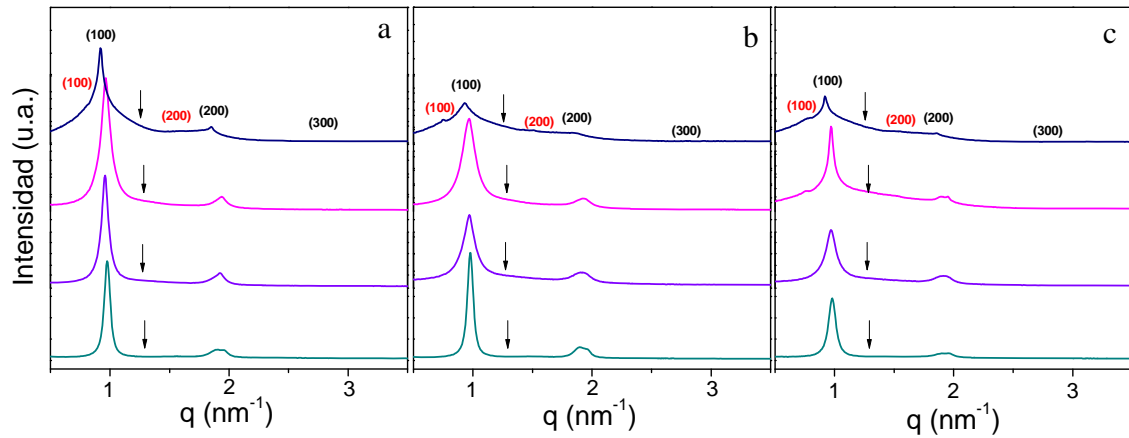


Figura A7. Difractogramas de SAXS para los lipoplejos $(C_{16}Im)_2(C_2O)_3/DOPE-pDNA$ a diferentes α y relación de carga: a) $\rho_{eff} = 2.0$; b) $\rho_{eff} = 2.5$; c) $\rho_{eff} = 3.0$ y d) $\rho_{eff} = 5.0$. Línea negra corresponde a $\alpha = 0.2$; rosa a $\alpha = 0.4$; morada $\alpha = 0.5$ y verde $\alpha = 0.7$. Índices de miller (hkl) corresponden a las diferentes estructuras lamelares: rojos ($L_{\alpha, DOPE\ rich}$) y negros ($L_{\alpha, main}$). Las flechas indican la posición del máximo de difracción correspondiente a la correlación pDNA-pDNA.

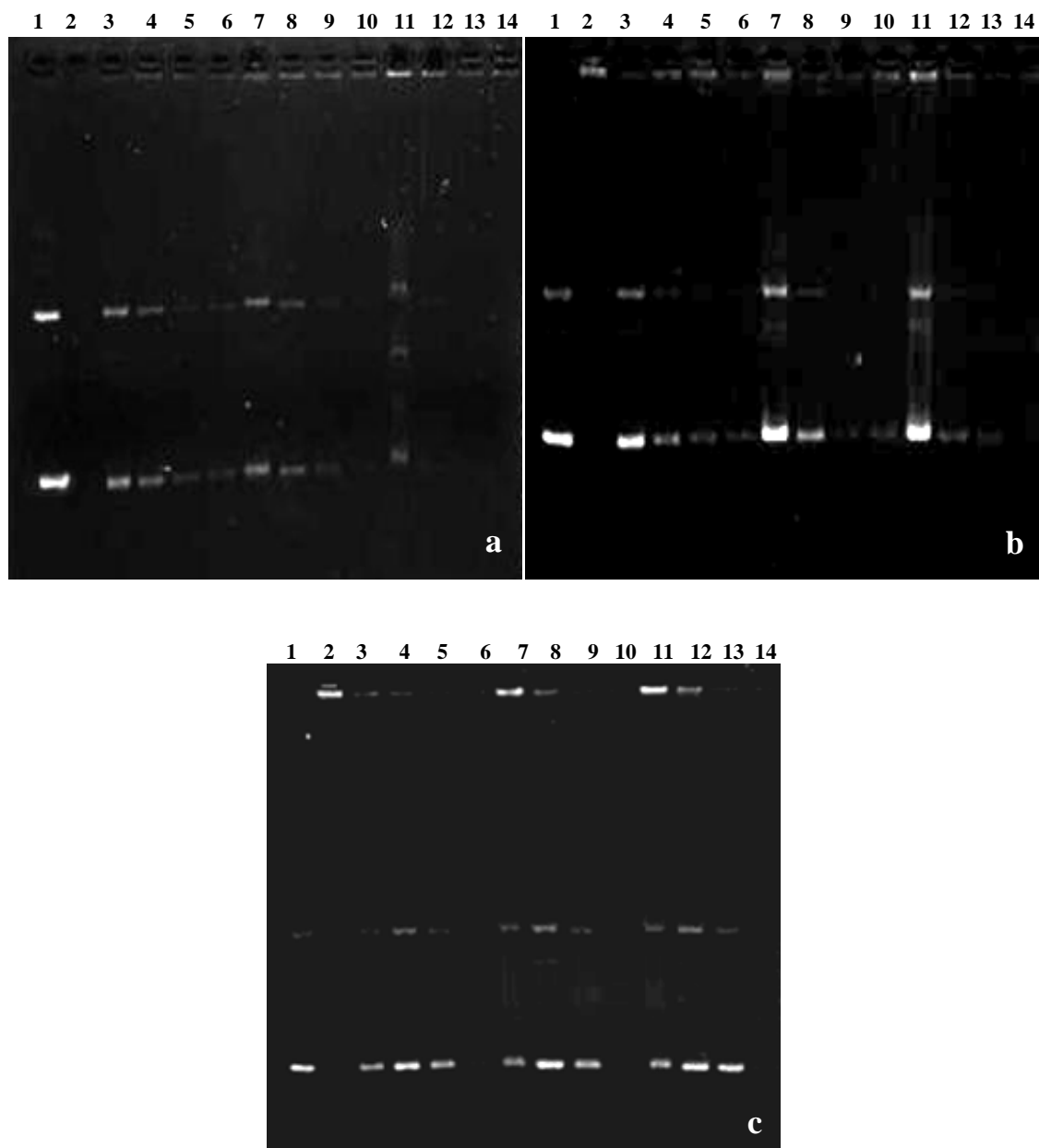


Figura A8. Resultados de gel electroforesis para los lipoplejos (a) DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA a $\alpha = 0.20$; (b) DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA a $\alpha = 0.25$ y (c) DOPG/DOPE- Ca^{2+} -pDNA lipoplexes at $\alpha = 0.50$. Línea 1: pDNA. Línea 2: lipoplejos CL/DOPE. Líneas 3-6: relación molar de carga AL/pDNA 10; Líneas 7-10: relación molar de carga AL/pDNA 15; Líneas 11-14: relación molar de carga AL/pDNA 20 en presencia de diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$: 10 mM (línea 3, 7 y 11), 25 mM (línea 4, 8 y 12), 50 mM (línea 5, 9 y 13), y 100 mM (línea 6, 10 y 14).

Tabla A7. Composición de la corona de proteínas asociada al liposoma mixto DC-Chol/DOPE incubado con suero humano (HP) a diferentes tiempos: 1, 30 y 60 min. Identificación realizada por nanoLC-MS/MS.

