

Uso de péptidos cariofílicos en el desarrollo de vectores no virales a base de quitosán para terapia génica

Karen Donají Olivo-Escalante, María Eugenia Aranda-Barradas*

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. C.P.: 54740

* mariaeugeniaarandab@comunidad.unam.mx

Resumen

La terapia génica es una estrategia que involucra a un conjunto de técnicas biotecnológicas y moleculares que llevan al tratamiento de enfermedades a través de la transferencia de material genético terapéutico que puede realizar las funciones de un gen sano o, silenciar un gen defectuoso, o bien, dar instrucciones de muerte a la célula, como en el tratamiento contra cáncer. Todo esto mediante el uso de vectores con capacidad de penetrar las membranas celulares (como hacen, por ejemplo, los virus). En este escenario donde los vectores poseen tal importancia para el desarrollo de la terapia génica, el presente trabajo se centra en la optimización de la capacidad del quitosán (un biopolímero biodegradable y no tóxico) para transferir genes, es decir, como vector no viral, por medio del acoplamiento de dos péptidos cariofílicos, los cuales consisten en secuencias diferentes de aminoácidos que actúan como señales de localización nuclear (NLS) y favorecen la entrada del DNA terapéutico al núcleo de la célula a través de receptores denominados *importinas*. Se encontró que los péptidos cariofílicos ejercen efectos positivos en las características físicas de nanopartículas de quitosán utilizadas como vector y además aumentan su eficiencia para transferir genes cuando sus secuencias tienen una composición de pocos aminoácidos neutros y varios aminoácidos con carga positiva. La eficiencia del quitosán como vector puede aún incrementarse a futuro por medio del acoplamiento de ligandos específicos para lograr terapias dirigidas, con la intención de desarrollar un vector que pueda ser incluso más eficiente que un virus sin las desventajas que eso conlleva.

Palabras Claves: nanopartículas, terapia génica, plásmido, péptido cariofílico, señal de localización nuclear.

Abstract

Gene therapy is a strategy that involves a cluster of biotechnological and molecular techniques that lead to the treatment of diseases through the transference of genetic material that can perform the functions of a healthy gene, silence a defective one, or give death instructions to a cell, such as a cancer treatment. These goals only can be achieved by using vectors that are capable to get into the cell and, if applied, to the cell nucleus (just like viruses do, for example). In this scenario in which vectors have such an importance for the development of gene therapy, the present work focuses on the optimization of the capability of chitosan (a biodegradable and non toxic biopolymer) to transfer genes, meaning as a nonviral vector, by the coupling of two karyophilic peptides, which consist on different amino acid sequences that act as nuclear localization signals (NLS) and promote the therapeutic DNA entrance to the nucleus through receptors called *importins*. It was found that karyophilic peptides have positive effects on the physical characteristics of chitosan nanoparticles used as vectors and, furthermore, they increase their efficiency to transfer genes when their sequences have less neutral amino acids and several ones positively charged. Chitosan efficiency as a vector can even further increase by coupling specific ligands to develop a vector almost as efficient as viruses without the disadvantages that they imply.

Key Words: nanoparticles, gene therapy, plasmid, karyophilic peptide, nuclear localization signal

Introducción

La terapia génica es una herramienta potencial en el combate de diversas enfermedades para las cuales no hay aún una cura definitiva o bien, la que hay compromete de manera importante la calidad de vida de los pacientes. Entre 1998 y 2010, se aprobaron cuatro medicamentos basados en terapia génica (Vitravene, Gendicine, Oncorine y Rixin-G), y tres de ellos obtuvieron autorización para tratar algunos tipos de cáncer en Asia. Desde entonces, ha habido un incremento año con año en el número de protocolos clínicos de terapia génica en todo el mundo, y por lo tanto, más medicamentos basados en terapia génica han obtenido las licencias de comercialización en Europa y Estados Unidos. Del 2011 al 2019 se aprobaron un total de 18 productos basados en terapia génica por agencias reguladoras de Estados Unidos, Europa, China, Corea, Japón, Canadá, Rusia y Filipinas (Ma et al., 2020).

¿En qué consiste la terapia génica?

