

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



“Síntesis y caracterización de nanopartículas de gelatina acopladas a nanoanticuerpos con aplicación anticancerígena”

TESIS

Para obtener el grado de
Maestría en Ciencias

Presenta:

QFB. Citlaly Bucio Arzate

Director de tesis

Dra. Kenia Palomino Vizcaino

Codirector de tesis

Dr. Giovanni Palomino Vizcaino

Tijuana B.C.

Agosto 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.364
Tijuana, B.C., a 05 de julio, 2024

C. Citlaly Bucio Arzate
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente

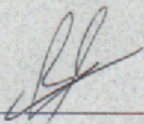
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS .

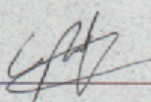
Es propuesto, por los C. Dra. Kenia Palomino Vizcaino y
 Dr. Giovanni Palomino Vizcaino .


Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido
al tema “*Síntesis y caracterización de nanopartículas de gelatina acopladas a*
nanoanticuerpos con aplicación anticancerígena”.

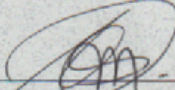
El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. RESUMEN
- II. INTRODUCCIÓN
- III. ANTECEDENTES
- IV. JUSTIFICACIÓN
- V. HIPÓTESIS
- VI. OBJETIVOS
- VII. MATERIALES
- VIII. MÉTODOS
- IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- X. CONCLUSIÓN


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora


Dra. Kenia Palomino Vizcaino
Directora De Tesis


Dr. Giovanni Palomino Vizcaino
Co-Director De Tesis



Agradecimientos

A ustedes que formaron parte del proceso y a todos los que se cruzaron a lo largo de mi estancia en el posgrado.

A mis **padres**, por formar a la persona que soy, inculcando valores, perseverancia y ganas de superación, por siempre apoyar cada paso que soy, nunca desalentar ninguna decisión tomada en mi vida académica y laboral, por hacerme saber que están orgullosos de cada logro, son mi motor de vida, esto es por ustedes y sin ustedes esto hubiera logrado.

A la **Dra. Kenia Palomino Vizcaino**, por abrirme las puertas y confiar en mí para este trabajo, su apoyo y dirección durante estos años.

Al **Dr. Giovani Palomino Vizcaíno**, por transmitir su conocimiento, enseñarme nuevas técnicas, por el apoyo, dirección y consejos durante este trabajo.

A mis **amigos**, por estar de manera incondicional, aliviar los momentos de cansancio y estrés, sus ánimos para continuar y consejos.

A los **compañeros de posgrado**, por escuchar las quejas o dudas y dar consejos para resolver problemas experimentales. Por siempre hacer amenos los días, compartir cafés y comidas en el posgrado.

A **mí**, la persona que trabajó duro para que esto se lleve a cabo, por tomar la decisión de entrar a la maestría, tener perseverancia y ganas de superación. Me agradezco por poner todo el empeño, mis habilidades y conocimiento, sobre todo por nunca rendirme por terminar este trabajo.

Gracias infinitas, los quiero.

Tabla de contenido

Tabla de contenido	4
Índice de Figuras	6
Índice de tablas	7
1. Resumen	8
2. Introducción	9
2.1. Cáncer.	9
2.2. Terapia farmacológica.	10
2.3. Transportadores ABC.	12
2.4. Nanomedicina.	13
2.5. Nanopartículas de gelatina.	14
2.6. Proteínas fluorescentes.	15
3. Antecedentes	16
4. Justificación	17
5. Hipótesis	18
6. Objetivos	18
6.1. Objetivo general.	18
6.2. Objetivos específicos.	18
7. Materiales	19
7.1. Reactivos biológicos y químicos.	19
7.1.1. Bacterias.	19
7.1.2. Medios de cultivo.	19
7.1.3. Plásmidos.	19
7.1.4. Reactivos químicos.	20
7.2. Equipo.	20
8. Métodos.	22
8.1. Producción de células químicamente competentes.	22
8.2. Transformación bacteriana.	22
8.3. Extracción de plásmido por método de lisis alcalina.	22
8.4. Análisis de la expresión de proteína.	23
8.4.1. Expresión de proteínas totales.	23
8.4.2. SDS-PAGE.	25
8.4.3. Purificación de proteína.	25
8.4.4. Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.	26
8.5. Síntesis de nanopartículas de gelatina por método nanoprecipitación.	26
8.6. Adición de grupos tiol a nanopartículas.	26
8.7. Caracterización de nanopartículas de gelatina.	27
8.7.1. Dispersión de luz dinámica y potencial zeta.	27
8.7.2. Espectroscopia de infrarrojo.	27
8.7.3. Cuantificación grupos tiol.	27
8.8. Conjugación de nanopartículas de gelatina con proteína.	28
8.9. Estudio de biocompatibilidad de nanopartículas de gelatina.	28

9. Resultados y discusión.	29
9.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de gelatina.	29
9.1.1. Tamaño hidrodinámico.	29
9.1.2. Potencial Zeta.	30
9.1.3. Grupos conformacionales de las nanopartículas.	31
9.1.4. Cuantificación de grupos sulfhidrilo.	34
9.2. Transformación de células.	36
9.3. Extracción y purificación de plásmido.	37
9.4. Análisis de la expresión y purificación de proteínas.	37
9.4.1. Cuantificación de proteínas.	40
9.5. Evaluación del conjugado nanopartícula-proteína.	40
9.6. Biocompatibilidad de nanopartículas.	42
9.7. Discusión.	43
10. Conclusión	46
11. Referencias bibliográficas	47

Índice de Figuras

Figura 1. Síntesis de nanopartículas de gelatina.....	29
Figura 2. Gráficos de tamaño de partícula.....	30
Figura 3. Espectroscopia de infrarrojo.....	32
Figura 4. Espectroscopia de infrarrojo.....	32
Figura 5. Espectroscopia de infrarrojo.....	33
Figura 6. Formación de nanopartículas tioladas con 2-iminotilano.....	34
Figura 7. Curva de calibración con cisteína, medición de absorbancias a 412 nm.....	35
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1% del pNb, purificado mediante lisis alcalina en maxi-escala.....	37
Figura 9. Separación electroforética (SDS-PAGE 15%) de las fracciones proteicas recolectadas durante la cromatografía de afinidad de metales para purificar la proteína mClover3.....	38
Figura 10. Separación electroforética (SDS-PAGE 15%) de las fracciones proteicas recolectadas durante la cromatografía de afinidad de metales para purificar la proteína Nb.	39
Figura 11. Separación electroforética (SDS-PAGE 15%) de las fracciones de las cepas que portan el plásmido pNb, en dos condiciones de expresión proteica: ausencia y presencia de arabinosa 1%.....	39
Figura 12. Formación del complejo nanopartícula-proteína.....	40
Figura 13. Caracterización de conjugado Np-P.....	41
Figura 14. Emisión de fluorescencia, unidades relativas de fluorescencia de la proteína mClover3, lavados, nanopartículas y conjugado nanopartícula-proteína; a longitud de excitación de 477 nm y emisión de 520 nm.....	41
Figura 15. Viabilidad celular de células (BE(2)-C) tratadas con nanopartículas de gelatina y solución de gelatina. n=3.....	42

Índice de tablas

Tabla 1. Caracterización de nanopartículas.....	30
Tabla 2. Identificación de bandas de infrarrojo de gelatina.....	33
Tabla 3. Identificación de bandas de infrarrojo de glutaraldehído.....	33
Tabla 4. Identificación de bandas de infrarrojo de nanopartículas.....	34
Tabla 5. Cuantificación de grupos sulfhidrilo.....	35
Tabla 6. Caracterización de nanopartículas.....	36
Tabla 7. Clonas transformadas con plásmido Nb.....	36

1. Resumen

El objetivo de la investigación es la síntesis y caracterización de nanopartículas (Nps) de gelatina por el método de nanoprecipitación, entrecruzadas con glutaraldehído para generar estabilidad en las nanopartículas, se modifica la superficie de Nps de gelatina con 2-iminotiolano, introduciendo grupos tiol. Concomitantemente, mediante técnicas biotecnológicas se expresa la proteína de interés, el producto obtenido será purificado mediante cromatografía de afinidad metálica. Las nanopartículas tendrán la finalidad de unirse a una línea celular tumoral, con la ayuda del acoplamiento de un nanoanticuerpo a la superficie de las Nps mediante el uso del entrecruzante heterobiofuncional sulfo-MBS, creando así un nanosistema. La unión del nanosistema a células tumorales será confirmada mediante microscopía de fluorescencia, la emisión de fluorescencia confirmará la presencia del nanosistema, teniendo prometedoras aplicaciones anticancerígenas.

2. Introducción

2.1. Cáncer.

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la transformación de células por alteración en los procesos de crecimiento y proliferación. Las células normales se dividen en respuesta a señales de manera controlada, existen diferentes factores que pueden dañar el ciclo de división celular como, el factor hereditario y la exposición a agentes cancerígenos. Si el ADN celular sufre una mutación o alteración podrían ser reparadas o activar la muerte celular; mientras que, en el caso de células anormales o cancerígenas han perdido los mecanismos de control, por lo que, la célula anormal prolifera incontroladamente con la posibilidad de implantarse en cualquier parte del cuerpo generando tumores.

Los tumores cancerígenos que pueden ser de dos tipos: (1) tumores sólidos que ocasionan crecimiento de tejido anormal, los cuales eventualmente pueden adquirir la capacidad de diseminarse a otras partes del cuerpo, proceso llamado metástasis y (2) los linfáticos, originados en la médula ósea o tejidos linfáticos y producen células sanguíneas anormales [1].

Esta enfermedad se puede presentar a cualquier edad, pero conforme aumenta la edad de las personas, el riesgo se vuelve mayor. En personas de 0 a 19 años los principales tumores malignos son de tejidos linfoides y hematopoyéticos, mientras que, para la población de 20 años o más, los tumores malignos que encabezaron los primeros lugares en el año 2017, fueron el de mama y de órganos genitales, como tercer lugar se encontró el de órganos digestivos. Existen diferencias en los tipos de cáncer que atacan a cada sexo, al igual que en las tasas de morbilidad, en las mujeres la tasa de morbilidad más alta por cáncer se presenta entre la edad de 60 a 64 años y para los hombres, la tasa de morbilidad más alta es entre 75 a 79 años, siendo los causantes el cáncer de mama y cáncer de próstata para cada sexo respectivamente.

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común en mujeres y se encuentra en 4to lugar en la lista de mortalidad, en todo el mundo, con más de 500 mil muertes en el año 2022, según el observatorio global de cáncer (GCO, por sus siglas en inglés). Esta enfermedad es un tumor epitelial desarrollado a partir de las células que recubren los lobulillos que producen la leche de la mama. En este tipo de cáncer se puede encontrar expresión de tres receptores hormonales: receptor de estrógenos, receptor de progesterona

y factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, por sus siglas en inglés). HER2 es un receptor tirosina quinasa de membrana, perteneciente a la familia erbB, que regula el crecimiento, adhesión, migración y diferenciación celular. Se encuentra sobreexpresado en el 25-40% de los cánceres de mama, relacionado con mal pronóstico de la enfermedad [2].

En México del año 2019, el 12% del total de defunciones corresponden a tumores malignos, entre ese porcentaje se encontró que la mayoría de los fallecimientos eran mujeres con un 51% y el otro porcentaje corresponde a los hombres [4]. En el año 2020, el GCO, estimó un total de 19, 292, 789 casos nuevos de cáncer en todo el mundo, el 9% de los casos se encuentran en latino américa y el caribe. En México los tipos de cáncer más comunes son de mama y próstata, en el año 2019, se registró una incidencia de 50.2 y 56.6 por cada 100 000 habitantes, respectivamente y una tasa de mortalidad de 13.7 para cáncer de próstata y 13.1 en cáncer de mama [3].

El cáncer o tumores malignos se encontró entre las primeras cinco causas de muerte en México en el año 2021 según el INEGI [4]. Se estima que para el año 2040, el número de casos nuevos de cáncer en Latino américa y el Caribe sea de 2.44 millones, es decir, un millón más de nuevos casos a comparación de los casos registrados en el año 2020, según la GCO [3].

El diagnóstico temprano de la enfermedad es primordial para establecer una terapia efectiva. En México, se realizan campañas que promueven las revisiones continuas para la detección temprana de tumores y evitar su progresión. Uno de los métodos de diagnóstico más comunes, son las biopsias, procedimiento en el que se extrae una muestra de tejido, misma que después de un tratamiento particular es observada por un patólogo en busca de tejido anormal. Otro de los métodos más útiles es la tomografía, esta se basa en la obtención de imágenes de diferentes partes del cuerpo que ayudan a detectar los tumores [5].