Proteínas identificadas	Número de acceso	RPA		
		1 min	30 min	60 min
1 Apolipoprotein B-100 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOB PE=1 SV=2	APOB_HUMAN	1.25	1.21	1.61
2 Complement C3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C3 PE=1 SV=2	CO3_HUMAN	2.27	1.77	2.30
3 Serum albumin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ALB PE=1 SV=2	ALBU_HUMAN	4.61	6.19	5.55
4 Myosin-9 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=MYH9 PE=1 SV=4	MYH9_HUMAN	0.75	0.76	1.04
5 Complement C4-B OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C4B PE=1 SV=1	CO4B_HUMAN	0.91	0.72	0.56
6 Talin-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TLN1 PE=1 SV=3	TLN1_HUMAN	0.53	0.50	0.62
7 Keratin, type II cytoskeletal 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=KRT1 PE=1 SV=6	K2C1_HUMAN	1.42	1.86	2.56
8 Apolipoprotein A-I OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOA1 PE=1 SV=1	APOA1_HUMAN	3.08	3.35	4.09
9 Fibrinogen alpha chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=FGA PE=1 SV=2	FIBA_HUMAN	0.89	1.11	1.12
10 Vitronectin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=VTN PE=1 SV=1	VTNC_HUMAN	2.60	1.55	1.79
11 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ITIH2 PE=1 SV=2	ITIH2_HUMAN	1.57	0.57	0.72
12 Fibrinogen beta chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=FGB PE=1 SV=2	FIBB_HUMAN	1.88	1.89	1.58
13 Filamin-A OS = <i>Homo sapiens</i> GN=FLNA PE=1 SV=4	FLNA_HUMAN	0.32	0.39	0.42
14 Alpha-2-macroglobulin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=A2M PE=1 SV=3	A2MG_HUMAN	0.61	0.63	0.59
15 Actin, cytoplasmic 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ACTB PE=1 SV=1	ACTB_HUMAN	2.20	2.12	2.50
16 C4b-binding protein alpha chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C4BPA PE=1 SV=2	C4BPA_HUMAN	2.14	0.92	1.02
17 Fibrinogen gamma chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=FGG PE=1 SV=3	FIBG_HUMAN	1.49	1.62	1.94
18 Keratin, type I cytoskeletal 9 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=KRT9 PE=1 SV=3	K1C9_HUMAN	1.05	1.34	1.69
19 Serotransferrin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TF PE=1 SV=3	TRFE_HUMAN	0.77	1.35	0.97
20 Apolipoprotein E OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOE PE=1 SV=1	APOE_HUMAN	1.95	2.20	2.69
21 Complement C5 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C5 PE=1 SV=4	CO5_HUMAN	0.36	0.42	0.41
22 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ITIH1 PE=1 SV=3	ITIH1_HUMAN	1.09	0.41	0.69
23 Keratin, type I cytoskeletal 10 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=KRT10 PE=1 SV=6	K1C10_HUMAN	0.77	0.94	2.08
24 Alpha-1-antitrypsin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	A1AT_HUMAN	1.22	1.55	1.33
25 Apolipoprotein(a) OS = <i>Homo sapiens</i> GN=LPA PE=1 SV=1	APOA_HUMAN	0.14	0.12	0.15
26 Apolipoprotein D OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOD PE=1 SV=1	APOD_HUMAN	2.77	2.16	2.73
27 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS = <i>Homo sapiens</i> GN=KRT2 PE=1 SV=2	K22E_HUMAN	0.71	1.04	1.59
28 Clusterin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CLU PE=1 SV=1	CLUS_HUMAN	0.93	0.89	1.18
29 Vitamin K-dependent protein S OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PROS1 PE=1 SV=1	PROS_HUMAN	1.26	0.42	0.38
30 Apolipoprotein A-IV OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOA4 PE=1 SV=3	APOA4_HUMAN	0.98	1.13	1.24

Anexo 2

Tabla A7 (continuación). Composición de la corona de proteínas asociada al liposoma mixto DC-Chol/DOPE incubado con suero humano (HP) a diferentes tiempos: 1, 30 y 60 min. Identificación realizada por nanoLC-MS/MS.

Proteínas identificadas	Número de acceso	RPA		
		1 min	30 min	60 min
31 Prothrombin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=F2 PE=1 SV=2	THRB_HUMAN	1.22	0.42	0.68
32 Ig mu chain C region OS = <i>Homo sapiens</i> GN=IGHM PE=1 SV=3	IGHM_HUMAN	1.11	0.91	0.72
33 Thrombospondin-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=THBS1 PE=1 SV=2	TSP1_HUMAN	0.38	0.31	0.38
34 Ig gamma-1 chain C region OS = <i>Homo sapiens</i> GN=IGHG1 PE=1 SV=1	IGHG1_HUMAN	1.48	1.62	1.86
35 Vinculin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=VCL PE=1 SV=4	VINC_HUMAN	0.40	0.28	0.37
36 Integrin alpha-IIb OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ITGA2B PE=1 SV=3	ITA2B_HUMAN	0.41	0.32	0.54
37 Ig gamma-2 chain C region OS = <i>Homo sapiens</i> GN=IGHG2 PE=1 SV=2	IGHG2_HUMAN	0.64	1.22	0.76
38 Complement component C9 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C9 PE=1 SV=2	CO9_HUMAN	0.67	0.50	0.61
39 Gelsolin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=GSN PE=1 SV=1	GELS_HUMAN	0.36	0.48	0.30
40 Hemoglobin subunit beta OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HBB PE=1 SV=2	HBB_HUMAN	2.26	1.73	2.81
41 Hemoglobin subunit alpha OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HBA1 PE=1 SV=2	HBA_HUMAN	2.01	1.89	1.73
42 Ig kappa chain C region OS = <i>Homo sapiens</i> GN=IGKC PE=1 SV=1	IGKC_HUMAN	2.43	2.75	2.39
43 Ceruloplasmin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CP PE=1 SV=1	CERU_HUMAN	0.20	0.35	0.15
44 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ITIH4 PE=1 SV=4	ITIH4_HUMAN	0.20	0.34	0.15
45 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ITIH3 PE=1 SV=2	ITIH3_HUMAN	0.61	0.11	0.11
46 Apolipoprotein C-III OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOC3 PE=1 SV=1	APOC3_HUMAN	2.10	2.37	3.10
47 Fermitin family homolog 3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=FERMT3 PE=1 SV=1	URP2_HUMAN	0.34	0.35	0.27
48 Haptoglobin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HP PE=1 SV=1	HPT_HUMAN	0.36	0.70	0.33
49 Ig alpha-1 chain C region OS = <i>Homo sapiens</i> GN=IGHA1 PE=1 SV=2	IGHA1_HUMAN	0.74	0.59	0.47
50 Integrin beta-3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ITGB3 PE=1 SV=2	ITB3_HUMAN	0.27	0.20	0.31
51 Lipopolysaccharide-binding protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=LBP PE=1 SV=3	LBP_HUMAN	0.36	0.38	0.39
52 Tubulin beta chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TUBB PE=1 SV=2	TBB5_HUMAN	0.60	0.41	0.35
53 Apolipoprotein C-II OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOC2 PE=1 SV=1	APOC2_HUMAN	2.37	1.33	2.85
54 Apolipoprotein A-II OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOA2 PE=1 SV=1	APOA2_HUMAN	1.55	1.12	2.97
55 Myosin light polypeptide 6 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=MYL6 PE=1 SV=2	MYL6_HUMAN	1.71	1.22	1.12
56 Alpha-actinin-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ACTN1 PE=1 SV=2	ACTN1_HUMAN	0.10	0.23	0.24
57 Complement component C6 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C6 PE=1 SV=3	CO6_HUMAN	0.19	0.16	0.18
58 Tubulin alpha-1B chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TUBA1B PE=1 SV=1	TBA1B_HUMAN (+1)	0.56	0.25	0.38
59 Ig lambda-2 chain C regions OS = <i>Homo sapiens</i> GN=IGLC2 PE=1 SV=1	LAC2_HUMAN	2.92	2.65	2.23
60 Apolipoprotein C-I OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOC1 PE=1 SV=1	APOC1_HUMAN	0.33	1.62	2.73

Tabla A7. Composición de la corona de proteínas asociada al liposoma mixto DC-Chol/DOPE incubado con human plasma a diferentes tiempos 1, 30 y 60 min. Identificación realizada por nanoLC-MS/MS.

