

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“Síntesis y caracterización de microesferas biocompatibles
con capacidad de carga y transfección de DNA”**

TESIS

Para obtener el título de

Maestra en Ciencias

Por

QFB. Gabriela Carolina Valenzuela Bonillas

Directora de tesis

Dra. Kenia Palomino Vizcaíno

Co-Director de tesis

Dr. Hector Alfonso Magaña Badilla

Tijuana, B.C., Mayo 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.357
Tijuana, B.C., a 17 de enero, 2024

C. Gabriela Carolina Valenzuela Bonillas
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente

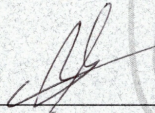
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS.


Es propuesto, por los C. Dra. Kenia Palomino Vizcaino y
Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla.


Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido
al tema "Síntesis y caracterización de microesferas de gelatina con capacidad de
carga y transfección de DNA".


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

- I. INTRODUCCIÓN
- II. EXPERIMENTAL
- III. RESULTADOS Y DISCUSIONES
- IV. CONCLUSIONES
- V. ANEXOS
- VI. REFERENCIAS


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora


Dra. Kenia Palomino Vizcaino
Directora De Tesis


Dr. Héctor Alfonso Magaña Badilla
Co-Director De Tesis



Contenido

Contenido	2
Lista de figuras	4
Lista de tablas	5
Lista de abreviaturas	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos institucionales	6
Resumen	7
Capítulo I. Introducción	8
I.1 Antecedentes	9
I.2 Hipótesis	11
I.3 Justificación	11
I.5 Objetivos específicos	12
I.6 Fundamento teórico	13
I.6.1 Sistemas de liberación controlada	13
I.6.2 Nanoesferas	14
I.6.3 Gelatina catiónica	16
I.6.4 Plásmidos	17
I.6.5 Transfección	18
Capítulo II. Experimental	20
II.1 Equipos y reactivos	21
II.1.2 Equipos	21
II.1.3 Reactivos	21
II.2 Síntesis de microesferas de gelatina catiónica	22
II.3 Determinación de grupos amina	23
II.4 Caracterización de las microesferas	24
II.4.1 Determinación del tamaño de partícula	24
II.4.2 determinación de potencial Z	25
II.4.3 Análisis por espectrofotometría de infrarrojo (FTIR-ATR)	25
II.5 Evaluación de la biocompatibilidad	26
II.6 Obtención del plásmido pEYFP	26
II.7 Acomplejamiento y evaluación de la capacidad de transfección	27

II.8 Análisis de resultados	29
Capítulo III. Resultados Y Discusiones	30
III.1 Síntesis de microesferas	31
III.2 Determinación de tamaño y potencial Z.....	32
III.3 Determinación de contenido de grupos amina.....	37
III.4 Caracterización por espectrofotometría de infrarrojo.....	38
III.5 determinación de biocompatibilidad	40
III.6 Transfección del plásmido pYEFP	43
Capítulo IV. Conclusiones	45
Capítulo V. Referencias	47

Lista de figuras

Figura 1 Estrategias de liberación focalizada de las nanopartículas en el órgano diana.

Figura 2. Diagrama esquemático de dos transfecciones diferentes. A. Transfección estable. B. Transfección transitoria.

Figura 3. Diálisis de microesferas de gelatina/etilendiamina.

Figura 4. Liofilizado de microesferas de gelatina/etilendiamina.

Figura 5. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 10% con etilendiamina.

Figura 6. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 15% con etilendiamina.

Figura 7. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 30% con etilendiamina.

Figura 8. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 15% con espermina.

Figura 9. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 30% con espermina.

Figura 10. Espectro infrarrojo de gelatina y microesferas a diferentes porcentajes de cationización con etilendiamina.

Figura 11. Espectro infrarrojo de gelatina y microesferas a diferentes porcentajes de cationización con espermina.

Figura 12. Viabilidad celular de componentes y mezcla de las microesferas.

Figura 13. Viabilidad celular de mezcla de las microesferas y plásmido.

Figura 14. Observación de células HeLa transfectadas en campo claro 40x (A) y con filtro de fluorescencia 40x (B).

Lista de tablas

Tabla 1. Tamaño de partícula de gelatina/etilendiamina.

Tabla 2. Potencial Z de partículas de etilendiamina.

Tabla 3. Tamaño de partícula de espermina.

Tabla 4. Potencial Z de partículas de etilendiamina.

Tabla 5. Grupos amina teórico y experimental en las microesferas gelatina/etilendiamina.

Tabla 6. Tabla de Identificación de bandas de infrarrojo.

Lista de abreviaturas

CaCl₂: cloruro de calcio

CO₂: dióxido de carbono

DLS: dispersión de luz dinámica

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

EDC: (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida)

FTIR-ATR: espectrofotometría de infrarrojo con módulo de reflectancia total atenuada

HCl: ácido clorhídrico

KH₂PO₄: fosfato de potasio dibásico

LB: Luria Bertani

MTT: (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Na₂HPO₄: fosfato disódico

NaHCO₃: bicarbonato de sodio

PBS: tampón fosfato salino

pEYFP: plásmido amarillo fluorescente mejorado por sus siglas en inglés enhanced yellow fluorescent protein

SDS: dodecilsulfato sódico

TNBS: ácido trinitrobenzenosulfónico

Dedicatoria

A la Gabita de 10 años que soñaba con ser científica.

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Autónoma de Baja California por su compromiso con la excelencia académica, la innovación y el desarrollo integral de la comunidad estudiantil y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindar los recursos para facilitar mi formación académica.

A la Dra. Kenia Palomino por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su dirección, quiero agradecer su confianza en mí, su compromiso con mi crecimiento académico y sobre todo su disposición y su constante apoyo que va más allá de lo académico, dejando una huella en mi formación personal y profesional.

Al Dr. Héctor Magaña por su constante apoyo y motivación a mejorar, al Dr. José Manuel Cornejo por su paciencia y orientación, y al Dr. Giovanni Palomino por su guía, apoyo y compromiso.

Resumen

El presente trabajo tiene como propósito desarrollar una serie de preparaciones de microesferas de gelatina catiónica en diferentes condiciones, mismas que serán caracterizadas por distintas técnicas como DLS y potencial Z. Se estudiará su composición por medio de FT-IR, se evaluará su biocompatibilidad en líneas celulares a través de ensayos de viabilidad celular y además se verificará su capacidad de cargar y transfección de un plásmido que contiene un gen reportero (proteína amarilla fluorescente) en líneas celulares. En dichas células se probará la capacidad del sistema propuesto identificando y cuantificando la fluorescencia por microscopía y citometría de flujo.

Capítulo I. Introducción

I.1 Antecedentes

El cáncer es una patología en la cual ocurre reproducción celular sin control debido a mutaciones en el material genético, en ocasiones las células cancerosas se diseminan por el resto del cuerpo en un proceso llamado metástasis. El sistema inmune usualmente es capaz de eliminar las células tumorales sin embargo algunas logran evadir estos mecanismos y desarrollar una neoplasia (Sanchez, 2013) (Valent, 2012).

La mayoría de los pacientes reciben una combinación de tratamientos como cirugía con quimioterapia o radioterapia. Regularmente los tratamientos con quimioterapia son administrados por un tiempo prolongado y con un estrecho margen terapéutico ya que presentan baja biodisponibilidad oral, baja solubilidad en agua, bajos índices terapéuticos y alta toxicidad, esto aunado al alto número de efectos secundarios de corto y largo plazo (Cho, 2008).

En el año 2020 el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) reportó que hubo 19,292,789 nuevos casos de cáncer en el mundo. El número de muertes por causa de esta enfermedad en el mismo año fue de 9,958,133 defunciones y la cantidad de casos prevalentes en los 5 años anteriores fue de 50,550,287. Siendo el cáncer de mama, pulmón, colorrectal, próstata y estómago los principales tipos de cáncer que se presentan en el mundo (Ferlay, et al., 2020).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, por tal motivo se han desarrollado múltiples propuestas para nuevos tratamientos a base de terapia génica. En la cual material genético es introducido a la célula para manipular o controlar la expresión de un gen dentro de la misma (Ferlay, et al., 2020) (Young,2023).

Yu Et al., en 2016 lograron la inhibición del crecimiento de un tumor en células CMF-7 mediante T7-LPC/siEGFR recubierto de liposomas catiónicos. Elazar Et al., en 2010 lograron la disminución de la incidencia y el tamaño de metástasis óseas tumorales en modelo de rata con cáncer de mama mediante el uso de nanopartículas de AS-PLGA. Yang Et al., en 2016 lograron aumentar el efecto de supresión tumoral de la doxorubicina en células resistentes a MCF-7/adriamicina mediante la reducción de la salida de nanoburbujas de Doxorubicin-PLGA/PEI/P-gp shRNA.

Gracias a la aplicación de las herramientas nanotecnológicas, así como los importantes avances en este campo podrían dar lugar a sistemas de diagnóstico y tratamientos terapéuticos de mayor eficacia que los existentes mejorando la calidad de vida de los pacientes (Lechuga, 2011).

I.2 Hipótesis

Es posible sintetizar microesferas de gelatina catiónica con capacidad de carga y transfección de DNA para potencial aplicación como terapia génica para cáncer de mama.

I.3 Justificación

La necesidad de nuevos y mejores tratamientos de alta eficacia y seguridad nos impulsa a la búsqueda de alternativas farmacéuticas antineoplásicas con mínimos efectos secundarios, garantizando mayor efectividad y menor afección al tejido sano para el aseguramiento del bienestar del paciente.