El mecanismo de acción de la terapia génica consiste en conferir al organismo la capacidad de generar, o bien, detener la producción de alguna proteína que sea clave para combatir determinada enfermedad mediante el envío de DNA o RNA terapéutico(s) a las células (Patil et al., 2019). Es una terapia que tiene muy pocos efectos adversos. Sin embargo, todavía tiene varios retos. Para empezar, debido a que hay muchas enzimas en circulación que pueden degradar rápidamente al DNA o RNA circulante, su administración requiere del uso de vectores que los protejan del entorno para que lleguen íntegros a las células donde se requiere de su acción terapéutica. De manera general, hay dos tipos de vectores: los virales y los no virales (Figura 1); ambos tienen ventajas y desventajas.

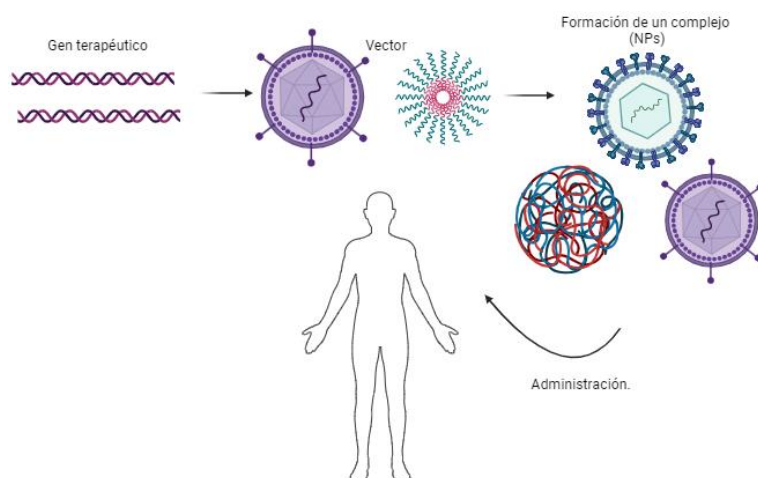


Figura 1. Terapia génica. El gen (DNA) o RNA terapéutico se acoplan a vectores virales o no virales para poder llegar a las células y ejercer su efecto terapéutico.

Los vectores virales, como su nombre indica, son virus, comúnmente adenoasociados (AAV), retrovirus, lentivirus o adenovirus (Ads), que son modificados mediante ingeniería genética para restringir la expresión de genes patogénicos e insertar el material genético terapéutico, lo que permitirá la entrega segura y eficiente de este material a las células objetivo. Una de las principales ventajas de los vectores virales es que, al ser virus en sí mismos, poseen la maquinaria molecular necesaria para la internalización del material genético en la célula huésped y su

expresión. Esto asegura que el gen terapéutico o la secuencia de interés sean transferidos de manera eficiente y puedan ser utilizados por la célula para producir la proteína terapéutica; este proceso se denomina *transfección*. Esta capacidad de los vectores virales para entrar a las células y entregar genes es su principal fortaleza en el ámbito de la terapia génica. Sin embargo, los vectores virales también presentan desafíos significativos. Uno de ellos es su alto costo de producción y purificación, lo que limita su disponibilidad y aplicación en un contexto

clínico más amplio. Además, estos vectores tienen limitaciones en cuanto al tamaño del material genético que pueden empaquetar, lo que puede restringir el tipo de genes que se pueden entregar, tienen un tropismo muy variado (lo que dificulta lograr una terapia dirigida) y finalmente, al ser virus pueden inducir una respuesta inmunológica, en muchos casos, exacerbada, a pesar de estar genéticamente modificados (Yin et al., 2014).