Proteínas identificadas	Número de acceso	RPA		
		1 min	30 min	60 min
61 Vitamin D-binding protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=GC PE=1 SV=1	VTDB_HUMAN	0.32	0.38	0.23
62 14-3-3 protein zeta/delta OS = <i>Homo sapiens</i> GN=YWHAZ PE=1 SV=1	1433Z_HUMAN	0.43	0.58	0.39
63 Alpha-1-antichymotrypsin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	AACT_HUMAN	0.36	0.32	0.34
64 Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=IGLL5 PE=2 SV=2	IGLL5_HUMAN	0.52	0.87	0.30
65 Complement component C8 gamma chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C8G PE=1 SV=3	CO8G_HUMAN	0.96	0.66	0.56
66 Erythrocyte band 7 integral membrane protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=STOM PE=1 SV=3	STOM_HUMAN	0.41	0.41	0.60
67 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=GAPDH PE=1 SV=3	G3P_HUMAN	0.53	0.38	0.42
68 Profilin-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PFN1 PE=1 SV=2	PROF1_HUMAN	0.94	1.08	0.55
69 Apolipoprotein L1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOL1 PE=1 SV=5	APOL1_HUMAN	0.34	0.26	0.37
70 Angiotensinogen OS = <i>Homo sapiens</i> GN=AGT PE=1 SV=1	ANGT_HUMAN	0.34	0.26	0.33
71 Integrin-linked protein kinase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ILK PE=1 SV=2	ILK_HUMAN	0.37	0.21	0.27
72 ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ATP5B PE=1 SV=3	ATPB_HUMAN	0.26	0.26	0.29
73 Tropomyosin alpha-4 chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TPM4 PE=1 SV=3	TPM4_HUMAN	0.31	0.58	0.52
74 Cofilin-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CFL1 PE=1 SV=3	COF1_HUMAN	0.90	0.73	0.86
75 Pleckstrin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PLEK PE=1 SV=3	PLEK_HUMAN	0.25	0.29	0.14
76 Multimerin-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=MMRN1 PE=1 SV=3	MMRN1_HUMAN	0.09	0.12	0.04
77 Coagulation factor XIII A chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=F13A1 PE=1 SV=4	F13A_HUMAN	0.17	0.15	0.20
78 Complement component C7 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C7 PE=1 SV=2	CO7_HUMAN	0.13	0.17	0.14
79 Complement factor H OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CFH PE=1 SV=4	CFAH_HUMAN	0.07	0.14	0.05
80 Actin, alpha cardiac muscle 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ACTC1 PE=1 SV=1	(+1)	1.53	1.54	1.04
81 Protein AMBP OS = <i>Homo sapiens</i> GN=AMBP PE=1 SV=1	AMBP_HUMAN	0.59	0.22	0.28
82 Beta-parvin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PARVB PE=1 SV=1	PARVB_HUMAN	0.26	0.22	0.45
83 Hyaluronan-binding protein 2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HABP2 PE=1 SV=1	HABP2_HUMAN	0.26	0.13	0.11
84 Serum amyloid A-4 protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SAA4 PE=1 SV=2	SAA4_HUMAN	1.21	0.87	0.36
85 Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PON1 PE=1 SV=3	PON1_HUMAN	0.38	0.17	0.34
86 Keratin, type II cytoskeletal 5 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=KRT5 PE=1 SV=3	K2C5_HUMAN	0.08	0.37	0.51
87 Serum amyloid A protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SAA1 PE=1 SV=2	SAA_HUMAN	1.00	0.77	1.07
88 Tubulin beta-1 chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TUBB1 PE=1 SV=1	TBB1_HUMAN	0.54	0.25	0.44
89 Band 3 anion transport protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SLC4A1 PE=1 SV=3	B3AT_HUMAN	0.16	0.12	0.11
90 Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=LCAT PE=1 SV=1	LCAT_HUMAN	0.32	0.18	0.30

Anexo 2

Tabla A7 (continuación). Composición de la corona de proteínas asociada al liposoma mixto DC-Chol/DOPE incubado con suero humano (HP) a diferentes tiempos: 1, 30 y 60 min. Identificación realizada por nanoLC-MS/MS.

Proteínas identificadas	Número de acceso	RPA		
		1 min	30 min	60 min
91 Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PKM2 PE=1 SV=4	KPYM_HUMAN	0.16	0.26	0.05
92 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PPIA PE=1 SV=2	PPIA_HUMAN	0.84	0.51	0.83
93 Heat shock cognate 71 kDa protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HSPA8 PE=1 SV=1	HSP7C_HUMAN	0.14	0.13	0.19
94 Hemopexin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HPX PE=1 SV=2	HEMO_HUMAN	0.15	0.25	0.10
95 Keratin, type I cytoskeletal 16 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=KRT16 PE=1 SV=4	K1C16_HUMAN	0.33	0.44	0.64
96 Histidine-rich glycoprotein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HRG PE=1 SV=1	HRG_HUMAN	0.15	0.20	0.14
97 Kininogen-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=KNG1 PE=1 SV=2	KNG1_HUMAN	0.14	0.16	0.08
98 Platelet glycoprotein Ib beta chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=GP1BB PE=1 SV=1	GP1BB_HUMAN	0.55	0.28	0.43
99 Alpha-enolase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ENO1 PE=1 SV=2	ENOA_HUMAN	0.28	0.20	0.20
100 Heparin cofactor 2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SERPIND1 PE=1 SV=3	HEP2_HUMAN	0.12	0.13	0.00
101 Complement component C8 beta chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C8B PE=1 SV=3	CO8B_HUMAN	0.16	0.07	0.10
102 Plasminogen OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PLG PE=1 SV=2	PLMN_HUMAN	0.13	0.09	0.09
103 Protein Z-dependent protease inhibitor OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SERPINA10 PE=1 SV=1	ZPI_HUMAN	0.39	0.12	0.05
104 Ig kappa chain V-III region HAH OS = <i>Homo sapiens</i> PE=2 SV=1	KV312_HUMAN (+1)	0.72	0.77	0.58
105 Complement factor B OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CFB PE=1 SV=2	CFAB_HUMAN	0.06	0.16	0.06
106 Ras-related protein Rap-1b OS = <i>Homo sapiens</i> GN=RAP1B PE=1 SV=1	RAP1B_HUMAN	0.57	0.37	0.58
107 Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ATP2A3 PE=1 SV=2	AT2A3_HUMAN	0.06	0.11	0.07
108 von Willebrand factor OS = <i>Homo sapiens</i> GN=VWF PE=1 SV=4	VWF_HUMAN	0.02	0.04	0.02
109 Ig heavy chain V-III region VH26 OS = <i>Homo sapiens</i> PE=1 SV=1	HV303_HUMAN	0.54	0.65	0.42
110 Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ORM1 PE=1 SV=1	A1AG1_HUMAN	0.21	0.42	0.17
111 Platelet basic protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PPBP PE=1 SV=3	CXCL7_HUMAN	0.79	0.33	0.29
112 Endoplasmin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	ENPL_HUMAN	0.13	0.07	0.00
113 Alpha-2-HS-glycoprotein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=AHSG PE=1 SV=1	FETUA_HUMAN ML12A_HUMAN	0.00	0.28	0.00
114 Myosin regulatory light chain 12A OS = <i>Homo sapiens</i> GN=MYL12A PE=1 SV=2	(+1)	0.30	0.46	0.68
115 Platelet glycoprotein IX OS = <i>Homo sapiens</i> GN=GP9 PE=1 SV=3	GPIX_HUMAN	0.48	0.28	0.00
116 Apolipoprotein F OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOF PE=1 SV=2	APOF_HUMAN	0.06	0.31	0.35
117 Transgelin-2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TAGLN2 PE=1 SV=3	TAGL2_HUMAN	0.50	0.14	0.56
118 Complement component C8 alpha chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C8A PE=1 SV=2	CO8A_HUMAN	0.06	0.17	0.15
119 Antithrombin-III OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	ANT3_HUMAN	0.04	0.22	0.10
120 Complement C1q subcomponent subunit C OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C1QC PE=1 SV=3	C1QC_HUMAN	0.23	0.30	0.10

Tabla A7 (continuación). Composición de la corona de proteínas asociada al liposoma mixto DC-Chol/DOPE incubado con suero humano (HP) a diferentes tiempos: 1, 30 y 60 min. Identificación realizada por nanoLC-MS/MS.