La terapia génica ha presentado un gran potencial para el tratamiento de diferentes enfermedades mediante el uso de nanopartículas ya que son una valiosa herramienta para tratar patologías mediante la inserción de material genético en un individuo debido a que estos sistemas son más específicos que los tratamientos antineoplásicos convencionales, aumentando la efectividad y minimizando la cantidad de efectos secundarios.

Existen nuevos sistemas nanométricos muy prometedores los cuales han ganado gran atención para el diagnóstico y tratamiento para diferentes enfermedades. Por lo cual el principal objetivo es el desarrollo de nuevos sistemas en especial el diseño de microesferas que modificadas muestren capacidad de transfección DNA favorecerá el desarrollo de fármacos con actividad terapéutica específica (Cho, 2008), (Ferlay, et al., 2020), (Jin, 2014), (Lechuga, 2011).

I.4 Objetivo general

Síntesis, caracterización y evaluación de la capacidad de transfección de microesferas de gelatina catiónica biocompatible.

I.5 Objetivos específicos

I.5.1 Sintetizar diferentes microesferas de gelatina cationizada.

I.5.2 Caracterizar las microesferas mediante dispersión de luz dinámica (DLS), potencial Z y espectrofotometría de infrarrojo (FTIR-ATR).

I.5.3 Evaluar la biocompatibilidad de las microesferas empleando ensayos de viabilidad celular.

I.5.4 Determinar la cantidad de grupos amina en la microesfera.

I.5.5 Purificación de DNA.

I.5.5 Evaluar la capacidad de transfección de un plásmido de DNA en líneas celulares.

I.6 Fundamento teórico

I.6.1 Sistemas de liberación controlada

Los sistemas de liberación controlada de fármacos son aquellos en los cuales se eligen las características de la liberación en el curso del tiempo y/o en la localización para lograr objetivos terapéuticos o de conveniencia que no ofrecen las formas farmacéuticas convencionales (USP 30, 2007).

En la mayoría de estos sistemas se introduce el agente activo en una matriz polimérica, en la cual la velocidad de liberación del agente activo será determinada por las propiedades del polímero y características del medio tales como pH (Saez, et al., 2007) (Lastres, 2002).

Estos sistemas se dividen en 4 categorías: liberación acelerada, liberación diferida, liberación prolongada y sistemas flotantes o bioadhesivos.

La liberación acelerada consiste en formas farmacéuticas sólidas que se disuelven rápidamente en la cavidad oral, lo cual permite aumentar biodisponibilidad ya que se reduce el efecto de primer paso debido a su absorción pregástrica.

La liberación diferida se basa en los sistemas que han sido creados para liberar el principio activo de forma retardada, lo cual permite modificar el lugar o tiempo en el que se va a realizar la liberación. Un ejemplo de este sistema son los comprimidos con cubierta entérica, cuya finalidad es evitar el contacto de los jugos gástricos con el fármaco.

Liberación prolongada o sostenida. Se trata de sistemas que han sido diseñados para disminuir picos de concentración o para prolongar el efecto terapéutico. Este sistema permite una liberación continua ya que contiene el principio activo en su forma cristalizada, que se disuelve

lentamente. Un ejemplo son los sistemas osmóticos los cuales basan su mecanismo de liberación del fármaco en el uso de un hidrogel recubierto de una membrana semipermeable, que produce una expansión del interior del mecanismo al paso del agua y resulta en la salida del principio activo de manera continua.

Los sistemas flotantes o bioadhesivos consisten en mecanismos creados para retrasar el tránsito gastrointestinal del medicamento o aumentar el tiempo de residencia en el estómago. Propician el aumento de biodisponibilidad del fármaco para medicamentos de absorción gástrica o de las primeras porciones del intestino delgado. Estos sistemas logran su efecto mediante el uso de principios activos resistentes a los jugos gástricos y de menor densidad de los mismos, ya que esto les permite flotar y permanecer más tiempo en el sitio deseado (Li, et al., 2001) (Gómez, et al., 2007) (Herrero, 2011).

I.6.2 Nanoesferas

Existen dos tipos de nanopartículas poliméricas. Las nanoesferas y las nanocápsulas. Las nanoesferas son sistemas matriciales esféricos, que tienen el agente activo disperso en una matriz polimérica de manera homogénea (Urrejola, 2018).

En el caso del empleo de polímeros biodegradables, la liberación del agente activo se lleva a cabo ya sea por difusión a través de los poros de la matriz, por degradación o erosión del polímero, o por una combinación de estos mecanismos. Cuando se emplean polímeros no biodegradables, la liberación se produce mediante un proceso de difusión lenta a través de la matriz (Mahmoudi, et al., 2019).

Las nanocápsulas por su parte son sistemas vesiculares que contienen el agente dentro de una cavidad rodeada por una membrana polimérica que controla su liberación dependiendo de su

naturaleza química, las diferencias estructurales aportan distintas propiedades de liberación de contenido a ambos tipos de nanopartículas (Urrejola, 2018).

Las estrategias de liberación focalizada en el órgano diana de los sistemas de nanopartículas son la orientación activa, la orientación pasiva y la liberación desencadenada por un estímulo (Fig. 1).

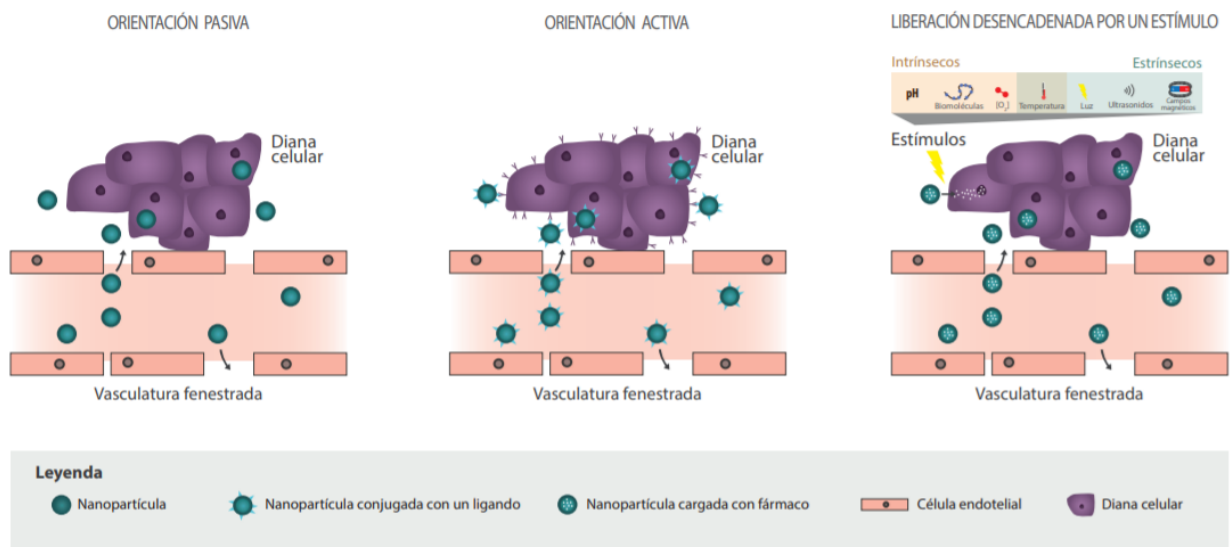


Figura 1 Estrategias de liberación focalizada de las nanopartículas en el órgano diana (Pillo,2016).

Las aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas poliméricas han sido de gran interés en el ámbito biotecnológico en las décadas recientes debido a su potencial aporte en patologías severas como enfermedades neurológicas, infecciones y cáncer. Estos sistemas deben diseñarse para obtener los efectos deseados, donde se mejore la biocompatibilidad, ser dirigidos específicamente, mejorar los perfiles de liberación y obteniendo el efecto máximo (Mahmoudi, et al., 2019).

Las nanopartículas que presentan ligandos en su estructura han sido ampliamente estudiadas como vectores selectivos para el tratamiento contra el cáncer. También se ha estudiado el efecto in vitro de nanopartículas cargadas con plásmidos, confirmando una exitosa transfección. Estudios in vivo han demostrado la acumulación de nanopartículas cargadas con fármacos antineoplásicos en el tejido tumoral y una reducción en la velocidad de crecimiento de dicho tejido (Acharya, et al., 2011).

Los sistemas nanométricos pueden ser diseñados a partir de polímeros sintéticos, así como naturales, siendo los de procedencia natural los que se prefieren para aplicaciones biomédicas, con fácil preparación y su estabilidad en fluidos biológicos (Xinliang, et al., 2018).

I.6.3 Gelatina catiónica

Las nanoesferas de gelatina son uno de los polímeros naturales más utilizados para la terapia génica ya que posee grandes ventajas las cuales incluyen biodegradabilidad y biocompatibilidad, son consideradas seguras bajo las normativas de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), bajo costo y fácil modificación (Madkhali, et al., 2019) (Jin, 2014).

Se ha demostrado que pueden servir como vehículos contra tumores debido a su estrategia diana basada en la falta de drenaje linfático y las anomalías vasculares del tejido tumoral, la cual también es conocida como el efecto mejorado de permeabilidad y retención. En el cual las moléculas de ciertos tamaños tienden a acumularse en el tejido tumoral mucho más de lo que lo hacen en los tejidos normales (Mahmoudi, 2019) (Maeda, 2000).

