



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA
CAMPUS AEROPUERTO



**USO POTENCIAL DE SÍLICES MESOCELULARES PARA
ENCAPSULAMIENTO DE FÁRMACOS MACROMOLECULARES**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de: Ingeniera Biomédica

Presenta:

Diana Catalina Tovar Ledesma

Director de tesis

Dr. Rufino Nava Mendoza

Co-director

Dra. Luz María López Marín



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA
CAMPUS AEROPUERTO



**USO POTENCIAL DE SÍLICES MESOCELULARES PARA
ENCAPSULAMIENTO DE FÁRMACOS MACROMOLECULARES**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de: Licenciada en
Ingeniería Biomédica

Presenta:

Diana Catalina Tovar Ledesma

Director de tesis

Dr. Rufino Nava Mendoza

Co-director

Dra. Luz María López Marín

Dr. Rufino Nava Mendoza
Presidente

Firma

Dra. Luz María López Marín
Secretario

Firma

Dra. María de los Angeles Cuán Hernández
Vocal

Firma

Dr. Edgar Jiménez- Cervantes Amieva
Suplente

Firma

Querétaro, Qro.
Septiembre de 2020
México

Dirección General de Bibliotecas UAQ

DEDICATORIA

A mi padre, el ser más maravilloso y especial, por todas tus enseñanzas, su amor y comprensión incondicional, por todo lo bueno que representas y que vivirá siempre, el mejor en pocas palabras.

A mi madre por ser un ejemplo de fortaleza y valentía, por todo su apoyo y cariño.

A mis hermanas, Miriam y Sofi, los seres más increíbles, a Bere por enseñarme siempre y por su cariño en todo momento.

A mi familia por todo su apoyo y a mis amigos que ya son familia: Erick V.

A todos los maestros que fueron parte de mi formación.

A Alberto por estar siempre.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Nanotecnología de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) y en el laboratorio de Nanobio-óptica del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM a través del proyecto PAPIIT IT203518.

Agradezco el otorgamiento de una beca de titulación por parte del proyecto PAPIIT IT203518 de la DGAPA-UNAM, así como el excelente apoyo para los análisis de microscopías del Instituto de Neurobiología (UNAM), Ing. Nydia Hernández Ríos y M. en C. Lourdes Palma Tirado, y del CFATA (UNAM), por las doctoras Carmen Peza y Alicia del Real. Agradezco también los análisis de dispersión de luz y potencial zeta por la Dra. Luz María Avilés (CINVESTAV, Querétaro), y el apoyo para experimentos de biología molecular por la Unidad de Proteogenómica (INB, UNAM).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, especialmente al laboratorio de Nanobio-óptica.

A la Dra. Luz María López Marín por su comprensión, conocimiento, paciencia y asesoría durante todo el proyecto, gracias por todo su tiempo y entusiasmo.

Al Dr. Rufino Nava Mendoza por su apoyo y disposición en todo momento, su interés en el proyecto y todo su conocimiento.

A la Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández por introducirme a un nuevo mundo de la ciencia, gracias por la oportunidad y la confianza.

Al Dr. Edgar Jiménez por su paciencia y apoyo durante todo el proyecto, por todas las aportaciones para enriquecerlo.

A José Carlos Olvera Olvera, mi compañero de todas las etapas, por su apoyo indispensable durante todo este tiempo.

A los miembros del laboratorio de Nanobio-óptica, M. en C. Carlos Valdemar y Dr. Ravichandran Manisekaran por su paciencia y apoyo durante los experimentos, a M. en C. Ana Patricia Santos por su compañía y consejos.

A la Dra. Beatriz Marcela Millan del CFATA, UNAM en la realización de los estudios de difracción de rayos X.

A la M. en C. Alicia del Real López del Laboratorio de Microscopía del CFATA, UNAM por su ayuda en la obtención de imágenes en microscopía electrónica de barrido.

A la Dra. Luz María Avilés Arellano del CINVESTAV, Querétaro por su apoyo con las mediciones de potencial zeta.

A mis amigos de la universidad por su compañía y comprensión siempre.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Fundamentación teórica	2
1.2.1. Nanomedicina	2
1.2.2. Materiales mesoporosos	3
1.2.3. Espumas de sílice mesocelular (MCF)	4
1.2.4. Macromoléculas	6
1.2.4.1. ADN plasmídico	6
1.2.4.2. Albúmina de suero bovino (BSA)	8
1.2.4.3. ARN	8
1.2.5. Detección de macromoléculas	9
1.2.5.1. Intercaladores de ácidos nucleicos	9
1.2.5.2. Fluorocromos	9
1.2.5.3. Acoplamiento covalente de fluorocromos en proteínas	10
1.2.6. Análisis de adsorción y encapsulamiento de macromoléculas en sílice	11
1.2.6.1. Electroforesis	11
1.2.6.2. Microscopia confocal	12
1.2.6.3. Espectrofotometría UV	13
1.2.6.4. Método de determinación de proteínas	14

1.3.	Justificación	15
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
2.1.	Hipótesis	16
2.2.	Objetivos	16
2.2.1.	Generales	16
2.2.2.	Particulares	16
3.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	17
3.1.	Síntesis de partículas de sílice mesocelular (MCF)	18
3.1.1.	Funcionalización de MCF con grupos aminos	19
3.2.	Caracterización de Sílice mesocelular nativa y aminada	19
3.2.1.	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	20
3.2.2.	Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	20
3.2.3.	Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ a 77 K.	20
3.2.4.	Difracción de rayos X a bajos ángulos (DRX).	21
3.2.5.	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	21
3.2.6.	Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Zeta	22
3.2.7.	Análisis termogravimétrico (TGA)	22
3.3.	Obtención de ADN plasmídico	22
3.3.1.	Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.	22
3.3.2.	Purificación de ADN plasmídico	23
3.3.3.	Espectrofotometría UV	24
3.3.4.	Electroforesis	24
3.4.	Encapsulamiento de ADN plasmídico en partículas de sílice mesocelular	25

3.4.1.	Eficiencia de encapsulamiento _____	25
3.5.	Preparación de BSA-FITC _____	25
3.5.1.	Cuantificación de proteínas por método del ácido bicinconínico (BCA) para BSA 26	
3.6.	Encapsulamiento de proteínas en partículas de sílice mesocelular (MCF y MCF-NH ₂)	26
3.7.	Tratamiento para protonación de las partículas de sílice _____	27
3.8.	Obtención de ARNs a partir de células inmortales _____	27
3.8.1.	Pase celular _____	27
3.8.2.	Obtención de ARN _____	27
3.8.3.	Espectrofotometría UV _____	28
3.8.4.	Electroforesis _____	28
3.9.	Encapsulamiento de ARN en partículas de sílice mesocelular _____	29
3.10.	Encapsulamiento de ADN plasmídico en partículas de sílice protonada _____	29
3.11.	Microscopia confocal _____	30
4.	RESULTADOS _____	30
4.1.	Caracterización físico-química de las partículas MCF Y MCF-NH ₂ _____	30
4.2.	Potencial zeta de las partículas MCF y MCF-NH ₂ _____	38
4.3.	Obtención de ADN plasmídico _____	39
4.4.	Visualización de ADN plasmídico en partículas de MCF en Microscopia confocal __	42
4.5.	Marcaje de proteínas con FITC _____	44
4.6.	Visualización de BSA-FITC en partículas de MCF por microscopia confocal _____	46
4.7.	Obtención de ARN _____	50
4.8.	Visualización de ARN en partículas de MCF-NH ₂ en microscopia confocal _____	52
4.9.	Análisis de ADN plasmídico en partículas de MCF-NH ₂ protonada _____	53

5. CONCLUSIONES	54
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Diagrama de formación de BSA-15 y MCF (Agudelo et al., 2020)</i>	5
<i>Figura 2 Transformación de la bacteria E. coli</i>	7
<i>Figura 3 Proceso de transformación para obtener ADN plasmídico.</i>	7
<i>Figura 4 Estructura del DAPI</i>	9
<i>Figura 5 Estructura del FITC</i>	10
<i>Figura 6 Reacción del FITC con los grupos amino de los compuestos (Hermanson, 2013)</i>	11
<i>Figura 7 Diagrama microscopio confocal..</i>	13
<i>Figura 8 Diagrama experimental</i>	18
<i>Figura 9 Micrografías por TEM.</i>	31
<i>Figura 10 Microscopías por SEM de las partículas MCF.</i>	31
<i>Figura 11 Imagen SEM de las partículas MCF-NH₂</i>	32
<i>Figura 12 Imagen SEM y medición de poros de las partículas MCF-NH₂</i>	33
<i>Figura 13 Isotermas de adsorción-desorción de N₂</i>	34
<i>Figura 14 Distribución del tamaño de poro de la espuma de sílice mesocelular pura y funcionalizada</i>	35
<i>Figura 15 Difractogramas de las partículas.</i>	36
<i>Figura 16 Espectro FT-IR de las partículas de sílice mesocelular MCF y MCF-NH₂.</i>	37
<i>Figura 17 Gráficas de DTA y GTA para MCF Y MCF-NH₂.</i>	38
<i>Figura 18 Graficas de potencial zeta de las partículas MCF y MCF-NH₂.</i>	39

Figura 19 Crecimiento de colonias de la bacteria E. coli modificadas con el plásmido en medio LB que contiene ampicilina.	40
Figura 20 Cuantificación de ADN plasmídico purificado por espectrometría UV.	41
Figura 21 Análisis del plásmido en gel de agarosa.	42
Figura 22 Imágenes de microscopio confocal de las partículas con ADN.	43
Figura 23 Acercamiento a las partículas por microscopía confocal.	44
Figura 24 Espectros de absorbancia para los lotes obtenidos del marcaje de BSA con FITC.	45
Figura 25 Grafica con los valores de concentración para FITC-BSA obtenida del marcaje de proteínas.	46
Figura 26 Campo general de las partículas con fluorescencia debido a la presencia de la proteína BSA marcada con FITC.	47
Figura 27 Proyecciones de las partículas por microscopía confocal para MCF (izquierda) y MCF-NH2 (derecha).	48
Figura 28 Acercamiento a una partícula de MCF de un corte medio en Z por microscopía confocal.	49
Figura 29 Acercamiento a una partícula de MCF-NH2 de un corte medio en Z por microscopía confocal.	49
Figura 30 Cuantificación de ARN por espectrometría UV.	51
Figura 31 Análisis de ARN en gel de agarosa. A la izquierda referencia de tallas moleculares, a la derecha ARN.	52
Figura 32 Acercamiento a una partícula de MCF-NH2 con fluorescencia debido a la presencia de ARN	53
Figura 33 Imagen por microscopía confocal de la MCF-NH2 después de ser protonada y en incubación con ADN.	54

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

En la actualidad, la administración de fármacos de naturaleza proteica y peptídica suele ser por la vía oral o vía intravenosa, que a su vez presenta una baja biodisponibilidad por parte del principio activo, debido a que se administran solos o bien, protegidos por un polímero hidrofílico llamado polietilenglicol y por consecuencia es necesario la aplicación de sucesivas dosis. Esto provoca que la probabilidad de causar efectos colaterales en el individuo sea alta (Neira et al., 2013). Es por ello que desde hace mucho tiempo se han buscado nuevos sistemas que permitan la entrega controlada de fármacos de una forma segura y con ello una liberación más eficiente, reduciendo la concentración de fármacos y la frecuencia de la dosis, ofreciendo así una administración más sencilla (Mamaeva et al., 2013).

Los nanomateriales son capaces de penetrar en los tejidos y son fácilmente absorbidos por las células, lo que permite un suministro eficiente de medicamentos a los sitios de acción objetivo. También se ha reportado que la absorción de las nanoestructuras es 15 a 250 veces mayor que la de las micropartículas en el rango de 1 a 10 μm (Ochubiojo et al., 2012).

Las partículas meso-estructuradas (es decir con poros de 2 a 50 nm de diámetro) específicamente las sílices mesoporosas, son consideradas excelentes candidatas para la administración controlada de fármacos debido a la estructura de sus poros, a su amplia área de superficie y a su gran volumen de poros. La superficie mesoporosa de la sílice es aplicable en múltiples campos como marcaje celular y tratamiento de cáncer (Aval, 2016).

Los avances en la síntesis de sílices mesoporosas han permitido tener un tamaño de partícula, tamaño de poro y morfología controlados, lo que ha hecho que sean muy atractivas para diferentes aplicaciones, entre ellas su utilización como potenciales vehículos para la liberación controlada de moléculas huésped

como fármacos y biomoléculas. Se han realizado pruebas con distintos tipos de síntesis de sílice, entre ellas las tipo MCM-41 que a pesar de ser internalizadas fácilmente en los ensayos in vitro para células animales y vegetales y no presentar citotoxicidad, presenta restricciones estructurales, como que el tamaño de poro máximo es 6 nm, lo que limita su aplicación como vehículo para la adsorción y liberación de moléculas grandes, como proteínas y ácidos nucleicos (Gao et al., 2009)

Para mejorar el rendimiento en el proceso de internalización, se ha propuesto el ampliar el tamaño de los poros de la sílice mesoporosa funcionalizada (Solberg & Landry, 2006). Por ello la espuma de sílice mesocelular (MCF) ha sido una buena candidata debido a su tamaño de poro que va de 17 a 44 nanómetros (Han et al., 2000).

1.2. Fundamentación teórica

1.2.1. Nanomedicina

Los avances de la nanotecnología están abriendo posibilidades en medicina que antes no se tenían contemplados, dando lugar a la generación de un campo nuevo de investigación denominado “nanomedicina”, lo que da lugar a aplicaciones novedosas en el área de diagnóstico, medicina regenerativa y la administración controlada de fármacos (Ortega et al, 2013).

Se entiende como nanomedicina al conjunto de prácticas médicas, incluyendo la prevención, el diagnóstico y la terapia, que requieren tecnologías basadas en interacciones entre el cuerpo humano y materiales, estructuras o dispositivos cuyas propiedades se definen a escala nanométrica (Freitas, 2005).

Los materiales y las tecnologías que se han utilizado para la construcción de nanosistemas de liberación de fármacos son muy diversos, pero se pueden clasificar de manera muy general en 2 grandes grupos (Rojas-Aguirre et al., 2016):

- a. Nanoestructuras orgánicas. Pertenecientes a este grupo se encuentran los materiales poliméricos, los cuales son utilizados para construir nanoesferas, nanocápsulas, micelas, liposomas, dendrímeros y conjugados polímero-fármaco.
- b. Nanoestructuras inorgánicas. En esta clasificación se encuentran las nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de sílice mesoporosa y nanotubos de carbono.

1.2.2. Materiales mesoporosos

Los materiales porosos se clasifican de acuerdo con la IUPAC en función del tamaño de poro: siendo materiales microporosos aquellos que tengan un tamaño de poro inferior a 2 nm, mesoporosos aquellos que tengan un tamaño de poro de entre 2 y 50 nm y materiales macroporosos los que cuenten con un tamaño de poro de más de 50 nm.

De las nanopartículas de sílice mesoporosas se han obtenido buenos resultados como un medio de transporte o de acarreamiento prometedor y novedoso de medicamentos debido a su estructura mesoporosa única, que preserva el nivel de estabilidad química, la funcionalidad de la superficie y la biocompatibilidad de tal manera que aseguran una liberación controlada además de la administración de fármacos de diversas moléculas (Slowing et al., 2008).

Entre las propiedades de los materiales inorgánicos para su uso en encapsulación de agentes bioactivos destacan: gran área de superficie específica, volumen de poro óptimo, se pueden cargar y liberar eficientemente diferentes categorías de fármacos y/o principios activos, la eficiencia de carga y cinética de liberación, la cual puede ser controlada ajustando la composición del material inorgánico, además, la presencia de grupos químicos que pueden funcionalizarse con moléculas bioactivas (Wu et al., 2013).

1.2.3. Espumas de sílice mesocelular (MCF)

Las espumas de sílice mesocelulares (MCF) consisten en una estructura de poros tridimensional de células grandes interconectadas por ventanas más estrechas. Las sílices de tipo MCF muestran un rendimiento mejorado como soporte para enzimas inmovilizadas y como adsorbentes en comparación con otras sílices mesoporosas (Schmidt-Winkel et al., 1999).

Por lo general hay dos vías para la síntesis de materiales de silicato de mesoporos grandes. La primera es expandiendo los poros con una plantilla de tensioactivo con moléculas orgánicas adecuadas, sirviendo como agente de plantilla auxiliar. La segunda vía es utilizar copolímeros anfifílicos o tensioactivos con cadenas hidrofóbicas más largas, que sirven para moldear poros (Knežević & Durand, 2015). La síntesis de la espuma de sílice mesocelular se puede obtener a partir de la síntesis de SBA-15 (Santa Barbara Amorfa No. 15), utilizando la primera vía.

La SBA-15 es un material con mesoporos y paredes, cuyas propiedades térmicas le dan una gran estabilidad. La SBA-15 es un material hexagonal con arreglo hexagonal de poros entre 3 y 5 nm (Barbaro & Liguori, 2010). Se obtiene a partir de un proceso sol-gel en cual se suele utilizar como precursor el tetraetilortosilicato (TEOS) que es la fuente de sílice y como agentes directores de estructura orgánica a un copolímero de bloques anfifílicos, como el Pluronic123 (EO20-PO70-EO20, P123). Este consiste en un copolímero de tres bloques, y es un surfactante que en solución tiene dos partes dentro de la misma molécula (un grupo de cabeza hidrofílico y una larga cola hidrofóbica), las cuáles al disolverse en agua, se agregan y autoorganizan de tal manera que minimizan el contacto entre sus extremos incompatibles. En la *Tabla 1* se muestra una comparación entre la SBA-15 y sílices mesocelulares.

Tabla 1.- Comparación entre las propiedades texturales de la MCF contra la SBA-15 (Knežević & Durand, 2015).

Características	MCF	SBA-15
Área superficial	910 m ² /g	800 - 940 m ² /g
Tamaño de poro	10 - 42 nm	3 - 5 nm
Volumen de poro	2.2 mc ³ /g	1 mc ³ /g

Para la síntesis de espumas de sílice mesocelulares, además del surfactante, se utiliza un agente de hinchamiento orgánico (no polar), como puede ser el mesitileno o 1, 3,5-trimetilbenceno, con el fin de crear arreglos micelares más grandes que le permitan al TEOS formar estructuras con poros más grandes, obteniendo así, poros entre 10 y 42 nm. Tal y como se exhibe en la Figura 1.