Proteínas identificadas	Número de acceso	RPA		
		1 min	30 min	60 min
121 Haptoglobin-related protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HPR PE=1 SV=2	HPTR_HUMAN	0.28	0.51	0.42
122 Alpha-1B-glycoprotein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=A1BG PE=1 SV=4	A1BG_HUMAN	0.04	0.18	0.13
123 Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial OS = <i>Homo sapiens</i> GN=IDH2 PE=1 SV=2	IDHP_HUMAN	0.00	0.15	0.11
124 Integrin beta-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ITGB1 PE=1 SV=2	ITB1_HUMAN	0.07	0.08	0.03
125 78 kDa glucose-regulated protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HSPA5 PE=1 SV=2	GRP78_HUMAN	0.07	0.15	0.00
126 ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ATP5A1 PE=1 SV=1	ATPA_HUMAN	0.12	0.10	0.11
127 Clathrin heavy chain 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CLTC PE=1 SV=5	CLH1_HUMAN	0.02	0.05	0.01
128 Transthyretin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TTR PE=1 SV=1	TTHY_HUMAN	0.00	0.82	0.00
129 Moesin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=MSN PE=1 SV=3	MOES_HUMAN	0.03	0.17	0.00
130 C4b-binding protein beta chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C4BPB PE=1 SV=1	C4BPB_HUMAN	0.43	0.00	0.00
131 Vitamin K-dependent protein Z OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PROZ PE=1 SV=2	PROZ_HUMAN	0.27	0.00	0.00
132 Ras suppressor protein 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=RSU1 PE=1 SV=3	RSU1_HUMAN	0.13	0.17	0.17
133 Platelet endothelial cell adhesion molecule OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PECAM1 PE=1 SV=1	PECA1_HUMAN	0.12	0.06	0.00
134 Fibronectin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=FN1 PE=1 SV=4	FINC_HUMAN	0.00	0.04	0.00
135 Glutathione peroxidase 3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=GPX3 PE=1 SV=2	GPX3_HUMAN	0.23	0.27	0.21
136 Coagulation factor IX OS = <i>Homo sapiens</i> GN=F9 PE=1 SV=2	FA9_HUMAN	0.12	0.09	0.05
137 Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SLC2A3 PE=1 SV=1	GTR3_HUMAN	0.07	0.11	0.05
138 Ras-related protein Rab-27B OS = <i>Homo sapiens</i> GN=RAB27B PE=1 SV=4	RB27B_HUMAN	0.00	0.28	0.11
139 Cholesteryl ester transfer protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CETP PE=1 SV=2	CETP_HUMAN	0.04	0.06	0.15
140 Apolipoprotein C-IV OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOC4 PE=1 SV=1	APOC4_HUMAN	0.27	0.36	0.36
141 Complement C1q subcomponent subunit B OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C1QB PE=1 SV=3	C1QB_HUMAN	0.22	0.23	0.00
142 Cartilage oligomeric matrix protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=COMP PE=1 SV=2	COMP_HUMAN	0.08	0.05	0.00
143 Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ORM2 PE=1 SV=2	A1AG2_HUMAN	0.17	0.32	0.00
144 Plasma protease C1 inhibitor OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SERPING1 PE=1 SV=2	IC1_HUMAN	0.00	0.17	0.00
145 Chloride intracellular channel protein 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CLIC1 PE=1 SV=4	CLIC1_HUMAN	0.19	0.06	0.00
146 Afamin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=AFM PE=1 SV=1	AFAM_HUMAN	0.09	0.08	0.00
147 WD repeat-containing protein 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=WDR1 PE=1 SV=4	WDR1_HUMAN	0.00	0.12	0.00
148 Dermcidin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=DCD PE=1 SV=2	DCD_HUMAN	0.00	0.14	0.25
149 Protein disulfide-isomerase A3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PDIA3 PE=1 SV=4	PDIA3_HUMAN	0.00	0.08	0.00
150 Ig kappa chain V-IV region B17 OS = <i>Homo sapiens</i> PE=2 SV=1	KV404_HUMAN	0.33	0.26	0.00

Anexo 2

Tabla A7 (continuación). Composición de la corona de proteínas asociada al liposoma mixto DC-Chol/DOPE incubado con suero humano (HP) a diferentes tiempos: 1, 30 y 60 min. Identificación realizada por nanoLC-MS/MS.

Proteínas identificadas	Número de acceso	RPA		
		1 min	30 min	60 min
151 L-lactate dehydrogenase B chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=LDHB PE=1 SV=2	LDHB_HUMAN	0.00	0.17	0.00
152 Keratin, type II cytoskeletal 6C OS = <i>Homo sapiens</i> GN=KRT6C PE=1 SV=3	K2C6C_HUMAN	0.00	0.36	0.00
153 Complement C1r subcomponent OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C1R PE=1 SV=2	C1R_HUMAN	0.06	0.07	0.00
HLA class I histocompatibility antigen, A-1 alpha chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HLA-A	1A01_HUMAN			
154 PE=1 SV=1	(+3)	0.00	0.15	0.00
155 Ig kappa chain V-I region AG OS = <i>Homo sapiens</i> PE=1 SV=1	KV101_HUMAN	0.50	0.13	0.00
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 OS = <i>Homo sapiens</i>	GNAI2_HUMAN			
156 GN=GNAI2 PE=1 SV=3		0.05	0.00	0.14
157 Tsukushin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TSKU PE=2 SV=3	TSK_HUMAN	0.11	0.08	0.00
158 Ig lambda chain V-III region LOI OS = <i>Homo sapiens</i> PE=1 SV=1	LV302_HUMAN	0.17	0.00	0.00
159 Tubulin alpha-4A chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TUBA4A PE=1 SV=1	TBA4A_HUMAN	0.36	0.00	0.14
160 Purine nucleoside phosphorylase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PNP PE=1 SV=2	PNPH_HUMAN	0.00	0.19	0.00
161 14-3-3 protein eta OS = <i>Homo sapiens</i> GN=YWHAH PE=1 SV=4	1433F_HUMAN	0.00	0.16	0.00
162 14-3-3 protein gamma OS = <i>Homo sapiens</i> GN=YWHAG PE=1 SV=2	1433G_HUMAN	0.00	0.19	0.00
163 Thromboxane-A synthase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TBXAS1 PE=1 SV=3	THAS_HUMAN	0.00	0.06	0.09
164 Sex hormone-binding globulin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SHBG PE=1 SV=2	SHBG_HUMAN	0.05	0.05	0.00
165 Thrombospondin-4 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=THBS4 PE=1 SV=2	TSP4_HUMAN	0.08	0.02	0.00
166 14-3-3 protein epsilon OS = <i>Homo sapiens</i> GN=YWHAE PE=1 SV=1	1433E_HUMAN	0.00	0.16	0.00
167 Retinol-binding protein 4 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=RBP4 PE=1 SV=3	RET4_HUMAN	0.00	0.30	0.00
168 Myosin regulatory light polypeptide 9 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=MYL9 PE=1 SV=4	MYL9_HUMAN	0.25	0.27	0.00
169 F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	CAZA1_HUMAN	0.12	0.00	0.00
170 Peroxiredoxin-1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PRDX1 PE=1 SV=1	PRDX1_HUMAN	0.00	0.24	0.00
171 Complement C1s subcomponent OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C1S PE=1 SV=1	C1S_HUMAN	0.03	0.02	0.00
172 Phosphoglycerate kinase 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PGK1 PE=1 SV=3	PGK1_HUMAN	0.00	0.10	0.00
173 Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment) OS = <i>Homo sapiens</i> PE=4 SV=1	KV205_HUMAN	0.00	0.41	0.21
174 Complement factor I OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CFI PE=1 SV=2	CFAI_HUMAN	0.06	0.02	0.00
175 Syntaxin-binding protein 2 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=STXB2 PE=1 SV=2	STXB2_HUMAN	0.00	0.05	0.00
176 Apolipoprotein M OS = <i>Homo sapiens</i> GN=APOM PE=1 SV=2	APOM_HUMAN	0.19	0.07	0.00
177 Integrin alpha-6 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ITGA6 PE=1 SV=4	ITA6_HUMAN	0.00	0.02	0.00
178 Vitamin K-dependent protein C OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PROC PE=1 SV=1	PROC_HUMAN	0.04	0.00	0.00
179 Prostaglandin G/H synthase 1 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PTGS1 PE=1 SV=2	PGH1_HUMAN	0.00	0.02	0.00
180 Ras-related protein Rab-6B OS = <i>Homo sapiens</i> GN=RAB6B PE=1 SV=1	RAB6B_HUMAN	0.00	0.17	0.00
181 C-reactive protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CRP PE=1 SV=1	CRP_HUMAN	0.28	0.00	0.00

Tabla A7 (continuación). Composición de la corona de proteínas asociada al liposoma mixto DC-Chol/DOPE incubado con suero humano (HP) a diferentes tiempos: 1, 30 y 60 min. Identificación realizada por nanoLC-MS/MS.