La gelatina es extraída de colágeno animal a través de hidrólisis parcial ácida (tipo A) o alcalina (tipo B). La gelatina catiónica es derivada de hidrólisis parcial ácida de colágeno tipo 1 de piel de cerdo. La gelatina es diferenciada de otros polímeros por tener secuencias de aminoácidos que modulan la adhesión celular, por lo cual juegan un rol significativo en el desempeño final de la gelatina en comparación con los polímeros sintéticos que carecen de sitios de reconocimiento celular.

La cationización de la gelatina es un factor que incrementa la habilidad del polímero para interactuar con estructuras que se encuentren cargadas negativamente, como lo son la membrana celular y el DNA (Madkhali, et al., 2019) (Wang, et al., 2012) (Zwiorek, et al. 2005).

I.6.4 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómicas que tienen la capacidad de replicarse de manera independiente del genoma y se transmiten de manera independiente con respecto al ADN cromosómico (Novick, 1987).

Los plásmidos con mayor frecuencia se presentan como moléculas circulares de doble cadena de ADN que varían significativamente en tamaño. Los productos codificados usualmente le aportan una ventaja a las bacterias como la resistencia a antibióticos, pero en general no codifican funciones esenciales para la actividad fisiológica normal de las bacterias (Carattoli, 2009).

Las características de los plásmidos los hacen ideales vectores para el aislamiento y estudio de genes, así como para amplificar fragmentos de DNA, expresión de proteínas, secuenciación de alelos de un gen, transferencia de material genético y transcripción in vitro. Tienen aplicaciones

dentro del campo de la clonación, expresión de genes, mutagénesis y clonación de promotores (Austin-Ward & Villaseca, 1998).

I.6.5 Transfección

La transfección es un procedimiento que consiste en la introducción de material genético externo a células mediante el uso de un vector para estudiar la regulación y función de genes, así como la función de proteínas. La transfección se puede clasificar en estable y transitoria.

Las transfecciones estables ocurren cuando el ADN se incorpora en el genoma del hospedero y es heredado a su progenie. El material genético incorporado usualmente cuenta con un marcador de selección que mantiene su expresión incluso cuando la célula se ha dividido (Kim & Eberwine, 2010). Las transfecciones transitorias son aquellas donde el ADN no es incorporado en el genoma y existe únicamente por un periodo limitado de tiempo (Haas, et al., 2001).

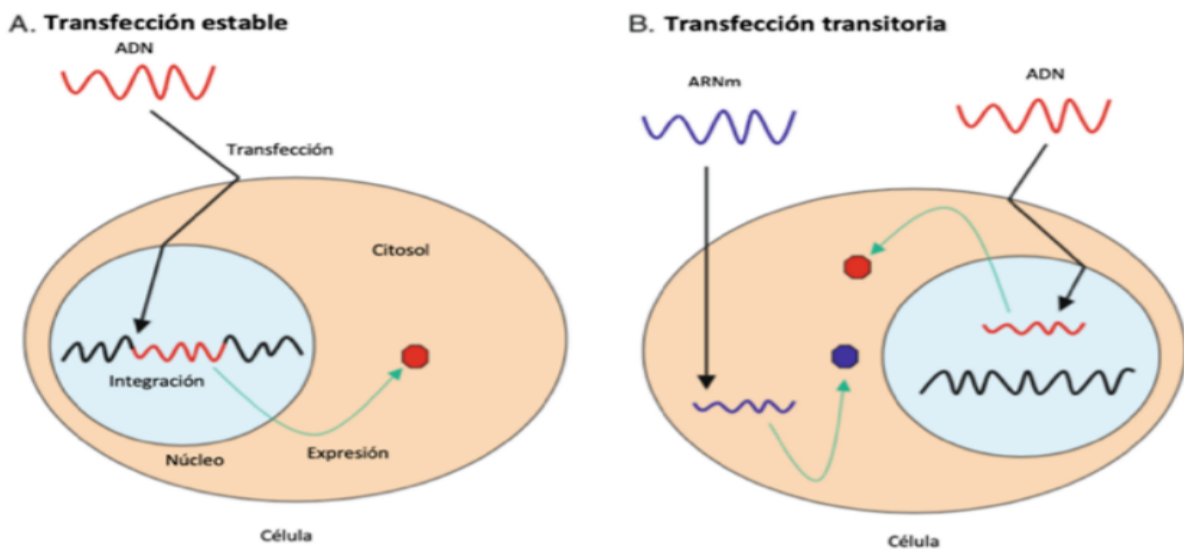


Figura 2. Diagrama esquemático de dos transfecciones diferentes. A. Transfección estable. B. Transfección transitoria (Kim & Eberwine, 2010).

Los métodos empleados para la transfección se clasifican en tres grupos: químicos, físicos y biológicos. Los métodos químicos se fundamentan en formar complejos que puedan ser incorporados o adquiridos por las células, mientras que los métodos físicos radican en la introducción de material genético a la célula de manera mecánica. Este método utiliza técnicas como electroporación, biobalística y microinyección directa (Resillas-Targa, 2006).

A diferencia de los métodos biológicos que están basados en procesos naturales de la célula, siendo la transducción o transfección viral una de las principales técnicas utilizadas, la cual consiste en la introducción de material genético por medio de un virus o bacteriófago. Otra técnica ampliamente utilizada es la conjugación, en la cual se realiza la transferencia de un plásmido a una célula receptora (Pfeifer & Verma, 2001) (Haas, et al., 2001).

Capítulo II. Experimental

II.1 Equipos y reactivos

II.1.2 Equipos

- II.1.2.1 Zetasizer Nano NS Malvern Instruments.
- II.1.2.2 Balanza analítica Denver Instrument M-200.
- II.1.2.3 Fourier Transform Infrared spectrophotometer de iDS
- II.1.2.4 Microscopio de fluorescencia
- II.1.2.5 Microscopio invertido Leica microsystems
- II.1.2.6 Liofilizador FreeZone 2.5 Liter -50C Benchtop Freeze Dryer de Labconco
- II.1.2.7 Microplate reader Bio-Rad model 680
- II.1.2.8 Parrilla con agitación magnética VWR
- II.1.2.9 Potenciómetro VWR
- II.1.2.10 Incubadora
- II.1.2.11 Campana de flujo laminar

II.1.3 Reactivos

- II.1.3.1 Gelatina tipo A Cas:9000-70-8 Sigma-Aldrich
- II.1.3.2 Etilendiamina
- II.1.3.3 EDC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- II.1.3.4 Espermina
- II.1.3.5 KH_2PO_4 Sigma-Aldrich
- II.1.3.6 Na_2HPO_4 Sigma-Aldrich
- II.1.3.7 Agua MilliQ
- II.1.3.8 Kit MTT Roche
- II.1.3.9 Medio DMEM
- II.1.3.10 Estreptomicina
- II.1.3.11 Suero fetal bovino
- II.1.3.12 Células HeLa
- II.1.3.13 plásmido pEYFP
- II.1.3.14 Kit GenElute HP Endotoxin-free Plasmid Maxiprep
- II.1.3.15 Lipofectin Invitrogen

II.2 Síntesis de microesferas de gelatina catiónica

La síntesis de micropartículas de gelatina se inicia determinando los compuestos catiónicos empleados para la aminación. Siendo propuestos dos compuestos etilendiamina y espermina. Posteriormente se determinaron las proporciones del grupo catiónico que se utilizaron en las síntesis para comparar el comportamiento de dichos compuestos en la microesfera, los porcentajes varían de 10 al 30 % deseado de incorporación.

Se inicia el proceso de síntesis determinando la cantidad del compuesto catiónico a utilizar, siendo dependiente del porcentaje a introducir y del compuesto (densidad y peso molecular). Siendo para etilendiamina 10, 15, y 30 % del grupo catiónico, y espermina 15 y 30 %.

La síntesis se realiza colocando la cantidad de gelatina a temperatura ambiente, alcanzada esta temperatura se coloca en buffer de fosfatos 0.1M pH 5 con agitación constante hasta disolver completamente. Posteriormente se agrega el compuesto catiónico en la cantidad deseada a utilizar y se ajusta a pH 5. Una vez ajustado el pH se añade EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) que se utiliza como acoplamiento en este tipo de síntesis y se procede a aforar el volumen a un total de 50 ml, se deja en agitación constante por lo menos 18 horas para culminar con la reacción.

Posteriormente la solución es colocada en una membrana de diálisis de nitrocelulosa (12000-14000 Da) la cual debe ser hidratada antes de ser utilizada se coloca la cantidad necesaria de membrana y se procede a cerrar un extremos de la membrana y agregar las alícuotas posteriormente se cierra y se colocan en el contenedor con agua suficiente, siempre siendo en mayor proporción que la alícuota colocada en la membrana de diálisis, este procesos de diálisis dura por 3 días donde se realizan cambios del agua exterior para mejorar la purificación se

recomienda mínimo 2 a 3 cambios de agua al día. Se disponen alícuotas en este procedimiento para posteriores análisis.

Una vez que tenemos las microesferas de gelatina catiónica se procede a la liofilización de las muestras, se colocan en tubos cónicos para su proceso de congelamiento siendo este un punto crítico, de ser posible se congelan por medio de nitrógeno líquido, de no tenerlos disponible se procede a utilizar un ultracongelados. Cuando las muestras se encuentran congeladas se procede a utilizar el liofilizador FreeZone 2.5 Liter -50C Benchtop Freeze Dryer de Labconco, donde se dejan el tiempo necesario para obtener un material seco, el proceso puede durar 24 a 48 horas. Una vez liofilizadas se pueden almacenar y utilizar para sus posteriores caracterizaciones.