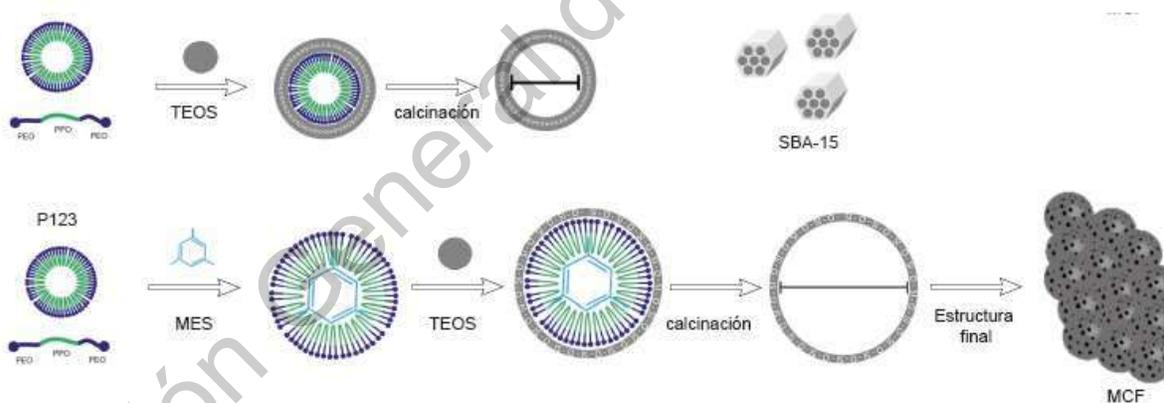


Figura 1 Diagrama de formación de BSA-15 y MCF (Agudelo et al., 2020)

La superficie de la sílice (SiO₂) está compuesta por grupos silanol (Si-OH) y puentes de siloxano (-Si-O-Si-). A un pH superior a 3, los grupos de silanol tienden a ser desprotonados como Si-O⁻, lo que lleva a una superficie cargada negativamente (Mathé et al., 2013).

1.2.4. Macromoléculas

1.2.4.1. ADN plasmídico

Los plásmidos son pequeñas moléculas de ADN circular con la capacidad de replicarse forma autónoma, independientemente del cromosoma. Son muy comunes en bacterias y algunos de ellos, sobre todo los más pequeños, existen en las células bacterianas en un número elevado (hasta 100 copias por célula). Éstos, portan información génica para muchas funciones que no son esenciales para la célula en condiciones normales de crecimiento. (Betancor et al., 2006). En el área de la Biología molecular e ingeniería genética, los plásmidos son una herramienta importante ya que pueden ser utilizados como “vectores” para introducir en ellos cualquier fragmento de ADN de interés, de tal manera que se puede replicar de forma natural al interior de la bacteria. Actualmente existen muchos plásmidos disponibles para usar con este fin y en donde la mayoría contienen al menos los siguientes elementos (Caballero et al., 2007):

- Un origen de replicación autónomo para *Escherichia coli* que permite la replicación autónoma en esta bacteria.
- Un gen que confiere a la bacteria portadora del plásmido resistencia a algún antibiótico, generalmente ampicilina.
- Un sitio de clonación múltiple en el que se encuentra dianas únicas para varias enzimas de restricción y que permite la introducción del ADN a clonar.

Para la obtención de un lote de un plásmido en específico primero debe introducirse el material genético a las bacterias, este paso es llamado transformación. Una de las bacterias más utilizadas para transformación es la *E. coli*. La transformación por choque térmico consiste en la preparación de una suspensión de células de *E. coli* con el plásmido seleccionado dejando incubar unos minutos en hielo para después pasarlo a una temperatura mucho mayor con el fin de permeabilizar la membrana y permitir de esta manera que el ADN plasmídico entre en la célula (Primrose & Twyman, 2006). Las células

transformadas se depositan en un medio rico en nutrientes para que sigan creciendo ya con la expresión del nuevo plásmido. Para comprobar que las células fueron transformadas se realiza un proceso de selección que utiliza la región de resistencia a antibiótico que posee el plásmido, para esto se siembra un cultivo en agar con antibiótico, el cual permite solo el crecimiento de las bacterias que fueron transformadas.

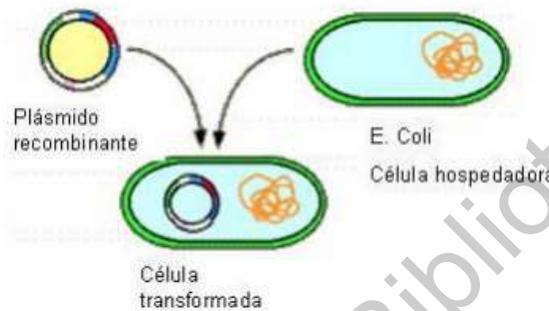


Figura 2 Transformación de la bacteria E. coli

Con el fin de obtener suficiente cantidad de material genético es necesario reproducir más células por lo que se realiza un cultivo a partir de una colonia de células transformadas sobre un medio selectivo con antibiótico (Glencross et al., 2001).

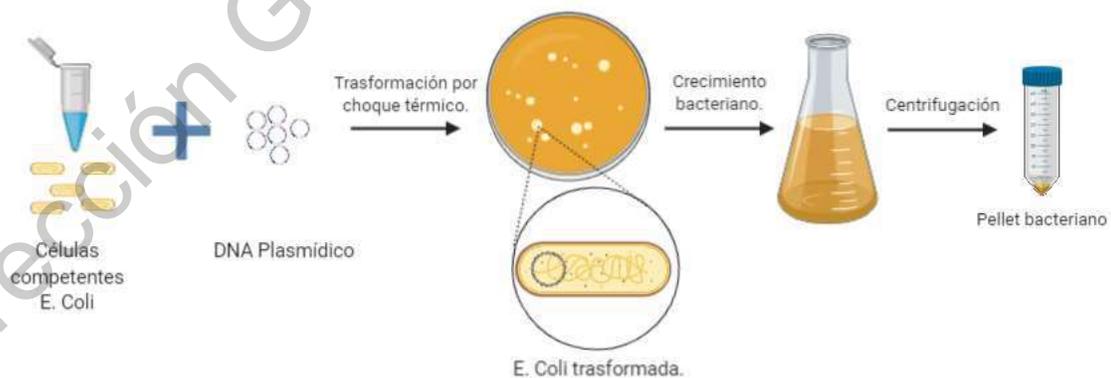


Figura 3 Proceso de transformación para obtener ADN plasmídico.

Por último, para obtener un lote de ADN plasmídico es necesario llevar a cabo el proceso de purificación, el cual consiste en el lisado de las membranas de las

células con el fin de eliminar el material ribonucleico y desnaturalizar el ADN genómico para posteriormente ser desechado, todo esto en condiciones apropiadas de pH. El ADN plasmídico es renaturalizado con una solución amortiguadora (Primrose & Twyman, 2006). El uso de columnas de separación por intercambio aniónico permite la separación del ADN plasmídico usando su carga negativa debido a sus grupos fosfatos, uniéndose a las cargas positivas de la resina presente en las columnas, además se hace un lavado para eliminar las biomoléculas. El ADN es recuperado mediante elución con un solvente rico en aniones. Por último el ADN plasmídico es precipitado con isopropanol (Qiagen, 2012).

1.2.4.2. Albúmina de suero bovino (BSA)

La BSA es una proteína globular grande (66.4 kDa) comúnmente utilizada en muchos estudios como proteína modelo debido a sus numerosas aplicaciones en ciencias biomédicas y a su interés como modelo para la HSA (albúmina de suero humano) (Sezões et al., 2010). Presenta un punto isoeléctrico entre 4.7 y 4.9 pH (Zydney, 1998) y tiene un tamaño de 3.8 nm de diámetro y 14 nm de largo (Gekle, 2005). Las albúminas se caracterizan por presentar un bajo contenido de triptófano y metionina pero con un contenido alto en cisteína y aminoácidos aniónicos como el ácido glutámico y aspártico.

1.2.4.3. ARN

El ácido ribonucleico (ARN) es un polímero de nucleótidos que está compuesto de un azúcar (la ribosa), de un grupo fosfato y bases, como lo son la adenina, citocina, guanina y uracilo. A diferencia del ADN, el ARN posee un grupo oxhidrilo (-OH) en la posición 2- de la ribosa (Schroeder et al., 2017). El ARN se puede clasificar en dos grupos, el primero en ARNs encargados de mediar la síntesis de proteínas, como lo son el ARN mensajero (mRNA), ARN ribosomal (rRNA) y ARN de transferencia (tRNA). El mRNA es el encargado de la transcripción del código genético proveniente del DNA para la síntesis de proteínas. El rRNA constituye al

ribosoma, cuya función es la decodificación del mRNA en las secuencias de aminoácidos de las proteínas. El tRNA es una molécula adaptadora que lleva aminoácidos individuales al sitio de síntesis de proteínas, permitiendo la síntesis de estas en secuencias codificadas por el mRNA (Großhans & Filipowicz, 2008). El segundo grupo lo constituyen los ARNs no codificantes, los cuales son capaces de regular otras funciones, como bloquear o activar la transcripción celular, pero sin la capacidad de codificar proteínas (Rinflerch et al., 2016). Entre ellos se encuentran los pequeños ARN de interferencia (siRNA) que son pequeñas cadenas de ARN (20-25 nucleótidos) cuyo interés en la investigación ha aumentado debido a que tienen la capacidad de silenciar genes relacionados con enfermedades, es decir que pueden actuar como medicamentos.

1.2.5. Detección de macromoléculas

1.2.5.1. Intercaladores de ácidos nucleicos

El 4',6-diamidino-2-fenilindol, mejor conocido como DAPI, es un compuesto azul fluorescente utilizado como marcador de ADN (Lakowicz, 2006), ya que se intercala entre las bases del DNA, específicamente a timina y adenina (Chazotte, 2011). Cuando dicha intercalación ocurre, el DAPI emite fluorescencia, por lo que permite detectar la presencia de ADN mediante la detección de luz emitida por la muestra.

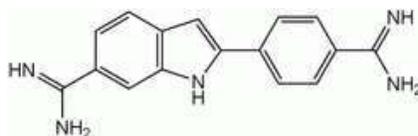


Figura 4 Estructura del DAPI

1.2.5.2. Fluorocromos

El FITC es un colorante fluorescente verde que pertenece al grupo de los colorantes de xanteno. Se utiliza para el marcado de diversas biomoléculas

como inmunoglobulinas, lectinas, diversas proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, oligo y polisacáridos (Horobin & Kiernan, 2003). El FITC es reactivo a nucleófilos, entre ellos los grupos aminos y los grupos tioles de las proteínas (Riggs, Seiwald, Burckhalter, Downs, & Metcalf, 1958).

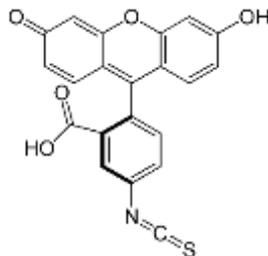


Figura 5 Estructura del FITC

1.2.5.3. Acoplamiento covalente de fluorocromos en proteínas

El marcaje luminiscente es una simple y efectiva forma de monitorear en tiempo real la localización de un vector dentro de un sistema (Insin et al., 2008). Dentro de los marcadores orgánicos más comunes para el marcaje de componentes orgánicos encontramos el isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina y la cianina (Wu et al., 2013).

La unión del FITC con las proteínas ocurre por medio de un enlace covalente en el cual el grupo isocianato ($-R=N=C=S$) del FITC reacciona con los grupos amino de los residuos de lisina de las proteínas (Hermanson, 2013).

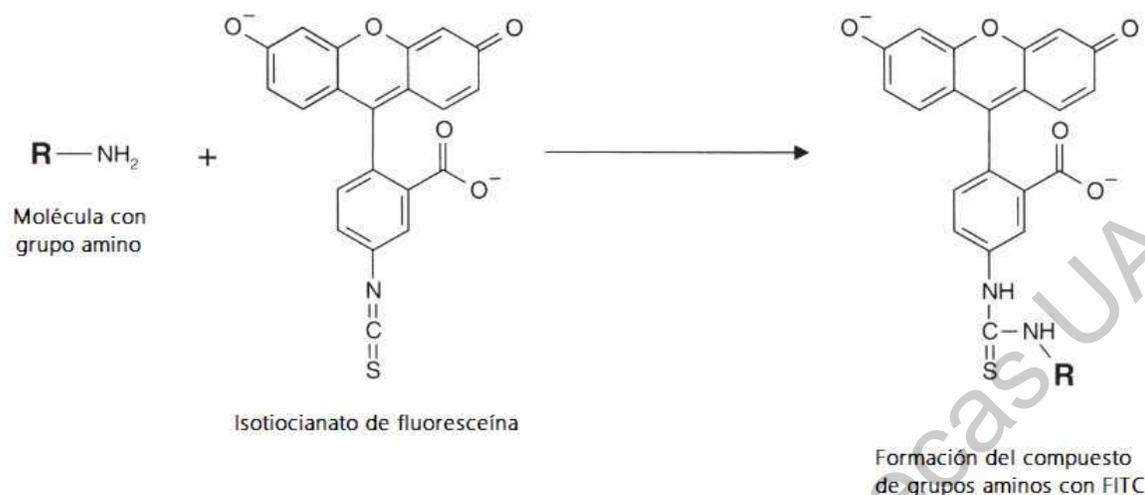


Figura 6 Reacción del FITC con los grupos amino de los compuestos (Hermanson, 2013)

1.2.6. Análisis de adsorción y encapsulamiento de macromoléculas en sílice

1.2.6.1. Electroforesis

La electroforesis en gel de agarosa es un método que permite visualizar ADN o fragmentos del mismo que se separan en función de su tamaño. Esta técnica consiste en someter el ADN a un campo eléctrico, utilizando las cargas que posee (cargas negativas de sus grupos fosfato desprotonados) para hacer que migre al polo positivo. Las moléculas de ADN se embeben en un gel de agarosa, por el cual las moléculas se van desplazando. El tiempo de desplazamiento dependerá del tamaño de las moléculas, entre más pequeñas, más rápido migrarán al polo positivo. Una vez separados todos los fragmentos por tamaño, el gel es sumergido en un intercalador de ADN, es decir en una sustancia afín a las bases nucleotídicas, para posteriormente ser revelado con luz UV (Caballero et al., 2007).

El bromuro de etidio es una molécula que tiene afinidad con el ADN, éste se intercala entre sus pares de bases y al estar unido a ellas, fluoresce. Esto hace que cuando el gel se expone a luz UV, se ven las bandas de fluorescencia, que corresponde a las moléculas de ADN.

1.2.6.2. Microscopia confocal

Es un método no destructivo de caracterización que permite eliminar las imágenes que están más cerca o más lejos del punto enfocado (Faraldos & GobeARN, 2014) a partir de un láser que pasa por una apertura confocal, llamada “pinhole”. Esto permite reconstruir una imagen tridimensional de los componentes de la muestra. La microscopia confocal permite la visualización de fluorescencia de manera definida con el fin de identificar marcaje con fluorocromos además de identificar proteínas, células entre otros.

La imagen en un microscopio confocal se logra escaneando uno o más haces de luz enfocados, generalmente de un láser o una fuente de descarga de arco, a través de la muestra. Este punto de iluminación se enfoca en la muestra mediante la lente del objetivo y se escanea lateralmente utilizando algún tipo de dispositivo de escaneo bajo control de la computadora. Las secuencias de puntos de luz de la muestra se detectan mediante un tubo fotomultiplicador (PMT) a través de un pinhole (apertura), y la salida del PMT se integra en una imagen y mostrado por la computadora, como se muestra en la figura 8.

Si bien las muestras no teñidas se pueden ver utilizando la luz reflejada, la mayoría de las veces las muestras se marcan con uno o varios fluorocromos. Se utiliza un láser para proporcionar la luz de excitación, de acuerdo a cada marcador. La luz láser se refleja en un espejo dicróico que golpea dos lentes montadas en motores. Estos espejos escanean el láser a través de la muestra, tiñen las muestras de fluorescencia y la luz emitida se deseca por los mismos espejos que se usan para escanear la luz de excitación del láser. La luz emitida pasa a través del espejo y se enfoca en el pinhole. La luz que pasa a través del

pinhole se mide mediante un detector, es decir, un tubo fotomultiplicador. Por lo tanto, nunca hay una imagen completa de la muestra en un instante dado; solo se ve un punto de la muestra. El detector está conectado a una computadora que construye la imagen, un píxel a la vez. Para acelerar el escaneo, se utilizó un deflector óptico acústico (AOD) especial en lugar de uno de los espejos. AOD utiliza una onda de sonido de alta frecuencia en un cristal especial para crear una rejilla de difracción, que desvía la luz láser. Al variar la frecuencia de la onda de sonido, el AOD cambia el ángulo de la luz difractada, lo que permite un escaneo rápido que conduce a imágenes de 512x480 píxeles 30 veces por segundo. Si uno mira un campo de visión más pequeño, el proceso puede ser aún más rápido (Rai & Dey, 2011).

Componentes del microscopio confocal:

- Fuente de luz (sistema láser)
- Filtros
- Dispositivos acusto-ópticos
- Escáner
- Detector (PMT, APD)
- Pinhole

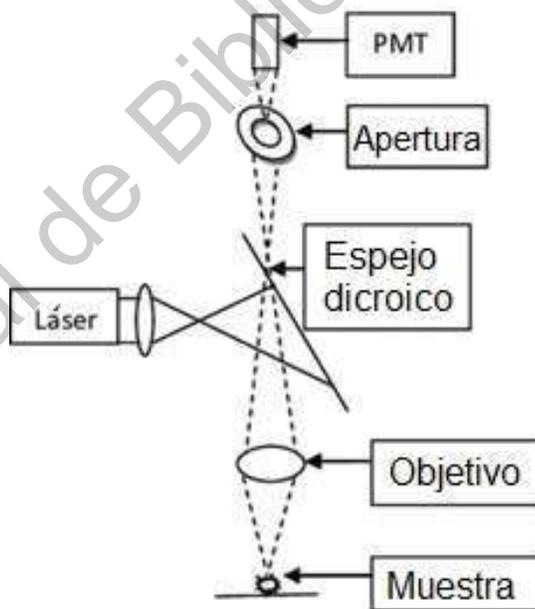


Figura 7 Diagrama microscopio confocal..