Proteínas identificadas	Número de acceso	RPA		
		1 min	30 min	60 min
182 Platelet glycoprotein Ib alpha chain OS = <i>Homo sapiens</i> GN=GP1BA PE=1 SV=1	GP1BA_HUMAN	0.00	0.02	0.00
183 Keratin, type I cytoskeletal 14 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=KRT14 PE=1 SV=4	K1C14_HUMAN	0.00	0.24	0.00
184 Coagulation factor V OS = <i>Homo sapiens</i> GN=F5 PE=1 SV=4	FA5_HUMAN	0.01	0.01	0.00
185 Hemoglobin subunit delta OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HBD PE=1 SV=2	HBD_HUMAN	0.00	1.30	0.00
186 Zinc-alpha-2-glycoprotein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=AZGP1 PE=1 SV=2	ZA2G_HUMAN	0.00	0.05	0.00
187 Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=VCP PE=1 SV=4	TERA_HUMAN	0.00	0.03	0.00
188 Heat shock protein HSP 90-beta OS = <i>Homo sapiens</i> GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	HS90B_HUMAN	0.00	0.02	0.00
189 Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PRDX3 PE=1 SV=3	PRDX3_HUMAN	0.00	0.05	0.00
190 Complement C1q subcomponent subunit A OS = <i>Homo sapiens</i> GN=C1QA PE=1 SV=2	C1QA_HUMAN	0.15	0.00	0.00
191 Calnexin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CANX PE=1 SV=2	CALX_HUMAN	0.00	0.07	0.00
192 Actin-related protein 2/3 complex subunit 3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ARPC3 PE=1 SV=3	ARPC3_HUMAN	0.29	0.00	0.00
193 ATP synthase subunit O, mitochondrial OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ATP5O PE=1 SV=1	ATPO_HUMAN	0.00	0.20	0.00
194 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PGLYRP2 PE=1 SV=1	PGRP2_HUMAN	0.00	0.02	0.00
195 Platelet factor 4 variant OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PF4V1 PE=1 SV=1	PF4V_HUMAN	0.00	0.13	0.00
196 Beta-Ala-His dipeptidase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CNDP1 PE=1 SV=4	CNDP1_HUMAN	0.00	0.03	0.00
197 Corticosteroid-binding globulin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SERPINA6 PE=1 SV=1	CBG_HUMAN	0.00	0.03	0.00
198 Coagulation factor XII OS = <i>Homo sapiens</i> GN=F12 PE=1 SV=3	FA12_HUMAN	0.00	0.02	0.00
199 Alpha-2-antiplasmin OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SERPINF2 PE=1 SV=3	A2AP_HUMAN	0.00	0.03	0.00
200 Protein S100-A9 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=S100A9 PE=1 SV=1	S10A9_HUMAN	0.00	0.12	0.00
201 Actin-related protein 3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ACTR3 PE=1 SV=3	ARP3_HUMAN	0.00	0.03	0.00
202 Protein disulfide-isomerase A6 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PDIA6 PE=1 SV=1	PDIA6_HUMAN	0.00	0.06	0.00
203 Calpain-1 catalytic subunit OS = <i>Homo sapiens</i> GN=CAPN1 PE=1 SV=1	CAN1_HUMAN	0.00	0.02	0.00
204 Endonuclease domain-containing 1 protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=ENDOD1 PE=1 SV=2	ENDD1_HUMAN	0.00	0.03	0.00
205 Ficolin-3 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=FCN3 PE=1 SV=2	FCN3_HUMAN	0.00	0.05	0.00
206 Ig lambda chain V-I region HA OS = <i>Homo sapiens</i> PE=1 SV=1	LV102_HUMAN	0.00	0.13	0.00
207 Pregnancy zone protein OS = <i>Homo sapiens</i> GN=PZP PE=1 SV=4	PZP_HUMAN	0.05	0.00	0.00
208 Syntaxin-11 OS = <i>Homo sapiens</i> GN=STX11 PE=2 SV=1	STX11_HUMAN	0.00	0.05	0.00
209 Triosephosphate isomerase OS = <i>Homo sapiens</i> GN=TP11 PE=1 SV=3	TPIS_HUMAN	0.00	0.05	0.00
210 Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D OS = <i>Homo sapiens</i> GN=GPLD1 PE=1 SV=3	PHLD_HUMAN	0.00	0.02	0.00
211 Selenoprotein P OS = <i>Homo sapiens</i> GN=SEPP1 PE=1 SV=3	SEPP1_HUMAN	0.00	0.04	0.00
Número total de proteínas		160	200	134

Anexo 2

Tabla A8. Valores de carga, Q, calculados para las principales proteínas encontradas en los liposomas DC-Chol/DOPE a los diferentes tiempos de incubación.

Proteína identificada	Carga pH = 7	Q		
		t = 1 min	t = 30 min	t = 60 min
Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	-5.6	-17.23	-18.73	-22.90
Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1	-0.1	-0.16	-0.11	-0.30
Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3	-12	-11.78	-13.52	-14.90
Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2	2.4	2.99	2.89	3.87
Apolipoprotein C-I OS=Homo sapiens GN=APOC1 PE=1 SV=1	0.9	0.30	1.46	2.45
Apolipoprotein C-II OS=Homo sapiens GN=APOC2 PE=1 SV=1	-4.1	-9.73	-5.44	-11.68
Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3 PE=1 SV=1	-1.8	-3.78	-4.27	-5.58
Apolipoprotein C-IV OS=Homo sapiens GN=APOC4 PE=1 SV=1	6.2	1.66	2.22	2.25
Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1	-4.7	-13.04	-10.14	-12.81
Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1	-3.6	-7.03	-7.91	-9.68
Apolipoprotein F OS=Homo sapiens GN=APOF PE=1 SV=2	-6.7	-0.38	-2.06	-2.35
Apolipoprotein L1 OS=Homo sapiens GN=APOL1 PE=1 SV=5	-5.6	-1.92	-1.47	-2.08
Apolipoprotein M OS=Homo sapiens GN=APOM PE=1 SV=2	-3.8	-0.73	-0.28	0.00
Apolipoprotein(a) OS=Homo sapiens GN=LPA PE=1 SV=1	-88.3	-12.21	-10.83	-13.45
	-126.8			
Complement C1q subcomponent subunit A OS=Homo sapiens GN=C1QA PE=1 SV=2	7.3	1.13	0.00	0.00
Complement C1q subcomponent subunit B OS=Homo sapiens GN=C1QB PE=1 SV=3	4.5	1.00	1.02	0.00
Complement C1q subcomponent subunit C OS=Homo sapiens GN=C1QC PE=1 SV=3	4.2	0.97	1.24	0.44
Complement C1r subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1R PE=1 SV=2	-9.25	-0.58	-0.62	0.00
Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1	-29.1	-0.76	-0.58	0.00
Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	-11.6	-26.35	-20.59	-26.63
Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=1	2.8	2.55	2.01	1.58
Complement C5 OS=Homo sapiens GN=C5 PE=1 SV=4	-9.8	-3.51	-4.16	-4.05
Complement component C6 OS=Homo sapiens GN=C6 PE=1 SV=3	-3.3	-0.63	-0.53	-0.60
Complement component C7 OS=Homo sapiens GN=C7 PE=1 SV=2	-6.6	-0.85	-1.13	-0.96
Complement component C8 alpha chain OS=Homo sapiens GN=C8A PE=1 SV=2	-3.7	-0.23	-0.61	-0.54
Complement component C8 beta chain OS=Homo sapiens GN=C8B PE=1 SV=3	12.5	2.06	0.86	1.27
Complement component C8 gamma chain OS=Homo sapiens GN=C8G PE=1 SV=3	3.1	2.97	2.06	1.73
Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2	-11.6	-7.77	-5.80	-7.03
Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2	0.6	0.04	0.10	0.04
Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH PE=1 SV=4	-7.7	-0.50	-1.06	-0.38
Complement factor I OS=Homo sapiens GN=CFI PE=1 SV=2	5.1	0.31	0.12	0.00
	-52.55			
Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2	-12.7	-11.28	-14.07	-14.21
Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FBG PE=1 SV=2	7.8	14.69	14.77	12.34
Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3	-11.5	-17.10	-18.69	-22.30
	-16.4			
Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	-2.6	-1.92	-1.52	-1.21
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	-1.2	-1.77	-1.95	-2.23
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	2.5	1.60	3.04	1.89
Ig heavy chain V-III region VH26 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	1.8	0.97	1.17	0.75
Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1	1.3	3.16	3.58	3.10
Ig kappa chain V-I region AG OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	-0.9	-0.45	-0.12	0.00
Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	0.1	0.00	0.04	0.02
Ig kappa chain V-III region HAH OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	0.9	0.65	0.69	0.53
Ig kappa chain V-IV region B17 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	-0.1	-0.03	-0.03	0.00
Ig lambda chain V-I region HA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	3.3	0.00	0.42	0.00
Ig lambda chain V-III region LOI OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	-3.6	-0.60	0.00	0.00
Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1	0.3	0.88	0.80	0.67
Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3	-1.2	-1.33	-1.09	-0.87
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=2	6.5	3.41	5.64	1.93
	7.1			
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	-14.2	-10.88	-13.31	-29.52
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	-13.2	0.00	-3.12	0.00
Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4	-14.4	-4.82	-6.29	-9.24
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	-14.2	-14.95	-19.00	-24.04
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	2.9	4.10	5.40	7.43
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	3.8	2.70	3.95	6.06
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	1.6	0.13	0.59	0.81
Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KRT6C PE=1 SV=3	3.1	0.00		
	-44.6			
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	-8.2			
Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1	-8.2			
	-8.2			
Q total		-136.03	-134.96	-190.37

Anexo 3

En este anexo se indexan los artículos científicos publicados a los que ha dado origen el trabajo presentado en esta tesis doctoral.