II.3 Determinación de grupos amina

La determinación de grupos amina se realiza para comprobar cuantos grupos amina se integraron a las microesferas y con ellos compararlos con el porcentaje teórico colocado, y con ello estudiar su comportamiento. Para determinar estos grupos amina libres se realiza por el método de TNBS (ácido trinitrobencenosulfónico) siendo una técnica espectrofotométrica.

Se cuantifican los grupos amina para determinar la cantidad de espacios disponibles en la molécula, con las diferentes muestras obtenidas de las síntesis. Se realiza una suspensión de microesferas de 1 mg/ml, así como del blanco que sería la gelatina de partida. Se adiciona a cada una de las muestras (se realizan como mínimo por triplicado) a la cuales se les adiciona PBS, NaHCO_3 y TNBS. Se dejarán en ausencia de luz completamente por 1 hora, transcurrido el periodo de tiempo se añade a cada muestra una solución de HCl y SDS 10%, se agita cuidadosamente. En una placa de 96 pocillos se coloca a cada una de las muestras una alícuota

de 200µl por triplicado y se añaden 3 pocillos con agua. Se determina la absorbancia mediante espectrofotometría de UV-VIS utilizando el equipo Microplate reader Bio-Rad model 680 a 415nm.

Con los resultados de las absorbancias obtenidos se calcula el porcentaje incorporado de grupos amina empleando la siguiente fórmula.

$$-NH_2 = \frac{abs\ muestra}{abs\ gelatina} = a$$

Para determinar el porcentaje incorporado se toman en cuenta los sitios de intercambio, así como las aminas existentes.

$$\% incorporado = \left(\frac{33(a - 1)}{93} \right) 100$$

II.4 Caracterización de las microesferas

II.4.1 Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de partícula de la microesfera se determina mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) la cual se muestra por el diámetro hidrodinámico esto fue utilizando el equipo Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments), la primera medición se realiza en crudo cuando la muestra no se ha sometido al proceso de liofilizado y una segunda medición posterior al proceso de liofilizado. Las muestras de microesferas en crudo se determina su tamaño colocando 1 ml del producto de la diálisis en una celda del equipo y se

procede a su lectura. Mientras que para las microesferas liofilizadas se realiza una suspensión de 1 mg/ml utilizando agua como solvente. Se coloca en agitación por 15 minutos y se procede a la lectura de tamaño colocando 1 ml de la suspensión en la celda especial, donde se colocan datos específicos de lectura como una temperatura de 25 °C con 16 lecturas continuas. Para determinar la estabilidad de las muestras se procede a realizar las mediciones en diferentes tiempos a las 2 horas, 24 horas, 3 días y 6 días.

II.4.2 determinación de potencial Z

Se determina el potencial Z con el objetivo de conocer la carga superficial de la partícula utilizando el equipo Zetasizer Nano NS, donde se utiliza una celda especial donde se coloca una suspensión de las microesferas de 1mg/ml en agua y se procede a la lectura en el equipo realizando la lectura por triplicado.

II.4.3 Análisis por espectrofotometría de infrarrojo (FTIR-ATR)

Para este análisis se coloca la muestra en seco (liofilizada) en el equipo Thermo scientific modelo Nicolet iS5, donde se utiliza el módulo de reflectancia total atenuada (ATR) este se limpia con etanol antes de utilizarlo, la muestra se coloca de manera directa sobre el detector del equipo cuidando que sea suficiente para cubrir el área pero no demasiado como para saturar la punta de diamante del equipo, se procede a la lectura de la muestra en la cual se utiliza el software OMNIC 09/02/41 programando la lectura repetida por 16 ocasiones para darte un resultado de lectura. Se repitió este proceso para todas las muestras, así como una lectura blanco para determinar las bandas características del ambiente.

II.5 Evaluación de la biocompatibilidad

La evaluación se realiza por medio del ensayo de MTT para comprobar la viabilidad donde se determina por medio de células vivas y células muertas de una población por medio de la determinación colorimétrica donde evaluar la actividad metabólica de las células, este estudio se realiza con línea celular HeLa.

En este estudio se colocan en placas de 96 pocillos un número determinado de células (50,000 células/ml), las cuales son colocadas con medio DMEM, suero fetal bovino (10%) y solución de estreptomicina (1%) y se incuban durante 12 h. Posteriormente se colocan las muestras a estudiar en una suspensión de 1mg/ml de las diferentes microesferas en contacto con las células y se incuban a 37 °C, CO₂ (5%) y atmósfera húmeda por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se utiliza para cuantificar la proliferación celular utiliza un kit MTT. Donde se añaden 10 µl del reactivo de marcaje MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a cada pocillo. Se incuba la placa durante 4 h en una atmósfera húmeda, posteriormente se añaden 100 µl de la solución de solubilización a cada pocillo y se deja reposar en la incubadora por toda la noche. Se verifica al microscopio la solubilización completa de los cristales de formazán y finalmente se coloca la placa en el lector de placas Elisa, la cual se realiza la lectura de absorbancia.

II.6 Obtención del plásmido pEYFP

La primera etapa, se inicia con la preparación de células competentes utilizando la cepa de E. coli JM109, la cual se incuba en medio LB durante un día. Posteriormente, se toma una alícuota del medio de cultivo saturado para inocular un medio fresco, incubándose durante 4 horas.

Transcurrido el periodo se procede a centrifugar y se descarta el sobrenadante, se coloca el pellet obtenido en hielo, se resuspende en CaCl_2 y se mantiene en frío durante 30 minutos más.

Con las células competentes listas, se lleva a cabo la transformación. Las células competentes se colocan en un tubo junto con una alícuota de plásmido y se incuban en hielo durante 15 minutos. Luego, se realiza un choque térmico elevando la temperatura a $42\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 minutos. Después de este paso, se vuelve a colocar en hielo durante 3 minutos y se añade medio de cultivo LB para incubar durante una hora a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y 200 RPM. Posteriormente, se toma una alícuota de las células transformadas y se sembraron en una placa de agar LB con ampicilina.

Continuando con el proceso, se emplea el kit GenElute HP Endotoxin-free Plasmid Maxiprep para aislar el plásmido. Inicialmente, se inocula un medio LB líquido con una colonia joven de las células transformadas, generando un pellet con 150 ml de cultivo de 16 horas. Se agrega solución de RNasa al pellet y se resuspende. Luego, se añade la solución de lisado, se mezcla y se neutraliza, posteriormente se filtra para eliminar desechos celulares. Se añade una solución de unión al lisado filtrado y se coloca en una columna del colector de vacío. Una vez que la muestra atravesó la columna, se aplican soluciones de lavado y se transfirió a un tubo de recolección al cual se le añadieron 3 ml de agua libre de endotoxinas para facilitar la elución del plásmido. Terminando el proceso se obtiene el plásmido listo para ser utilizado.

II.7 Acomplejamiento y evaluación de la capacidad de transfección

El estudio de carga y transfección se inicia cultivando células HeLa, una vez que se tienen suficiente confluencia cerca del 80%, se inicia el proceso de conteo de células donde se colocan

en placas de 6 pocillos un total de 50000 células por pocillo en 2 mL y se coloca incuba a 37 °C, CO₂ (5%) y atmósfera húmeda por 24 horas.

Se colocan las muestras a evaluar, un control negativo, positivo y el complejo con las microesferas catiónicas. La evaluación de microesferas se inicia con la solución y se coloca en interacción 50:50 de muestra y plásmido, este se mezcla adecuadamente y se deja incubar en la campana a temperatura ambiente por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo está listo para ser colocado en los pocillos. Se retira el medio de cultivo de la placa de células, se adiciona 100 µl de la mezcla de microesfera/plásmido y 900 µl de medio sin suero, se deja incubar a 37 °C, CO₂ (5%) y atmósfera húmeda por 6 horas, posteriormente se retira el medio y se adiciona 2 ml de medio completo y se incuba hasta cumplir las 24 horas. El porcentaje de células transfectadas es evaluado mediante un conteo en la cámara de Neubauer.

Para la muestra del control positivo se preparan dos soluciones, la primera se diluye 1-2 µg de plásmido en 100µL de medio sin suero ni antibióticos, la segunda es 2-20µL de lipofectin en 100µL de medio sin suero ni antibióticos. Se dejan reposar a temperatura ambiente por 30-45 minutos. Se combinan las dos soluciones, el plásmido diluido con el reactivo lipofectin diluido. Se mezcla gentilmente y se incuba por 10-15 minutos a temperatura ambiente se remueve el medio de las células y se añaden 0.8 mL de medio sin suero ni antibióticos a los complejos. Estos se mezclan gentilmente y se añaden 200µL a los pocillos. Las células son incubadas a 37 °C en atmosfera húmeda con 5% CO₂ por 6 horas. Pasado este tiempo se reemplaza el medio que contenga suero fetal bovino. La expresión del transgén es evaluada a las 24-72 horas post-transfección.

II.8 Análisis de resultados

Se realiza análisis de varianza (ANOVA) para demostrar diferencias significativas entre estudios de viabilidad celular en la evaluación de los sistemas propuestos.

Capítulo III. Resultados Y Discusiones

III.1 Síntesis de microesferas

Se llevó a cabo la síntesis de microesferas de gelatina cationizada mediante el método de aminación, donde por medio de varias síntesis se determinó el mejor método y condiciones de reacción para estas microesferas catiónicas, donde se variaron la velocidad de agitación, el tiempo y el método para poder elegir el que mostraba mejores resultados y reproducibilidad.

Estas síntesis dieron lugar a 5 reacciones, 10, 15 y 30 % de etilendiamina y 15 y 30% de espermina donde las microesferas en liquido son transparentes como se observa en el proceso de diálisis en la Figura 3, esta tonalidad se observaba en todas las reacciones.