1.2.6.3. Espectrofotometría UV

La espectrofotometría es una técnica que se encarga de medir la interacción de moléculas con la radiación electromagnética. Los ácidos nucleicos se encuentran

conformados por grupos aromáticos funcionales, por lo que pueden ser cuantificados mediante la absorción de luz ultravioleta (Schmid & Beer, 2001).

Para los ácidos nucleicos la absorción máxima es de 260 nm, y desde hace mucho tiempo se usa la relación de este máximo de absorbancia con la absorbancia a 280 nm como una medida de pureza en las extracciones de ADN y ARN (Thermoscientific, 2012)

Si la relación de $A_{260/280}$ para ácidos nucleicos es mayor a 1.8 se considera que es un preparación de ADN libre de impurezas, como lo son algunas proteínas (Wilfinger et al., 1997).

1.2.6.4. Método de determinación de proteínas

El método del ácido bicinconínico fue propuesto por primera vez en 1985 por Paul. K, Smith. El BCA es un método colorimétrico para detección y cuantificación de proteínas. Consiste en agregar las muestras con proteína sobre una placa a la que posteriormente se le agrega el reactivo de trabajo de BCA y se deja incubar media hora a 37°, obteniendo un color púrpura, después de lo cual se hace la medición a 562 nm (Thermo Scientific, 2010). Cabe mencionar que el ensayo BCA es compatible con una amplia gama de detergentes, incluido el dodecilsulfato de sodio (SDS) (Olson, 2016).

El ensayo mide la formación de Cu^+ a Cu^{2+} por el complejo de Biuret en soluciones alcalinas de proteínas usando el BCA. La primera reacción sucede con la interacción de cobre y BCA con los residuos de cisteína, cistina, triptófano y tirosina presentes en las proteínas (Olson, 2016b). El segundo paso de la reacción consiste en el desarrollo del color, esto gracias al BCA, al ser un reactivo de detección colorimétrico reacciona con el catión cuproso (Cu^+) que se forma en la reacción anterior. El color púrpura se forma debido al complejo BCA/Cu^+ . La intensidad del color será proporcional a las cantidad de enlaces peptídicos que se encuentren en la reacción (Thermo Scientific, 2010).

1.3. Justificación

En la actualidad, la administración de fármacos de naturaleza proteica y peptídica suele ser por la vía oral o vía intravenosa, que a su vez presenta una baja biodisponibilidad por parte del principio activo, debido a que se administran solas o bien, protegidas por un polímero hidrofílico llamado polietilenglicol y por consecuencia es necesaria la aplicación de sucesivas dosis. Esto provoca que la probabilidad de causar efectos colaterales en el individuo sea alta (Neira et al., 2013). Es por ello que desde hace mucho tiempo se han buscado nuevos sistemas que permitan la entrega controlada de fármacos de una forma segura y con ello una liberación más eficiente, reduciendo la concentración de fármacos y la frecuencia de la dosis, ofreciendo así una administración más sencilla (Mamaeva et al., 2013).

Los nanomateriales son capaces de penetrar en los tejidos y son fácilmente absorbidas por las células, lo que permite un suministro eficiente de medicamentos a los sitios de acción objetivo. También se ha reportado que la absorción de las nanoestructuras es 15 a 250 veces mayor que la de las micropartículas en el rango de 1 a 10 μm (Ochubiojo et al., 2012).

Las partículas meso-estructuradas (es decir con poros de 2 a 50 nm de diámetro) específicamente las sílices mesoporosas, son consideradas excelentes candidatas para la administración controlada de fármacos debido a la estructura de sus poros, a su amplia área de superficie y a su gran volumen de poros. La superficie mesoporosa de la sílice es aplicable en múltiples campos como marcaje celular y tratamiento de cáncer (Aval, 2016).

Los avances en la síntesis de sílices mesoporosas han permitido tener un tamaño de partícula, tamaño de poro y morfología controlados, lo que ha hecho que sean muy atractivas para diferentes aplicaciones, entre ellas su utilización como potenciales vehículos para la liberación controlada de moléculas huésped como fármacos y biomoléculas. Se han realizado pruebas con distintos tipos de

síntesis de sílice, entre ellas las tipo MCM-41 que a pesar de ser internalizadas fácilmente en los ensayos in vitro para células animales y vegetales y no presentar citotoxicidad, presenta restricciones estructurales, como que el tamaño de poro máximo es 6 nm, lo que limita su aplicación como vehículo para la adsorción y liberación de moléculas grandes, como proteínas y ácidos nucleicos (Gao et al., 2009)

Para mejorar el rendimiento en el proceso de internalización, una ventaja que se ha considerado es ampliar el tamaño de los poros de la sílice mesoporosa funcionalizada (Solberg & Landry, 2006). Por ello la esponja de sílice mesocelular (MCF) ha sido una buena candidata debido a su tamaño de poro que va de 17 a 44 nanómetros (Han et al., 2000).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

. Las adecuadas propiedades texturales de la sílice mesocelular permitirán incorporar las moléculas de DNA plasmídico y una proteína modelo (BSA) en el interior de sus poros.

2.2. Objetivos

2.2.1. Generales

Sintetizar una sílice mesocelular con propiedades texturales y fisicoquímicas adecuadas para la internalización de tres tipos de macromoléculas: RNAs pequeños, albúmina de suero bovino (BSA) como proteína modelo, y DNA plasmídico.

2.2.2. Particulares

- Sintetizar sílice mesocelular de tipo espuma (MCF, del inglés *mesocellular foam*).

- Determinar las propiedades texturales, morfológicas y de tamaño de la sílice mesocelular.
- Funcionalizar la MCF con grupos amino (-NH₂) para cationizar su superficie.
- Purificar y caracterizar ácidos nucleicos (RNAs y DNA plasmídico).
- Marcar BSA adquirida comercialmente con fluoresceína.
- Explorar la incorporación de macromoléculas en los poros de la MCF mediante su marcaje con fluorocromos y microscopía confocal.

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El desarrollo de este proyecto consistió en la síntesis de la espuma de sílice mesocelular y su caracterización, para posteriormente hacer pruebas de internalización de macromoléculas en los poros del material. Para ello, las moléculas fueron marcadas con fluorocromos y observadas en microscopía confocal.

En la Figura 8 se exhibe un esquema resumido del procedimiento experimental desarrollado en este trabajo de tesis.

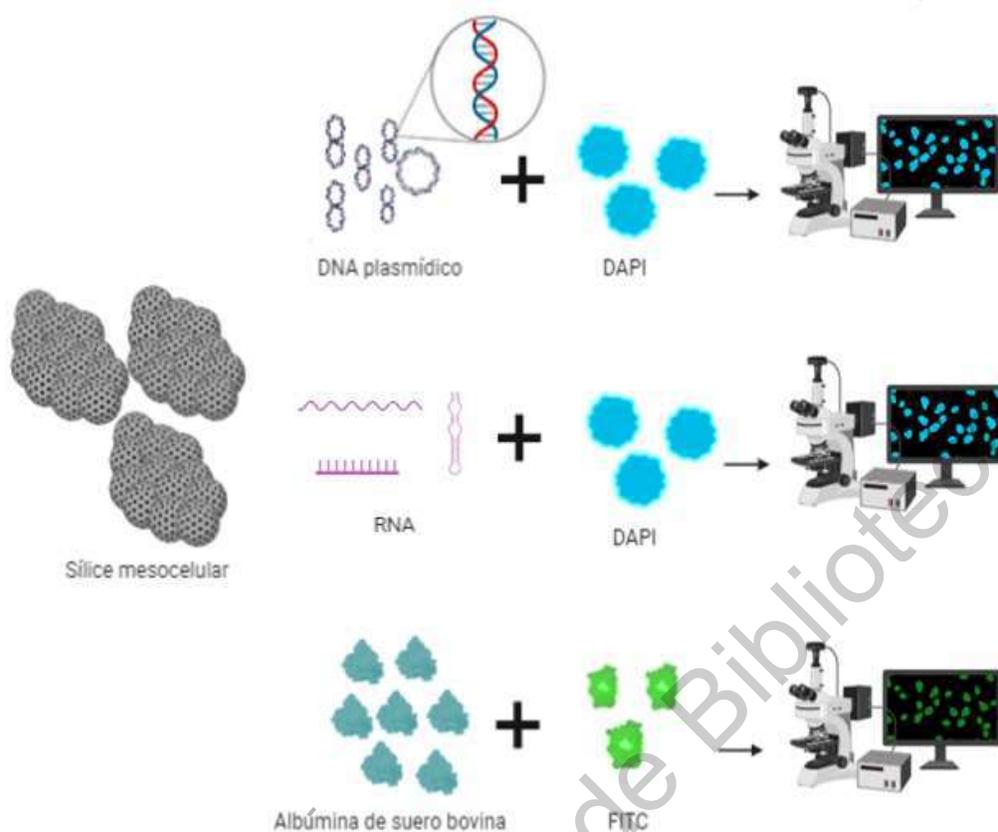


Figura 8 Diagrama experimental

3.1. Síntesis de partículas de sílice mesocelular (MCF)

La síntesis de la espuma de sílice mesocelular MCF se realizó por el método sol-gel, utilizando como agente director de la mesoestructura el surfactante no iónico Pluronic 123, un copolímero de tres bloques (P123, Aldrich, 99%) y como precursor de la sílice el tetraetil ortosilicato (TEOS, Aldrich 99%) y Mesitileno (MES, Aldrich 99%) como agente de hinchamiento.

Se disolvieron 4.8 g del surfactante neutro pluronic 123 en una solución con 75 ml de ácido clorhídrico 4M y 112.5 ml de agua desionizada con agitación constante a 35°C. Posteriormente, después de que se disolvió por completo el P123 se agregaron 5.8 ml del agente de hinchamiento MES y, una vez dispersado

totalmente, se agregaron 8 ml de TEOS. La reacción se incubó a 35°C con agitación constante durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción fue transferida a un bote de polipropileno para efectuar el proceso de madurado, siendo calentada a 80°C durante 24 horas sin agitación dentro de una mufla. Terminado el proceso, se dejó enfriar y se recuperó el sólido por filtración, lavándolo 3 veces con agua desionizada. El sólido recuperado se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se secó a 100°C por 18 horas y, para la eliminación del molde orgánico, se calcinó la muestra a 550°C por 4 horas.

3.1.1. Funcionalización de MCF con grupos aminos

La funcionalización superficial de la MCF con grupos aminos se realizó por el método de post-síntesis (ex-situ), es decir, a partir de la MCF previamente sintetizada, descrito por Nava y colaboradores (Hernández-Morales et al., 2012).

En una síntesis representativa, 2.1 g de MCF se dispersó en una solución de 2.7 ml de 3-aminopropil trietoxisilano (APTES, Aldrich, 99%) (precursor de los grupos funcionales NH₂) en 31 ml etanol absoluto (Aldrich, 99%).

La reacción se incubó bajo agitación constante a temperatura ambiente por 60 minutos. Posteriormente, se agregaron 41 ml de agua desionizada y se continuó agitando por 60 minutos. El sólido se recuperó por filtración y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el secado fue completado en una mufla a 110 °C por 18 horas.

3.2. Caracterización de Sílice mesocelular nativa y aminada

Se realizaron varios estudios de caracterización de la sílice mesocelular para comprobar de forma cualitativa y cuantitativa que el material cumplía con las características esperadas para este tipo de material (Schmidt-Winkel et al., 1999a)

3.2.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Se montó una muestra de MCF sobre un portamuestras de aluminio con un trozo de cinta adhesiva de carbono, donde se depositó la MCF y posteriormente fue recubierto con una capa de oro, utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido Jeol, Modelo JSM-6060LV para su análisis en SEM. El estudio se realizó en un microscopio electrónico de barrido Jeol, Modelo JSM-6060LV.

3.2.2. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Para cada lote de material, se preparó una suspensión de 1 mg/ml en agua desionizada y se sonicó durante 30 segundos en un sonicador de baño. Posteriormente, se realizó una dilución 1:20, y se depositó la muestra sobre rejillas de cobre para TEM con película de carbono. El equipo utilizado para la observación fue el Microscopio Electrónico de Transmisión JEM-1010 (Jeol Co., Peabody).

3.2.3. Isotermas de adsorción-desorción de N₂ a 77 K.

Las propiedades texturales (área superficial, diámetro y volumen de poro) de los materiales (MCF pura y funcionalizada NH₂-MCF) se determinaron mediante las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno (N₂) a 77 K, utilizando un Autosorb iQ2 de la marca Quantachrome. Las muestras se desgasificaron previamente a 150°C durante 18 h bajo vacío (10⁻⁴ mbar), para garantizar una superficie limpia y seca, libre de cualquier especie adsorbida (Brechignac, 2006).

Las áreas específicas de las muestras se determinaron de acuerdo con el procedimiento BET estándar usando datos de la isoterma de adsorción de nitrógeno recopilados en el intervalo de presión relativa de equilibrio de 0.03 <P/P₀

<0.3. Las distribuciones de tamaño de poro se calcularán a partir de las isoterma de desorción de nitrógeno utilizando el método BJH.

El volumen total de poros (V_p) se estimó a partir de la cantidad de nitrógeno adsorbido a una presión relativa de 0,98, y el volumen de microporos (V_μ) y el área de microporos (S_μ) se estimarán utilizando el método de t-plot.

3.2.4. Difracción de rayos X a bajos ángulos (DRX).

El análisis por difracción de rayos X de la espuma de sílice mesocelular MCF en su forma de polvo, se realizó para comprobar la formación de la estructura mesoporosa tipo esponja en la MCF. Las mediciones de los difractogramas se registraron en un difractómetro Rigaku, modelo Ultra, utilizando radiación monocromática Cu K α en el rango 2θ de 0.5° a 10° .

3.2.5. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La presencia de los grupos funcionales amino $-\text{NH}_2$ en la superficie de la espuma de sílice mesocelular MCF, se analizó por medio de la respuesta vibracional de sus enlaces moleculares (Zhao, 2012), a través de los análisis por espectroscopía de infrarrojo. Los espectros de vibración de IR de las muestras en polvo se midieron en un espectrofotómetro Spectrum Two, marca PerkinElmer, en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} . La preparación de la muestra consistió en hacer pastillas de MCF y MCF- NH_2 con bromuro de potasio, con la finalidad de poder ver un espectro más amplio de la señal.

3.2.6. Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Zeta

Para determinar el tamaño de partícula y el potencial zeta se utilizó el equipo Zetasizer de la marca Malvern, colocando la muestra en una suspensión de 1 mg de MCF y MHF-NH₂ en 1 ml de agua desionizada en celdas de cuarzo.

3.2.7. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico TGA/DTG permitió evaluar la estabilidad térmica de los grupos funcionales amino -NH₂ en el interior de los poros de la espuma de sílice mesocelular MCF. Este estudio se realizó en un equipo Q500 TGA de TA Instruments, en un rango de temperatura de 25 °C a 600° C.

3.3. Obtención de ADN plasmídico

3.3.1. Transformación de *E. coli* por choque térmico.

Se utilizó el plásmido *pCX::GFP-GPI2*, diseñado para su replicación en *E. coli*, con una talla de 6000 pares de bases (bp). Con esta longitud de nucleótidos, el plásmido super-enrollado se estima de una talla de entre 25 a 100 nanómetros (Arkhangelsky et al., 2011), es decir que se encuentra en el límite de tallas a ser insertada en una sílice mesoporosa. Para la transformación de *E. coli*, se siguió el protocolo de Sambrook (Sambrook & Green, 2012). Para ello, se descongelaron dos viales de células competentes a 4°C en baño de hielo, uno como control y el otro para ser transformado. Dentro de una campana de esterilidad, al vial a transformar se le agregaron 6 µl de plásmido *pCX::GFP-GPI2*, equivalentes a una cantidad de 100 ng de ADN. Se dejaron en el baño de hielo por 30 minutos.

Para el choque térmico se pusieron los viales a 42°C por 2 minutos en un baño e inmediatamente después se pasaron al baño de hielo por 2 minutos. Se depositó cada muestra en un tubo Falcon estéril con 1 ml de medio LB cada uno, en ausencia de antibiótico. La incubación se hizo por 30 minutos a 37°C en agitación constante.

Posteriormente, se sembraron 50 µl de cada tubo en cada una de 2 cajas Petri con agar de medio LB con ampicilina; se dispersaron con perlas de vidrio estériles, las cajas fueron cerradas con Parafilm™ y dejadas en incubación toda la noche.

Del cultivo de bacterias se tomaron algunas colonias para ser resuspendidas en un tubo Falcon con 3 ml de medio LB con ampicilina, y se dejó incubar por 8 horas a 37°C en agitación constante. Posteriormente se diluyó el cultivo (1/1000) en 500 ml de medio LB con ampicilina y se incubó a 37°C por 12 horas en agitación. Por último se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C para obtención de la biomasa.

3.3.2. Purificación de ADN plasmídico

La purificación del ADN se llevó a cabo con el material y reactivos indicados en el protocolo establecido por QIA-GEN® (Qiagen, 2012).

La biomasa fue resuspendida en presencia de RNAsa para posteriormente agregar detergente y así romper la membrana celular y desnaturalizar el ADN genómico. Al final se renaturalizó únicamente el ADN plasmídico,

La purificación del plásmido con este kit consistió en separar las biomoléculas provenientes del cultivo y el plásmido, único componente de carga polianiónica. Y para ello se utilizó una columna de intercambio aniónico, en donde después de lavar otros componentes, el plásmido fue recuperado con una solución eluyente.

Para precipitar el ADN se agregaron 10.5 ml de isopropanol y se centrifugó a 5000 rpm por 60 minutos a 4°C. Después de decantar el sobrenadante, el pellet se disolvió con 5 ml de etanol y fue centrifugado a 5000 rpm por 60 minutos a 4°C. El pellet se dejó secar y se congeló.