2.2. Terapia farmacológica.

El tratamiento del cáncer se basa en tres métodos principales, la cirugía, radioterapia y terapia farmacológica, los primeros dos métodos se conocen como tratamientos locales, dado que, su aplicación es en una parte específica del cuerpo, mientras, la terapia farmacológica (también llamada quimioterapia) es sistémica. Regularmente, la terapia para el cáncer se puede componer de una combinación de dos o

tres de estos métodos, lamentablemente el tratamiento no asegura la cura contra la enfermedad, solo una tercera parte de los cánceres se curan, y dos tercios progresan a metástasis [1]. Otro de los problemas de quimioterapia es la citotoxicidad, el tratamiento no distingue células normales de las anormales, causando efectos no deseados en la terapia, como cardiotoxicidad, supresión de la médula ósea, hepatotoxicidad, entre otros.

Dentro de la terapia farmacológica se encuentran los fármacos antineoplásicos, los cuales se dividen en dos categorías, fármacos citotóxicos y fármacos dirigidos o inmunoterapia, los primeros tienen la función de inhibir la replicación celular, mientras que la segunda categoría inhibe la síntesis o función de proteínas implicadas en el crecimiento celular tumoral. El metotrexato fue uno de los primeros fármacos citotóxicos utilizados contra el cáncer que logró remisión en casos de leucemia, este fármaco es análogo del ácido fólico, el cual inhibe la síntesis de una enzima necesaria para la síntesis de purina y timidina, bases necesarias en la síntesis de ADN, por lo tanto, inhibe la síntesis, reparación y replicación celular, disminuyendo el desarrollo de tumores. Otro fármaco, el fluorouracilo, un antimetabolito pirimidínico el cual de igual manera impide la síntesis de timidina, inhibiendo la síntesis del ADN. El cisplatino es uno de los fármacos más utilizados en la terapia contra el cáncer, este derivado del platino reacciona con el agua creando puentes intracatenarios, los cuales distorsionan el ADN e impidiendo su replicación y transcripción, causando la muerte celular [1].

Entre los inhibidores enzimáticos y del proteosoma, se encuentran imatinib, sunitinib, bortezomib, entre otros. Este tipo de fármacos inhiben algunas vías moleculares relacionadas con la proliferación de células cancerosas e impide la degradación de proteínas del proteosoma por lo que se acumulan, lo que conduce a la muerte celular [1].

La inmunoterapia consiste en fármacos que ayudan a activar el sistema inmune del paciente, con el fin de que reconozca y destruya células cancerosas [6]. Los anticuerpos monoclonales forman parte de esta terapia, el rituximab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado para el cáncer, principalmente utilizado para el linfoma no Hodgkin, el cual provoca la lisis de las células del linfoma. Con el paso del tiempo, el avance en la ciencia y tecnología, se han creado nuevos fármacos no solo con el fin de disminuir la tasa de mortalidad del cáncer, sino también, con el fin de obtener fármacos más específicos y con menos efectos adversos. Un nuevo enfoque es la terapia génica, basada en el uso de material genético para modificar células con el propósito de curar la enfermedad, actualmente existen estudios preclínicos sobre estas nuevas terapias en diferentes tipos de cáncer [7].

2.3. Transportadores ABC.

Existe un proceso denominado resistencia farmacológica, en el cual las células cancerosas no responden al medicamento que suele destruirlas, creando una adaptabilidad a la exposición continua de fármaco sin ser afectadas. La resistencia farmacológica es causante del fracaso del tratamiento del cáncer, dicha resistencia puede ser adquirida o innata. La resistencia innata puede ser causada por oncogenes que inactivan los genes supresores tumorales como p53, también la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 causan resistencia a fármacos interfiriendo en la señal de muerte celular inducida por el fármaco antineoplásico. Por su parte, la resistencia adquirida, está causada por mutaciones genéticas y expresión génica anómala en la evolución del cáncer debido al microambiente del tumor y difusión de fármacos en tumores sólidos [1]. Las células cancerígenas pueden generar mecanismos de resistencia llamados resistencia a múltiples fármacos (MDR). El mecanismo de los MDR no es específico a la estructura o mecanismo de acción del fármaco, está mediado por distintas proteínas de membrana, citoplasma o núcleo, el mecanismo es la expulsión hacia la matriz extracelular y la reducida acumulación intracelular de fármacos, causado por una sobreexpresión de proteínas como glucoproteína P (Bukowski, K. 2020)

Los transportadores ABC son una extensa familia de proteínas transmembrana altamente conservada, que median el transporte activo de diferentes sustratos a través de la membrana celular. La superfamilia ABC ha sido categorizada en siete subfamilias (A-G), basado en su estructura y similitudes de secuencia. La subfamilia A está conformada por transportadores completos, que se ven involucrados en enfermedades monogénicas, es decir, aquellas que sufren alteración de un solo gen en su secuencia de ADN, por ejemplo, enfermedad de Tangier. D es una subfamilia de transportadores que necesitan ser dimerizados para estar activos y se encuentran localizados en peroxisomas, metabolizando ácidos grasos. E y F son subfamilias que no tienen dominios transmembrana, por lo que, no se encuentran envueltos en transporte de membrana [8, 9]. Las subfamilias B, C y G se ven implicadas en el proceso de resistencia a fármacos anticancerígenos. Los transportadores funcionan como bombas de eflujo, expulsando los fármacos fuera de la célula en presencia de ATP, disminuyendo la eficacia de la quimioterapia. (Liu, X. 2019). La glicoproteína P es una bomba de eflujo perteneciente a esta superfamilia se encuentra en la superficie de células cancerígenas y también en células normales como enterocitos [10].

2.4. Nanomedicina.

La nanomedicina, es la aplicación de la nanotecnología con fines de mejorar la calidad de vida en los seres humanos, dicha ciencia surgió como idea en el año de 1959, cuando Richard Feynman dicta en su conferencia que “se tienen las herramientas adecuadas para manipular átomos y moléculas de forma individual”; Sin embargo, no fue hasta el año de 1974 que se acuñó el término “nanotecnología” por Norio Taniguchi, lo definió como el procedimiento de separación, consolidación y deformación de materiales átomo por átomo o molécula por molécula. Esta idea fue consolidada por las investigaciones del Dr. Drexler en los años 80’s, dando paso a una amplia área de investigación científica [11].

En el área biomédica, se tiene sumo interés en nanotecnología para el desarrollo de nuevos dispositivos de diagnóstico, mejoramiento de fármacos y nanosistemas acarreadores de fármacos. Las nanopartículas (Nps) son partículas de un tamaño menor a 100 nm, que por sus propiedades pueden ser utilizadas como importantes herramientas en el área biomédica. Una de las propiedades de interés, es la superficie disponible, la cual es inversamente proporcional al tamaño de la nanopartícula, lo cual las hace ideal para unir, absorber y cargar fármacos, proteínas o múltiples moléculas [12]. Otras de las propiedades de interés son, biocompatibilidad, tamaño y forma, y pueden ser cargadas con compuestos fluorescentes para ser empleadas en imagenología.

El objetivo de las nanopartículas utilizadas como acarreadores de fármacos o macromoléculas puede ser: proteger de la degradación, aumentar su tiempo de vida media, dirigir a su diana, reducir los efectos adversos y mejorar su biocompatibilidad [13]. Las Nps pueden tener un origen metálico como oro, plata, cadmio o ser de polímeros naturales, sintéticos biocompatibles y biodegradables, ejemplos de estos polímeros son ácido poliglicólico (PGA), ácido polietilenglicol (PEG), quitosano, albúmina, gelatina y colágeno [12].

Los nanosistemas de composición metálica fueron de los primeros estudios para utilizarse como tratamiento contra el cáncer. Hainfeld y colaboradores sintetizaron nanopartículas de oro para mejorar la radioterapia en tumores mamarios EMT-6 de ratones, las Nps se administraron vía intravenosa a los ratones seguido de radiación en el área del tumor, esta combinación obtuvo erradicación en la mayoría de los tumores [14].

Bloise et al. sintetizaron nanopartículas de oro como terapia contra el cáncer de mama, las Nps fueron decoradas con poliamidoamina biodegradable, funcionalizadas con tiol y cargadas con trastuzumab, el anticuerpo monoclonal contra el cáncer de mama HER2 positivo. Se realizó la caracterización por dispersión de luz dinámica, microscopía, espectroscopía, cuantificación de proteínas, entre otros. Obtuvieron nanopartículas estables de 5 nm y con capacidad de conjugarse con trastuzumab, lo que permitió el direccionamiento a líneas celulares SKBR-3, MCF-7 y 3T3, con distintos grados de expresión de HER-2, prometiendo ser una nanoplataforma anti cáncer [15].

2.5. Nanopartículas de gelatina.

Existe un favoritismo con las nanopartículas de origen natural en el área biomédica, esto debido a los métodos sencillos de preparación y su estabilidad en fluidos biológicos [16]. La gelatina, uno de los polímeros naturales utilizados para la síntesis de Nps, ha sido de los más estudiados recientemente, este es una proteína desnaturalizada obtenida de la hidrólisis del colágeno de origen animal, es catalogada como una sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) por la administración de medicamentos y alimentos (FDA, por sus siglas en inglés). La gelatina tiene propiedades de interés como biocompatibilidad, biodegradable por su estructura compuesta de diferentes grupos funcionales, permite múltiples modificaciones para acoplar reticuladores, fármacos y ligandos, esto convierte a las nanopartículas de gelatina (GNP's) en un material de interés para la liberación de fármacos [16, 17].

Varios métodos han sido empleados para la síntesis de las nanopartículas de gelatina, entre las cuáles se encuentran desolvatación, coacervación, microemulsión fase inversa, nanoprecipitación, autoensamblaje, entre otras [17]. Dentro de los métodos más empleados se encuentra la doble desolvatación, este es una modificación de la desolvatación sencilla, aumentando la eficiencia al añadir una segunda desolvatación, las Nps obtenidas tendrán un menor tamaño, mayor uniformidad y menor tendencia a agregarse. Otro de los métodos considerados como sencillos, fáciles y rápidos, es la nanoprecipitación, en este la solución de gelatina en fase solvente es añadida a una fase no solvente, donde la turbulencia/precipitación generada por el desplazamiento del solvente da como resultado a las nanopartículas. Después de la síntesis de las nanopartículas, estas

pueden ser entrecruzadas químicamente, con el objetivo de obtener mejoras en la forma, estabilidad y tiempo de vida media de las Nps [16]. Existen distintos métodos para el entrecruzamiento, de los más utilizados está el glutaraldehído y carbodiimida; los grupos funcionales contenidos en estos entrecruzantes como aldehídos y aminos, se unen a los diferentes residuos de la gelatina, causando estabilidad en su estructura [17]. Se pueden realizar otras modificaciones a la superficie de las nanopartículas, enlazando ligandos como moléculas catiónicas, proteínas, anticuerpos y distintos polímeros que presentan un uso biomédico [16].

2.6. Proteínas fluorescentes.

Las proteínas fluorescentes han sido utilizadas como herramientas de imagen de células vivas, dado a su fluorescencia se puede estudiar la localización, estructura y dinámica de moléculas. La proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), fue derivada y aislada por primera vez en la medusa *Aequorea victoria*, por el doctor Shimomura en los años 1960 [18]. Con el paso del tiempo, la expresión de GFP en células procariontas como *E. coli*, dio inicio a la producción de nuevas variantes de la proteína, que sean más brillantes, mejor fotoestabilidad y menor sensibilidad al pH [19].

Bajar y colaboradores, produjeron una variante de GFP, denominada mClover3, esta variante presenta mayor brillo y mejor fotoestabilidad, en comparación a las demás proteínas de la familia mClover. Presentan una longitud máxima de excitación y emisión de 506 y 518, respectivamente [20]. Esta variante es una buena herramienta para la imagen en células vivas.

3. Antecedentes

Lee et al, evaluaron el método de nanoprecipitación para la síntesis de nanopartículas de gelatina, tamaño, forma de partícula, porcentaje rendimiento y formación de aglomerados, obteniendo tamaño menor a 200 nm con bajo índice de polidispersidad, de morfología esférica, y ligeros aglomerados en su estado liofilizado, llegando a ser redispersadas en medio acuoso gracias al emulsificante y entrecruzante durante la síntesis, con un rendimiento del 30%. Con lo anterior, lograron obtener las condiciones óptimas para potenciar el método de nanoprecipitación [21].

Cascone, Lazzeri y colaboradores, sintetizaron nanopartículas de gelatina mediante método emulsión agua/aceite, para el encapsulamiento de metotrexato, la liberación del fármaco fue realizada en celda de difusión lado a lado, donde las nanopartículas de 100-200 nm lograron liberar el 40% de metotrexato en 4 horas, demostrando que la liberación está controlada por la gelatina [22].

Kushibiki y colaboradores, Sintetizaron micelas de gelatina modificadas con polietilenglicol (PEG) marcados con radioisótopo para el mejoramiento de tiempo de circulación. Realizaron caracterización de micelas y ensayos de distribución en el cuerpo de ratones femeninos, mediante administración intravenosa. Las micelas obtuvieron un tamaño cercano a 100 nm con carga superficial casi neta, demostraron que las micelas con PEG mejora el tiempo de circulación, distribución y acumulación en tumores comparado con la gelatina y el radioisótopo administrados por sí solos. El perfil de distribución de esta micella es un nuevo sistema de administración intravenosa de fármacos, gracias a su acumulación en tumores [23].