Este tipo de desafíos ha llevado al desarrollo de otro tipo de vectores, los vectores no virales. Estos se forman a partir de diversos materiales, en general biocompatibles, como los lípidos, polímeros catiónicos, péptidos catiónicos y algunas moléculas inorgánicas con propiedades especiales para el envío de genes, tales como el fosfato de calcio. El material genético terapéutico se acopla a estos vectores; cuando se trata de un gen terapéutico, este se encuentra insertado en una molécula de DNA conocida como plásmido (pDNA). A los complejos pDNA-lípidos se les conoce como *lipoplexes* y los complejos pDNA-polímeros catiónicos son conocidos como *poliplexes*. Estos vectores ofrecen ventajas en términos de seguridad, capacidad de carga genética y facilidad de producción a gran escala, así como una posibilidad más amplia para el diseño de terapias génicas dirigidas. A pesar de todas estas ventajas, este tipo de vectores tampoco son una solución completa a la problemática, pues aquí también se presentan retos, el principal de ellos: la baja eficiencia de transfección (Patil et al., 2019).

Retos y estrategias para la optimización de vectores no virales

Los vectores no virales deben superar varios retos para lograr el envío de genes de manera exitosa. Una vez que el vector ha interactuado con la célula, el siguiente paso es la internalización que se lleva a cabo mediante endocitosis e involucra la invaginación de la membrana celular y la formación de vesículas; dicho proceso puede clasificarse como macropinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por receptor que, a su vez, se clasifica en dependiente e independiente de clatrina. La vía más común de internalización de los complejos es la endocitosis y esta depende de la estructura, composición, tamaño del vector, así como el tipo celular (Oliveira et al., 2017). Una vez dentro de la

célula, debe ocurrir el escape del endosoma para que la nanopartícula pueda continuar hacia su destino, ya sea el citoplasma o el núcleo, evitando su llegada al lisosoma, organelo con el que se fusiona el endosoma y en el que, debido a su pH ácido y riqueza en enzimas hidrolíticas, se degradaría el vector y el material genético terapéutico. Logrando el escape endosomal y una vez en el citoplasma, el DNA requiere ser transportado hacia el núcleo; en este paso, la afinidad del polímero utilizado como vector con el pDNA puede ser una limitante para la disociación del complejo, por lo que deben optimizarse sus características fisicoquímicas, o elegir biopolímeros que puedan degradarse fácilmente en el ambiente intracelular (Perez Ruiz de Garibay, 2016). Posteriormente, es necesaria la entrada del pDNA al núcleo, que es donde se procesará para obtener el efecto terapéutico deseado. De manera general, la entrada de cualquier molécula al núcleo puede ocurrir de manera pasiva durante la reintegración de la envoltura nuclear cuando la célula se encuentra en mitosis, lo que en este caso reduce de manera muy importante las probabilidades de que ingrese una cantidad importante del gen terapéutico al núcleo, o bien, de manera más eficiente e independiente del estadio celular, el ingreso activo al núcleo puede ser mediante el complejo de poro nuclear (NPC). Sin embargo, mediante este mecanismo sólo pueden ingresar las moléculas que cuentan con una señal de localización nuclear (NLS), que consiste en diversas secuencias de aminoácidos que son reconocidas por proteínas en el citoplasma llamadas *importinas* que tienen alta afinidad por el NPC y pueden gestionar la entrada de las moléculas que contengan la NLS al núcleo (Yao et al., 2013).

Todos estos retos han llevado al desarrollo de diferentes estrategias para optimizar los vectores no virales. Entre ellos se encuentran: la modificación química de los lípidos o polímeros catiónicos utilizados como vector (Yao et al., 2013), el uso de diversos pesos moleculares en función del polímero, la optimización de relaciones molares pDNA:polímero (Aranda-Barradas et al., 2022), o la integración de ligandos específicos para receptores celulares que lograrían tanto una endocitosis más eficiente como una terapia dirigida y específica (Katas et al.,

2012), o la incorporación de moléculas que tengan NLS para facilitar la llegada del pDNA al núcleo (Cartier & Reszka, 2002). Asimismo, pueden utilizarse promotores tejido-específicos (secuencias de DNA que regulan específicamente la transcripción del gen) durante la inserción del gen terapéutico en el plásmido utilizado, con la finalidad de que solo sea expresado en las células que puedan promover su transcripción y procesamiento de manera específica (Saukkonen & Hemminki, 2004).

¿Qué es el quitosán?