Al siguiente día el ADN fue resuspendido y se conservó en congelación.

3.3.3. Espectrofotometría UV

Para el análisis cualitativo del ADN plasmídico se realizó un análisis de espectroscopia UV en el equipo Nanodrop (Thermo Scientific) para determinar la concentración del ADN obtenido en la metodología de la purificación. Para ello se tomó 1 μ l de la muestra depositándolo en el punto de carga del equipo.

3.3.4. Electroforesis

El ADN plasmídico obtenido en la metodología anterior se analizó cualitativamente por medio de un gel de agarosa en una cámara Biorad de electroforesis horizontal para observar la forma topoisomérica en la que se encuentra el ADN plasmídico.

El plásmido fue diluido a una concentración de 100 ng de ADN para cada pozo, en un volumen total de 20 μ l, incluyendo $\frac{1}{4}$ de volumen de buffer de carga (Sigma-Aldrich, D3937), preparando la muestra sobre un pedazo de Parafilm™. Como referencia se utilizó una escalera de 500 a 10,000 pares de bases (ADN LADDER, DIRECTLOAD, 1 KB, SIGMA).

Para preparar el gel al 0.8% de agarosa, se pesaron 0.32 g de agarosa colocándolos en un matraz con 36 ml de agua. La mezcla se calentó por 30 segundos en el microondas. Al finalizar, se agregaron 4 ml de TBE 10x y se dejó enfriar a una temperatura de ca. 37°C.

Una vez tibio se vertió sobre una base de plástico, colocando el molde para hacer los pozos sobre los que se depositan las muestras. Se dejó gelificar durante 60 minutos. Pasado ese tiempo, se montó el gel sobre la cámara de electroforesis, colocado del lado negativo de la cámara los pozos para depósito del ADN. El gel se cubrió con 200 ml de buffer TBE 1x.

El proceso de electroforesis se realizó de negativo a positivo a 150 V por 1 hora. Al finalizar se preparó una mezcla de 30 ml de TBE 1X con 3 μ l de SYBR Safe™, para incubar en ella el gel, cubriendo totalmente de la luz con papel aluminio, en el

agitador orbital por 20 minutos. El gel fue revelado en el fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Biorad).

3.4. Encapsulamiento de ADN plasmídico en partículas de sílice mesocelular

Se pesó 1 mg de cada muestra de sílice, se diluyó en 500 μ l de PBS 0.25x y se sonicó la suspensión durante 30 segundos en un sonicador de baño. En un tubo Eppendorf se agregaron 250 μ l de la suspensión de sílice con PBS y 250 μ l de ADN plasmídico purificado obtenido de la metodología de purificación de ADN plasmídico. Se incubó por 20 minutos con agitación ocasional. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos. Pasado ese tiempo, se tomó el sobrenadante y se guardó para su posterior análisis. Al sedimento se le agregaron 200 μ l de PBS 0.25x para continuar con dos lavados más, guardando el sobrenadante de cada uno, a fin de evaluar la cantidad de plásmido no encapsulado. Por último se agregaron 200 μ l más de PBS 0.25x.

3.4.1. Eficiencia de encapsulamiento

La eficiencia de encapsulamiento se calculó a partir del análisis del material no encapsulado en el sobrenadante, analizando por espectrofotometría UV en un equipo Nanodrop 1000.

3.5. Preparación de BSA-FITC

Para el marcaje de la BSA se siguió el protocolo establecido por Sigma Aldrich (Spiguel et al., 2017). Brevemente, se preparó una solución de BSA de 2 mg/ml en buffer de carbonato de sodio, pH 9, 0.1 M. El FITC fue preparado a una concentración de 1mg/ml en dimetil sulfóxido (DMSO). Se mezcló el FITC con 1 ml de BSA, depositando 50 μ l de FITC en alícuotas de 5 μ l, con agitación entre cada una, y posteriormente se dejó incubar 8 horas a 4°C cubriéndolo de la luz. Pasado

ese tiempo se le agregaron 55.2 μ l de NH_4Cl y se dejó incubar toda la noche. Para separar la proteína marcada del fluorocromo sobrante, se utilizó una columna de separación con Sephadex G-50, fase para separar proteínas globulares con una matriz de exclusión de 1,500 a 30,000. Al finalizar, las sílices fueron analizadas en cuanto a su contenido proteico por el método del BCA, para saber la concentración final de la proteína con FITC.

3.5.1. Cuantificación de proteínas por método del ácido bicinconónico (BCA) para BSA

El reactivo de trabajo se preparó con 0.3 ml de Cu^{2+} y 14.7 ml de BCA, mezclando hasta que se obtuvo una solución color verde. Para la curva de BSA se preparó una solución madre de 2 mg/ml. Posteriormente se hicieron diluciones para obtener una concentración de proteínas dentro de la curva patrón.

En una placa de microtitulación de 96 pozos (Nunc-Immuno™ MicroWell™ Sigma-Aldrich) se colocaron 10 μ l de cada dilución de BSA por triplicado. En seguida se depositaron 200 μ l del reactivo de trabajo. Se dejó incubar media hora a 37°C y posteriormente se midieron los valores de absorbancia en el equipo Varioskan a una longitud de onda de 562 nm. Para determinar el valor de la concentración se interpolaron los datos de la curva patrón para tener una relación de concentración-absorbancia.

3.6. Encapsulamiento de proteínas en partículas de sílice mesocelular (MCF y MCF-NH₂)

Una dilución de BSA-FITC equivalente a 1 mg de proteína por ml, se incubó con 1 mg de partículas de sílice. Se les dejó incubar por una hora con agitación ocasional, para realizar posteriormente dos lavados con PBS 1x. Al finalizar se montaron las muestras para verlas en el microscopio confocal. Para ello, 100 μ l de partículas en suspensión fueron colocadas en un portaobjetos y se dejaron secar. Posteriormente se le añadió a la muestra una gota de ©ClearMount y cuidadosamente se le puso un cubreobjetos. Para finalizar, el cubreobjetos fue

inmovilizado, sellando su contorno con barniz transparente. Para su observación, el equipo utilizado fue un Microscopio Laser Scaning ZEISS LSM880/Axion Observer 7.

3.7. Tratamiento para protonación de las partículas de sílice

Para mejorar la interacción del RNA con las partículas de sílice, se realizó una protonación de la superficie, siguiendo el procedimiento descrito por Liu y colaboradores (Liu et al., 2009). Se pesaron 20 mg de partículas de sílice mesocelular (MCF) o de sílice mesocelular funcionalizada (MFC-NH₂) en un tubo Falcon y se dejó incubar a 80 °C con 10 ml de una solución al 4% de hidróxido de amonio y 4% de peróxido de hidrógeno por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante

3.8. Obtención de ARNs a partir de células inmortales

3.8.1. Pase celular

Se utilizó una línea celular inmortal llamada THP-1. Estas células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y complementado con antibióticos (estreptomomicina y penicilina). La línea celular es no adherente. Para su cosecha, se centrifugaron las células a 1500 rpm por 4 minutos y posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X. La densidad celular se determinó por conteo en una cámara de Neubauer, con el fin de ajustar su número a 1,000,000 de células en 10 mL.

3.8.2. Obtención de ARN

El ARN utilizado se obtuvo a partir de las células THP-1, utilizando el protocolo del kit de purificación de ARN de la marca Promega (Wiskerchen, 1998). Para ello, se tomaron 5×10^6 células en 25 mL de PBS 1X estéril, previamente colocado en un

baño de hielo y se centrifugaron a 1500 g por 4 minutos. Se decantó el sobrenadante y al pellet se le añadieron 175 μ l de solución de lisis (*ARN Lysis Buffer*), mezclando por pipeteo. Las células junto con el buffer de rompimiento fueron pasados por una aguja del número 21 para romper el ADN genómico, repitiendo este paso 5 veces. El lisado se pasó a un tubo de 1.5 ml estéril. Enseguida, se añadieron 350 μ l de una solución diluyente (*RNA Dilution Buffer*), se mezcló por inversión 4 veces y se incubó 3 minutos a 70°C. Por último, la muestra se centrifugó a 13,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Sin perturbar el sedimento, el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf, donde se le añadieron 200 μ l de etanol al 95% y se mezcló por pipeteo.

Finalmente, el RNA precipitado fue purificado de acuerdo con las instrucciones del proveedor, utilizando DNAsa I y sistemas de filtración y de lavados.

3.8.3. Espectrofotometría UV

Para el análisis cualitativo del ARN se realizó un análisis de espectroscopia UV en un equipo Nanodrop (Thermo Scientific) para determinar la concentración del ARN obtenido. Para ello se utilizó 1 μ l de la muestra.

3.8.4. Electroforesis

El ARN obtenido se analizó cualitativamente por medio de un gel de agarosa en una cámara Biorad de electroforesis horizontal para observar los tamaños obtenidos de ARN.

El ARN fue diluido a una concentración de 37 ng de ADN para cada pozo, agregando 2 μ l de buffer de carga (Sigma-Aldrich). Como referencia se utilizó una escalera de 100 a 2,000 pares de bases (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder).

Para preparar el gel al 1% se pesaron 0.40 g de agarosa colocándolos en un matraz con 36 ml de agua. La mezcla se calentó por 30 segundos en horno de microondas; al finalizar se agregaron 4 ml de TBE 10x y se dejó enfriar a 37°C.

Una vez tibio, la suspensión se vertió sobre una base de plástico, colocando el molde para los pozos (peine) sobre los que se depositan las muestras. Se dejó gelificar durante 60 minutos. Pasado ese tiempo se montó sobre la cámara de electroforesis, colocando del lado negativo de la cámara los pozos del gel de agarosa y se vertieron 200 ml de buffer TBE 1x hasta cubrir el gel.

El proceso de electroforesis se realizó de negativo a positivo a 100 V por 1 hora. Al finalizar se preparó una mezcla de 30 ml de TBE 1X con 6 μ l del marcador Nancy-520®, para incubar el gel. La incubación se realizó cubriendo totalmente de la luz con papel aluminio, en un agitador orbital por 20 minutos. El gel fue revelado en el fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Biorad).

3.9. Encapsulamiento de ARN en partículas de sílice mesocelular

En un tubo Eppendorf se agregaron 150 μ l de suspensión de sílice protonada en PBS y 150 μ l de ARN purificado. Se incubó por 20 minutos con agitación ocasional. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos. Pasado ese tiempo se tomó el sobrenadante y se guardó para su posterior análisis. Al sedimento se le agregaron 200 μ l de PBS 0.25x para continuar con dos lavados más, guardando el sobrenadante de cada uno, para fines de cuantificación de ARN no encapsulado o adsorbido. Por último se agregaron 200 μ l más de PBS 0.25x.

3.10. Encapsulamiento de ADN plasmídico en partículas de sílice protonada

En un tubo Eppendorf se agregaron 150 μ l de la suspensión de sílice protonada con PBS y 150 μ l de ADN purificado. Se incubó por 20 minutos con agitación ocasional. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos. Pasado ese tiempo, se tomó el sobrenadante y se guardó para su posterior análisis. Al sedimento se le agregaron 200 μ l de PBS 0.25x para continuar con dos lavados

más, guardando el sobrenadante de cada uno. Por último, se agregaron 200 μ l más de PBS 0.25x.

3.11. Microscopia confocal

Las muestras se montaron sobre un portaobjetos, al cual se le colocaron 100 μ l de cada suspensión de sílice, se les dejó secar. Posteriormente se le añadió a la muestra una gota de DAPI y cuidadosamente se le puso un cubreobjetos. Para finalizar, el portaobjetos fue inmovilizado, sellando con barniz transparente alrededor del cubreobjetos. El equipo utilizado fue un Microscopio Laser Scanning Zeiss LSM880/Axion Observer 7 con el objetivo 100x.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización físico-química de las partículas MCF Y MCF-NH₂

La síntesis de esponjas mesocelulares de sílice da como resultado estructuras con un tamaño de poro más grande a comparación de las síntesis convencionales de sílice, debido a la adición de un agente de hinchamiento, en este caso mesitileno, obteniendo poros con dimensiones entre 17 y 46 nm (Schmidt-Winkel et al., 1999b).

Para poder comprobar que mediante la síntesis se obtuvo la morfología deseada de la sílice mesocelular, se realizaron diferentes pruebas de caracterización. En la figura 9 se muestran micrografías de una partícula, obtenida por microscopia electrónica de transmisión; del lado izquierdo se observa que posee una forma irregular y no definida. La figura 9 del lado derecho muestra un acercamiento que permite ver la porosidad presente en toda la partícula de forma no ordenada.

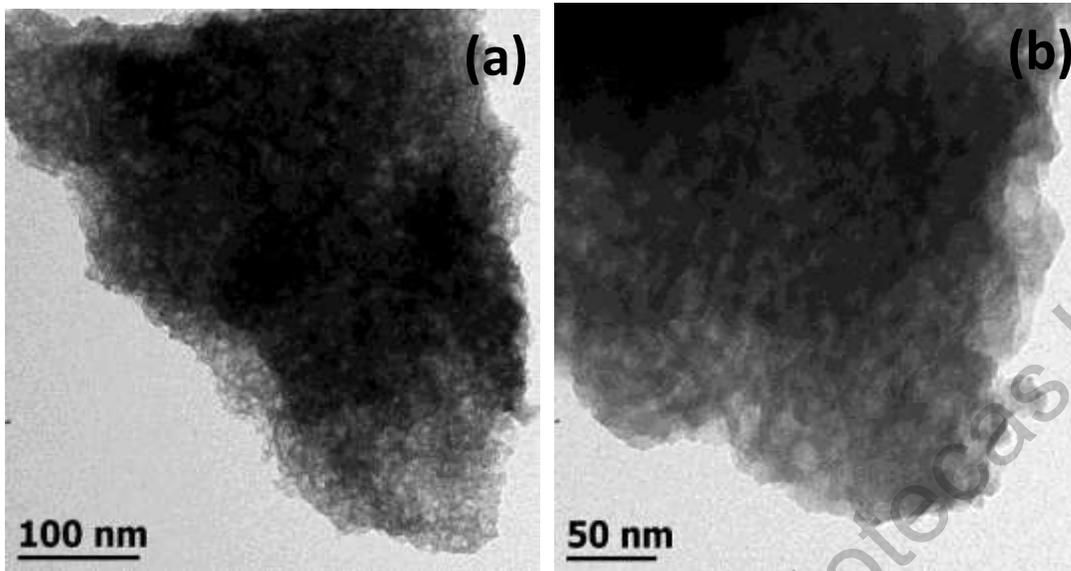


Figura 9 Micrografías por TEM.

Muestran la morfología de la partícula b) es un acercamiento donde se aprecia mejor la porosidad de la partícula.

El material también fue analizado por microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual permitió observar un panorama general del tamaño de las partículas, como se puede observar en la figura 10 las partículas forman aglomerados de 20 micras aproximadamente.

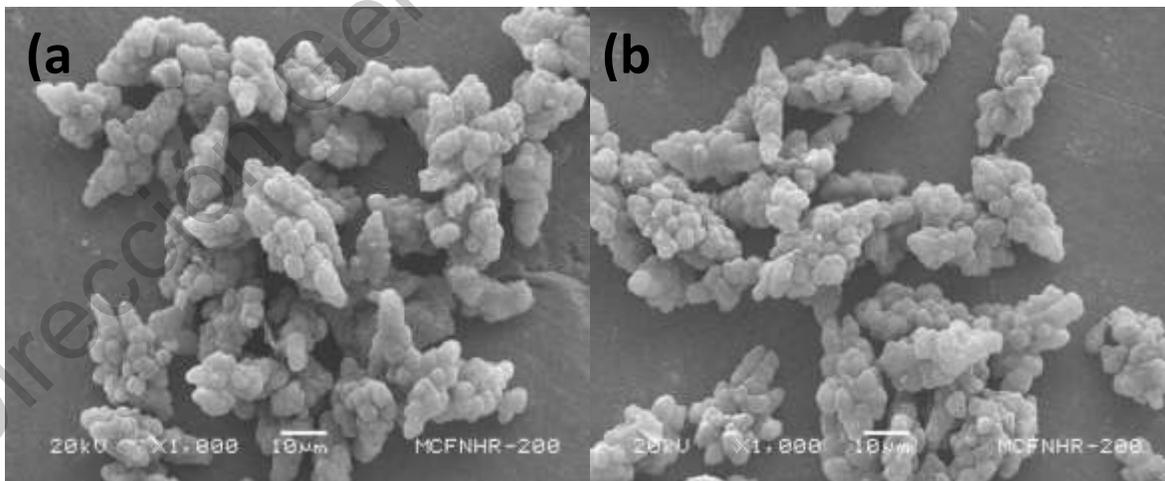


Figura 10 Microscopías por SEM de las partículas MCF.