Kuo y un grupo de investigadores de Taiwán, sintetizaron nanopartículas de gelatina marcadas fluorescentemente conjugadas con PHA-E, una fitohemaglutinina; y cargadas con gemcitabina (gem). Las nanopartículas fluorescentes con neutrAvidina tetrametilrodamina, fueron sintetizadas por el método de nanoprecipitación y la superficie de las partículas fue modificada con grupos tiol y un linker heterobiofuncional para la conjugación de PHA-E y GEM, las nanopartículas demostraron buena acumulación e inhibición celular en líneas celulares A-549 y H292 de carcinoma de pulmón. [24].

4. Justificación

El cáncer es una enfermedad que ataca a nivel mundial, en el año 2019 se registró como la segunda causa de muerte en el mundo, se espera que para el año 2040 los casos nuevos aumenten en un millón, ascendiendo a 2.44 millones de casos solo en Latino América y el caribe. Esta afectación está caracterizada por un descontrol en la división celular causada por la acumulación de mutaciones en el ADN, provocando el desarrollo y diseminación de células anormales causando tumores.

El desarrollo de un nanosistema capaz de discriminar células normales de células cancerígenas y expresar bombas de eflujo, podrá ser una forma de dirigir la farmacológica a las células resistentes, aumentando la eficacia de las terapias farmacológicas actuales.

5. Hipótesis

Las nanopartículas de gelatina acopladas a un nanoanticuerpo serán capaces de acoplarse a una línea celular tumoral y tener aplicación anticancerígena.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general.

Síntesis y acoplamiento de nanopartículas de gelatina con nanoanticuerpo para su direccionamiento celular.

6.2. Objetivos específicos.

1. Síntesis de nanopartículas de gelatina por el método de nanoprecipitación.
2. Caracterización de las nanopartículas mediante DLS, Potencial Z y FTIR-ATR.
3. Producción de plásmido en E. coli para la obtención de ADN plasmídico.
4. Expresión y purificación del nanoanticuerpo por cromatografía de afinidad.
5. Conjugación del nanoanticuerpo a las nanopartículas de gelatina.
6. Evaluación del direccionamiento del nanosistema en una línea celular tumoral.

7. Materiales

7.1. Reactivos biológicos y químicos.

7.1.1. Bacterias.

La cepa *Escherichia coli* NEB® 5 alpha [fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17] se utiliza para la expresión de plásmido; es resistente fago T1 (fhuA2) y deficiente de endonucleasa A para preparaciones de alta calidad de plásmidos.

La cepa *Escherichia coli* SHuffle® T7 [fhuA2 [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --TetS) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10] fue utilizada para la expresión proteica, controlada mediante el operador de lactosa, y empleando el promotor del bacteriofago T7. Adicionalmente, sobreexpresa en el citoplasma la proteína DsbC, capaz de formar puentes disulfuro, para promover el correcto plegamiento de la proteína en el citoplasma.

La cepa *Escherichia coli* Origami™ B (DE3) [F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522:: Tn10 trxB (KanR, TetR)] fue utilizada para la expresión proteica; tiene mutaciones en glutatión reductasa (gor) y Tiorredoxina reductasa (trxB), facilitando la formación de enlaces disulfuro, para el correcto plegamiento de la proteína con puentes disulfuro en citoplasma.

7.1.2. Medios de cultivo.

Las bacterias se cultivan en medios de cultivo líquidos y sólidos [1.5% agar]. Los medios Luria-Bertani (LB) [1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 0.5% cloruro de sodio] y STAB [1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% cloruro de sodio] se esterilizan por método de calor húmedo en autoclave a 15 psi, 121 °C por 20 min.

7.1.3. Plásmidos.

Para la expresión del nanoanticuerpo (Nb) se utilizó el plásmido pSb_init (Addgene #132698) el cual contiene el nanoanticuerpo TM287/288 Nb_TM#2 (pNb), mismo que fué un

regalo de Markus Seeger. La expresión de la proteína está controlada por el promotor BAD, con marcador de selección cloranfenicol acetil transferasa (cat), que confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol a las células transformadas estables y se induce con arabinosa al 1%.

7.1.4. Reactivos químicos.

Los reactivos químicos empleados: Tris (tris- [hidroxietil]-aminometano), SDS (dodecilsulfato de sodio), EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), acrilamida (2-propenamida), bis-acrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida), TEMED (N,N,N',N-tetra-metilen-etilendiamina), IPTG (Isopropil- β -D-tio-galactopiranosido), APS (persulfato de amonio), Na₂HPO₄ (fosfato bibásico de sodio), etanol (alcohol etílico), reactivo de Traut (2-Iminotiolano), sulfo-MBS (m-maleimidabenzoil-N-hidroxisulfosuccinamida ester) gelatina, glutaraldehído, glicina, bromuro de etidio, cisteína, imidazol, azul de bromofenol, azul de coomassie, ácido bórico y acetato de sodio se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich.

De la compañía FAGA Lab se adquirieron los siguientes reactivos, etanol (alcohol etílico), NaOH (hidróxido de sodio).

De la compañía Merck se adquirieron los siguientes reactivos, CaCl₂ (cloruro de calcio), NaCl (cloruro de sodio) y L-(+)-Arabinosa.

De la compañía Thermo scientific se adquirió el reactivo DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico).

De la compañía Jalmek se adquirieron los siguientes reactivos, HCl (ácido clorhídrico) y glicerol.

Los reactivos β -mercaptoetanol y Poloxamer 188, se adquirieron de Bio-Rad y BASF, respectivamente.

7.2. Equipo.

Para la digitalización y visualización de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie se utilizó el fotodocumentador GelDoc-It (UVP). Las bacterias fueron cultivadas en incubadoras New Brunswick de ambiente controlado y las células eucariotas fueron cultivadas en una

incubadora de CO₂ y ambiente controlado (VWR). La purificación de nanopartículas se realizó en centrifugas, Avanti J-E (Beckman Coulter). El tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z fue medido con el equipo Zetasizer nano ZS (Malvern). La caracterización de los grupos funcionales conformacionales de las nanopartículas por medio del espectrofotómetro de infrarrojo Nicolet iS 5 (Thermo scientific). Las absorbancias para la cuantificación de grupos sulfhidrilo se midieron en el espectrofotómetro DR 6000 (Hach). La cuantificación de proteína y emisión de fluorescencia se midieron en el lector de placas multimodo EnSpire 2300 (PerkinElmer). El liofilizado de nanopartículas para la obtención del rendimiento fue obtenido con el Freezezone 2.5 L -50 °C (Labconco). Los materiales utilizados fueron esterilizados en la autoclave SN300 (Yamato).

8. Métodos.

8.1. Producción de células químicamente competentes.

De forma aséptica se inoculan 10 μ L de un cultivo nocturno en 5 mL de medio LB líquido, se incuba 4 hr a 37 °C, 200 rpm. El cultivo joven es dividido proporcionalmente en cuatro microtubos y se centrifugan 3 min, a 10 000 rpm, el sobrenadante se descarta. Se adicionan 250 μ L de CaCl_2 0.1 M frío a cada microtubo para resuspender con vortex. Posteriormente se mezcla el contenido de los microtubos y se centrifuga 3 min a 10 000 rpm. Se descarta el sobrenadante y el paquete celular se resuspende en 1 mL de CaCl_2 seguido de una incubación de 30 min en hielo. Finalmente se centrifuga 3 min a 10 000 rpm, se descarta el sobrenadante y se resuspendió en 200 μ L de CaCl_2 0.1 M frío.

8.2. Transformación bacteriana.

Las células químicamente competentes preparadas por el método de CaCl_2 fueron transformadas por el método de choque térmico. Brevemente, con técnica aséptica se mezclan 100 ng del plásmido con 50 μ L de células competentes preparadas como previamente se describió, se incuban 30 min en hielo, se incuba a 42 °C por 3 min, posteriormente se incuba 3 min en hielo. Agregar 1 mL de medio LB e incubar 45 min a 37 °C. Se siembran 100 μ L y 900 μ L en medio LB-agar con Cam [25 μ g/ml] y se incuban 16 h a 37 °C.

8.3. Extracción de plásmido por método de lisis alcalina.

Extracción y purificación del plásmido a mini-escala. Se inoculan 3 mL de medio LB suplementado con 25 μ g/mL de cloranfenicol con la bacteria Neb 5 alpha transformada con el pNb. El cultivo se incuba toda la noche a 37 °C y 250 rpm. Con técnica aséptica se separa el cultivo en dos microtubos estériles y se centrifugan 30 seg a 14 000 rpm el sobrenadante se descarta. Para la lisis celular, se resuspende el pellet en 200 μ L de solución 1 de lisis alcalina [EDTA 10 mM, ARNasa 100 μ g/mL, Tris 50 mM, pH 8], seguido de 400 μ L solución 2 de lisis alcalina [NaOH 200 mM, SDS 1%], se mezcla invirtiendo el microtubo 5 veces. Posteriormente, se adicionan 300 μ L solución de lisis alcalina 3 [KCOOH 3M], se mezcla por inversión. Finalmente se centrifuga 10 min a 14 000 rpm y se transfiere el sobrenadante a un microtubo esteril. Para la precipitación del plásmido, se divide el volumen del microtubo en dos microtubos, se añaden dos volúmenes de etanol absoluto, se

mezcla con ayuda de vortex y se dejan reposar 2 min a temperatura ambiente. Se precipitan los ácidos nucleicos mediante centrifugación por 45 min a 14,000 RPM. Posteriormente se descarta el sobrenadante, se añade 1 mL de etanol 70% y se mezclan por inversión para eliminar sales. Se centrifugan durante 2 min a 14 000 rpm, se reúnen las pastillas de ADN en un solo microtubo. Finalmente se centrifuga el microtubo 1 min a 14 000 rpm, se descarta el sobrenadante, se añade 1 mL de etanol puro y para su almacenaje a 4 °C. Para su uso inmediato, se resuspende en 50 µL de TBE 1x [Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3] o agua libre de nucleasas.

Extracción y purificación del plásmido a maxi-escala. Se inoculan 100 mL de medio LB suplementado con 25 µg/mL de cloranfenicol con la bacteria Neb 5 alpha transformada con el pNb, y se incuba toda la noche a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente se prosigue a la extracción de ADN plasmídico, utilizando el kit comercial QIAGEN® Plasmid *Plus* Maxi Kit.

Análisis de ADN plasmídico. El ADN purificado fue analizado y visualizado en electroforesis en gel de agarosa 1% y buffer TBE 1x [Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3]. Las muestras (12 µL) se mezclaron con 6 µL de nucleic acid sample buffer 5x [50 mM Tris-HCl pH 8, 25% glicerol, 5 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol, 0.2% Xileno cianol FF] y se cargó en los pocillos del gel, posteriormente se corre el gel en cámara de electroforesis EDVOTEK® EDGE™ con voltaje de 100 voltios durante 20 minutos, después se tiñe por inmersión el gel en solución de bromuro de etidio [0.1 mg/mL] durante 30 minutos, luego se corre el gel a 100 voltios 5 minutos, finalmente se visualiza en fotodocumentador con filtro ultravioleta.

8.4. Análisis de la expresión de proteína.

8.4.1. Expresión de proteínas totales.

Mini-ensayo de inducción pNb. Se inocula 10 µL de un cultivo ON con la bacteria transformada en 5 mL de medio LB + Cam, se incuba 2 horas a 37 °C, 220 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se divide el cultivo en dos fracciones iguales de 2 mL, una se marca como fracción con inductor "CI" y otra sin inductor "SI". La fracción "CI" se induce con arabinosa (concentración final de 1%), incubando ambas fracciones 2 horas a 37 °C, 220 rpm. Terminada la incubación, centrifugar 1 mL de cada fracción por 2 minutos a 10 000 rpm, se descarta el sobrenadante en cloro. Se resuspende el pellet con 400 µL del buffer de carga desnaturalizante y reductor (Laemli Sample Buffer), incubar durante 10 min a 95 °C,

terminada la incubación, se colocan en hielo. Los lisados bacterianos se separan en electroforesis de gel de poliacrilamida 12% teñidos con azul de coomassie.