Dentro de los grupos de materiales utilizados en el desarrollo de vectores no virales

mencionados previamente, y perteneciendo al grupo de los polímeros catiónicos, se encuentra el quitosán. Este es un biopolímero compuesto de β -D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (Figura 2), producido por desacetilación alcalina de la quitina, la cual es un biopolímero presente en las cáscaras de camarón, algunos hongos y algunos insectos, que además es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (Pellis et al., 2022). Debido a sus grupos amino, el quitosán se comporta como una base débil con un pH entre 6.2 - 7.2, es únicamente soluble en un pH de entre 1 y 6, intervalo en el que también se encuentran protonados estos grupos funcionales (Liu & De Yao, 2002).

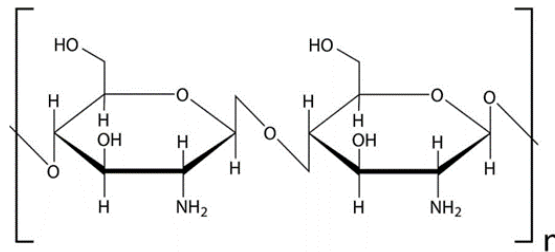


Figura 2. Unidad repetitiva del polímero quitosán

El quitosán es biocompatible, biodegradable y no tóxico; por lo tanto, se ha propuesto como una alternativa más segura a otros vectores no virales en el transporte de pDNA (Aranda-Barradas et al., 2022), RNA (Soliman et al., 2020) y la regulación por siRNA (RNA de silenciamiento, que será capaz de evitar la traducción de un RNA mensajero diana) (Holzerny et al., 2012). Además de estas características favorables para considerarlo en el desarrollo de vectores no virales, al quitosán se le ha vinculado con la hipótesis del efecto esponja de protones, la cual se basa en que, a pH fisiológico, solo algunos átomos de nitrógeno de las aminas presentes en el polímero son protonadas. En el endosoma, el pH desciende y la cantidad de aminas protonadas aumenta, lo que provoca un gradiente de carga que desencadena un flujo de iones Cl^- y la concentración de iones Cl^- incrementa, lo que induce un flujo de agua que eventualmente provocará la lisis del endosoma, evitando así la llegada al lisosoma donde se degradará el material genético terapéutico que transporta (Santos-Carballal et al., 2018).

Otra ventaja del quitosán es que una vez que las nanopartículas a base de quitosán pueden

escapar del endosoma y ser liberadas al citoplasma, es que en este medio se encuentran lisozimas y quitinasas que lo degradan (Islam et al., 2019), lo que permite que el pDNA quede libre y tenga mayores probabilidades de ingresar al núcleo.

¿Qué son los plásmidos y los genes reporteros y por qué juegan un papel tan importante en la terapia génica?

Los plásmidos (pDNA), son secuencias de DNA circular bicatenario y se encuentran separados del genoma bacteriano principal, en el citoplasma de la célula. Estos plásmidos se caracterizan por tener una replicación independiente del cromosoma y por no portar genes esenciales para el crecimiento y reproducción de la célula, pero pueden llevar genes que codifican para algunas proteínas que confieren resistencia a algún antibiótico, lo que permite seleccionar bacterias que lo portan, además de propagarlo fácilmente mediante cultivo bacteriano (generalmente de *Escherichia coli*). Su aislamiento es sencillo y puede realizarse utilizando ciertas soluciones o utilizando kits comerciales. Gracias a estas características, los plásmidos se utilizan ampliamente como soporte para transportar algún fragmento de DNA de interés, ya que

también cuentan con una estructura muy estable (a diferencia de un fragmento más pequeño y lineal de DNA). La secuencia de interés (en este caso, un gen terapéutico o bien, un gen reportero), se inserta en un plásmido específico mediante técnicas de biología molecular y este plásmido ya se encuentra listo para acoplarse a algún vector no viral no solo para el envío efectivo de este DNA a la célula, sino también para proveer los elementos necesarios para que se procese correctamente este DNA en el núcleo, como secuencias que actúan como promotores para la transcripción, y/o señales dentro de la secuencia de nucleótidos para que se lleve a cabo correctamente la traducción, etc.