Figura 3. Diálisis de microesferas de gelatina/etilendiamina.

Mientras que las microesferas que se encontraban liofilizadas se muestran en la Figura 4 donde su apariencia es color blanquecino brillante, su consistencia es esponjosa y moldeable siendo similar entre todas las reacciones sin importar el compuesto catiónico utilizado. El porcentaje de

rendimiento de las reacciones se determinó por medio del peso obtenido, siendo para estas de cerca del 70 % para cada una de ellas.



Figura 4. Liofilizado de microesferas de gelatina/etilendiamina.

III.2 Determinación de tamaño y potencial Z

El primer compuesto catiónico con el cual se realizaron diferentes síntesis fue etilendiamina, en este se realizaron 3 diferentes porcentajes de conjugación siendo estos el 10, 15 y 30% del compuesto catiónico con relación a la gelatina.

Los resultados de la medición del tamaño de partícula se obtiene un promedio mediante el equipo Zetasizer, donde también obtenemos el índice de polidispersidad (PDI) que nos indica la variación de las poblaciones. Los resultados se muestran en la tabla 1 para etilendiamina, donde se observa que el tamaño de partícula disminuye ligeramente conforme aumenta el porcentaje de amina, el índice de polidispersidad se considera alto para las microesferas sin embargo se mantiene una sola dispersión en la mayoría de las lecturas, algunas gráficas se muestran a continuación.

Tabla 1. Tamaño de partícula de gelatina/etilendiamina.

Etilendiamina (%)	Tamaño (nm)	PDI
10	685	0.583
15	608	0.610
30	577	0.521

En las figuras 5 y 7, observamos la distribución del tamaño de partículas donde se muestran una sola población en el 10 y 30 % de etilendiamina. Mientras que la excepción fue el de 15 % de etilendiamina donde se muestra en la figura 6 que existen dos poblaciones definidas donde una corresponde a los tamaños mostrados en las otras síntesis, pero se observa una población grande que pueden ser aglomeraciones, esto continuó en las repeticiones de este porcentaje sin mostrar cambios.

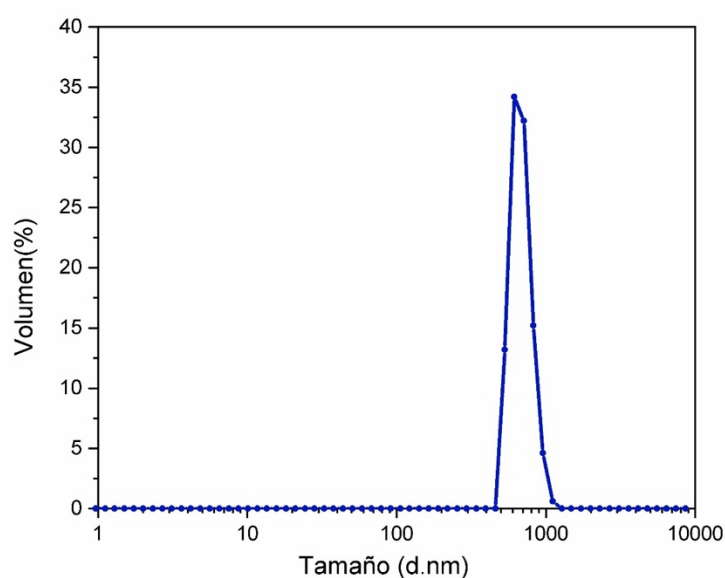


Figura 5. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 10% con etilendiamina.

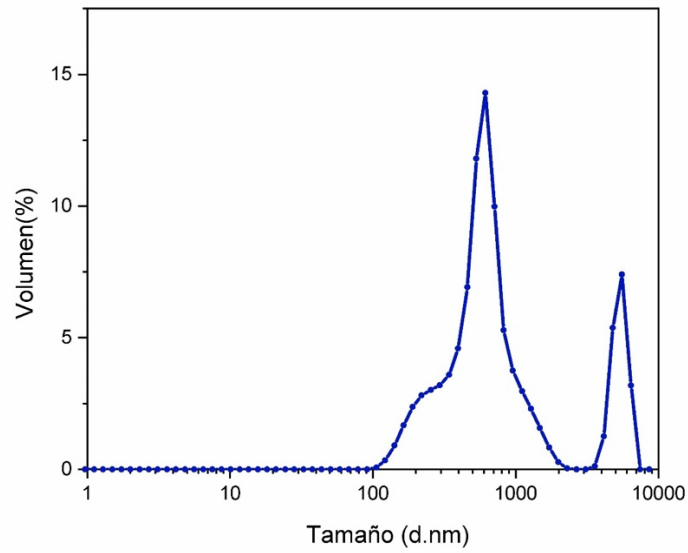


Figura 6. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 15% con etilendiamina.

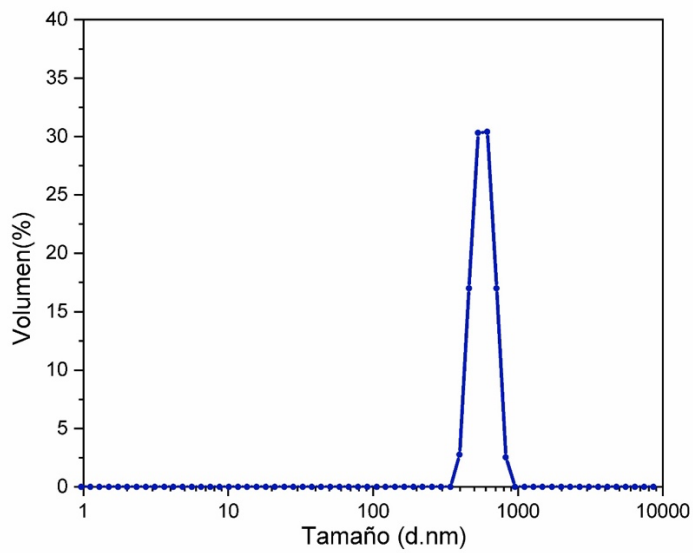


Figura 7. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 30% con etilendiamina.

En la tabla 2 se muestran los resultados del potencial Z de las microesferas de etilendiamina, donde la carga superficial de las partículas va disminuyendo conforme aumenta el porcentaje de etilendiamina.

Tabla 2. Potencial Z de partículas de etilendiamina.

Etilendiamina (%)	Potencial Z (mV)
10	26.6
15	25.6
30	21.4

Para las microesferas de espermina podemos ver los resultados en la tabla 3, donde el tamaño de partícula se muestra mayor conforme aumenta el porcentaje de amina incorporado en la reacción, pero el índice de polidispersidad es mayor respecto a lo considerado en las micropartículas pero consistente con la reacción con etilendiamina, en la figura 8 se muestra una sola distribución correspondiente al 15% de espermina y en la figura 9 se muestran el 30% que contiene dos poblaciones bien definidas siendo una 30 nm donde son muy pequeñas. Sin embargo, el tamaño de las microesferas disminuye cuando es menor porcentaje de espermina con relación al de 30% pero no se considera muy diferentes respecto al tipo de amina utilizada.

Tabla 3. Tamaño de partícula de espermina.

Espermina (%)	Tamaño (nm)	PDI
15	485	0.502
30	634	0.634

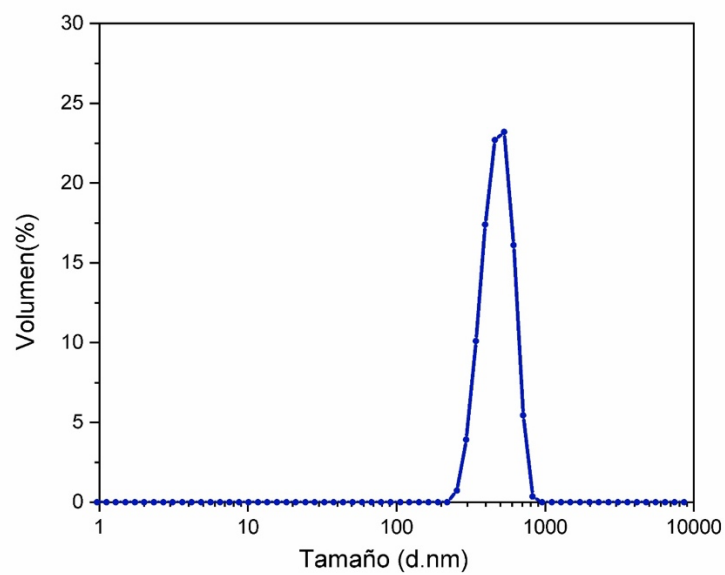


Figura 8. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 15% con espermina.

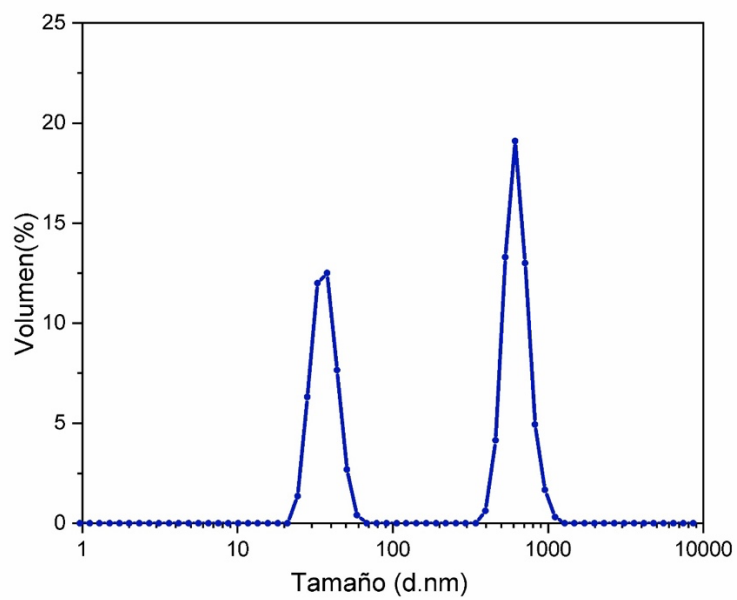


Figura 9. Medición de tamaño de partícula de la reacción al 30% con espermina.