Midi-ensayo de inducción y extracción pNb. Se realiza un pre cultivo en condiciones asépticas, se inocula 1 mL de medio LB suplementado con 25 µg/mL de cloranfenicol con la bacteria Origami transformada con el pNb, se incuba toda la noche a 37 °C y 250 rpm. Después se vierten 500 µL del cultivo nocturno a 50 mL de medio LB suplementado con 25 µg/mL de cloranfenicol y se incuba a 37 °C y 250 rpm durante 4 horas, cuando el cultivo alcance el cultivo una OD600= 0.4-0.8, inducir la expresión de proteína añadiendo 1 mL L-(+)-arabinosa 1% (concentración final de 0.02% (p/v)), se incuba toda la noche a 22 °C 230 rpm. Para la extracción de la proteína, se transfiere el cultivo a tubos de 50 mL y se recolectan las células por centrifugación a 4 000 g por 20 minutos, posteriormente se resuspenden las células en 5 mL buffer extracción [Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 3 mM, pH 8.0, Triton X-100 0.1%] e incubar con agitación a 4 °C durante 30 min. Una vez terminado el tiempo de incubación, centrifugar 4 000 g por 20 minutos, el sobrenadante (conteniendo periplasma) se recolecta en un tubo nuevo (periplasma). El pellet celular se resuspende en buffer de lisis, se somete a sonicación durante 2 minutos en lapsos de 15 segundos, se transfiere una alícuota a microtubo limpio y etiquetado como "LT" (lisado total), luego se somete a centrifugación 4 000 g por 20 minutos, el sobrenadante es recuperado en tubo limpio y etiquetarlo como "FS" (fracción soluble) y el pellet como "FI" (fracción insoluble). Las fracciones (periplasma, LT, FS y FI) se mezclan con distintos volúmenes de buffer de carga desnaturante y reductor (Laemli Sample Buffer) y se desnaturalizan incubando durante 10 min a 95 °C, terminada la incubación, se colocan en hielo por 10 min las muestras y se guardan a 4 °C hasta el su análisis en SDS-PAGE.

Midi-ensayo de inducción y extracción mClover3. Se realiza un precultivo en condiciones asépticas, se inoculan 50 mL de medio LB suplementado con 200 µg/mL de ampicilina con la bacteria Neb 5 alpha transformada con mClover3, se incuba 6 horas a 37 °C y 250 rpm. Después, se vierte el precultivo en 200 mL de medio LB suplementado con 200 µg/mL de ampicilina y se incuba toda la noche a 37 °C y 250 rpm. Terminada la incubación, el cultivo se centrifuga a 5 000 rpm durante 3 minutos, descartando el sobrenadante. Las células se resuspenden en buffer de lisis [NaCl 300 mM, Tris-HCl 25 mM] y se somete a sonicación durante 2 minutos en lapsos de 15 segundos, se transfiere una alícuota a microtubo limpio y etiquetado como "LT" (lisado total), luego se somete a centrifugación 10 000 rpm por 45 minutos a 4 °C, el sobrenadante es recuperado en tubo limpio y etiquetarlo como "FS" (fracción soluble) y el pellet como "FI" (fracción insoluble). Las fracciones (LT, FS y FI) se mezclan con distintos volúmenes de buffer de carga

desnaturalizante y reductor (Laemli Sample Buffer) y se desnaturalizan incubando durante 10 min a 95 °C, terminada la incubación, se colocan en hielo por 10 min las muestras y se guardan a 4 °C hasta el su análisis en SDS-PAGE.

8.4.2. SDS-PAGE.

Las fracciones obtenidas en la expresión de proteínas se analizan en SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) para analizar la expresión proteica, las fracciones se cargan en los pocillos del gel apilador 4% [0.5 M Tris-HCl; pH 6.8, 10% APS, 10% SDS, 30% acrilamida/bisacrilamida, TEMED], se emplea running buffer 1X [250 mM Tris; pH 8.3, 192 mM glicina], se inicia con voltaje a 80 voltios hasta que las muestras alcancen el gel separador 15% [1.5 M Tris-HCl; pH 8.8, 10% APS, 10% SDS, 30% acrilamida/bisacrilamida, TEMED], posteriormente incrementar el voltaje a 125 volts hasta que el frente de corrido recorra el gel. A continuación, se retira el gel de la cámara y placas de vidrio, se procede a teñir en solución de tinción A [10% ácido acético, 10% isopropanol, 0.003% Azul de Coomassie] por 30 minutos. Seguido de tinción en solución de tinción B [10% ácido acético, 0.003% Azul de Coomassie] por 1 hora. Finalmente, el gel se destiñe toda la noche en agitación constante con solución de destañir [10% ácido acético].

8.4.3. Purificación de proteína.

El nanoanticuerpo será purificado empleando una etiqueta de poli histidinas que permite su inmovilización en una columna de afinidad a metales, específicamente níquel. Para la utilización de la columna, esta fue lavada con 10 volúmenes de wash buffer [NaOH 0.5 M, NaCl 2 M] mantener en agitación por 10 minutos a 4 °C y centrifugar a 2 200 rpm durante 3 minutos, retirar el sobrenadante. Posteriormente, se agregan 10 volúmenes de Tris 20 mM, pH 8.0, mantener en agitación por 10 minutos a 4 °C y centrifugar a 2 200 rpm durante 3 minutos, finalmente se retira el sobrenadante y se procede a la purificación de proteína.

En tubo cónico con 1 mL de resina de níquel se agrega 1 mL de la fracción periplasma obtenida en la expresión de proteína, dejar incubando en agitación 12 horas a 4 °C. Luego se centrifuga a 2 200 rpm durante 3 minutos, se recolecta el sobrenadante y se almacena como fracción no unida (FN). Posteriormente se lava dos veces la resina con 5 volúmenes wash buffer [Tris 20 mM, pH 8.0] mantener en agitación durante 10 minutos a 4 °C y centrifugar a 2 200 rpm durante 3 minutos, se recolectan los sobrenadantes en

microtubos y se guardan como “wash 1” y “wash 2”, respectivamente. Para la elución de la proteína mediante un exceso de imidazol, se agrega medio volumen (500 μ L) de elution buffer [NaPO_4 50 mM, pH 8.0, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM, Tween 20 0.1%] a la resina, mantener en agitación por 10 minutos a 4 °C y centrifugar a 2 200 rpm durante 3 minutos, se recolecta el sobrenadante en microtubos y se guarda como “elución 1”, se repite la elución 6 veces. Finalmente se lisan las fracciones obtenidas con fracciones con 12 μ L del buffer de carga desnaturizante y reductor (Laemli Sample Buffer), incubar durante 10 min a 95 °C, terminada la incubación, se colocan en hielo las muestras por 15 minutos y se guardan a 4 °C para su análisis.

8.4.4. Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.

La concentración de proteína se cuantifica mediante un ensayo de Bradford. Se realiza una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (BSA) a distintas concentraciones finales (0, 2, 20, 200, 400, 600 μ g/mL). En microplaca se colocaron 10 μ L de muestras estándar y desconocidas, enseguida se mezclan con 200 μ L del reactivo de Bradford [Azul brillante Coomassie G250 0.01%, Etanol 4.7%, ácido fosfórico 8.5%] y se incuban 5 minutos a temperatura ambiente. Se realiza la lectura de absorbancias a 595 nm.

8.5. Síntesis de nanopartículas de gelatina por método nanoprecipitación.

Adicionar por goteo 1 mL de solución de gelatina [12.5 mg/mL] a pH 8, 50 °C; a 20 mL de solución etanol/poloxamer [2% p/v] y se mezcla con agitación 15 min. Para el entrecruzamiento de las nanopartículas, se añaden 30 μ L de glutaraldehído al 5%, se mantiene en agitación por 12 hr. Finalmente purificar las nanopartículas mediante ciclos de centrifugación 15 min a 10 000 g y resuspender el precipitado final en 3 mL de agua desionizada.

8.6. Adición de grupos tiol a nanopartículas.

Se agrega 1 mL de suspensión de nanopartículas (4 mg/mL) a 2.5 mL de 2-iminotiolano en buffer tris [12 mg/mL, pH 8.5], se mezcla e incuba toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, purificar las nanopartículas realizando 5 lavados de centrifugado a 12 000 g por 8 min, entre cada ciclo se descarta el sobrenadante y se resuspende la pastilla en agua desionizada por sonicación. Los grupos tiol serán

cuantificados por espectrofotometría UV-VIS (412 nm) con ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico).

8.7. Caracterización de nanopartículas de gelatina.

8.7.1. Dispersión de luz dinámica y potencial zeta.

El tamaño de partícula se determina mediante dispersión de luz dinámica (Zetasizer nano ZS, Malvern), brevemente, se coloca 1 mL de solución de nanopartículas en la celda y se procede a analizar en el equipo, con un índice de refracción 1.2, dispersión de luz 90 °, tiempo de equilibrio de 120s y temperatura 25 °C. Para la medición del potencial eléctrico, se colocan 800 uL de muestra en una celda DTS1070 y se procede a la medición en el equipo con voltaje automatizado de acuerdo a la conductividad de la muestra.

8.7.2. Espectroscopia de infrarrojo.

La caracterización de los grupos funcionales se determina por espectroscopia de infrarrojo (Nicolet iS 5, Thermo scientific), brevemente, se limpia con etanol el módulo de reflectancia total atenuada, luego se colocan 10 mg de las muestras de gelatina, glutaraldehído, nanopartículas en solución y liofilizadas en dicho módulo con ayuda de una espátula y se analiza en el equipo, con 16 lecturas a una humedad menor a 38%.

8.7.3. Cuantificación grupos tiol.

Mediante espectrofotometría UV-VIS se cuantifican los grupos tiol añadidos a la superficie de la nanopartícula con reactivo de Ellman's [4 mg/mL] siguiendo la metodología propuesta por Thermo scientific, utilizando una curva patrón con cisteína [0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y 1.25 mM]. En microtubos se colocaron 125 µL de las muestras estándar y desconocidas, se mezclaron con 25 µL del reactivo de Ellman's e incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. La lectura de las absorbancias en celda de 1 cm, a una longitud de onda de 412 nm.

8.8. Conjugación de nanopartículas de gelatina con proteína.

La proteína purificada se activa incubando 500 μ L de la proteína (1 mg/mL) en buffer de fosfato (PBS) [NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM; pH 7.4] con un exceso 3 molar de linker sulfo-MBS [1.5 mg concentración final] y se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. El excedente de linker se elimina mediante cromatografía de exclusión de tamaño en columnas de desalinización PD10. Brevemente, la columna PD10 se equilibra con 25 mL de PBS, centrifugando a 1 000 g por 2 minutos, descartando la elución; posteriormente se añade la proteína y se centrifuga a 1 000 g por 2 minutos, se recupera la elución y se cuantifica en espectrofotómetro a 280 nm para monitorear la proteína. La proteína se conjuga con las nanopartículas, mezclando 3.5 mL de proteína (232 μ g/mL) con 1.5 mL de nanopartículas tioladas (1.6 mg/mL), incubando en agitación toda la noche a 4 °C, posteriormente, se realizan 2 ciclos de purificación 16 000 g por 10 minutos para retirar la proteína no unida, redispersando en volumen igual de PBS. Finalmente, la cantidad de proteína conjugada se determina indirectamente, cuantificando la proteína no unida por método Bradford y emisión de fluorescencia. El complejo nanopartícula-proteína se almacena a 4 °C.

8.9. Estudio de biocompatibilidad de nanopartículas de gelatina.

La biocompatibilidad de las nanopartículas de gelatina en una línea celular tumoral se evalúa mediante ensayo de viabilidad celular mediante MTT (bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para el estudio se utilizan células de neuroblastoma (BE(2)-C), cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina y 0.1% gentamicina. Brevemente, se siembran 7.5×10^4 células por pocillo en placa de 96 pocillos y se incuban a 37 °C y 5% CO_2 durante 24 horas. Posteriormente, el medio de cultivo es reemplazado por medio de cultivo con las nanopartículas de gelatina y solución de gelatina en distintas concentraciones (0.1, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/mL). Después de 24 horas de incubación, se agregan 5 μ L del reactivo MTT y 45 μ L de medio a cada pocillo, pasadas 4 horas de incubación, se agregan 50 μ L del buffer de solubilización y se incuban toda la noche. Finalmente, la viabilidad celular es calculada después de analizar la absorbancia medida a 620 nm en lector de placas.

9. Resultados y discusión.

9.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de gelatina.

Con la finalidad de analizar el tamaño, potencial eléctrico y grupos funcionales conformacionales de las nanopartículas, se realizaron caracterizaciones por dispersión de luz dinámica (DLS), potencial zeta y espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR). Las nanopartículas de gelatina fueron sintetizadas por el método de nanoprecipitación (figura 1), donde las partículas se forman debido a la unión de agua y etanol a causa de la turbulencia/precipitación generada por el desplazamiento del solvente. El valor de pH en la solución de gelatina es uno de los factores importantes a considerar, debido a que, este puede afectar la estructura y carga de la gelatina, así mismo, se utiliza como entrecruzante glutaraldehído para conferir estabilidad a las nanopartículas.

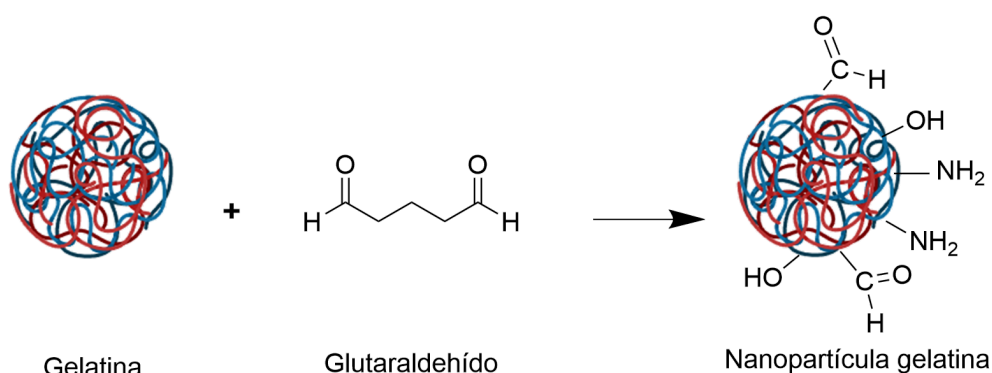


Figura 1. Síntesis de nanopartículas de gelatina. Síntesis por el método de nanoprecipitación, entrecruzadas con glutaraldehído 5%.