Durante el desarrollo de vectores no virales, en las primeras etapas es recomendable trabajar con genes reporteros, es decir, genes cuya expresión se hace evidente muy fácilmente, con el fin de establecer si las condiciones a prueba son ideales para la transferencia de genes. De manera comercial, hay plásmidos que contienen genes reporteros, como el plásmido pEGFP-N1, que tiene el gen que codifica una variante silvestre de la proteína verde fluorescente, lo que permite la localización de dicha proteína *in vivo* e *in vitro* y puede utilizarse como un marcador para determinar la eficiencia de

transfección de algún vector no viral (o viral) en desarrollo en cualquier línea celular de manera sencilla mediante microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo.

Ensamblaje de nanopartículas a base de quitosán como vectores no virales

La *coacervación compleja* es el método de auto-ensamblaje más utilizado para la formación de nanopartículas, basado en su formación a partir de las interacciones electrostáticas entre moléculas cargadas en solución. Dentro de las ventajas que presenta este método está la obtención de complejos a través de interacciones sencillas que no afectan la funcionalidad de lo que se desea transportar (Olivo-Escalante, 2022). Inicialmente el quitosán reacciona electrostáticamente con los nucleótidos, saturando todas las cargas negativas hasta neutralizar la carga total; posteriormente, se da una condensación de los ácidos nucleicos dentro del polímero formando el poliplex, que provee de protección contra la degradación por endonucleasas y a su vez permite la internalización celular. El proceso de condensación del pDNA es impulsado entrópicamente, por lo que al mezclarse un polímero catiónico y el pDNA forman de manera espontánea poliplexes (Raik et al., 2018) (Figura 3).

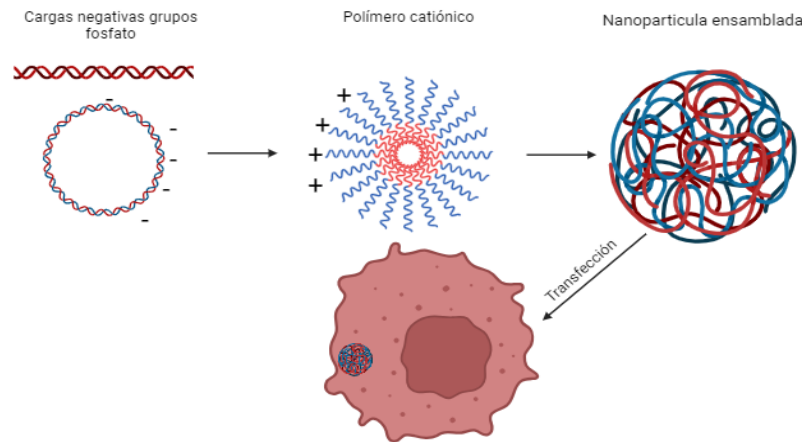


Figura 3. Interacción de cargas para la formación de nanopartículas.

Los coacervados o en este caso, los poliplexes, son formados con cargas opuestas entre sí interaccionando y en algunas ocasiones también pueden intervenir otro tipo de fuerzas como hidrofóbicas, Van der Waals y puentes de hidrógeno que estabilizan los complejos polisacárido – DNA (Köping-Höggård et al., 2004).

Las interacciones electrostáticas se dan según las cargas netas de las moléculas en las condiciones en las que se producen las mezclas, en el caso de la formación de los poliplexes DNA - quitosán, la interacción se da entre los grupos fosfato del DNA que le proporcionan una carga neta negativa con los grupos amino cargados positivamente del

quitosán, que lo convierten en un polielectrolito que se disuelve fácilmente en soluciones ácidas. Estas interacciones de carga generan cambios en la conformación del DNA hasta una forma condensada, inducida por el polielectrolito, así como por las cargas iónicas en el medio de disolución (Köping-Höggård et al., 2004). En función de estas interacciones (concentración de los componentes, condiciones de agitación, etc), se formarán estructuras esféricas (que son las más adecuadas para la endocitosis), o bien, estructuras alargadas o toroidales de diferentes tamaños (Golan et al., 1999).

¿Qué son los péptidos cariofílicos y por qué usarlos en el desarrollo de vectores no virales para terapia génica?