Con el fin de analizar mejor la superficie de la partícula se le hicieron acercamientos a la partícula que permitiera ver el tamaño de los poros, así como se muestra en las figuras 11 y 12. En ellas podemos observar como la porosidad está presente en la superficie y mediante el programa *Imagej* se determinó el diámetro de algunos poros donde se ven tamaños de entre 13 y 26 nm. Para la absorción de fármacos, ADN y proteínas se considera suficiente poros de tamaños entre 2 a 50 nm (Katiyar et al., 2006)

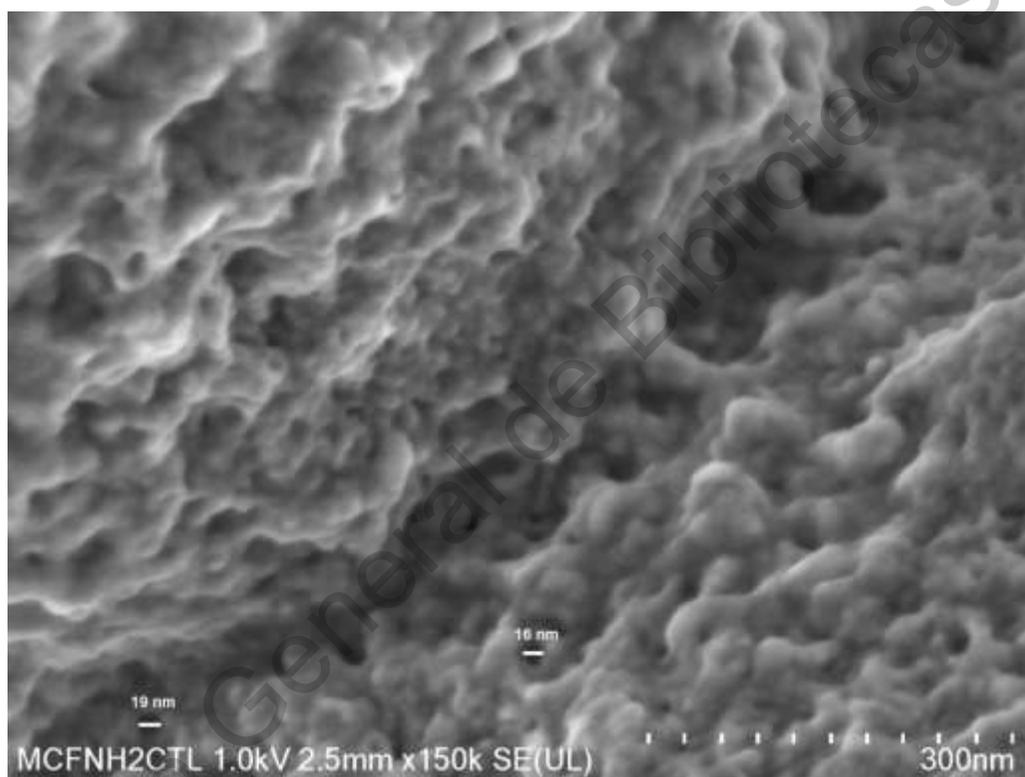


Figura 11 Imagen SEM de las partículas MCF-NH₂

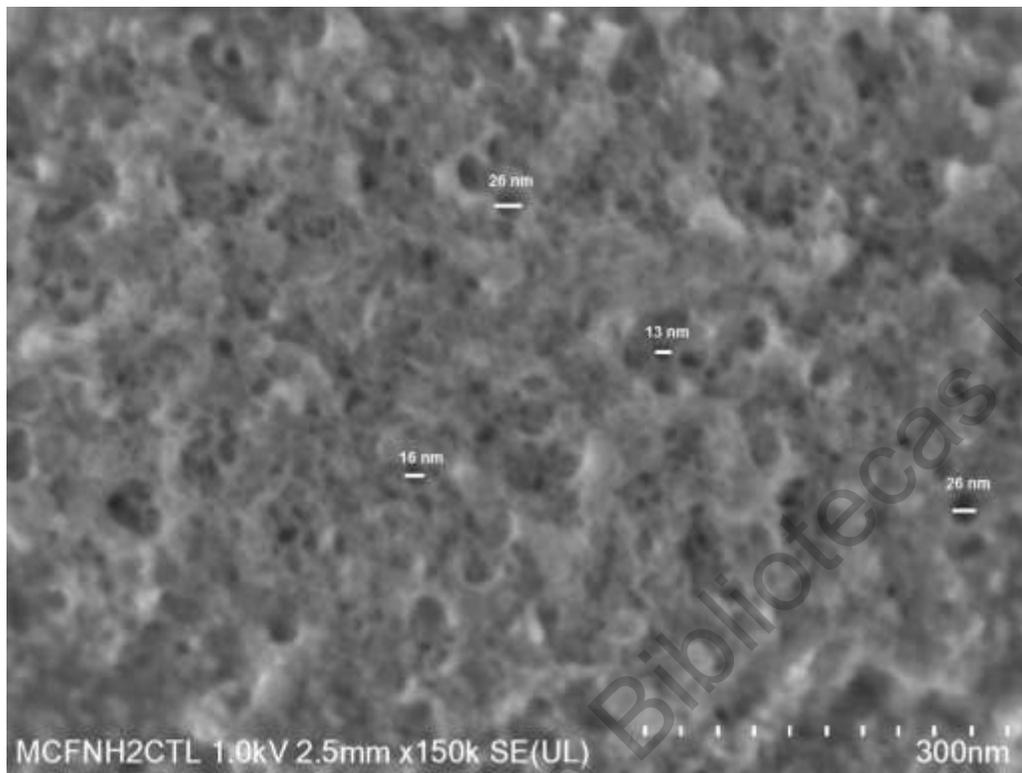


Figura 12 Imagen SEM y medición de poros de las partículas MCF-NH₂

En la Figura 13 se presentan las isotermas de adsorción-desorción de N₂ de la espuma de sílice mesocelular MCF pura y funcionalizada con grupos amino 0.3NH₂-MCF. Como se puede ver de la figura, tanto la MCF pura como funcionalizada exhiben una isoterma de adsorción del tipo IV con una curva de histéresis H1 de acuerdo a la clasificación de la IUPAC y que corresponde con los materiales mesoporosos.

Las isotermas muestran una región amplia en el rango de presiones relativas ($0.45 < P/P_0 < 0.95$) que representa el llenado espontáneo de los mesoporos debido a la condensación capilar, indicando la presencia de mesoporos con una distribución relativamente amplia en diámetro y sin arreglo en los mismos. La curva de adsorción-desorción de nitrógeno de nuestro material es similar a la reportada en la literatura para un material de esponja de sílice mesoporoso derivado de una SBA-15 [J. Ma, Q. Liu, D. Chen, S. Wen and T. Wang. 2015. Synthesis and characterization of pore-expanded mesoporous silica materials. *Micro and Nano Letters*, 10 (2) 140-144].

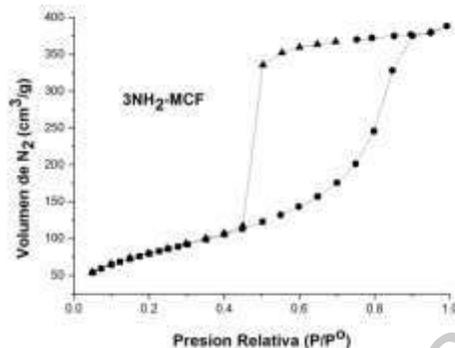
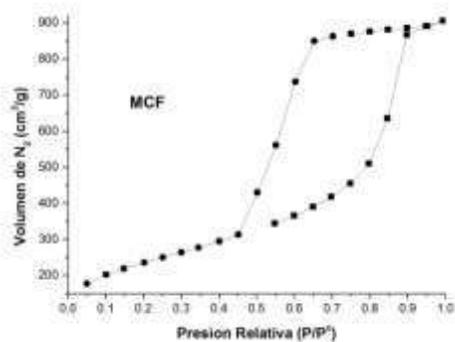


Figura 13 Isothermas de adsorción-desorción de N₂

La figura 14 presenta la distribución del tamaño de poro de la espuma de sílice mesocelular pura y funcionalizada con grupos amino. La distribución se calculó con los datos de la isoterma de desorción mediante el método B.J.H.

La espuma de sílice mesocelular de sílice pura MCF muestra una distribución relativamente amplia (de 40 a 70 nm) en el tamaño de poro centrado aproximadamente en 50 nm.

La espuma de sílice mesocelular funcionalizada con grupos amino 3NH₂-MCF, presenta una distribución más uniforme en el diámetro de poro, centrado alrededor de 40 nm, en comparación la MCF sin funcionalizar. Este resultado indica que los grupos amino se han incorporado (han decorado) de manera uniforme la superficie interna de los poros de la MCF.

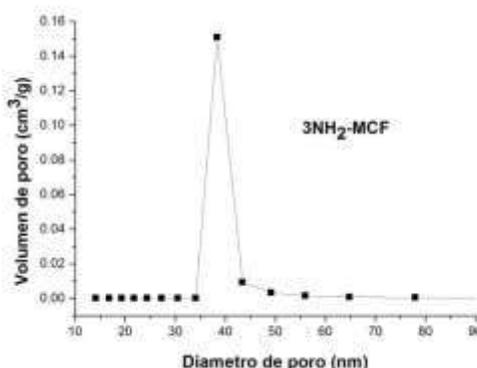
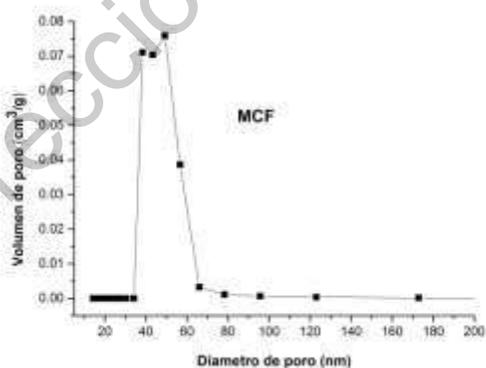


Figura 14 Distribución del tamaño de poro de la espuma de sílice mesocelular pura y funcionalizada

En la *tabla 2* se presenta un resumen de las propiedades texturales (área superficial, volumen promedio de poro y diámetro de poro) de la espuma de sílice mesocelular pura y funcionalizada con grupos amino.

En ella se observa que nuestro material MCF pura presenta una alta área superficial de 816.2 m²/g y un alto volumen de poro de 1.4 cm³/g.

La incorporación de los grupos funcionales amino en la superficie interna de los poros de la MCF provoca una importante disminución tanto en el área superficial como en el volumen de poro. Esta situación se puede atribuir a un posible decorado y bloqueo de poros por el precursor de los grupos amino. Sin embargo, el grande diámetro de poro y la alta área superficial y volumen de poro de la MCF-NH₂, le proporcionará al material una alta capacidad de adsorción.

Tabla 2. Propiedades texturales de los catalizadores

Material	Área superficial (m ² /g)	Volumen de poro (cm ³ /g)
MCF	816.20	1.40
MCF-NH ₂	472.6.0	0.73

Para el XRD no se presentan picos característicos de cristalinidad (Hernández-Morales et al., 2012) por lo se presenta un material amorfo para la sílice normal (MCF), Figura 15 parte superior y funcionalizada (MCF-NH₂) figura 12 parte inferior.

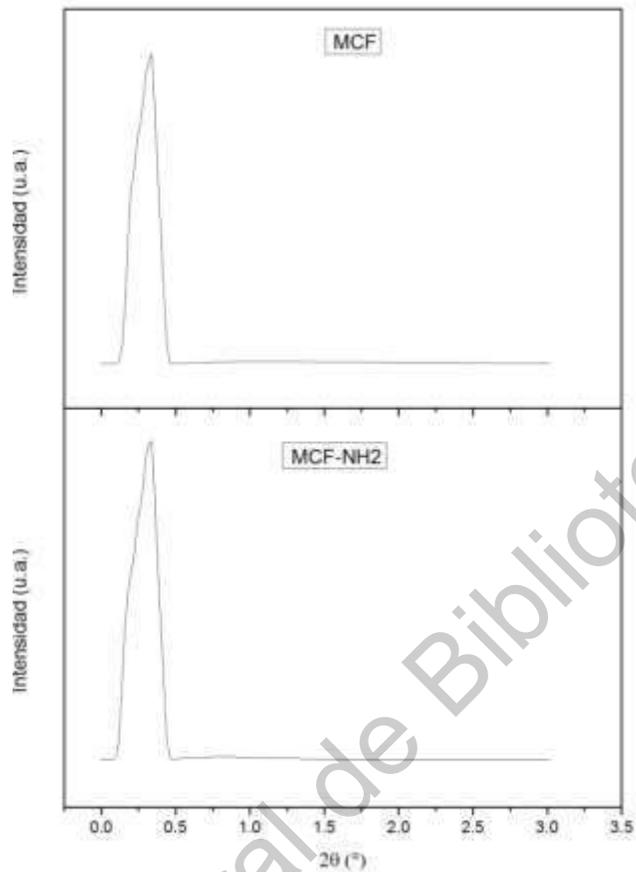


Figura 15 Difractogramas de las partículas.

a) MCF sin funcionalizar, b) partículas MFC-NH₂.

En la figura 16 se presenta la gráfica FT-IR para las partículas MCF y MCF-NH₂ las cuales presentan bandas de vibración correspondientes al enlace siloxano (Si-O-Si) en 1062 cm⁻¹ y en 804 cm⁻¹. En 3436 cm⁻¹, 963 cm⁻¹ se presentan los grupos silanoles (Si-OH). Para las partículas funcionalizadas con grupos aminos se presentan vibraciones en 941 cm⁻¹, 1559 cm⁻¹, 3273 cm⁻¹, que indican la presencia de enlaces N-H. Además, ambas graficas presentan una vibración en 1630 cm⁻¹ que pertenece a las moléculas de H₂O libres en las muestras. Con los resultados de FT-IR se comprueba que las partículas sintetizadas cuentan con la composición de las partículas de sílice, además de que solo la muestra

funcionalizada cuenta con los grupos aminos provenientes del APTES (Hernández-Morales et al., 2012).

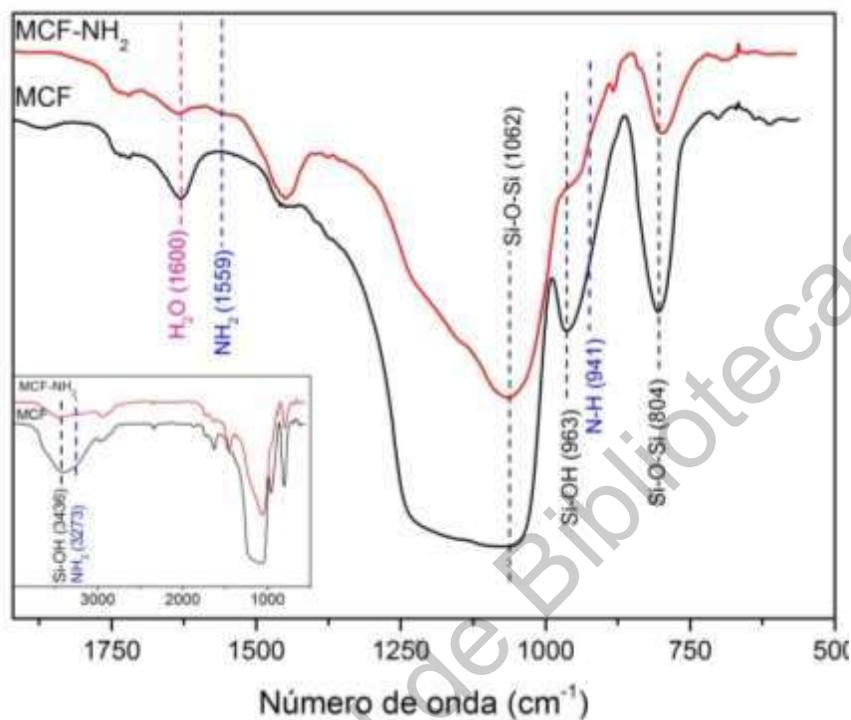


Figura 16 Espectro FT-IR de las partículas de sílice mesocelular MCF y MCF-NH₂.

En azul se muestra la síntesis normal y en rojo la muestran las partículas funcionalizada con grupos aminos.

En la figura 17 se muestran las curvas de TGA para MCF y MCF-NH₂ en las cuales se observa la pérdida de los materiales, en rojo vemos que para la segunda derivada de la MCF-NH₂ en 160 °C aproximadamente empieza la descomposición de los grupos aminos, lo que le da estabilidad térmica a la partícula a altas temperaturas. Para la sílice, en ambas muestras se observan puntos de inflexión en 50 y 250 °C, lo que indica la deshidratación y la deshidroxilación de la sílice respectivamente (Jesenák et al., 1999).

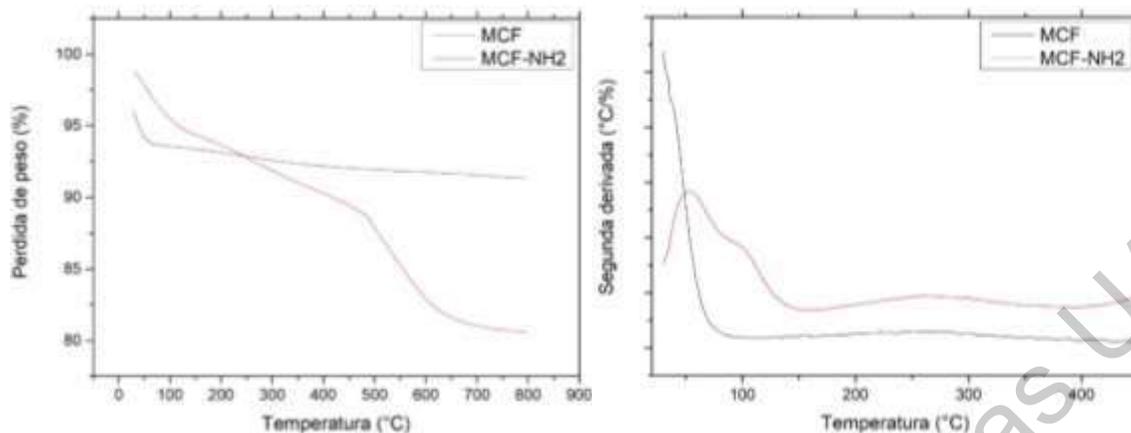


Figura 17 Gráficas de DTA y GTA para MCF Y MCF-NH₂.

4.2. Potencial zeta de las partículas MCF y MCF-NH₂

Con el fin de determinar la atracción o repulsión electrostática entre las partículas, se les realizaron pruebas de caracterización por potencial zeta, tanto a las partículas MCF, como a las funcionalizadas con grupos amino, MCF-NH₂. Además se incluyen los resultados de las partículas protonadas, refiriéndose a las que fueron tratadas con una solución salina y seguida por una solución ácida (Liu et al., 2009), con el fin de ver si se presentaban cambios en la carga superficial de la partícula con el fin de mejorar la interacción con las biomoléculas. Cabe mencionar que se realizaron pruebas en diferentes medios, para ver cómo afectaban en las interacciones entre partículas, se utilizó agua como medio convencional, y PBS ya que en este medio se realizarían los experimentos con las biomoléculas.