1. Ribbon-type and cluster-type lipoplexes constituted by a chiral lysine based cationic gemini lipid and plasmid DNA. Barran-Berdon, A. L.; Muñoz-Ubeda, M.; Aicart-Ramos, C.; Perez, L.; Infante, M. R.; Castro-Hartmann, P.; Martin-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E.; *Soft Matter* **2012**, *8*, 7368-7380. **Portada de revista**
2. Cationic gemini lipids containing polyoxyethylene spacers as improved transfecting agents of plasmid DNA in cancer cells. Barran-Berdon, A. L.; Misra, S. K.; Datta, S.; Munoz-Ubeda, M.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E.; *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 4640-4652.
3. A delocalizable cationic headgroup together with an oligo-oxyethylene spacer in gemini cationic lipids improves their biological activity as vectors of plasmid DNA. Kumar, K.; Barran-Berdon, A. L.; Datta, S.; Munoz-Ubeda, M.; Aicart-Ramos, C.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E.; *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3*, 1495-1506.
4. Ca²⁺-Mediated Anionic Lipid–Plasmid DNA Lipoplexes. Electrochemical, Structural, and Biochemical Studies. Barran-Berdon, A. L.; Yelamos, B.; Malfois, M.; Aicart, E.; Junquera, E.; *Langmuir* **2014**, *30*, 11704-11713.
5. Time evolution of nanoparticle–protein corona in human plasma: relevance for targeted drug delivery. Barran-Berdon, A. L.; Pozzi, D.; Caracciolo, G.; Capriotti, A. L.; Caruso, G.; Cavaliere, C.; Riccioli, A.; Palchetti, S.; Lagana, A. *Langmuir* **2013**, *29*, 6485-6494.
6. Calixarene Based Macrocyclic Lipidic Matrix Lipidic-Macrocyclic Scaffolds for NonViral Lipofection: A Multidisciplinary Study. Barran-Berdon, A. L.; García-Rio, L.; Aicart, E.; Junquera, E. **Enviado**

Soft Matter

www.rsc.org/softmatter

Volume 8 | Number 28 | 28 July 2012 | Pages 7368–7380



ISSN 1744-683X

RSC Publishing

PAPER

Elena Junquera

Ribbon-type and cluster-type lipoplexes constituted by a chiral lysine based cationic gemini lipid and plasmid DNA



1744-683X(2012)8:28;1-6

Cite this: *Soft Matter*, 2012, **8**, 7368

www.rsc.org/softmatter

PAPER

Ribbon-type and cluster-type lipoplexes constituted by a chiral lysine based cationic gemini lipid and plasmid DNA

Ana L. Barrán-Berdón,^a Mónica Muñoz-Úbeda,^a Clara Aicart-Ramos,^b Lourdes Pérez,^c María-Rosa Infante,^c Pablo Castro-Hartmann,^d Alberto Martín-Molina,^e Emilio Aicart^a and Elena Junquera^{*a}

Received 27th March 2012, Accepted 30th April 2012

DOI: 10.1039/c2sm25711d

Lipoplexes constituted by plasmid DNA pEGFP-C3 (pDNA) or linear double-stranded calf thymus DNA (ctDNA) and mixed cationic liposomes consisting of several percentages of the cationic lysine derived lipid C₆(LL)₂ and the zwitterionic lipid 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) have been analyzed by both experimental and theoretical approaches. Experimental studies, consisting of electrophoretic mobility/zeta potential, small angle X-ray scattering (SAXS), cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM), negatively stained transmission electron microscopy (NS-TEM), and GelRed fluorescence intercalation assays, have been carried out at several liposome and lipoplex compositions, defined in terms of cationic lipid molar fraction and either the mass or charge ratios of the lipoplex. The electrochemical study confirms that, in the presence of the mixed lipids and in contrast with what has usually been found for linear DNA, the plasmid DNA is compacted with a large number of its Na⁺ counterions, thus yielding a much lower effective negative charge (q_{pDNA}^-) than that for ctDNA (q_{ctDNA}^-), as reported recently by us (*J. Am. Chem. Soc.*, 2011) for other lipoplexes. This finding is revealed as crucial for an optimum and efficient lipoplex preparation, since a lower effective negative charge implies a lower quantity of cationic lipid and, accordingly, a potential lower cytotoxicity. TEM experiments reveal a complex scenario of multilamellar nanostructures, from ribbon-type (typically present for chiral lipids) to cluster-type structures (usually found in cationic lipid/DOPE systems), the composition of the mixed liposome playing an important role in the final morphology of the lipoplex. SAXS diffractograms confirm the existence of these two types of multilamellar structures through a deconvolution process of the first peak of diffractograms into two overlapping bands. On the other hand, a theoretical complexation model is employed to determine the net charge of the lipoplexes studied in this work. The model allows analysis and comparison of the electrochemical behaviour of lipoplexes containing linear DNA vs. those constituted by a supercoiled DNA, confirming the experimental findings.

Introduction

The use of synthetic cationic lipids (CLs), usually mixed with a zwitterionic helper lipid, as transfecting agents of DNA biopolymers in gene therapy, has recently been the subject of numerous studies.^{1–11} The method is based on the compaction of

DNA by CLs, with the formation of a complex with a positive net charge between the negative plasmid DNA and the cationic mixed liposome. The strong interaction between both components of the complex, named lipoplex (mixed lipid–DNA), facilitates their approach to the cell membrane, the DNA being liberated into the cytoplasm *via* the nucleus of the cell, after fusion or endocytosis.¹² DNA is a biopolymer that in aqueous solution gets ionized and remains negatively charged, and for that reason electrostatic interactions play an important role in any of the biological processes where it is involved. Thus, a physicochemical study of the compaction process of DNA by cationic lipids based on a zeta potential or a surface charge density study of the lipoplex, together with the determination of the structures formed by the lipoplex, may help to clear up the lipoplex behaviour and the mechanisms of its transfection process. Previous works^{8,12–18} analyzing different types of lipoplexes have concluded a correlation between the different

^aGrupo Química Coloidal y Supramolecular, Dpto. Química Física I, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain. E-mail: junquera@quim.ucm.es; Fax: +34-913944135; Tel: +34-913944131

^bDpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain

^cDpto. Tecnología Química y Tensioactivos, IQAC-CSIC, 08034-Barcelona, Spain

^dServei de Microscòpia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain

^eGrupo de Física de Fluidos y Biocoloides, Dpto. Física Aplicada, Fac. Ciencias, Universidad de Granada, 18071-Granada, Spain

Cationic gemini lipids containing polyoxyethylene spacers as improved transfecting agents of plasmid DNA in cancer cells†

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 4640

Ana L. Barrán-Berdón,^{‡a} Santosh K. Misra,^{‡b} Sougata Datta,^b Mónica Muñoz-Úbeda,^a Paturu Kondaiah,^c Elena Junquera,^a Santanu Bhattacharya^{*b} and Emilio Aicart^{*a}

Lipoplex nano-aggregates have been analyzed through biophysical characterization (electrostatics, structure, size and morphology), and biological studies (transfection efficiency and cell viability) in five cancer cell lines. Lipoplexes were prepared from pEGFP-C3 plasmid DNA (pDNA) and mixed liposomes, constituted by a zwitterionic lipid (DOPE) and a gemini cationic lipid (GCL) synthesized in this work, [bis(hexadecyl dimethyl ammonium) oxyethylene], referred to as $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$, (where n is the oxyethylene spacer length, $n = 1, 2$ or 3 , between the ammonium heads). Cryo-TEM micrographs show nano-aggregates with two multilamellar structures, a cluster-type (at low-to-medium GCL composition) and a fingerprint-type that coexists with the cluster-type at medium GCL composition and appears alone at high GCL composition. SAXS diffractograms show that these lipoplexes present three lamellar structures, two of them coexisting at low and high GCL composition. The optimized transfection efficiency (TE) of pDNA was higher for lipoplexes containing GCLs with a longer ($n = 3$) or shorter ($n = 1$) polyoxyethylene spacer, at high GCL composition ($\alpha = 0.7$) with low charge ratio ($\rho_{eff} = 2$). In the all cancer cell lines studied, the TE of the optimized formulations was much better than those of both lipofectamine 2000 and lipoplexes with GCLs of the bis(hexadecyl dimethyl ammonium) alkane series recently reported. Probably, (a) the coexistence of two lamellar structures at high GCL composition synergizes the TE of these lipid vectors, (b) the orientation of the polyoxyethylene region in $(C_{16}Am)_2(C_2O)_3/DOPE$ may occur in such a way that the spacing between two cationic heads becomes smaller than that in $(C_{16}Am)_2(C_2O)_2/DOPE$ which is poor in terms of TE, and (c) the synergistic interactions between serum proteins and $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ -pDNA lipoplexes containing a polyoxyethylene spacer improve TE, especially at high GCL content. Lipoplexes studied here show very low levels of toxicity, which confirm them as improved vectors of pDNA in gene therapy.