9.1.1. Tamaño hidrodinámico.

El tamaño de las nanopartículas con y sin entrecruzante ronda entre 270 y 300 nm con un índice de polidispersidad bajo, indicando la obtención de una mono dispersión, además de ser un método reproducible, mostrado en los gráficos de tamaño de la figura 2. Las nanopartículas utilizadas para la continuación de experimentos presentaron un tamaño de partícula de 268 nm, con un PDI de 0.310 (RX21), tal como se muestra en la tabla 1. Los tamaños de partícula concuerdan con lo establecido en la literatura, Kuo y colaboradores, sintetizaron nanopartículas de gelatina por el mismo método utilizado en este trabajo, obteniendo tamaños de partícula entrecruzada de aproximadamente 290 nm,

con PDI 0.204 [24]. En otro estudio, Chu y colaboradores, obtuvieron un tamaño de nanopartícula de gelatina de 349 nm con PDI de 0.08, sintetizadas por el método de doble desolvatación [27].

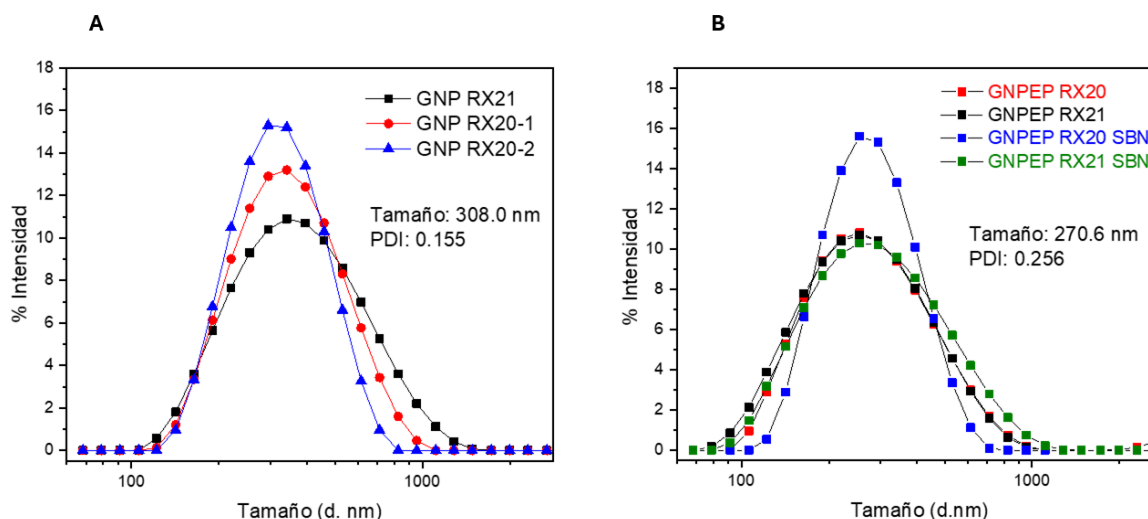


Figura 2. Gráficos de tamaño de partícula: Resultado de tamaño hidrodinámico mediante DLS. (A) nanopartículas de gelatina sin entrecruzante. (B) nanopartículas con entrecruzante. n=3.

9.1.2. Potencial Zeta.

El potencial Z de las nanopartículas ronda entre los 17 y 22 mV, denotando un potencial eléctrico positivo atribuido a los grupos aminos presentes en la gelatina. Las nanopartículas utilizadas para la continuación de experimentos presentaron un potencial zeta de +22.2 mV (RX21), tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de nanopartículas. tamaño hidrodinámico y potencial eléctrico de las nanopartículas entrecruzadas. n=3.

Síntesis	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	PDI	Rendimiento (%)
Rx 20	272	+18.6	0.254	101
Rx 21	268	+22.2	0.285	84

9.1.3. Grupos conformacionales de las nanopartículas.

La técnica de espectroscopía infrarroja permite la identificación de grupos funcionales de un compuesto, basada en la absorción diferencial de radiación infrarroja convirtiéndola en vibraciones moleculares que corresponden a un enlace específico.

Se compararon las nanopartículas en solución y liofilizadas. Como control se muestran los espectros de gelatina y glutaraldehído 25%. La gelatina muestra bandas alrededor de los 3300 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} características del estiramiento y doblamiento, respectivamente, del enlace N-H; y la banda a 1640 cm^{-1} del doble enlace C=O, presentes en la estructura de dicha proteína. Para glutaraldehído, se observa la banda a 1650 cm^{-1} denotando el enlace C=O, correspondiente al aldehído y también banda del enlace O-H a 3300 cm^{-1} correspondiente al agua presente en el entrecruzante.

Para las especies en solución no se logran apreciar todas las bandas correspondientes a los grupos funcionales esperados, esto debido a que al estar en solución quedan restos de los solventes y entrecruzante utilizados en la síntesis que camuflan las señales (figura 3). Por lo que, se procedió a liofilizar las muestras, donde el espectro nos confirma la presencia de nanopartículas por la banda del estiramiento N-H a 3300 cm^{-1} y el doblamiento a 1558 cm^{-1} , pertenecientes a la gelatina; así mismo, se observa el enlace C=O a 1650 cm^{-1} del glutaraldehído, indicando que las nanopartículas se entrecruzaron de manera exitosa. Se logró observar una banda perteneciente al enlace C-N a 1100 cm^{-1} , característico de las aminas en solución, indicando que nuestra muestra contaba con humedad, con lo que se puede identificar la interferencia del espectro correspondiente al material liofilizado (figura 4). Debido a la presencia de humedad en la muestra anterior, se procedió nuevamente a liofilizar y analizar la muestra, el espectro obtenido no presenta la banda del enlace C-N, indicando una liofilización completa (figura 5).

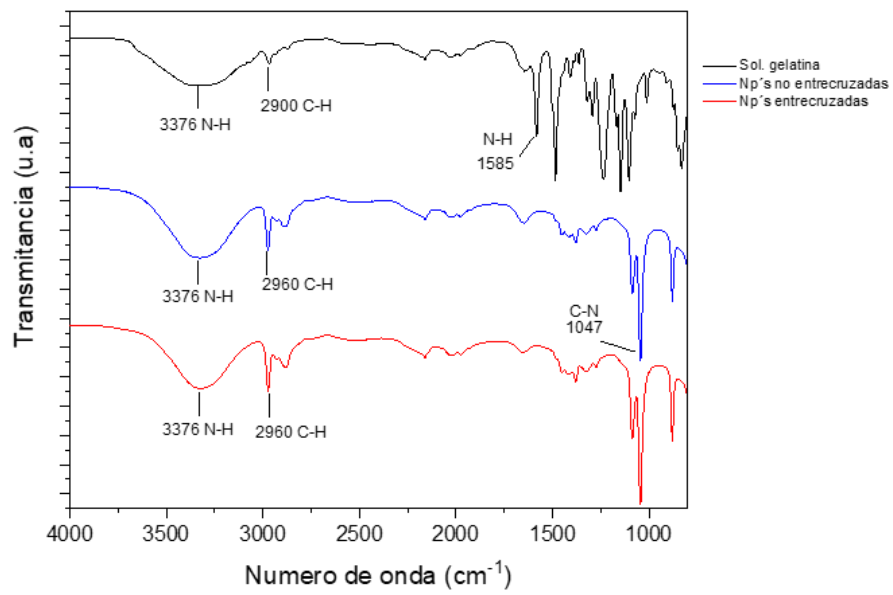


Figura 3. Espectroscopia de infrarrojo. Espectro de nanopartículas de gelatina en solución.

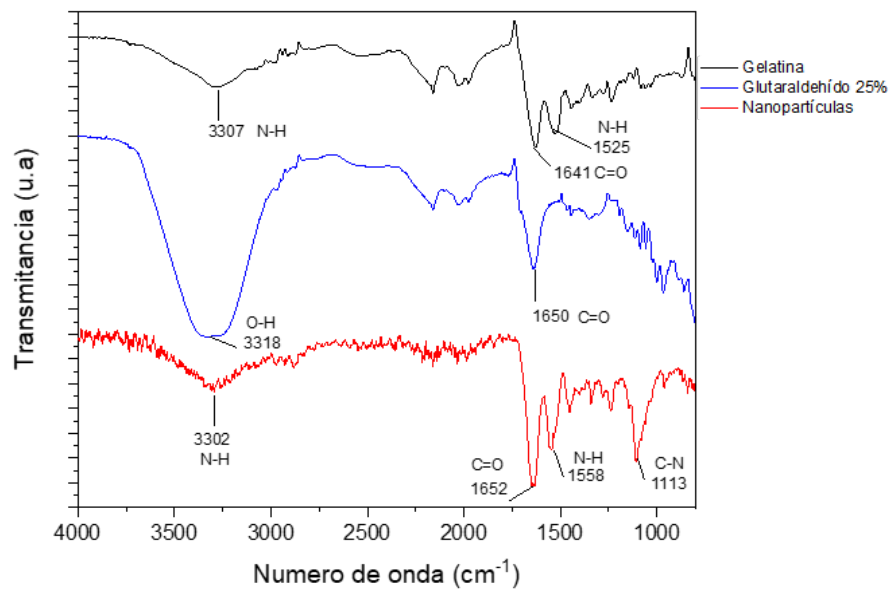


Figura 4. Espectroscopia de infrarrojo. Espectro de nanopartículas de gelatina liofilizadas con presencia de humedad.

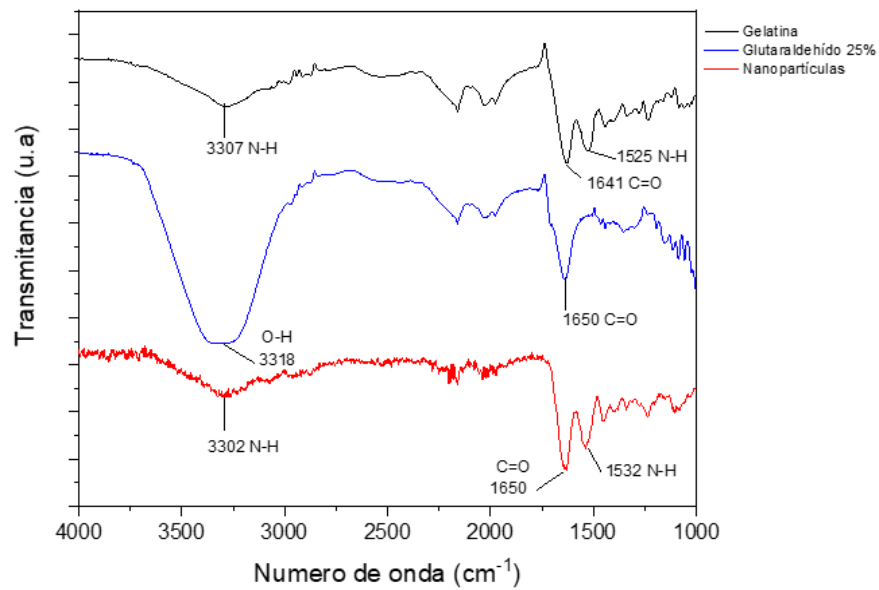


Figura 5. Espectroscopia de infrarrojo. Espectro de nanopartículas de gelatina liofilizadas en condiciones ideales durante 48 horas.

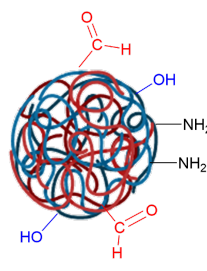
Tabla 2. Identificación de bandas de infrarrojo de gelatina.

Enlace	Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Gelatina
N-H	Amina	3307 y 1525	
C=O	Carbonilo	1641	

Tabla 3. Identificación de bandas de infrarrojo de glutaraldehído.

Enlace	Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Glutaraldehído
O-H	Hidroxilo	3318	
C=O	Carbonilo	1660	

Tabla 4. Identificación de bandas de infrarrojo de nanopartículas.

Enlace	Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Nanopartículas
N-H	Amina	3302 y 1532	
C=O	Carbonilo	1660	

9.1.4. Cuantificación de grupos sulfhidrido.

Los grupos amino de la superficie de la nanopartícula de gelatina fueron convertidos a grupos tiol para la formación del complejo nanopartícula-proteína. El compuesto de tiolación 2-iminitiolano reacciona de manera específica y espontánea con aminas primarias para añadir un pequeño separador mediante sulfhidrilos.