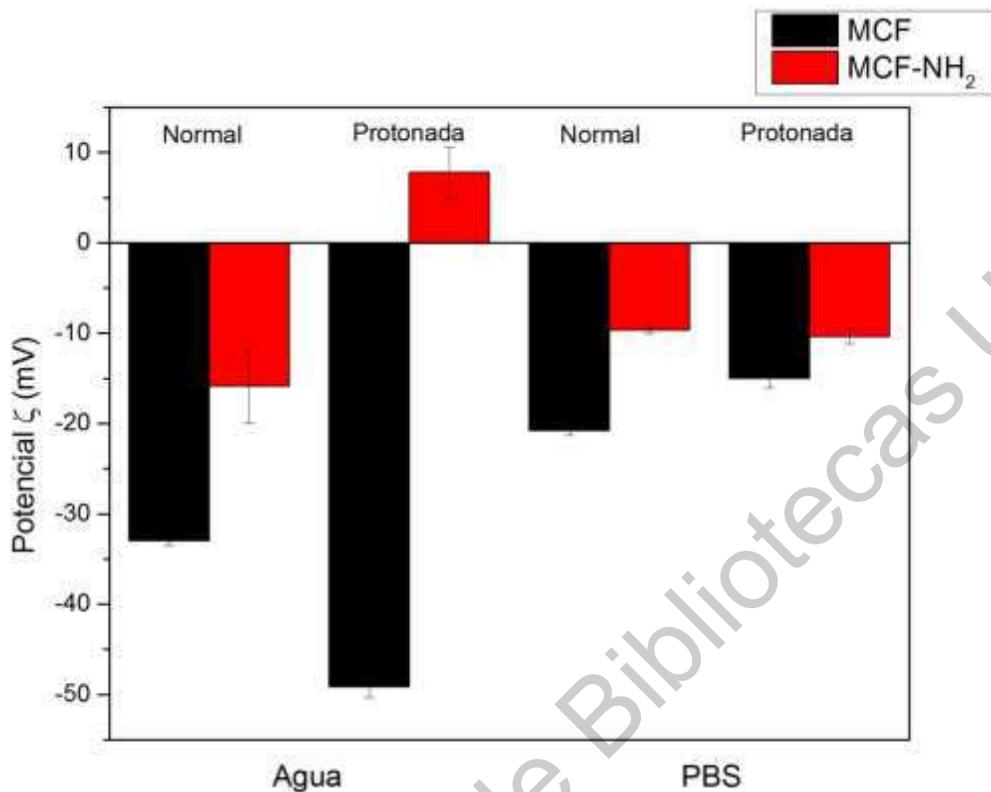


Figura 18 Graficas de potencial zeta de las partículas MCF y MCF-NH₂.

Como se puede observar en la figura 18 las muestras en PBS antes y después de la protonación se conservaron muy similares, en donde se observa un cambio más notable es en las muestras en agua, para MCF (en negro) aumento su negatividad, al contrario de la MCF-NH₂ (en rojo) que pasó de una carga negativa en la superficie a una positiva.

4.3. Obtención de ADN plasmídico

Como se mencionó anteriormente en la **metodología**, el ADN plasmídico se obtuvo mediante transformación introduciendo material genético en bacterias, y posteriormente haciendo una selección de células ya transformadas, en este caso gracias a la región de resistencia al antibiótico. Una vez seleccionadas las células,

crecen formando colonias de mismo tipo. El plásmido fue propagado en la bacteria *E. coli*, la cual fue transformada por choque térmico. El crecimiento de las colonias resistentes a ampicilina se observan en la figura 19.



Figura 19 Crecimiento de colonias de la bacteria E. coli modificadas con el plásmido en medio LB que contiene ampicilina.

Una vez obtenido el plásmido se procedió a la purificación, la cual consistía en extraer el material genético plasmídico de las bacterias transformadas. Esto por medio de la extracción de ADN por intercambio iónico, el cual se basa en la interacción de la carga negativa que tiene el ADN debido a sus grupos fosfatos y la resina que contienen las columnas con carga positiva. Por último el ADN se remueve por precipitación (Glencross et al., 2001).

El ADN plasmídico fue purificado con el kit *QIAGEN Plasmid MaxiKit*. Para comprobar la cantidad y calidad del plásmido se realizó una medición por espectroscopia UV, determinando las razones de $A_{260/280}$ para conocer la pureza del ADN obtenido. En la figura 20 se muestra el espectro del ADN, con un pico de absorbancia en 260, un valor característico de absorbancia para ácido nucleicos.

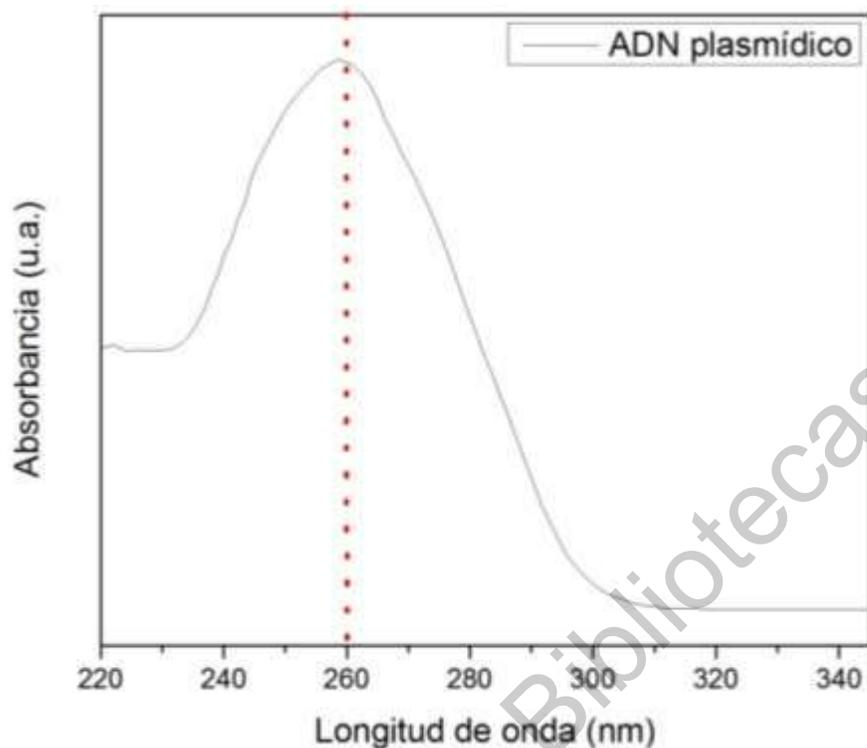


Figura 20 Cuantificación de ADN plasmídico purificado por espectrometría UV.

El lote de ADN plasmídico purificado obtuvo una razón 260/280 con un valor de 1.88, que como se había mencionado en **marco teórico**, entra en los parámetros adecuados para considerarse puro.

Con el fin de determinar las condiciones en las que se encontraba el plásmido, refiriéndose a su composición en formas topoisoméricas, se realizó un análisis de electroforesis horizontal en gel de agarosa, el cual se puede observar en la figura 21. En el gel se observa sobre el carril derecho, dos fragmentos de la muestra de ADN plasmídico purificado, los cuales representan el ADN relajado y el ADN superenrollado. Estas dos estructuras del ADN muestran las estructuras topoisoméricas más comunes en las que se encuentra el ADN purificado, por lo se puede afirmar que hay una mayor cantidad de ADN superenrollado, que es la forma que se buscaba al ser esta la forma más estable.

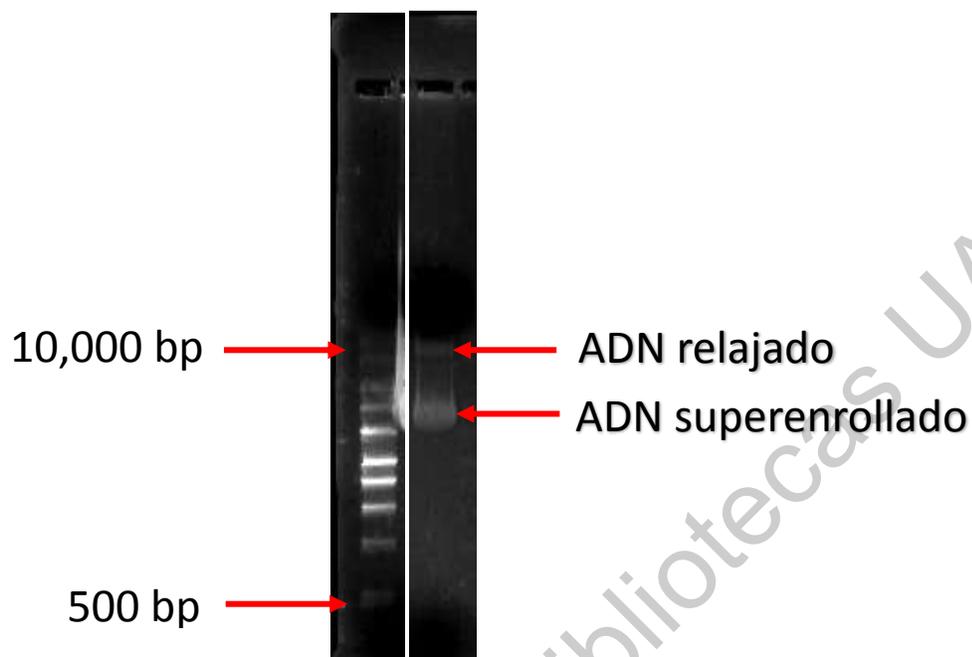


Figura 21 Análisis del plásmido en gel de agarosa.

A la izquierda referencia de tallas moleculares, a la derecha plásmido purificado.

4.4. Visualización de ADN plasmídico en partículas de MCF en Microscopia confocal

Una vez que se comprobó que el ADN plasmídico cumplía con las condiciones adecuadas de tamaño y cantidad se prosiguió a hacer las incubaciones correspondientes con las partículas de sílice mesocelular de acuerdo a la parte de **metodología** que se describió anteriormente. Una vez el ADN incubado con las partículas, fueron marcadas con DAPI, con el fin de que se intercalara con las bases nitrogenadas del ADN y así poder ver si estaba presente en la muestra.

En la figura 22 se presenta una vista general de las partículas en la muestra por microscopia confocal, en ella se puede ver que el tamaño y forma de las partículas concuerdan con las imágenes anteriormente presentadas por SEM. Del lado izquierdo se presenta una vista en campo claro de un corte en z por el microscopio confocal. Del lado derecho podemos observar la fluorescencia del DAPI alrededor

de todas las partículas, cada una de ellas con el contorno definido, lo que quiere decir que el ADN se encuentra presente sobre la superficie. Cabe mencionar que estas micrografías presentadas son de las partículas MCF funcionalizadas con grupos amino (MCF-NH₂), las cuales presentaban un potencial zeta ligeramente negativo, a comparación de las MCF sin funcionalizar, pero que permite la interacción entre las partículas de sílice y el ADN plasmídico sin importar su carga.

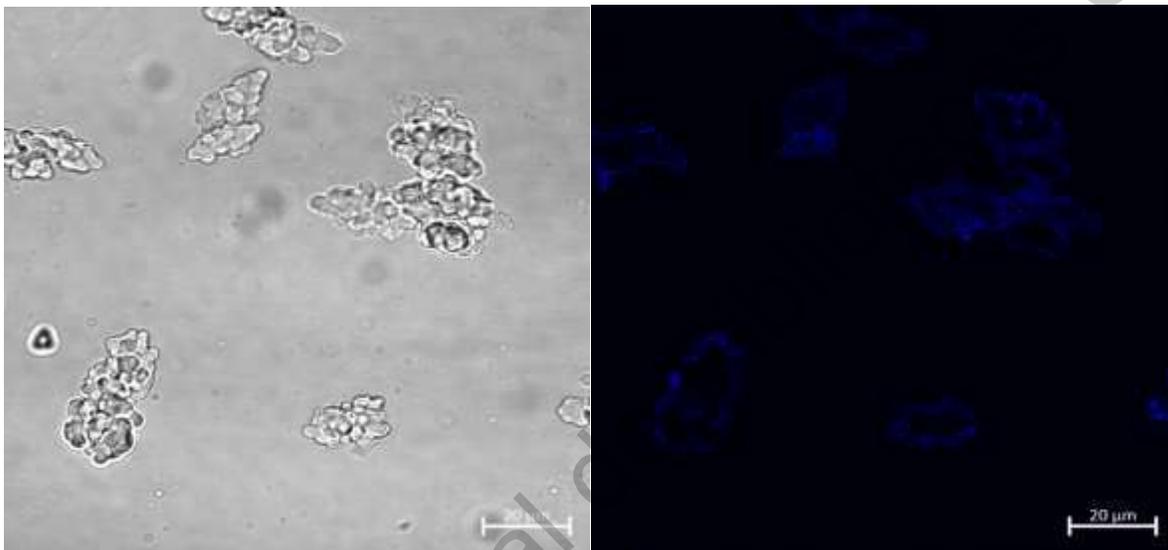


Figura 22 Imágenes de microscopio confocal de las partículas con ADN.

A la izquierda se observa un campo de las partículas en campo claro, a la derecha podemos ver las partículas fluorescentes en su contorno debido al DAPI intercalado en el ADN plasmídico.

Se hizo un acercamiento a las partículas con el fin de ver si se podía observar si el ADN se encontraba al interior de la partícula. Como se puede observar en la figura 23 el ADN no se encuentra en el centro de la partícula ya que no hay fluorescencia, sin embargo se pueden observar regiones donde el ADN se ve más abundante sobre la superficie.

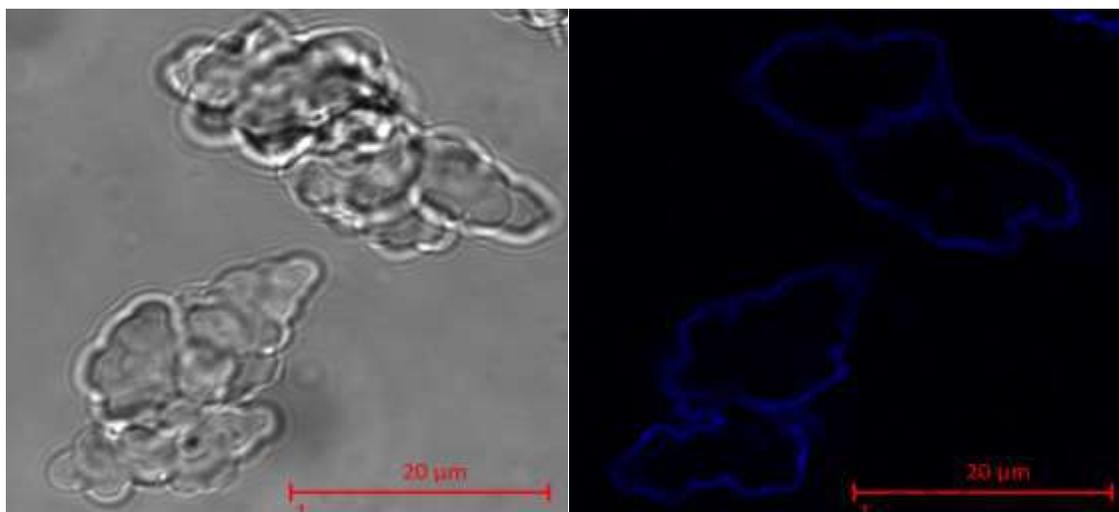


Figura 23 Acercamiento a las partículas por microscopía confocal.

A la izquierda la imagen encampo claro y a la derecha la misma imagen pero con la fluorescencia del DAPI.

4.5. Marcaje de proteínas con FITC

Con el fin de poder comprobar la interacción de la proteína BSA con respecto a las partículas de sílice se realizó un marcaje de proteínas con FITC con el fin de tener una proteína fluorescente. Para ello se siguió el procedimiento establecido por **la metodología**. De las incubaciones de BSA con FITC se obtuvieron dos lotes de proteína marcada por cromatografía de exclusión molecular, a uno se le llamo *FITC-BSA concentrada* y al otro *FITC-BSA diluida*, cada uno con un mililitro. Con el fin de determinar que se tenía en los lotes la presencia de la proteína con FITC se hizo un análisis por espectroscopia UV. La espectrofotometría es la técnica utilizada en los ensayos de proteína la cual depende de la presencia de un metal (en el caso de BCA se tiene Cu^{2+}) para absorber los fotones producidos por el espectrofotómetro. Su principal ventaja es que no es un método destructivo y puede realizar mediciones de alta precisión en periodos de tiempo muy cortos. En la figura 24 se muestran los dos espectros, los cuales presentan dos picos de

absorbancia en la misma muestra para cada lote, uno en 280 nm típicos de las proteínas y en 495 nm cuyo valor es el representativo para FITC, con lo cual se puede decir que la BSA había sido marcada exitosamente.

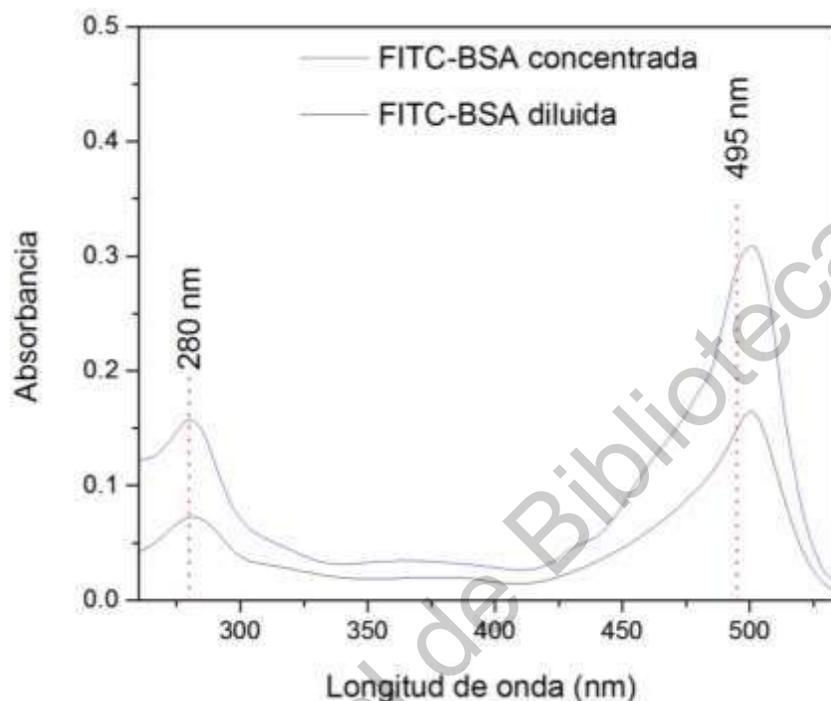


Figura 24 Espectros de absorción para los lotes obtenidos del marcaje de BSA con FITC.