Received 10th March 2014
Accepted 7th May 2014

DOI: 10.1039/c4tb00389f

www.rsc.org/MaterialsB

^aGrupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: aicart@quim.ucm.es; Fax: +34 913944135

^bDepartments of Organic Chemistry, Bangalore, Karnataka, India. E-mail: sb@orgchem.iisc.ernet.in; Fax: +91 8023600529

^cMolecular Reproduction Development and Genetics, Indian Institute of Science, 560012 Bangalore, Karnataka, India

† Electronic supplementary information (ESI) available: The procedure related to the synthesis of the divalent cationic gemini lipids $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n$ with the oxyethylene spacer $n = 1, 2$ or 3 ; description of the experimental methods; tables of the effective charges for the three GCLs and plasmid DNA; the particle size of mixed liposomes $(C_{16}Am)_2(C_2O)_n/DOPE$ at several GCL compositions; SAXS diffractograms and parameters for the three lamellar structures determined from them; zeta potential plots; cryo-TEM images; fluorescence anisotropy results; transfection efficiency plots in the absence (–FBS – FBS) and presence (–FBS + FBS) of serum in five cancer cell lines; fluorescence and confocal fluorescence images of transfected HEK293T cells with the optimized formulations of the lipoplexes; cell viability in the presence (–FBS + FBS) of serum, with the optimized formulations, in five cancer cell lines. See DOI: 10.1039/c4tb00389f

‡ These authors contributed equally.

1. Introduction

Nucleic acid delivery into the cells for therapeutic use is a promising field of modern medicine. However, there are a variety of factors that prevent obtaining efficient and promising outcomes and transfection.^{1–5} Cationic lipids (CLs) are commonly used vectors to improve the efficiency in nucleic acid delivery.^{6–10} Their structural similarity to the cell membranes makes them appropriate delivery agents. CLs are known to pack a large variety of nucleotides provoking a low immunogenic response; however, their use is limited due to cytotoxicity concerns, and moderate transfection efficiency (TE).^{10–13} In this regard, recent efforts have been addressed to find cationic lipids, as gemini cationic lipids (GCLs), with higher transfection capability and more biocompatibility.^{2,14–16} GCLs are amphiphilic molecules containing two head groups linked by a rigid or flexible spacer.^{17–19} Compared to monomeric CLs, GCLs have superior properties such as a lower critical micelle concentration (CMC), the presence of double charge per monomer, a

PAPER

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 1495

A delocalizable cationic headgroup together with an oligo-oxyethylene spacer in gemini cationic lipids improves their biological activity as vectors of plasmid DNA†

Krishan Kumar,^{‡a} Ana L. Barrán-Berdón,^{‡b} Sougata Datta,^{‡a} Mónica Muñoz-Úbeda,^b Clara Aicart-Ramos,^c Paturu Kondaiah,^d Elena Junquera,^b Santanu Bhattacharya^{*a} and Emilio Aicart^{*b}

Lipoplex nano-aggregates constituted of plasmid DNA (pDNA) pEGFP-C3 and mixed cationic liposomes, consisting of several percentages of a gemini cationic lipid (GCL) of the 1,2-bis(hexadecyl imidazolium) oxyethylene series, referred to as $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$, with oxyethylene spacers ($n = 1, 2$ or 3) between the imidazolium cationic groups and the DOPE zwitterionic helper lipid, have been characterized by various biophysical and biological approaches carried out at several GCL compositions (α), and either the mass or the effective charge ratio of the lipoplex. The electrochemical study by ζ -potential confirms that the three GCLs yield a 10% lower effective charge than the nominal one, while compacted pDNA yields only a 25% effective negative charge. The SAXS study reveals, irrespective of the spacer length (n) and effective charge ratio (ρ_{eff}), the presence of two lamellar structures, *i.e.*, one ($L_{\alpha,main}$) in the whole GCL composition and another ($L_{\alpha,DOPE,rich}$) with higher periodicity values that coexists with the previous one at low GCL composition ($\alpha = 0.2$). The cryo-TEM analysis shows two types of multilamellar structures consisting of cationic lipidic bilayers with pDNA sandwiched between them: a cluster-type (C-type) at low $\alpha = 0.2$ and a fingerprint-type (FP-type) at $\alpha \geq 0.5$, both with similar interlamellar spacing (d) in agreement with the $L_{\alpha,main}$ structure determined by SAXS. Transfection efficiencies (TEs) of each lipid mixture were determined in four different cell lines (HEK293T, HeLa, Caco-2 and A549) at several α and ρ_{eff} values in the absence and presence of serum (FBS). The optimized formulations ($\alpha = 0.2$ and $\rho_{eff} = 2.0$) substantially transfect cells much better than a commercial transfection reagent, Lipofectamine 2000 and previously studied efficient lipoplexes containing other cationic head groups or spacers both in the absence and presence of serum. The activity of optimized formulations may be attributed to the combination of several factors, such as: (a) the fusogenic character of DOPE which results in higher fluidity of the lipoplexes at $\alpha = 0.2$, (b) the coexistence of two lamellar structures at $\alpha = 0.2$ that synergizes the TE of these lipid vectors, and mainly (c) the higher biocompatibility of the GCLs reported in this work due to the presence of two imidazolium cationic groups together with an oligo-oxyethylene spacer. The length of the spacer in the GCL seems to have less impact, although $(C_{16}Im)_2(C_2O)_n$ /DOPE-pDNA lipoplexes with $n = 1$ and 3 show higher gene transfection than $n = 2$. All the optimum formulations reported herein are all highly efficient with negligible levels of toxicity, and thus, may be considered as very promising gene vectors for *in vivo* applications.

Received 24th November 2014

Accepted 9th January 2015

DOI: 10.1039/c4tb01948b

www.rsc.org/MaterialsB

^aDepartment of Organic Chemistry, Indian Institute of Science, 560012 Bangalore, India. E-mail: sb@orgchem.iisc.ernet.in; Fax: +91-8023600529

^bDepartments of Grupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: aicart@quim.ucm.es; Fax: +34-913944135

^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^dMolecular Reproduction Development and Genetics, Indian Institute of Science, 560012 Bangalore, India

† Electronic supplementary information (ESI) available: Details and tables of the effective charges for the three GCLs and plasmid DNA; SAXS diffractograms and parameters of the structures; ζ -potential plots; cryo-TEM images; fluorescence anisotropy results; transfection efficiency and cell viability results in the absence (–FBS) and presence (+FBS) of serum in four cell lines; and fluorescence microscopy images of the *in vitro* transfected Caco-2 and HeLa cells. See DOI: 10.1039/c4tb01948b

‡ These authors contributed equally.