En la tabla 4 se muestra el valor de potencial Z, en el cual se observa claramente el aumento de la carga superficial de la microesfera con forme se aumenta el porcentaje de amina, esto es debido a la diferencia en la naturaleza de las animas utilizadas.

Tabla 4. Potencial Z de partículas de espermina.

Espermina (%)	Potencial Z (mV)
15	33.2
30	48.9

III.3 Determinación de contenido de grupos amina.

Este análisis se realizó para determinar el porcentaje real de la incorporación de los grupos amina en las microesferas de gelatina respecto a la cantidad teórica que se calculó y se agregó en la reacción. Se determinó la cantidad de grupos amina por medio del método TNBS, donde se determinó por triplicado cada reacción. Los resultados se observan en la tabla 5, donde podemos ver que varía un poco la cantidad incorporada en las microesferas en respecto a lo que se colocó en la reacción, esto es algo que no depende del analista sino de la misma naturaleza de la reacción.

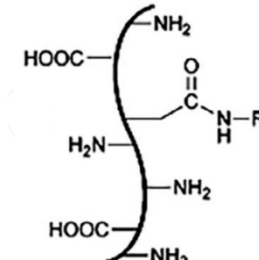
Tabla 5. Grupos amina teórico y experimental en las microesferas gelatina catiónica.

Microesfera	% Teórico	% Experimental	% DS
Gelatina/etilendiamina	10	17	1.51
	15	17	1.47
	30	24	1.66
Gelatina/espermina	15	14	1.38
	30	29	1.78

III.4 Caracterización por espectrofotometría de infrarrojo.

En el espectro de infrarrojo de la gelatina se utiliza como blanco y se determinan sus grupos funcionales para corroborar nuestro material de inicio, donde las bandas características de una estructura determinada pueden ser observadas, en este análisis se observa a 3274 cm^{-1} una banda correspondiente al estiramiento del enlace N-H, así mismo a 1629 cm^{-1} se encuentra presente una banda que corresponde al estiramiento C=O del carbonilo de tipo amida y a 1525 cm^{-1} se presenta una banda que corresponde con el doblamiento del enlace N-H, estos serán nuestras bandas del compuesto de partida determinados en la tabla 6.

Tabla 6. Tabla de Identificación de bandas de infrarrojo.

Grupo funcional	Numero de onda (cm^{-1})	Gelatina catiónica
N-H	3274	
C=O amida	1629	
N-H	1525	

En un estudio se realizó la lectura de los compuestos donde se comparó la gelatina y las reacciones de microesferas en los 3 diferentes porcentajes que se seleccionaron, Donde en la figura 10 se puede observar las 4 lecturas y destacándose las 3 señales principales y determinando una correlación entre el porcentaje de compuesto catiónico y la intensidad de la banda, por lo cual se determina que a mayor intensidad de la banda mayor presencia de grupos catiónicos muestra la microesfera.

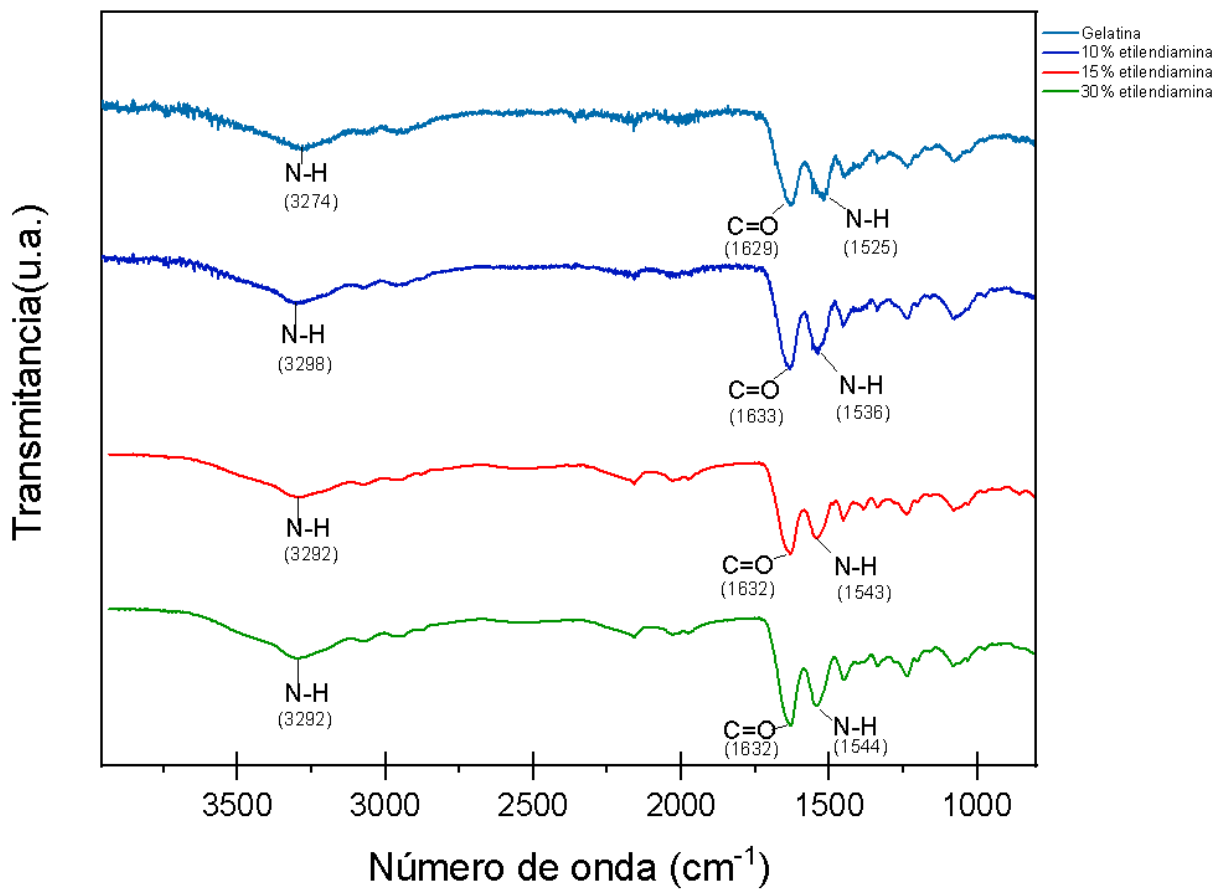


Figura 10. Espectro infrarrojo de gelatina y microsferas a diferentes porcentajes de cationización con etilendiamina.

Por otro lado, se realizó el mismo análisis donde se compara en la figura 11, la gelatina con las microsferas que tienen 15 y 30 % de espermina, donde se resaltan las 3 principales señales a comparar, donde se muestra un pequeño desplazamiento con el grupo amina pero de determina que la intensidad de la banda corresponde al aumento del grupo amina.