Una vez comprobado que la proteína había sido marcada, se realizó una prueba para determinar la concentración de la proteína usando el ensayo del ácido bicinoninico (BCA). La concentración se determinó a partir de una curva patrón de BSA con diferentes concentraciones. El método del ácido bicinoninico nos permite conocer los valores de la concentración a partir de la absorbancia, con la que se realiza una interpolación con los datos obtenidos de la curva patrón.

En la figura 25 se muestran los valores para las concentraciones de los lotes obtenidos de FITC-BSA. Para *FITC-BSA concentrada* se obtuvo un valor de 1.3

mg/ml y para *FITC-BSA diluida* un valor de 0.78 mg/ml. Siendo estos suficientes para realizar las pruebas de incubación con la sílice mesocelular.

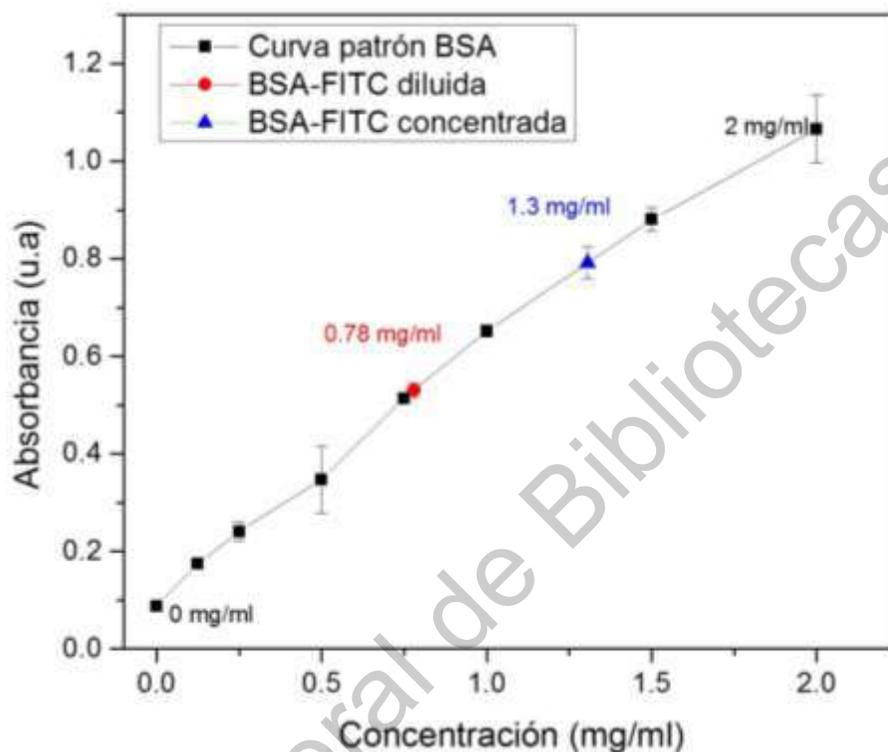


Figura 25 Grafica con los valores de concentración para FITC-BSA obtenida del marcaje de proteínas.

4.6. Visualización de BSA-FITC en partículas de MCF por microscopia confocal

Las incubaciones de la sílice mesocelular y la proteína BSA marcada con FITC fueron hechas de acuerdo a la metodología establecida en la sección de **metodología**. Las imágenes obtenidas por microscopia confocal de las partículas nos muestran en un campo general cómo la BSA está presente, como se ve en la figura 26.

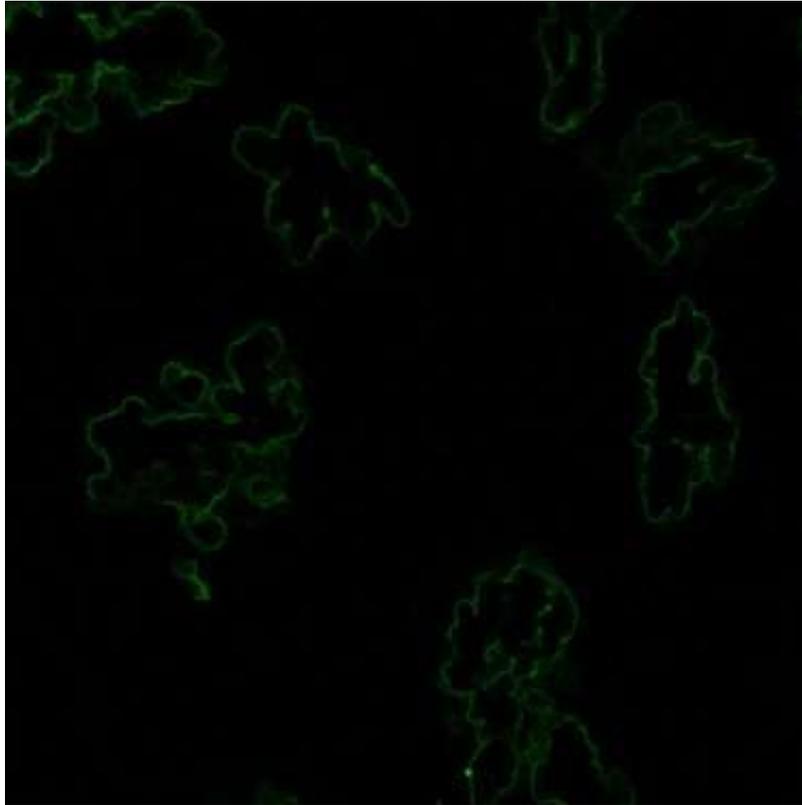


Figura 26 Campo general de las partículas con fluorescencia debido a la presencia de la proteína BSA marcada con FITC.

En la figura 27 se aprecian proyecciones para las partículas MCF (izquierda) y MCF-NH₂ (derecha) a partir de los planos obtenidos por el microscopio. En ella se puede observar como todas las partículas parecieran recubrirse con la proteína. Para las dos muestras se encontraron resultados bastante similares en cuanto a la interacción con la BSA, la diferencia entre las imágenes se debe a que para la MCF-NH₂ el fondo estaba mucho más limpio.

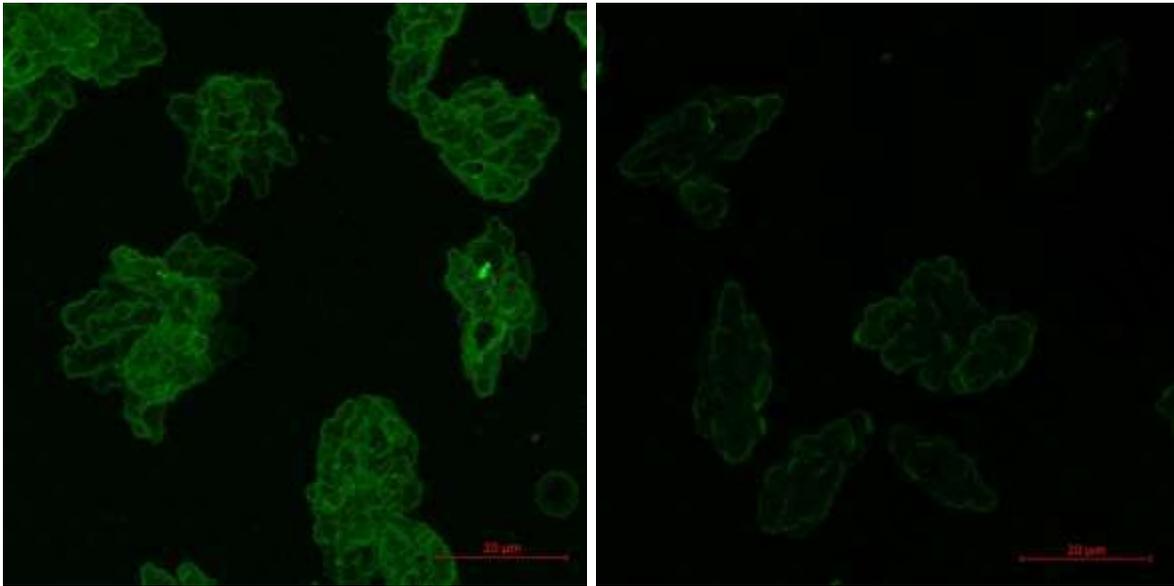


Figura 27 Proyecciones de las partículas por microscopia confocal para MCF (izquierda) y MCF-NH2 (derecha).

Con el fin de determinar más de cerca dónde se encontraba la proteína se hicieron acercamientos digitales a la muestra para poder observar una sola partícula en sus distintos planos. La figura 28 nos muestra el acercamiento a una partícula de MCF y la figura 29 a la una partícula de MCF-NH2. Para ambas partículas pareciera que la proteína se retiene sobretodo en la superficie, pero también se observa como en ciertas partes está más presente la fluorescencia verde en el interior como en la figura 28.

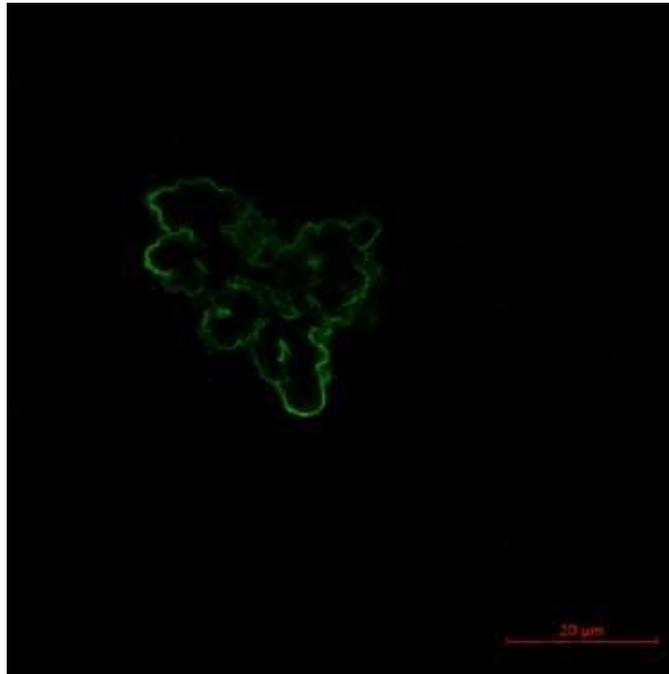


Figura 28 Acercamiento a una partícula de MCF de un corte medio en Z por microscopia confocal.

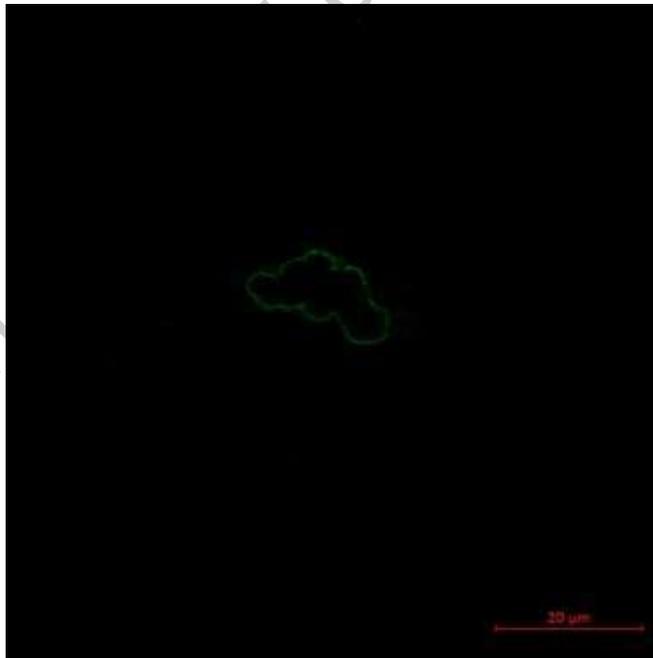


Figura 29 Acercamiento a una partícula de MCF-NH2 de un corte medio en Z por microscopia confocal.

4.7. Obtención de ARN

Con el objeto de monitorear la internalización de una macromolécula de talla más pequeña que el DNA plasmídico y que proteínas, se obtuvo el ARN total a partir de células humanas, el cual se sabe que consiste en ARN ribosomal (2 subunidades), ARNs de transferencia y ARN pequeños. El material fue obtenido de una línea celular inmortal llamada THP-1, derivada de monocitos humanos. Para purificar el ARN se utilizó el kit *SV Total RNA Isolation System* de la marca Promega (Wiskerchen, 1998). El aislamiento hace uso de las propiedades disruptivas y protectoras del tiocianato de guanidinio (GTC) y el β -mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en los extractos celulares. El GTS junto con el SDS sirve para romper las nucleoproteínas permitiendo que el ARN quede en solución libre de proteínas. La centrifugación permite eliminar el lisado de proteínas junto con los restos celulares, y el ARN se precipita con etanol selectivamente quedando en las cestas de centrifugado. La DNasa I sin RNasa se aplica directamente a la membrana de la cesta de centrifugado para digerir el ADN genómico contaminante sin dañar el ARN. Mediante simples pasos de lavado se eliminan las sales contaminantes, proteínas e impurezas celulares que quedan.

Finalmente, el ARN total se eluyó de la membrana mediante la adición de agua libre de nucleasas.

Para comprobar la cantidad y calidad del ARN se realizó una medición por espectroscopia UV, determinando las razones de $A_{260/280}$ para conocer la pureza del ARN obtenido. Como se puede ver en la figura 30 se observa el pico de absorbancia en 260, característica para ácidos nucleicos y obteniendo una relación de $A_{260/280}$ de 2.05, que se encuentra dentro de los parámetros establecidos para considerar un lote de ARN puro.

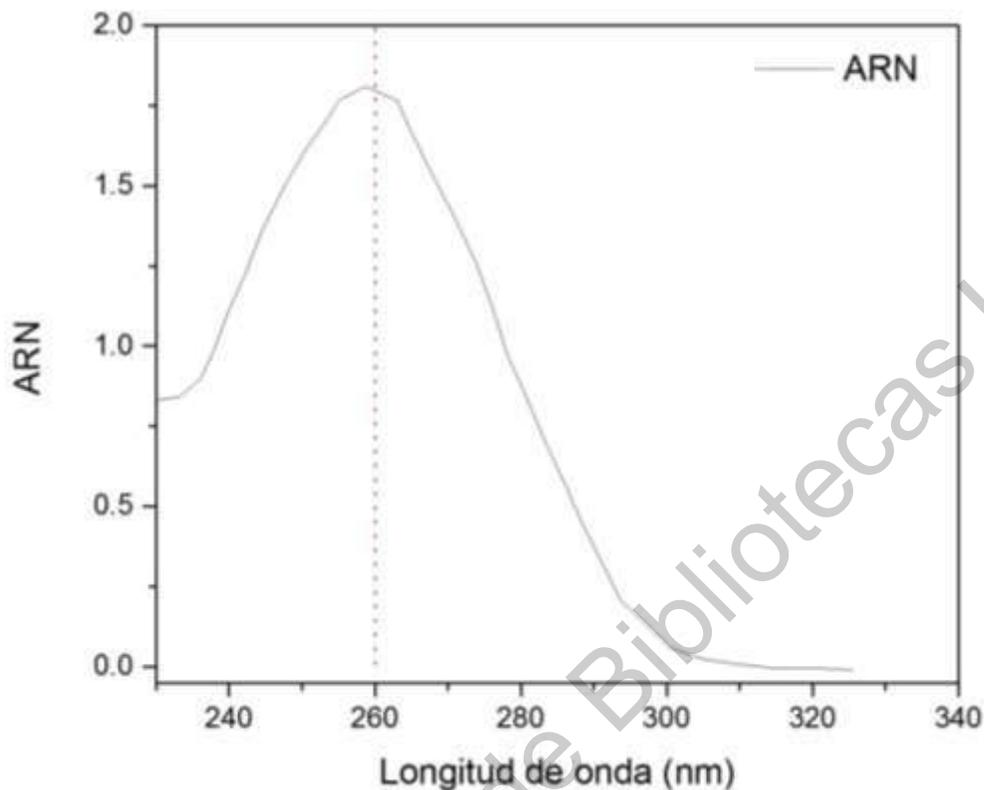


Figura 30 Cuantificación de ARN por espectrometría UV.

Para determinar el tamaño aproximado del ARN obtenido se hizo un análisis por electroforesis horizontal en gel de agarosa para la muestra. En la figura 31 se muestran en el carril derecho las subunidades correspondientes a 18S y 28S que son características para ARN de eucariontes. De acuerdo a la referencia de tallas moleculares que se encuentra a la izquierda podemos deducir que tenemos en la muestra ARN de varias tallas entre los cientos de pares de bases hasta un poco más de 2,000 pares de bases, que era lo que se esperaba al utilizar ARN, obtener un menor tamaño al del ADN plasmídico obtenido que era aproximadamente de 6,000 pares de bases.