Ca²⁺-Mediated Anionic Lipid–Plasmid DNA Lipoplexes. Electrochemical, Structural, and Biochemical Studies

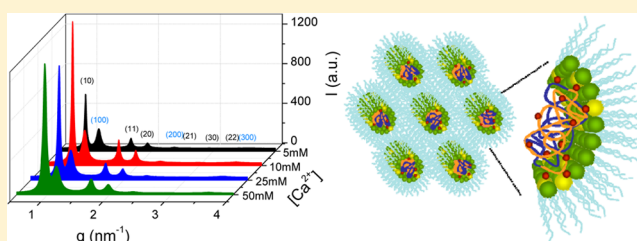
Ana L. Barrán-Berdón,[†] Belén Yélamos,^{||} Marc Malfois,[⊥] Emilio Aicart,[†] and Elena Junquera^{*,†}

[†]Grupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, and ^{||}Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

[⊥]Consortio para la Construcción, Equipamiento y Explotación del Laboratorio de Luz de Síncrotrón (CELLS), 08290 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Several experimental methods, such as zeta potential, gel electrophoresis, small-angle X-ray scattering, gene transfection, fluorescence microscopy, flow cytometry, and cell viability/cytotoxicity assays, have been used to analyze the potential of anionic lipids (AL) as effective nontoxic and nonviral DNA vectors, assisted by divalent cations. The lipoplexes studied are those comprised of the green fluorescent protein-encoding plasmid DNA pEGFP-C3, an anionic lipid as 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (DOPG) or 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS), and a zwitterionic lipid, the 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE, not charged at physiological pH). The studies have been carried on at different liposome and lipoplex compositions and in the presence of a variety of [Ca²⁺]. Electrochemical experiments reveal that DOPG/DOPE and DOPS/DOPE anionic liposomes may compact more effectively pDNA at low molar fractions (with an excess of DOPE) and at AL/pDNA ratios ≈20. Calcium concentrations around 15–20 mM are needed to yield lipoplexes neutral or slightly positive. From a structural standpoint, DOPG/DOPE-Ca²⁺-pDNA lipoplexes are self-assembled into a H_{II}^c phase (inverted cylindrical micelles in hexagonal ordering with plasmid supercoils inside the cylinders), while DOPS/DOPE-Ca²⁺-pDNA lipoplexes show two phases in coexistence: one classical H_{II}^c phase which contains pDNA supercoils and one L_α phase without pDNA among the lamellae, i.e., a lamellar stack of lipid bilayers held together by Ca²⁺ bridges. Transfection and cell viability studies were done with HEK293T and HeLa cells in the presence of serum. Lipoplexes herein studied show moderate-to-low transfection levels combined with moderate-to-high cell viability, comparable to those yield by Lipofectamine2000*, which is a cationic lipid (CL) standard formulation, but none of them improve the output of typical CL gen vectors, mostly if they are gemini or dendritic. This fact would be indicating that, nowadays, lipofection via anionic lipids and divalent cations as mediators still needs to enhance transfection levels in order to be considered as a real and plausible alternative to lipofection through improved CLs-based lipoplexes.



INTRODUCTION

Therapeutic gene transfer is not a new concept as it was first developed more than two decades ago.^{1,2} The treatment of human disease by gene therapy is promising in the medical field, because it is possible to revert the effects of many genetic disorders^{3,4} through the introduction of recombinant DNA into the cell with the aim of producing the necessary biologically active proteins to repair the cell damage.⁵ However, DNA internalization requires that the biopolymer must be first compacted by viral or nonviral vectors and then protected from degradation. Virus-based vectors, although more efficient to date as transfecting agents than nonvirus-based systems, may provoke immunogenic reactions.^{4,6} In addition, the nonviral systems are easier to prepare and can transfect larger plasmids into cells.⁴ In the past years, a great deal of effort has been devoted to find out, among the wide range of possibilities (polymers, cationic liposomes, zwitterionic liposomes, magnetic and nonmagnetic nanoparticles, amphiphilic cyclodextrins,

supramolecular devices, and so on),^{7–17} new formulations (nonviral in nature) capable of compacting, transporting, protecting, and delivering genetic material into the cells, all those actions being done as much efficiently as possible and also with the lowest possible level of toxicity to cells. Among the above-mentioned vehicles, lipofection (transfection with lipidic formulations) has been revealed as one of the most adequate methods to transfect DNA to a wide variety of cells. However, the use of cationic lipids (CLs) presents several inconveniences,^{18–21} such as cytotoxicity in vitro and in vivo and instability of their complexes with DNA in the presence of serum.^{22–24} In this respect, anionic lipids (ALs), which are present in the eukaryotic cell membrane, with less levels of phagocytosis by macrophages²⁵ and higher biocompatibility,

Received: April 11, 2014

Revised: September 8, 2014

Published: September 11, 2014

Time Evolution of Nanoparticle–Protein Corona in Human Plasma: Relevance for Targeted Drug Delivery

Ana Lilia Barrán-Berdón,^{†,‡,§,#} Daniela Pozzi,^{†,#} Giulio Caracciolo,^{†,*} Anna Laura Capriotti,[‡] Giuseppe Caruso,[‡] Chiara Cavaliere,[‡] Anna Riccioli,[‡] Sara Palchetti,[‡] and Aldo Lagana[‡]

[†]Department of Molecular Medicine, “Sapienza” University of Rome, Viale Regina Elena 291, 00161 Rome, Italy

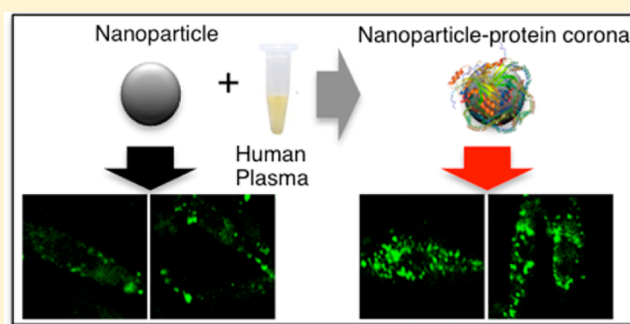
[‡]Department of Chemistry, “Sapienza” University of Rome, P.le A. Moro 5, 00185 Rome, Italy

[§]Departamento de Química Física I, Universidad Complutense de Madrid, Viale Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

[‡]Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti, Department of Anatomy, Histology, Forensic Medicine and Orthopaedics, Section of Histology and Medical Embryology, “Sapienza” University of Rome, Via A. Scarpa 14, 00161 Rome, Italy

S Supporting Information

ABSTRACT: When nanoparticles (NPs) enter a biological fluid (e.g., human plasma (HP)), proteins and other biomolecules adsorb on the surface leading to formation of a rich protein shell, referred to as “protein corona”. This corona is dynamic in nature and its composition varies over time due to continuous protein association and dissociation events. Understanding the time evolution of the protein corona on the time-scales of a particle’s lifetime in blood is fundamental to predict its fate *in vivo*. In this study, we used lipid NPs, the cationic lipid 3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] (DC-Chol) and the zwitterionic lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), that are among the most promising nanocarriers both *in vitro* and *in vivo*. Here, we investigated the time evolution of DC-Chol–DOPE NPs upon exposure to HP. On time scales between 1 and 60 minutes, nanoliquid tandem mass spectrometry revealed that the protein corona of DC-Chol–DOPE NPs is mainly constituted of apolipoproteins (Apo A-I, Apo C-II, Apo D, and Apo E are the most enriched). Since the total apolipoprotein content is relevant, we exploited the protein corona to target PC3 prostate carcinoma cell line that expresses high levels of scavenger receptor class B type 1 receptor, which mediates the bidirectional lipid transfer between low-density lipoproteins, high-density lipoproteins, and cells. Combining laser scanning confocal microscopy experiments with flow cytometry we demonstrated that DC-Chol–DOPE/HP complexes enter PC3 cells by a receptor-mediated endocytosis mechanism.



INTRODUCTION

Over the past few decades, there has been extensive interest in developing nanoparticles (NPs) as effective devices in view of their applications in the delivery of drugs, proteins, peptides, and nucleic acids.^{1–5} Among existing ones, lipid NPs, vesicular systems in which the drug is confined to a water cavity surrounded by a lipid envelope, exhibit unique advantages. They include increased encapsulation capacity, stability of drugs, and protection of drugs from degradation, ability to target the drug to the site of action and controlled release properties. When lipid NPs enter a biological fluid (e.g., human plasma (HP)), biomolecules, especially proteins, compete for binding to the NP surface.^{6–12} Rapidly the identity of the bare NP is lost, while its fate is dominated by the layer of adsorbed proteins, the so-called “protein corona”. Unfortunately, opsonins such as immunoglobulins (Ig), fibrinogen, and complement proteins promote phagocytosis with rapid clearance of the NPs from the bloodstream. Despite undesirable implications, the “protein corona” possesses

favorable properties that can be exploited. First, adsorption of dysopsonins like human serum albumin (HSA), apolipoproteins etc. may promote prolonged bloodstream circulation. Furthermore, since corona formation on NPs is unavoidable, this could be used in a positive way for targeted drug delivery. Very promising results¹¹ have given credence to the proof-of-concept that (i) dysopsonins associated with the NP–protein corona provide a “do not eat me” signal to the macrophages; (ii) target cells can actually be activated via proteins associated to the NP-corona. Despite its feasibility, some aspects limit the application of the “protein corona” nanotechnology. One of the major drawbacks is that the NP-corona composition is not constant, but it changes with time due to continuous protein binding and unbinding events up to when final equilibrium is reached typically within a few hours.^{13–15} Therefore, the

Received: March 30, 2013

Revised: April 15, 2013

Published: April 30, 2013