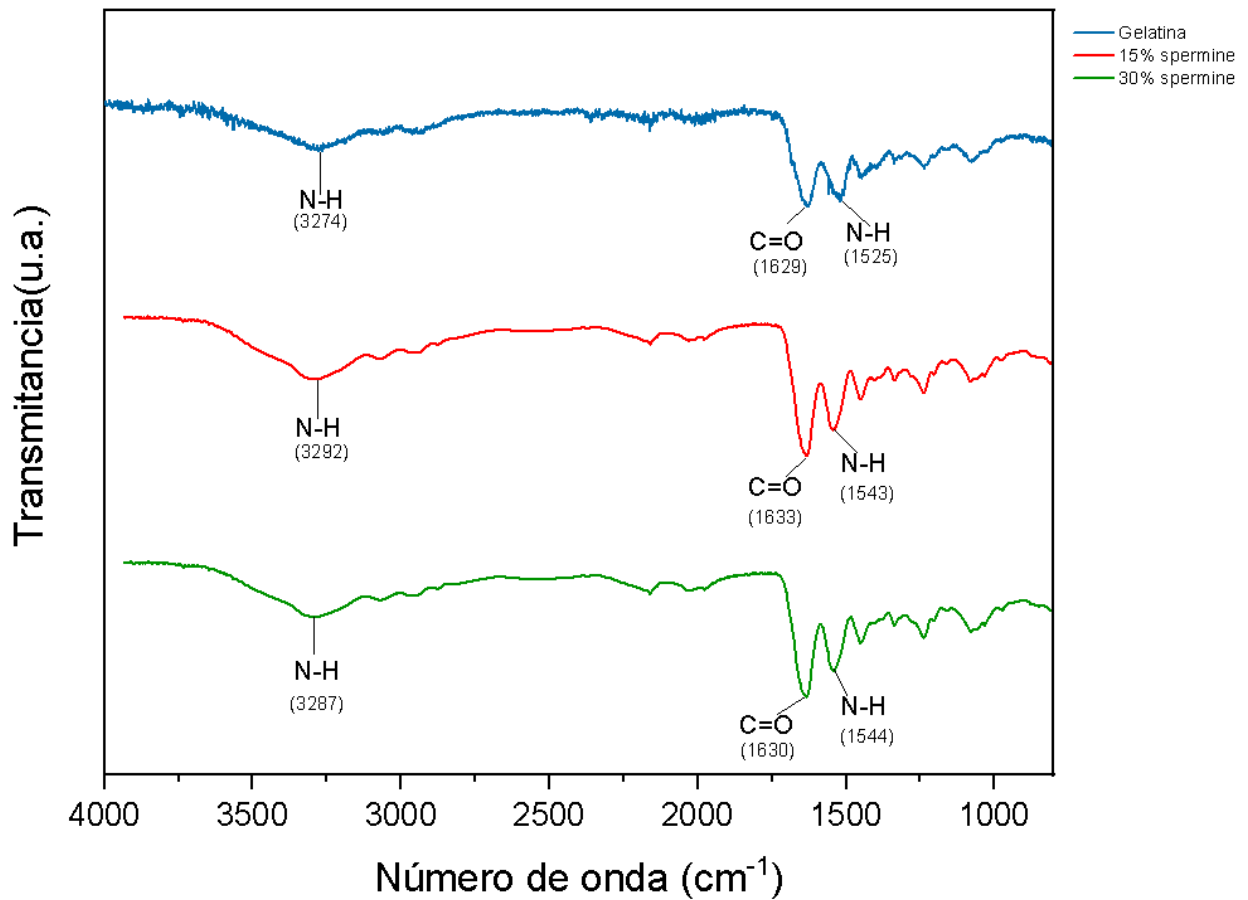


Figura 11. Espectro infrarrojo de gelatina y microesferas a diferentes porcentajes de cationización con espermina.

III.5 determinación de biocompatibilidad

Para evaluar el efecto de las micropartículas cargadas con el plásmido y su efecto en la viabilidad celular, se realizó un ensayo con células HeLa expuestas a cada componente, así como al complejo microesferas con plásmido, posteriormente se midió la cantidad de células vivas empleando el método de MTT.

El ensayo se dividió en dos secciones en la figura 12, se observa que el plásmido pYEFP que fue producido y purificado en el laboratorio muestra que no compromete la viabilidad de las células manteniendo el 100% de las células vivas, mientras que las microesferas disminuyen un poco alcanzando un 85% de viabilidad celular demostrando que las micropartículas por si solas las afecta pero no siendo consideradas citotóxicas. Este decremento mostrado por las microesferas puede ser debido a que el ingreso de estas a las células puede desencadenar alteraciones en procesos celulares comprometiendo la viabilidad celular (Cameron et al., 2022) en comparación con el cultivo control.

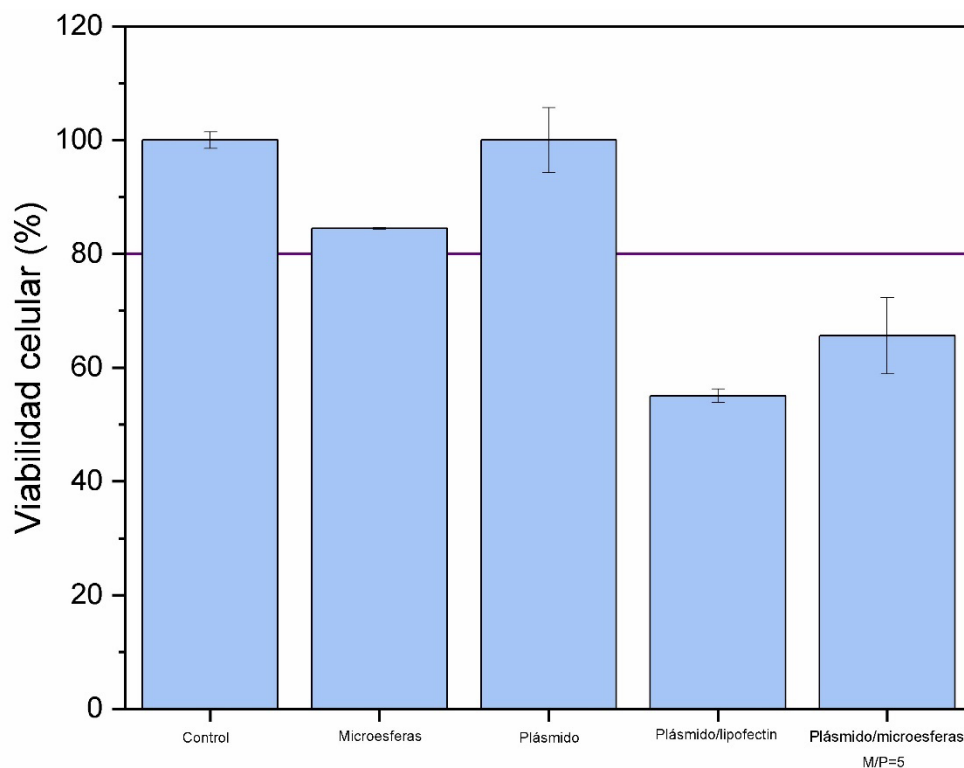


Figura 12. Viabilidad celular de componentes y mezcla de las microesferas.

Los complejos de microesfera/plásmido y plásmido/lipofectin cuentan con un porcentaje de viabilidad inferior al mínimo necesario establecido por la norma ISO 10993-5 para ser

considerados como biocompatibles por lo tanto se consideran citotóxicos al no cumplir con los estándares establecidos, a diferencia de las microesferas que si se consideran biocompatibles al presentar una viabilidad celular mayor al 70% (ISO 10993-5:2009).

En un segundo experimento para evaluar las microesferas a utilizar se variaron diferentes concentraciones de microesferas con relación al plásmido utilizado, donde en la figura 13 se muestra que cuando aumenta la concentración de micropartículas utilizada va disminuyendo la viabilidad celular.

Donde observamos el control en el 100% mientras que empieza un decremento de la viabilidad celular en la relación 1:1 microesfera/plásmido (M/P) nos muestra un 73 % de viabilidad celular con relación al control, mientras que la relación 5:1 y 10:1 M/P nos muestra un 60% y 55% de viabilidad celular respectivamente. Estos datos nos indican que las concentraciones de M/P 5:1 y 10:1 se consideran citotóxicas ya que se encuentran por debajo del límite, a diferencia de la concentración de micropartículas M/P=1 que si cumple con el requisito y puede ser considerado biocompatible.

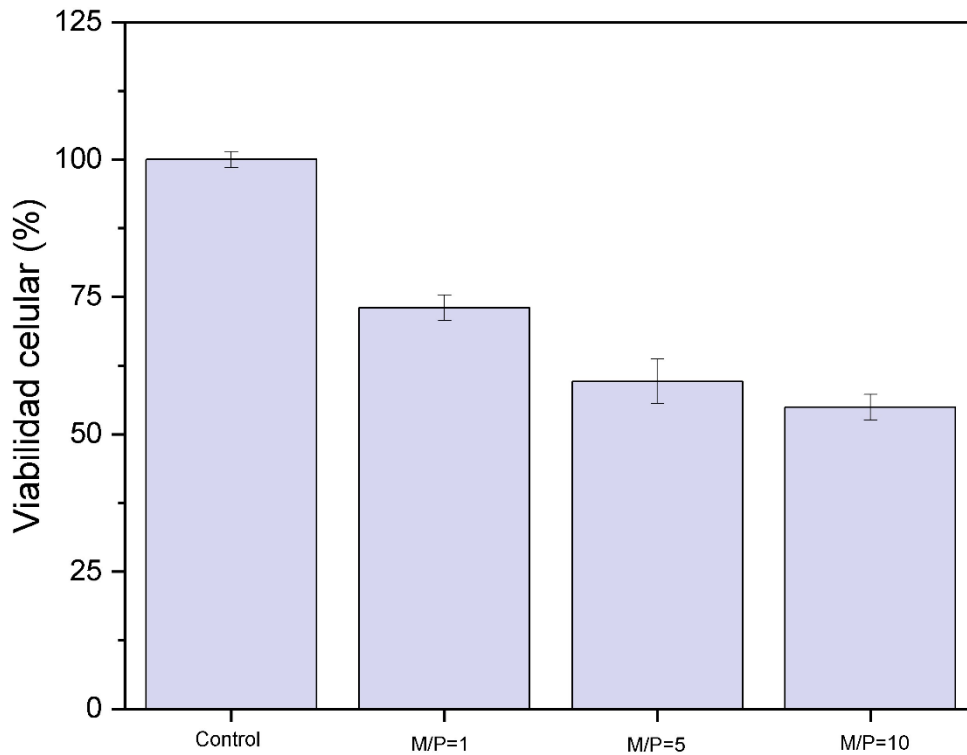


Figura 13. Viabilidad celular de mezcla de las microesferas y plásmido.

III.6 Transfección del plásmido pYFP

El plásmido pYFP fue obtenido mediante el método de lisis alcalina y posteriormente se llevó a cabo una transfección en células HeLa utilizando el reactivo lipofectin. El procedimiento se incluyó que una vez realizado el proceso de transfección las células fueran despegadas de su caja, y se colocaron en un portaobjetos para poder ser visualizadas en campo claro y en el microscopio de fluorescencia. Donde se observa la manifestación de fluorescencia en las células transfectadas, como se evidencia en la figura 14. Se logró un notable porcentaje de transfección del 68%, indicando la proporción de células que experimentaron una exitosa introducción del plásmido. Este porcentaje de transfección es un indicador crucial para evaluar la eficiencia en la

transferencia de material genético a las células, demostrando así que la purificación y expresión del plásmido fue exitosa.