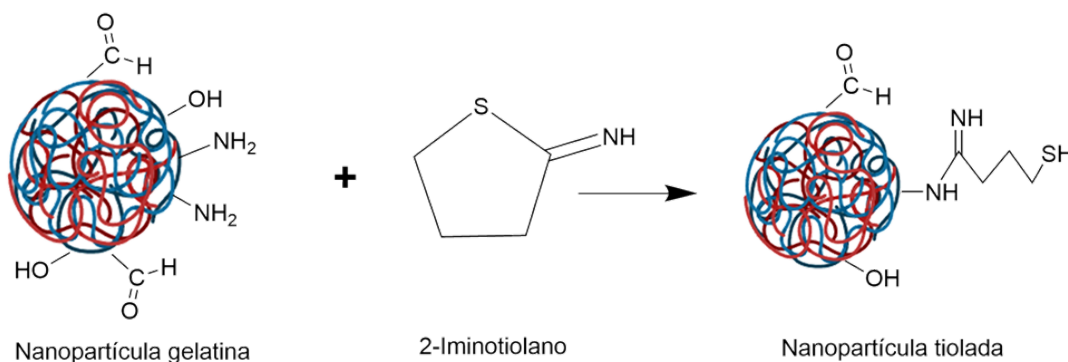


Figura 6. Formación de nanopartículas tioladas con 2-iminitiolano.

Las absorbancias obtenidas de las diferentes soluciones estándar para la elaboración de la curva de calibración se muestran en la tabla 5. Mediante la extrapolación se obtuvieron concentraciones de tioles unidos a la nanopartícula de gelatina previamente sintetizada.

La ecuación del gráfico correspondiente a la curva de calibración es la siguiente:
 $y = 0.6944x + 0.0174$; $r = 0.9998$, como se muestra en la figura 7.

Tabla 5. Cuantificación de grupos sulfhidrido. Absorbancias de la solución estándar, cisteína, y nanopartículas tioladas, mediante espectrofotometría a 412 nm.

Estándar	Concentración	Absorbancia
A	1.5 mM	1.473
B	1.25 mM	0.883
C	1.0 mM	0.711
D	0.75 mM	0.544
E	0.5 mM	0.365
F	0.25 mM	0.188
Blanco	0.0 mM	0.000
RX 21	3.31 mM	2.317
Lavado 1	3.69 mM	2.582

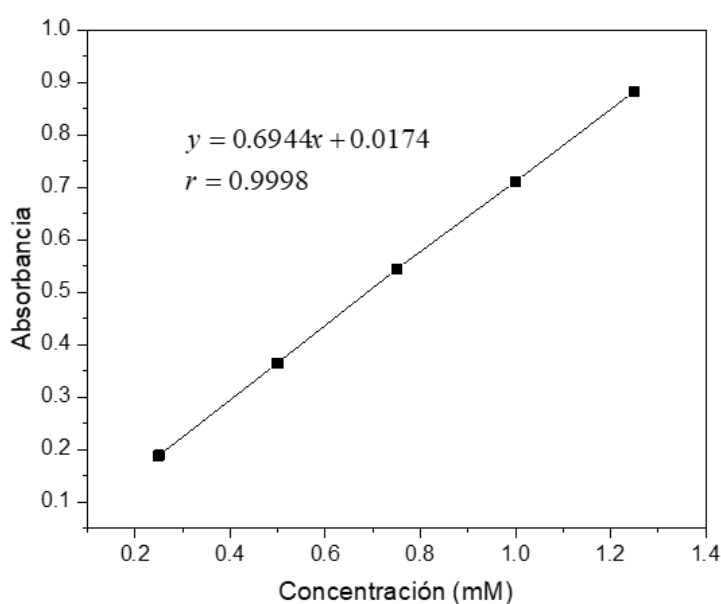
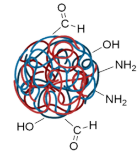
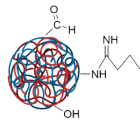


Figura 7. Curva de calibración con cisteína, medición de absorbancias a 412 nm.

Adicionalmente, se midió el tamaño de partícula y potencial eléctrico de la nanopartícula tiolada, comparado los resultados obtenidos (tabla 6) con las nanopartículas de gelatina sin modificación, observamos un incremento de tamaño a 367 nm y un cambio en el potencial eléctrico a -7.08 mV. Con lo anterior, podemos inferir la correcta adición de grupos tiol a las nanopartículas.

Tabla 6. Caracterización de nanopartículas. Comparación de tamaño hidrodinámico y potencial eléctrico de las nanopartículas entrecruzadas con nanopartículas tioladas.

Síntesis	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	PDI	Estructura
Rx 21	268.5	+22.2	0.285	
Rx 21-tiol	367.2	-7.08	0.794	

9.2. Transformación de células.

La transformación de células químicamente competentes empleando el pNb TM287/288, en la cepa *E.coli* Origami debido al ambiente reductor de la bacteria que propicia la formación de enlaces disulfuro para el correcto plegamiento de la bacteria. Se seleccionan clonas capaces de crecer en presencia de cloranfenicol, las cuales presentaban morfología uniforme, circular de color crema. El número de unidades formadoras de colonias (UFC), en el control de viabilidad fueron incontables, esto siendo un resultado esperado, debido que nos indica que tenemos células viables para la transformación, caso contrario tenemos el control de células no transformadas en medio suplementado con antibiótico, donde no se encontraron UFC, ya que las células al no tener el plásmido no tenía la capacidad de crecer en presencia de dicho antibiótico. Finalmente, los experimentales de células transformadas, donde esperamos la presencia de UFC, dado que estas células al tener internalizado el plásmido tienen resistencia al antibiótico, obteniendo 13 y 90 UFC en cada experimental, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Clonas transformadas con plásmido Nb.

Muestra	Medio	UFC
Control viabilidad celular	Luria Bertani	Incontables
Control células no transformadas	Luria bertani + cloranfenicol	0
Células transformadas (100uL)	Luria bertani + cloranfenicol	13
Células transformadas (900uL)	Luria bertani + cloranfenicol	90

9.3. Extracción y purificación de plásmido.

Se tomó 1 UFC de cepa transformada con pNb TM287/288 para la extracción y purificación por el método de lisis alcalina, donde la presencia de NaOH y un detergente aniónico (SDS), nos permitió obtener el ADN plasmídico. Posteriormente se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm utilizando un factor de conversión (50) y se analizó en gel agarosa 1%. La concentración obtenida mediante espectrofotometría, fue de de 10 µg/mL, correspondiente a una absorbancia 0.200; así mismo, la confirmación del mismo de pNb en gel agarosa 1%, como se observa en la figura 8.

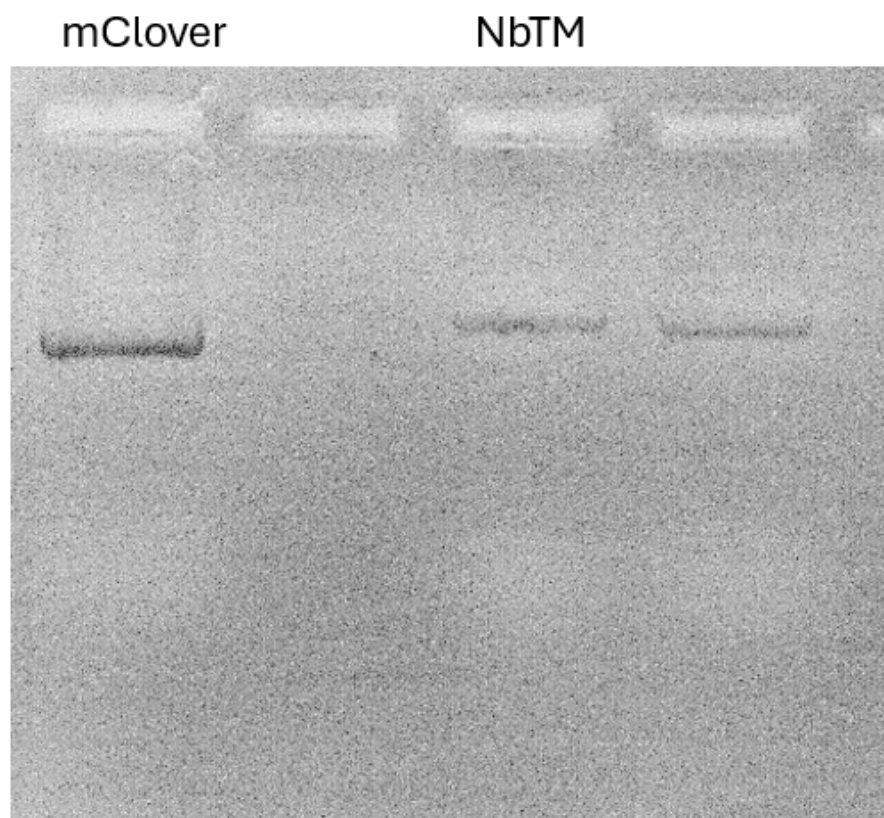


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1% del pNb, purificado mediante lisis alcalina en maxi-escala.

9.4 Análisis de la expresión y purificación de proteínas.

Análisis mClover3. El vector de expresión pNCS-mClover3 que contiene el gen mClover3, controlado por el promotor T7, el cual facilita su expresión sin necesidad de inductor. Después del crecimiento a gran escala sin inducción toda la noche, se obtienen los

lisados bacterianos que portan el plásmido mClover3, de una pastilla celular de 500 mL de cultivo.

Para evaluar la expresión de la proteína deseada, se realizó mediante SDS-PAGE 15%, donde con ayuda de un marcador de peso molecular logramos identificar la proteína. Como se muestra en la figura 9, las diluciones E1, E2, E3 y E4, muestran un patrón de migración correspondiente al tamaño de proteína deseado (27 kDa). Adicionalmente, se muestra una banda cercana a los 55 kDa, indicando una posible dimerización de la proteína.

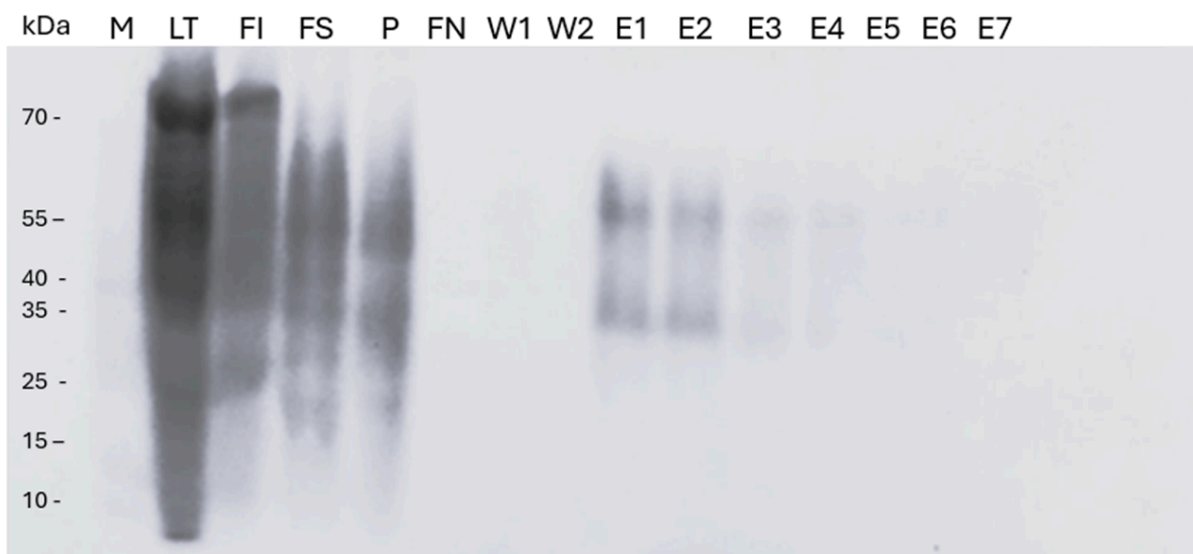


Figura 9. Separación electroforética (SDS-PAGE 15%) de las fracciones proteicas recolectadas durante la cromatografía de afinidad de metales para purificar la proteína mClover3.

Análisis Nb. El vector de expresión pSb_Init-Nanobody Nb_TM contiene el gen de un nanoanticuerpo TM 287/288, que está controlado por el promotor BAD, el cual permite la inducción de la expresión proteica mediante arabinosa. Después de una inducción toda la noche, y obtener la pastilla celular de un cultivo de 500 mL, el periplasma fue recolectado para la posterior purificación de la proteína.

Para evaluar la expresión de la proteína de interés inducida con arabinosa, se realizó mediante SDS-PAGE al 15%, donde por comparación con el marcador de peso molecular logramos identificar la proteína. En la figura 10, en los carriles E1 y E2, se lograron observar ligeras bandas entre 25 y 35 kDa, concordado con el tamaño molecular esperado de la proteína de 20 kDa aproximadamente. Adicionalmente, se lograron observar bandas entre los 70 y 40 kDa, indicando una posible copurificación de alguna proteína o formación de un dímero.