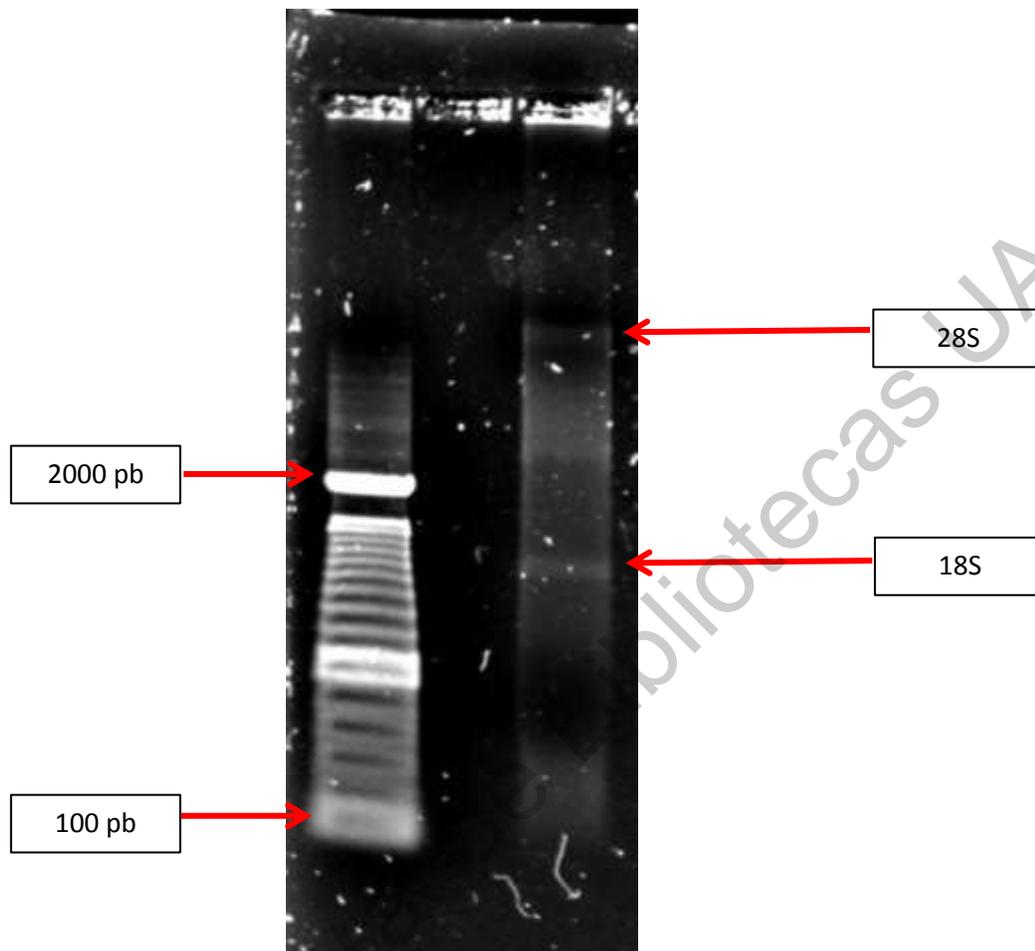


Figura 31 Análisis de ARN en gel de agarosa. A la izquierda referencia de tallas moleculares, a la derecha ARN.

4.8. Visualización de ARN en partículas de MCF-NH₂ en microscopia confocal

Para la incubación de ARN con partículas de sílice se siguió un procedimiento similar a la incubación con ADN, usando como marcador fluorescente el DAPI. En este caso fueron utilizadas las partículas de sílice mesoceular hidrofílicas, con el fin de mejorar la interacción con el ARN ya que esto significaría un cambio de carga para la partícula a una menos negativa. Como se observa en la figura 32, la cual es un corte intermedio de la partícula, podemos ver que hay presencia de

ARN en la superficie y se podría decir que un poco más hacia su interior, sin embargo no se puede confirmar si al centro de la partícula hay presencia de fluorescencia porque también hay ruido en la imagen.



Figura 32 Acercamiento a una partícula de MCF-NH₂ con fluorescencia debido a la presencia de ARN

4.9. Análisis de ADN plasmídico en partículas de MCF-NH₂ protonada

Se realizó una prueba más con ADN pero esta vez con partículas de MCF-NH₂ protonada, para ver si había una diferencia en su interacción. En la figura 33 que corresponde al plano medio en Z obtenido por microscopia confocal, se ve como no hay un cambio significativo en la ubicación de la fluorescencia, se sigue presentando en la superficie de la partícula, no obstante también es notable como el ADN se ve más agrupado a las orillas de la partícula.

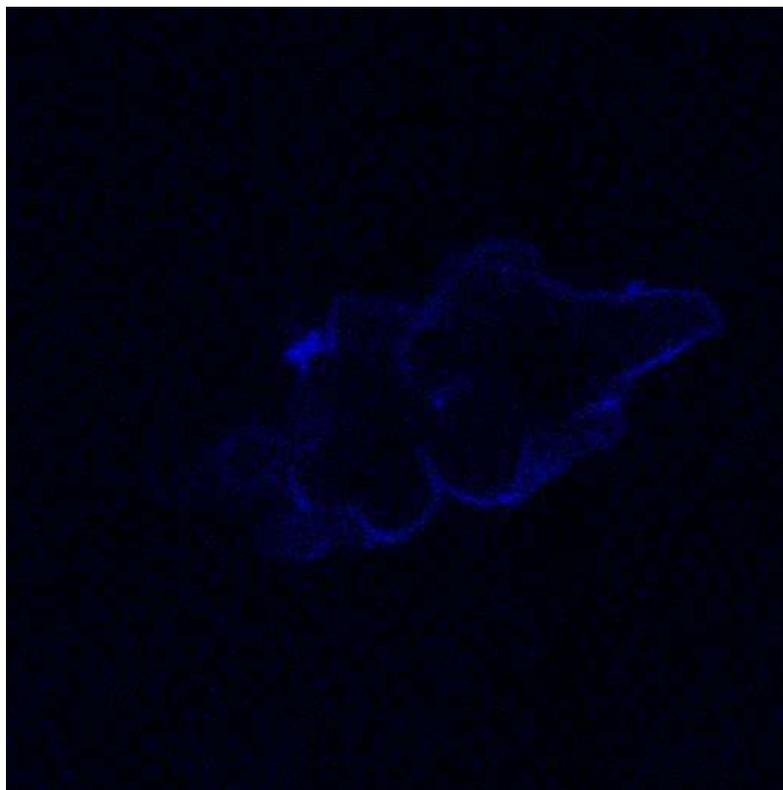


Figura 33 Imagen por microscopia confocal de la MCF-NH₂ después de ser protonada y en incubación con ADN.

5. CONCLUSIONES

Síntesis y caracterización de partículas

Se obtuvieron las estructuras esperadas para las espumas de sílice mesocelular, con un tamaño de poro grande y partículas de gran tamaño para que fuera posible ver su interacción con macromoléculas por microscopia confocal. También se obtuvo una exitosa funcionalización demostrada por los resultados de potencial zeta en los cuales se distingue un cambio en la carga de la partícula proporcionada por los grupos aminos, lo cual significa que la partícula tiene gran capacidad de cambio en cuanto a su funcionalización, además se comprueba que poseen alta estabilidad térmica.

Marcaje de proteínas e incubación en las partículas

La proteína BSA fue marcada con éxito con FITC, como se pudo ver la espectroscopia UV y la determinación de la concentración por el método del ácido bicinoninico, se obtuvo la cantidad necesaria para llevar a cabo los experimentos. Las incubaciones de las partículas con la proteína permitieron ver por microscopia confocal cómo interactuaban, y por lo que se pudo observar con las imágenes es evidente que existe un fenómeno de adsorción en la superficie de las partículas.

Obtención de ADN plasmídico y ARN

El ADN plasmídico y el ARN fueron obtenidos de acuerdo a los parámetros esperados de purificación. Mediante la electroforesis se pudo observar el número de bases que presentaba cada uno. Siendo el ARN el que contenía menor número de pares de bases, lo que se esperaba ya que el propósito de usarlo era ver si afectaba el tamaño de las biomoléculas para que fuera posible la internalización en las espumas de sílice mesocelular.

Mediante la microscopia confocal y gracias al marcador fluorescente DAPI, fue posible hacer el rastreo de las moléculas en las partículas. Con las imágenes se pudo observar cómo el ADN también presenta un fenómeno de adsorción en la superficie de la partícula, en todos los planos obtenidos de la microscopia se puede ver. Posteriormente cuando se hicieron incubaciones con las partículas protonadas y el ADN no hubo un cambio representativo, esto debido a que por los resultados obtenidos en potencial zeta la protonación no afectó la carga de la superficie en el medio PBS para las partículas. Con respecto al ARN se observó una leve mejoría en cuanto a la internalización. Cabe mencionar que la funcionalización de la sílice en su superficie no constituye un grave problema, debido al alta área superficial del material, y a la alta carga de material nucleico que en esta localización puede ser alcanzado (Carrasco et al., 2016).

En este trabajo se analizó la capacidad de la sílice mesocelular para el encapsulamiento de biomacromoléculas por microscopía confocal. El uso de

fluorescencia para reconstrucción de imágenes confocales pudo ser realizado gracias a la escala mesocelular de la sílice estudiada, que cuenta con poros de 10 - 50 nm, y tallas de 1 - 20 micras (Goodsell, 2019).

El uso potencial de estas sílices mesocelulares en aplicaciones biomédicas es prometedor sobre todo para la inmovilización de biomoléculas y administración controlada de fármacos, gracias a la versatilidad de las partículas durante su síntesis y funcionalización.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agudelo, N. A., Escobar, S., Tejada, J. C., & López, B. L. (2020). Understanding of the formation of mesocellular-like silica foam particles of nano size and its chemical surface to immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase. *Microporous and Mesoporous Materials*, 294, 109948. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.109948>
- Arkhangelsky, E., Sefi, Y., Hajaj, B., Rothenberg, G., & Gitis, V. (2011). Kinetics and mechanism of plasmid DNA penetration through nanopores. *Journal of Membrane Science*, 371(1–2), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.01.014>
- Aval, N. A. (2016). *Mesoporous Materials in Drug Delivery*. 4(3), 19–20. <https://doi.org/10.15406/jnmr.2016.04.00091>
- Barbaro, P., & Liguori, F. (2010). *Heterogenized Homogeneous Catalysts for Fine Chemicals Production*. Springer Science & Business Media.
- Betancor, L., Gadea, M., & Flores, K. (2006). Genética bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica, C*, 59–80.
- Caballero, J. L., Moyano, E., & Muñoz, J. (2007). Purificación de ADN plámidico y electroforesis del mismo gen de agarosa. *Análisis de La Presencia de Organismos Genéticamente Modificados En Muestras de Alimentos*, 1–12.
- Carrasco, G., López-Marín, L. M., Fernández, F., Salas, P., Loske, A. M., & Millán-Chiu, B. E. (2016). Biomimetic coat enables the use of sonoporation to assist delivery of silica nanoparticle-cargoes into human cells. *Biointerphases*, 11(4), 04B303. <https://doi.org/10.1116/1.4965704>
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6(1), 80–83. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5556>
- Cheriyedath, Susha. (2018, November 12). Tipos de ARN: mRNA, rRNA y tRNA.

News-Medical. Retrieved on March 02, 2020 from <https://www.news-medical.net/life-sciences/-Types-of-RNA-mRNA-rRNA-and-tRNA.aspx>.

Faraldos, M., & Goberna, C. (2014). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales* (Issue September).

Freitas, R. A. (2005). What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1(1), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2004.11.003>

Gao, F., Botella, P., Corma, A., Blesa, J., & Dong, L. (2009). Monodispersed mesoporous silica nanoparticles with very large pores for enhanced adsorption and release of DNA. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(6), 1796–1804. <https://doi.org/10.1021/jp807956r>

Gekle, M. (2005). Renal Tubule Albumin Transport. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 573–594. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.031103.154845>

Glencross, H., Ahmed, N., & Wang, Q. (2001). Biomedical Science Practice. In *Appl. Phys. A* (Vol. 73).

Goodsell, D. S. (2019). Symmetry at the Cellular Mesoscale. *Symmetry*, 11(9), 1170. <https://doi.org/10.3390/sym11091170>

Großhans, H., & Filipowicz, W. (2008). Molecular biology: The expanding world of small RNAs. *Nature*, 451(7177), 414–416. <https://doi.org/10.1038/451414a>

Han, Y., Stucky, G. D., Butler, A., Barbara, S., & June, R. V. (2000). *Mesoporous Silicate Sequestration and Release of Proteins*. 20, 9897–9898.

Hermanson, G. T. (2013). Fluorescent Probes. In *Bioconjugate Techniques*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382239-0.00010-8>

Hernández-Morales, V., Nava, R., Acosta-Silva, Y. J., Macías-Sánchez, S. A., Pérez-Bueno, J. J., & Pawelec, B. (2012). Adsorption of lead (II) on SBA-15 mesoporous molecular sieve functionalized with -NH₂ groups. *Microporous and Mesoporous Materials*, 160, 133–142.

<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.05.004>

Horobin, R. ., & Kiernan, J. . (2003). Conn's Biological Stains. A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine. In R. . Horobin & J. . Kiernan (Eds.), *Journal of Anatomy* (Issue 4). Oxford.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00223.x>

Insin, N., Tracy, J. B., Lee, H., Zimmer, J. P., Westervelt, R. M., & Bawendi, M. G. (2008). *Incorporation of Iron Oxide Nanoparticles and Quantum Dots into Silica Microspheres*. 2(2), 197–202.

Jesenák, K., Kuchta, L., Hudec, P., & Fajnor, V. . (1999). Calcination of SiO₂-Aerogel in oxidizing atmosphere. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 55, 773–777.

Katiyar, A., Yadav, S., Smirniotis, P. G., & Pinto, N. G. (2006). Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules. *Journal of Chromatography A*, 1122(1–2), 13–20.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.055>

Knežević, N., & Durand, J. O. (2015). Large pore mesoporous silica nanomaterials for application in delivery of biomolecules. *Nanoscale*, 7(6), 2199–2209.
<https://doi.org/10.1039/c4nr06114d>

Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.

Liu, J., Stace-naughton, A., Jiang, X., & Brinker, C. J. (2009). *Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers (Protocells) as Delivery Vehicles Porous Nanoparticle Supported Lipid Bilayers (Protocells) as Delivery*. 1354–1355.
<https://doi.org/10.1021/ja808018y>

Mamaeva, V., Sahlgren, C., & Lindén, M. (2013). Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(5), 689–702. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.018>

- Mathé, C., Devineau, S., Aude, J. C., Lagniel, G., Chédin, S., Legros, V., Mathon, M. H., Renault, J. P., Pin, S., Boulard, Y., & Labarre, J. (2013). Structural determinants for protein adsorption/non-adsorption to silica surface. *PLoS ONE*, 8(11), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081346>
- Neira, A., Yáñez, D., Aguirre, P., Amar, Y., Vidal, S., & Egaña, R. (2013). Encapsulación de Biomoléculas Usando Polímeros Naturales : “ Un Nuevo Enfoque en la Entrega de Fármacos en Medicina .” *Avances En Ciencias Veterinarias*, 28(2), 31–40.
- Ochubiojo, M., Chinwude, I., Ibang, E., & Ifianyi, S. (2012). Nanotechnology in Drug Delivery. In *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. <https://doi.org/10.5772/51384>
- Olson, B. J. S. C. (2016a). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 2016, A.3A.1-A.3A.32. <https://doi.org/10.1002/cpph.3>
- Olson, B. J. S. C. (2016b). Assays for determination of protein concentration. In *Current Protocols in Pharmacology* (Vol. 2016). <https://doi.org/10.1002/cpph.3>
- Ortega Esquembre, C., Piqueras, A., Páramo Valer, V., & Ruíz Rubio, C. (2013). El mejoramiento humano (1st ed., pp. 82-83). Granada: Editorial Comares.
- Primrose, R. M., & Twyman, S. B. (2006). Principles of Gene Manipulation. In *Journal of Medical Genetics* (Issue 5). <https://doi.org/10.1136/jmg.19.5.397-a>
- Qiagen. (2012). QIAfilter Plasmid Purification Handbook Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. *Product Manual*, April.
- Rai, V., & Dey, N. (2011). The Basics of Confocal Microscopy. *Laser Scanning, Theory and Applications*, March. <https://doi.org/10.5772/16214>
- RIGGS, J. L., SEIWALD, R. J., BURCKHALTER, J. H., DOWNS, C. M., &

METCALF, T. G. (1958). Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *The American Journal of Pathology*, 34(6), 1081–1097.

Rinflerch, A. R., Italiano, H., Aires, D. B., & Luca, D. A. De. (2016). *Ácidos ribonucleicos no codificantes : hacia la era de la medicina personalizada Noncoding ribonucleic acids : Stepping into the era. April.*

Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K., & González-Méndez, I. (2016). *La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?* 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.11.002>

Sambrook, J., & Green, M. R. (2012). Molecular cloning. In *Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA: Vol. Vol 1*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00007-0>

Schmid, F., & Beer, L. (2001). Biological Macromolecules : Spectrophotometry Concentrations. *Methods*, 1–4.

Schmidt-Winkel, P., Lukens, W. W., Zhao, D., Yang, P., Chmelka, B. F., & Stucky, G. D. (1999a). Mesocellular siliceous foams with uniformly sized cells and windows [5]. *Journal of the American Chemical Society*, 121(1), 254–255. <https://doi.org/10.1021/ja983218i>

Schmidt-Winkel, P., Lukens, W. W., Zhao, D., Yang, P., Chmelka, B. F., & Stucky, G. D. (1999b). Mesocellular siliceous foams with uniformly sized cells and windows [5]. *Journal of the American Chemical Society*, 121(1), 254–255. <https://doi.org/10.1021/ja983218i>

Schroeder, A., Levins, G., Cortez, C., Langer, R., & Anderson, D. (2017). Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Sezões, F., Carrott, M. M. L. R., Mourão, P. A. M., & Carrott, P. J. M. (2010). Adsorption of bovine serum albumin onto mesocellular silica foams with

differently sized cells and windows. *Adsorption Science and Technology*, 28(8–9), 777–788. <https://doi.org/10.1260/0263-6174.28.8-9.777>

Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. L., Wu, C. W., & Lin, V. S. Y. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1278–1288. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.012>

Solberg, S. M., & Landry, C. C. (2006). Adsorption of DNA into mesoporous silica. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(31), 15261–15268. <https://doi.org/10.1021/jp061691+>

Spiguel, L., Shaw, C., Katz, A., Guo, L., Chen, H.-C., Lee, B. T., & Singhal, D. (2017). Fluorescein Isothiocyanate. *Annals of Plastic Surgery*, 78, S296–S298. <https://doi.org/10.1097/sap.0000000000001034>

Thermo Scientific. (2010). Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook Version 2 Table of Contents. In *Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook Version 2*. www.thermoscientific.com/pierce

Thermoscientific. (2012). *Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios*. 7707. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>

Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481.

Wiskerchen, B. M. (1998). SV Total RNA Isolation System. *System*, 67, 1–4.

Wu, C., Chang, J., & Xiao, Y. (2013). *Advanced Bioactive Inorganic Materials for Bone Regeneration and Drug Delivery*.

Zydney, A. L. (1998). Protein separations using membrane filtration: New opportunities for whey fractionation. *International Dairy Journal*, 8(3), 243–250.

[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00045-4)

Dirección General de Bibliotecas UAQ