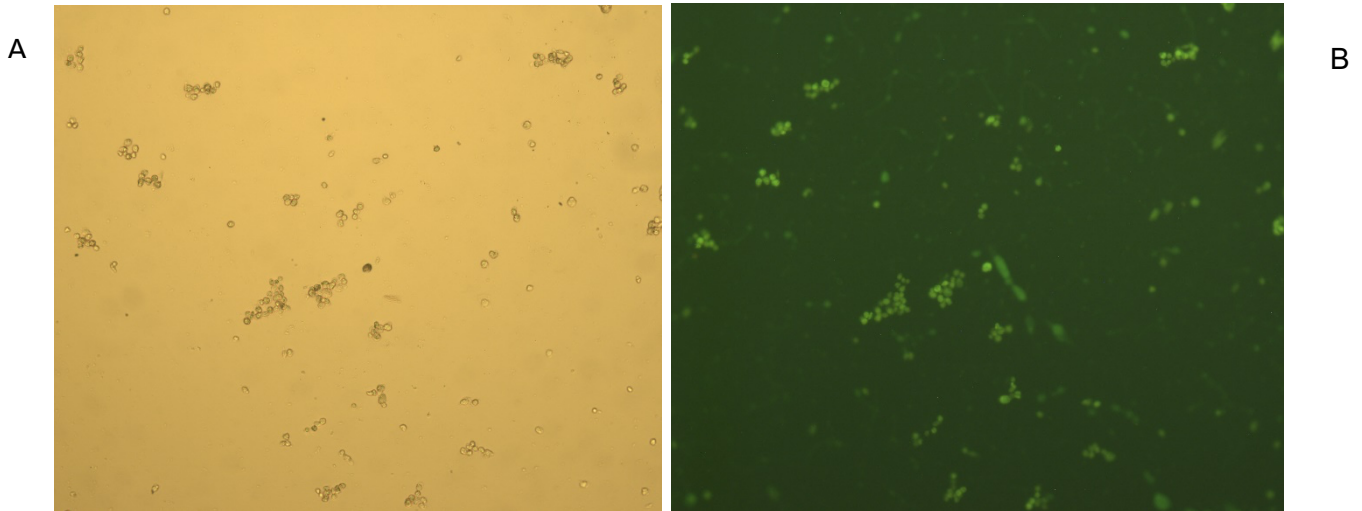


Figura 14. Imágenes de células HeLa transfectadas en campo claro 40x (A) y con filtro de fluorescencia 40x (B).

El ultimo experimento realizado fue aplicando las microesferas como medio de transporte, sin embargo, la falta de estandarización en este proceso, baja cantidad de plásmido debido a la cantidad obtenido en la purificación de este, asi como el tiempo fueron determinantes. Ya que en el experimento con microesferas se utilizó una concentración alta de M/P lo cual no logro mantener una cantidad considerable de células vivas para que pudieran expresar la fluorescencia esperada.

Capítulo IV. Conclusiones

Se determino el método de síntesis adecuado para la preparación de microesferas catiónicas, siendo replicados adecuadamente en diferentes porcentajes de incorporación. El tamaño obtenido de las partículas en ambas composiciones oscilo entre los 400 a 600 nm, con PDI considerados altos sin embargo la mayoría de estas con una sola distribución. Se demostró que la espermina se incorpora mejor, y tiene una mayor cantidad de grupos amina que apoya en la carga superficial de las microesferas que puede ser usado para mejorar la capacidad de transporte.

El plásmido pYEFP fue obtenido con éxito pero en pequeñas cantidades, lo cual limito los estudios posteriores, el estudio se realizó con éxito en la transfección con lipofectamina alcanzando cerca del 70%.

Las microesferas utilizadas para transfección fueron en relación de 5:1 M/P, por lo tanto la cantidad de células que murieron en relación a la baja viabilidad que se determinó. Este estudio no logro ser estandarizado por las limitantes de tiempo.

Capítulo V. Referencias

- Acharya, S., & Sahoo, S. K. (2011). PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 170–183.
- Austin-Ward, E. D., & Villaseca G, C. (1998). La terapia génica y sus aplicaciones. *Revista Médica de Chile*, 126(7), 838–845.
- Cameron, S. J., Sheng, J., Hosseinian, F., & Willmore, W. G. (2022). Nanoparticle effects on stress response pathways and nanoparticle–protein interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7962. <https://doi.org/10.3390/ijms23147962>
- Cancer today. (n.d.). Retrieved May 8, 2021, from *Iarc.fr* website: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–2238.
- Cho, K. W. (2008). Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical cancer research*, 1309-1316.
- Elazar, V., Adwan, H., Bäuerle, T., Rohekar, K., Golomb, G., & Berger, M. R. (2010). Sustained delivery and efficacy of polymeric nanoparticles containing osteopontin and bone sialoprotein antisenses in rats with breast cancer bone metastasis. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 126(7), 1749–1760. <https://doi.org/10.1002/ijc.24890>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: *Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer* (<https://gco.iarc.fr/today>), consultado en mayo de 2021
- Gómez Ayala, A.-E. (2007). Manipulación de especialidades farmacéuticas. *Farmacia profesional* 21(4), 44–48.
- Haas, K., Sin, W. C., Javaherian, A., Li, Z., & Cline, H. T. (2001). Single-cell electroporation for gene transfer in vivo. *Neuron*, 29(3), 583–591.
- Herrero, G. H. (2011). *Tratado de medicina farmacéutica*. Madrid, Spain: Editorial Médica Panamericana.
- ISO 10993-5:2009 (2009). *Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity*. International Organization for Standardization
- Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y., & He, N. (2014). Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*, 4(3), 240–255.

- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178.
- Lastres García, J.L., (2002). Nuevos sistemas orales de liberación modificada. *Schironia I*, 63-71.
- Lechuga, L. M. (2011). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. *In Biotecnología aplicada a la salud humana: (Vol. 9, pp. 8–112).*
- Li, S., Lin, S., Chien, Y. W., Daggy, B. P., & Mirchandani, H. L. (2001). Statistical optimization of gastric floating system for oral controlled delivery of calcium. *AAPS PharmSciTech*, 2(1), E1.
- Madkhali, O., Mekhail, G., & Wettig, S. D. (2019). Modified gelatin nanoparticles for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 554, 224–234.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., & Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 65(1–2), 271–284.
- Mahmoudi Saber, M. (2019). Strategies for surface modification of gelatin-based nanoparticles. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 183(110407), 110407.
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews*, 51(4), 381–395.
- Pfeifer, A., & Verma, I. M. (2001). GENETHERAPY: Promises and Problems. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2(1), 177–211.
- Pillo, A. L. (2016) Desarrollo de sistemas micro y nano particulares de liberación sostenida para administración parenteral. Facultad de farmacia universidad complutense
- Recillas-Targa, F. (2006). Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular Biotechnology*, 34(3), 337–354.
- Sánchez, N, Catherine. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70659-x](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70659-x)
- Sáez, V., Hernáez, E., & Angulo, y. L. S. (n.d.). *MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS DESDE MATERIALES POLÍMEROS.*

- Shen, H., Mittal, V., Ferrari, M., & Chang, J. (2013). Delivery of gene silencing agents for breast cancer therapy. *Breast Cancer Research: BCR*, *15*(3), 205. <https://doi.org/10.1186/bcr3413>
- USP 30, (2007). The United States Pharmacopoeia, 30 ed., *U.S. Pharmacopoeial Convention, Inc.*, Rockville, MD.
- Urrejola, M. C., Soto, L. V., Zumarán, C. C., Peñaloza, J. P., Álvarez, B., Fuentevilla, I., & Haidar, Z. S. (2018). Sistemas de nanopartículas poliméricas II: Estructura, métodos de elaboración, características, propiedades, biofuncionalización y tecnologías de autoensamblaje Capa por Capa (layer-by-layer self-assembly). *Revista Internacional de Morfología [International Journal of Morphology]*, *36*(4), 1463–1471.
- Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J. J., Stassi, G., Huntly, B., Herrmann, H., Soulier, J., Roesch, A., Schuurhuis, G. J., Wöhrer, S., Arock, M., Zuber, J., Cerny-Reiterer, S., ... Eaves, C. (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews. Cancer*, *12*(11), 767–775. <https://doi.org/10.1038/nrc3368>
- Wang, H., Boerman, O. C., Sariibrahimoglu, K., Li, Y., Jansen, J. A., & Leeuwenburgh, S. C. G. (2012). Comparison of micro- vs. nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase. *Biomaterials*, *33*(33), 8695–8703.
- Yang, H., Deng, L., Li, T., Shen, X., Yan, J., Zuo, L., Wu, C., & Liu, Y. (2015). Multifunctional PLGA nanobubbles as theranostic agents: Combining doxorubicin and P-gp siRNA co-delivery into human breast cancer cells and ultrasound cellular imaging. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *11*(12), 2124–2136. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2168>
- Young, P. (2023). Treatment to cure: Advancing AAV gene therapy manufacture. *Drug Discovery Today*, *28*(7), 103610. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103610>
- Yu, M.-Z., Pang, W.-H., Yang, T., Wang, J.-C., Wei, L., Qiu, C., Wu, Y.-F., Liu, W.-Z., Wei, W., Guo, X.-Y., & Zhang, Q. (2016). Systemic delivery of siRNA by T7 peptide modified core-shell nanoparticles for targeted therapy of breast cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *92*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.06.020>
- Zwiorek, K., Kloeckner, J., Wagner, E., & Coester, C. (2005). Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, *7*(4), 22–28.