Por lo anterior, se realizó un cultivo control manejado en las mismas condiciones que el cultivo de expresión proteica, a excepción de la inducción con arabinosa. Posteriormente, las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 15% y se comparó con el cultivo inducido. Como se puede observar en la figura 11, tanto las fracciones en ausencia de inductor como el lisado en presencia de inductor, muestran patrones de migración similares dentro de los 50 y 70 kDa, sin embargo, las fracciones inducidas con arabinosa presentan una banda cercana a 20 kDa, concordante con el peso molecular de la proteína de interés.

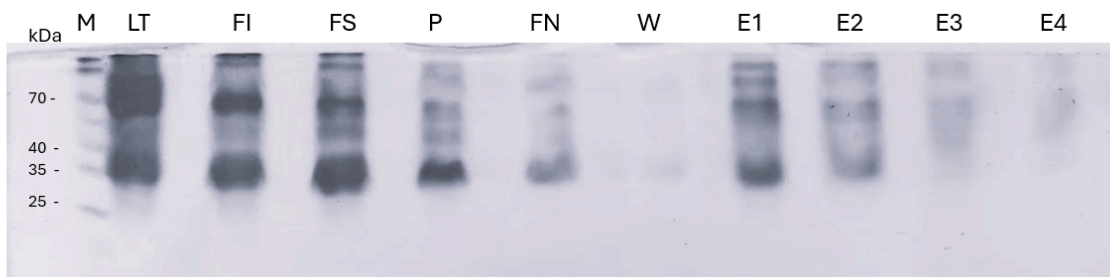


Figura 10. Separación electroforética (SDS-PAGE 15%) de las fracciones proteicas recolectadas durante la cromatografía de afinidad de metales para purificar la proteína Nb.

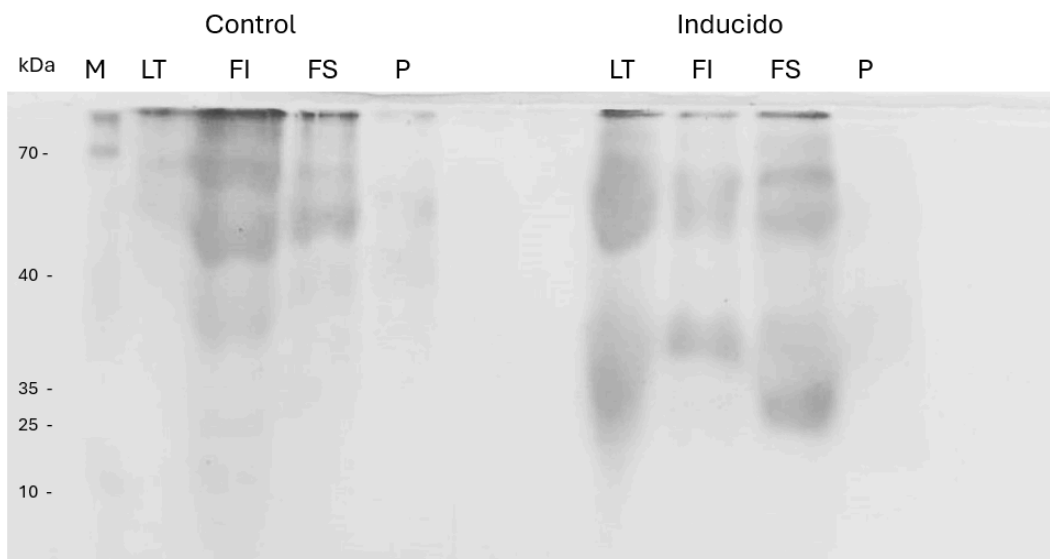


Figura 11. Separación electroforética (SDS-PAGE 15%) de las fracciones de las cepas que portan el plásmido pNb, en dos condiciones de expresión proteica: ausencia y presencia de arabinosa 1%.

9.4.1. Cuantificación de proteínas.

Las proteínas purificadas mediante cromatografía de afinidad de metales, fueron cuantificadas por el método de Bradford, con la finalidad de conocer la concentración de dichas proteínas al momento de su conjugación con las nanopartículas. Se mezclaron las diluciones E1, E2, y E3, y fueron colocadas en una bolsa de diálisis de 12 kDa, en PBS [NaCl 300 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM; pH 7.4] durante 24 horas, para su posterior análisis. Para el caso de la proteína mClover3, se obtuvo una concentración de 1.01 mg/mL, con una intensidad de fluorescencia de 36 855 unidades relativas de fluorescencia. Por otro lado, se obtuvo 1.09 mg/mL de la proteína Nb.

9.5. Evaluación del conjugado nanopartícula-proteína.

La formación del conjugado nanopartícula-proteína se llevó a cabo con ayuda de un entrecruzante heterobiofuncional, sulfo-MBS; donde los grupos éster del entrecruzante reaccionan con las aminas primarias de la proteína a pH 7-9, formando enlaces amida. Por otro lado, los grupos maleimida del sulfo-MBS interactúan con los grupos tiol de la nanopartícula formando enlaces tioéter estables, teniendo así un espaciador de 7.3 Å (figura 12).

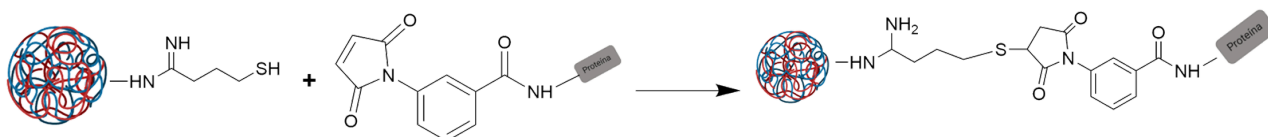


Figura 12. Formación del complejo nanopartícula-proteína.

Primeramente, se realizó la conjugación entrecruzante-mClover3, donde el excedente de entrecruzante es retirado con una columna desalinización (PD10), donde al pasar por esta columna, nuestra proteína se diluyó llegando a una concentración final de 232 µg/mL. Posteriormente se procedió a la formación del conjugado nanopartícula-mClover3 y se evaluó por fluorescencia, tamaño de partícula y potencial zeta.

Como se observa en la figura 13, el tamaño de partícula aumenta cuando se forma el complejo, pasando de 367 nm a 458 nm y cambio de potencial eléctrico a -15.5 mV, indicándonos la formación de un complejo nanopartícula-proteína. Sin embargo, los resultados de emisión de fluorescencia mostrados en la figura 14, mostraron la disminución de fluorescencia conforme se realizaron los ciclos de purificación, esto pudo deberse a que

la cantidad de proteína utilizada fue pequeña comparada a las reportadas en artículos, las cuales van desde 2.5 a 14 mg/mL de proteína [24, 25, 26]. Comparados con 232 µg/mL de la proteína mClover3 empleados en este experimento.

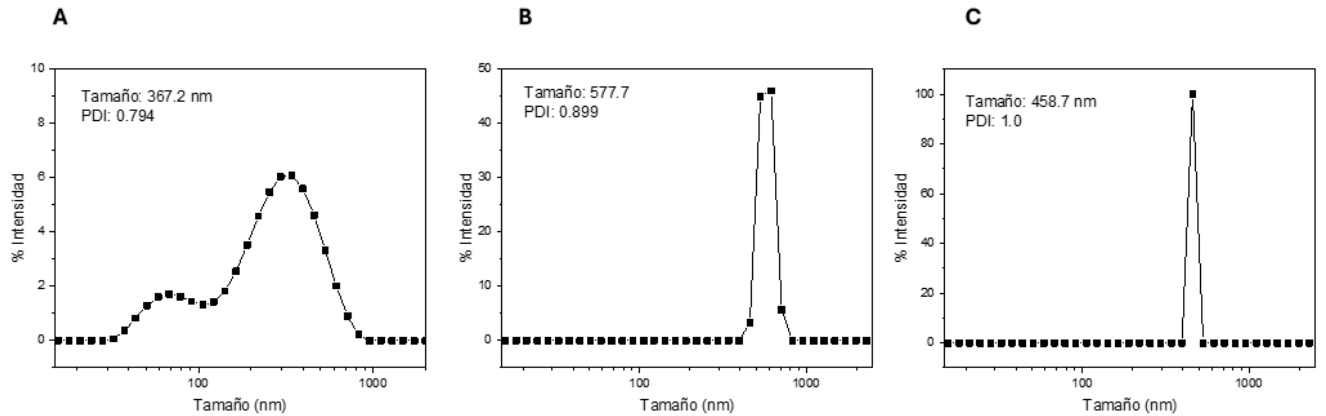


Figura 13. Caracterización de conjugado Np-P. Gráficas de tamaño hidrodinámico de nanopartículas por dispersión de luz dinámica. (A) nanopartículas tioladas, (B) conjugado nanopartícula-proteína sin purificar, (C) conjugado nanopartícula-proteína purificado.

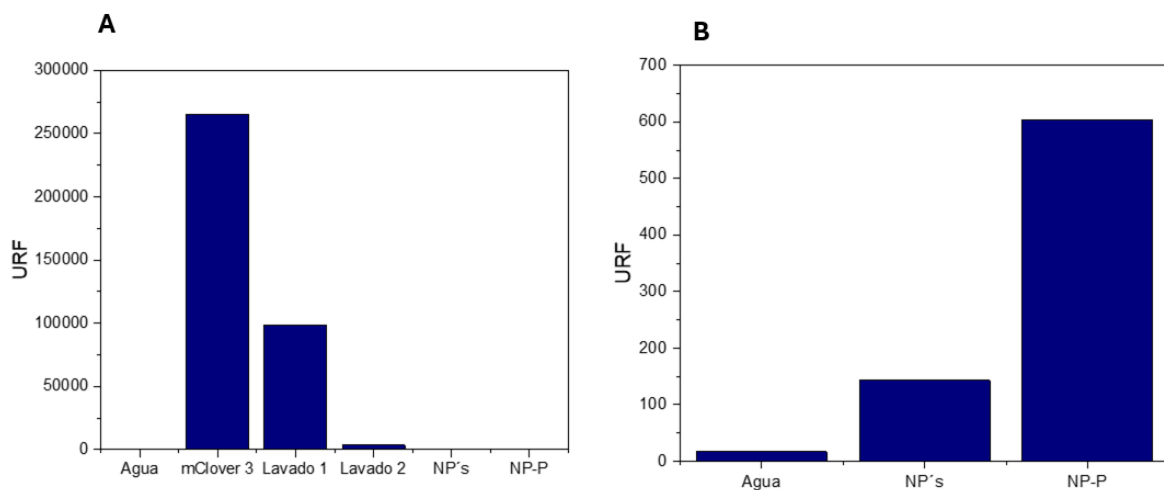


Figura 14. Emisión de fluorescencia. (A) unidades relativas de fluorescencia de la proteína mClover3, lavados, nanopartículas y conjugado nanopartícula-proteína, (B) agua, nanopartículas y conjugado nanopartícula-proteína; longitud de excitación de 477 nm y emisión de 520 nm.

9.6. Biocompatibilidad de nanopartículas.

La biocompatibilidad de las nanopartículas de gelatina fue determinada mediante ensayo de viabilidad celular con MTT, en línea celular (BE(2)-C). Se realizó un micro-ensayo, utilizando diferentes concentraciones de nanopartículas, que fueron comparadas contra solución de gelatina.

Después de 24 horas de incubación con las nanopartículas, el número de células viables fue determinado mediante sal de tetrazolio (MTT, bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio). El MTT, es bio-reducido por células viables a formazán, un producto colorido. Esta reducción está relacionada con la producción de NADPH por enzimas de las células activas metabólicamente.

Como se observa en la figura 15, las nanopartículas en concentraciones de 0.1-1 mg/mL, demuestran buena biocompatibilidad, dado que el porcentaje de células viables se encuentra por arriba del 70%, entre las concentraciones de 0.1-0.25 mg/mL de nanopartículas no se observa inhibición, puesto que las células superan el 100% de células viables, esto de acuerdo a lo establecido en la ISO 10993-5, donde se considera efecto citotóxico la reducción de más del 30% de la viabilidad celular. Por otro lado, la solución de gelatina tiene un efecto similar, entre las concentraciones de 0.1-0.25 mg/mL no se muestra inhibición celular; en cambio, entre las concentraciones 0.5-1 mg/mL, el porcentaje de células viables es menor a 10%. Con estos resultados, podemos decir que las nanopartículas de gelatina entrecruzadas con glutaraldehido presentan buena biocompatibilidad en línea celular de neuroblastoma (BE(2)-C), considerándose como un posible acarreador de fármacos.

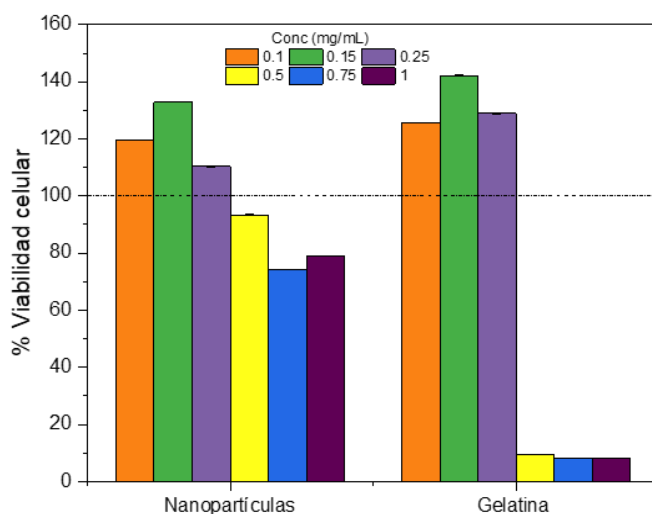


Figura 15. Viabilidad celular de células (BE(2)-C) tratadas con nanopartículas de gelatina y solución de gelatina. n=3.

9.7. Discusión.

La enfermedad del cáncer es una de las primeras cinco causas de muerte en México [4]. Aunque existen terapias para tratar el cáncer, estas son inespecíficas, causando efectos adversos como citotoxicidad, cardiotoxicidad y mielosupresión, otros leves como náuseas, vómitos, pérdida de peso y cabello. Por lo que, es importante la búsqueda de nuevas estrategias de acarreamiento de fármacos o moléculas, que sean específicos y sin efectos adversos. Para el tratamiento de cáncer en este trabajo, se propuso la síntesis de nanopartículas de gelatina y su acoplamiento a un nanoanticuerpo, con el objetivo de dirigir a células cancerosas una carga útil y evaluar su efecto.

La gelatina es obtenida de la hidrólisis de colágeno y existe en dos tipos, tipo A y B. En este trabajo, se empleó el tipo A, el cual posee una carga neta positiva, debido a los residuos de arginina y lisina que posee carga positiva. Para formar el complejo nanopartícula-nanoanticuerpo los grupos de las nanopartículas de gelatina fueron modificadas con 2-iminotiolano, introduciendo grupos tiol, reaccionando de manera específica con aminas primarias para añadir un pequeño separador, con el cual se podrá lograr el acoplamiento del nanoanticuerpo. En cambio, la proteína purificada fue activada con un entrecruzante heterobiofuncional, sulfo-MBS, donde sus grupos éster reacciona con aminas primarias de la proteína para formar enlaces amida; por otro lado, los grupos maleimida del sulfo-MBS interaccionan con los grupos tiol de la nanopartícula formando enlaces tioéter estables, generando un espaciador entre la nanopartícula y proteína.

Las nanopartículas sintetizadas por el método de nanoprecipitación, entrecruzadas con glutaraldehído para evitar la agregación de las partículas, y con grupos tiol en su superficie, obtuvieron un tamaño de 367.2 nm y un potencial zeta de -7.08 mV. Después de conjugar las nanopartículas con la proteína, el tamaño de partícula aumentó a 458.7 nm y el potencial zeta cambió a -15.5 mV, indicando la conjugación covalente de la proteína con la nanopartícula. La proteína unida, es una proteína verde fluorescente, por lo que, otra forma de confirmar su unión fue con emisión de fluorescencia. En dicho análisis, la fluorescencia del complejo fue 604 unidades relativas de fluorescencia (RFU) y 16.5 RFU del agua (blanco), denotando un aumento de en la fluorescencia del complejo. Sin embargo, comparado con 265 530 RFU de la proteína sola, se observa que el aumento de fluorescencia es ligero, esto puede deberse a que la cantidad de proteína añadida fue muy poca, ocasionando este resultado de fluorescencia en el conjugado.

respecto a la funcionalización de las nanopartículas, la falta de fluorescencia refleja una pobre eficiencia en la reacción, lo cual puede deberse por: (1) la cantidad de sulfo-MBS agregada para la activación de la proteína fue insuficiente para la concentración de la misma, aunque lo agregado (exceso 3 molar) fue en base a los protocolos publicados donde demuestran éxito, la guía de uso del reactivo sulfo-MBS, recomienda un exceso 10 molar con respecto a la concentración de proteína utilizada. Por lo tanto, puede que no toda la proteína haya sido activada para su posterior conjugación con las nanopartículas. (2) la concentración de proteína utilizada fue muy poca comparada a lo reportado en los protocolos publicados. Balthasar y colaboradores, prepararon y caracterizaron nanopartículas de gelatina con anticuerpos como acarreador de fármacos, donde agregan 2.5 mg de proteína para la formación del complejo [25]. En otro estudio, Kuo y colaboradores, utilizaron la misma técnica de acoplamiento para un quimioterapéutico, gemcitabina, donde, agregan 14 mg/mL del agente terapéutico para la síntesis del complejo [24]. En el presente trabajo, se agregó 232 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína mClover3, dado que, al eliminar el excedente de sulfo-MBS en columna desalinización (PD10), la proteína se diluyó, obteniendo la concentración final mencionada anteriormente. Comparando las concentraciones de proteína utilizadas en los estudios de referencia, la cantidad añadida fue muy poca, lo que explicaría la falta de fluorescencia en el conjugado. Sin embargo, Balthasar y colaboradores, sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de gelatina modificadas con anticuerpos como sistemas acarreadores de fármacos, evaluando el conjugado por el cambio de potencial eléctrico de las nanopartículas no modificadas (+20 mV) comparado con las nanopartículas modificadas con proteína (-20 mV), confirmando la conjugación covalente de la proteína mediante potencial zeta. Por lo tanto, aunque la proteína conjugada con las nanopartículas fue mínima que no puede ser observable por fluorescencia, el cambio en el tamaño de partícula y potencial eléctrico nos indica que el conjugado se formó de manera satisfactoria.

El nanoanticuerpo Nb, expresado y purificado por cromatografía de afinidad metálica, se obtuvo en una concentración de 1 mg/mL, sin embargo, este no fue utilizado para la conjugación con nanopartículas, debido a que, el SDS-PAGE revela una baja pureza, por lo que, es de importancia obtenerlo de forma pura antes de continuar con su acoplamiento a nanopartículas, así como el uso de un anti-nanoanticuerpo para la confirmación de la formación del nanosistema.

En lo respecta a los resultados de viabilidad celular, las nanopartículas de gelatina en el rango de concentración 0.1-1 mg/mL, mostraron buena biocompatibilidad celular en línea celular de neuroblastoma (BE(2)-C), comparado con solución de gelatina, la cual a

concentraciones de 0.1-0.25 mg/mL no muestra inhibición celular, indicando ser biocompatible, pero las concentraciones 0.5-1 mg/mL, disminuyen la viabilidad celular a 10% o menor.

Finalmente, en el presente trabajo fue posible la síntesis del complejo nanopartícula-proteína, mostrando que las nanopartículas de gelatina por si solas presentan buena biocompatibilidad. Como perspectiva de este trabajo, está expresar y purificar proteína a gran escala para el análisis del nanosistema en línea celular de neuroblastoma y evaluar el efecto del nanoanticuerpo Nb como molécula de direccionamiento.

10. Conclusión

En resumen, se logró sintetizar de manera reproducible nanopartículas de gelatina por el método de nanoprecipitación, logrando modificar la superficie para la adición de grupos tiol mediante la reacción de grupos amina libres con 2-iminotiolano, para la posterior conjugación covalente con proteínas. Por otro lado, se logró la expresión y purificación de proteínas recombinantes mediante técnicas biotecnológicas, para formar el conjugado nanopartícula-proteína. Finalmente, se logró sintetizar el conjugado nanopartícula-proteína con un tamaño de 458.7 nm y un potencial zeta de -15.5 mV. Este conjugado mostró buena biocompatibilidad celular en línea celular de neuroblastoma (BE(2)-C). El conjugado sintetizado a partir de nanotecnología farmacéutica promete ser un potencial acarreador farmacológico para terapia dirigida contra el cáncer.

11. Referencias bibliográficas

1. Brenner, G. M., & Stevens, C. W. (2019). *Farmacología Básica (5ª Edición)* Elsevier España, S.L.U.
2. Choi, L. (2023, 12 julio). *Cáncer de mama*. Manual MSD Versión Para Profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/ginecolog%C3%ADa-y-obstetricia/c%C3%A1ncer-de-mama/c%C3%A1ncer-de-mama>
3. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [15/03/2022]
4. INEGI. (2021, febrero). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer* (N.º 105/21). https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
5. N.I.H. (2021, 5 mayo). *¿Qué es el cáncer?* Instituto Nacional del Cáncer. Recuperado 15 de marzo de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
6. Reyes, S. J., González, K. B., & Rodríguez, C. (2020). Actualización general de inmunoterapia en cáncer. *Revista médica de Chile*, 148(7). Recuperado marzo de 2022, de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98872020000700970&script=sci_arttext&tlng=e
7. Cross, D., & Burmester, J. K. (2006). Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clinical Medicine & Research*, 4(3), 218–227. <https://doi.org/10.3121/cmr.4.3.218>
8. Dean, M., Moitra, K., & Allikmets, R. (2022). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Human mutation*, 43(9), 1162–1182. <https://doi.org/10.1002/humu.24418>
9. Liu, X., & Pan, G. (Eds.). (2019). *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi:10.1007/978-981-13-7647-4
10. Kumar, A., Mansour, H.M., Friedman, A., & Blough, E.R. (Eds.). (2013). *Nanomedicine in Drug Delivery* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b14802>
11. Alonso Gutiérrez, B. J., López Meléndez, A., Rodríguez Liñan, C. Y., & Lázaro López, D. A. (2015). La nanotecnología a 40 años de su aparición: Logros y tendencias. *Ingenierías UANL*, 18(66).

12. De Jong, W. H., & Borm, P. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133–149. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>
13. Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). *Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 52–79. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018
14. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., & Smilowitz, H. M. (2004). *The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice*. *Physics in Medicine and Biology*, 49(18), N309–N315. doi:10.1088/0031-9155/49/18/n03
15. Bloise, N., Massinori, A., della Piña, C., Alongi, J., Siciliani, S., Manfredi, A., Bioggiogera, M., Rossi, M., Ferruti, P., Ranucci, E., & Visai, L. (2020). Extra-Small Gold Nanospheres Decorated With a Thiol Functionalized Biodegradable and Biocompatible Linear Polyamidoamine as Nanovectors of Anticancer Molecules. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(132). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00132>
16. Mahmoudi Saber, Mohaddeseh (2019). *Strategies for surface modification of gelatin-based nanoparticles*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (), 110407–. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110407
17. Elzoghby, A. O. (2013). Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *Elsevier: Journal of controlled release*, 172, 1075–1091. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.019>
18. Prasher, Douglas C.; Eckenrode, Virginia K.; Ward, William W.; Prendergast, Frank G.; Cormier, Milton J. (1992). *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. *Gene*, 111(2), 229–233. doi:10.1016/0378-1119(92)90691-H
19. Shaner, N. C., Patterson, G. H., & Davidson, M. W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *Journal Of Cell Science*, 120(24), 4247-4260. <https://doi.org/10.1242/jcs.005801>
20. Bajar, B. T., Wang, E. S., Lam, A. J., Kim, B. B., Jacobs, C. L., Howe, E. S., Davidson, M. W., Lin, M. Z., & Chu, J. (2016). Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep20889>
21. Lee, E. J., Khan, S. A. & Lim, K. H. (2011). Gelatin Nanoparticle Preparation by Nanoprecipitation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22(4-6), 753-771. <https://doi.org/10.1163/092050610x492093>
22. Cascone, M. G., Lazzeri, L., Carmignani, C., & Zhu, Z. (2002). Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. *Journal of*

Materials Science: Materials in Medicine, 13, 523–526.
<https://doi.org/10.1023/A:1014791327253>

23. Kushibiki, T., Matsuoka, H., & Tabata, Y. (2004). *Synthesis and Physical Characterization of Poly(ethylene glycol)-Gelatin Conjugates*. *Biomacromolecules*, 5(1), 202–208. doi:10.1021/bm0343139
24. Kuo, W.-T., Huang, J.-Y., Chen, M.-H., Chen, C.-Y., Shyong, Y.-J., Yen, K.-C., ... Lin, F.-H. (2016). *Development of gelatin nanoparticles conjugated with phytohemagglutinin erythroagglutinating loaded with gemcitabine for inducing apoptosis in non-small cell lung cancer cells*. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(14), 2444–2454. doi:10.1039/c5tb02598b
25. Sabine Balthasar; Kerstin Michaelis; Norbert Dinauer; Hagen von Briesen; Jörg Kreuter; Klaus Langer (2005). *Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes*. , 26(15), 2723–2732. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.047
26. A. Cirstoiu-Hapca; L. Bossy-Nobs; F. Buchegger; R. Gurny; F. Delie (2007). *Differential tumor cell targeting of anti-HER2 (Herceptin®) and anti-CD20 (Mabthera®) coupled nanoparticles*. , 331(2), 190–196. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.12.002
27. Chu, Y., Fang, H., Wu, Y., Tang, Y., Hsieh, E., She, Y., Chang, C., Lin, I., Chen, Y., Liu, G., & Tseng, C. (2023). Functional Peptide-Loaded Gelatin Nanoparticles as Eyedrops for Cornea Neovascularization Treatment. *International Journal Of Nanomedicine*, Volume 18, 1413-1431. <https://doi.org/10.2147/ijn.s398769>