A lo largo de la evolución, las células han desarrollado diferentes mecanismos que protegen al DNA propio y a la célula de DNA exógeno que pueda resultar perjudicial como el de los virus, mientras que a su vez estos patógenos han desarrollado mecanismos de evasión. Es por esto que el conocer este tipo de relaciones entre la evasión y la defensa puede contribuir en el desarrollo de vectores para la entrega de genes terapéuticos. Los péptidos que contienen señales de localización nuclear, o también llamados comúnmente *péptidos cariofílicos*, son secuencias de 5 - 20 aminoácidos, formados principalmente por aminoácidos básicos como la lisina (K) y la arginina (R), derivadas de proteínas nucleares eucariotas y de proteínas virales, las cuales contienen una señal de localización nuclear (NLS) que es reconocida por proteínas receptoras intracelulares específicas (importinas) que interactúan con los poros nucleares y facilitan el ingreso al núcleo (Yao et al., 2013).

Los sistemas de transferencia de genes no virales todavía adolecen de una eficiencia de transfección relativamente baja en comparación con los vectores virales, lo que dificulta su amplia aplicación clínica, pues tras el escape del endosoma y la degradación del polímero en el citoplasma, el pDNA es liberado, pero no internalizado al núcleo, por lo que la expresión del material genético terapéutico no se realiza. Los péptidos que contienen una señal de localización nuclear (NLS) pueden unirse al pDNA de modo que se forma un complejo pDNA-NLS, mismo que

puede ser reconocido como un sustrato de importación nuclear (Cartier & Reszka, 2002).

Si bien la incorporación de péptidos con secuencias NLS aprovecha la maquinaria de importación nuclear, el diseño de vectores no virales requiere tener en consideración diferentes factores que influyen en la capacidad de los péptidos cariofílicos para mejorar la entrega de genes terapéuticos, como la secuencia y concentración del péptido, el método de incorporación con el pDNA, y la proporción pDNA:péptido cariofílico:quitosán (Olivo-Escalante, 2022). Estos factores pueden tener un efecto en las características físicas de las nanopartículas, las cuales a su vez definen su eficiencia de transfección. Entre los parámetros más importantes a determinar para predecir esto se encuentran la morfología, el tamaño, el índice de polidispersión (el cual determina qué tan homogéneo es el tamaño de las partículas en suspensión) y la carga de superficie. Las características buscadas para cada uno respectivamente son: forma esférica, tamaño de 100 a 300 nm, índice de polidispersión <0.5 y carga de superficie de entre 10 y 50 mV, ya que se ha reportado que estas características facilitan la internalización de las nanopartículas a la célula, lo cual repercute positivamente en la eficiencia de transfección (Aranda-Barradas et al., 2022).

¿Qué es lo que se ha realizado y qué se ha obtenido?

Bremner et al (2004), reportaron la incorporación covalente de péptidos cariofílicos a determinada secuencia de DNA lineal y pDNA (sin el uso de otro polímero como vector), donde se encontró un incremento en la transfección en comparación con poliplexes a base de polilisina. También se evaluó la capacidad de estos péptidos cariofílicos para compactar al pDNA por interacciones electrostáticas, encontrando que la compactación del pDNA es directamente proporcional al contenido de aminoácidos catiónicos; sin embargo, no es suficiente para lograr una transfección adecuada, aunque no se reportaron datos de morfología o tamaño de los complejos.

Por otro lado, Opanasopit et al. (2009), reportaron el uso de un péptido cariofílico en nanopartículas a base de quitosán, incorporando electrostáticamente

concentraciones crecientes de péptido una vez formado el complejo pDNA-quitosán. Encontraron que a medida que aumenta la concentración de péptido, aumenta la eficiencia de transfección; sin embargo, también se presenta cierta toxicidad celular a mayor concentración de péptido cariofílico.

No sería posible señalar con exactitud la cantidad de un péptido que debe utilizarse, sin embargo, se debe tener en cuenta que el complejo debe presentar las cargas positivas de la lisina y arginina para la interacción con los receptores de transporte, y su neutralización al unirse electrostáticamente al DNA impediría el reconocimiento, además de que, si se desea formar un poliplex por coacervación compleja, también se debe buscar un balance de cargas para formar la nanopartícula. Los péptidos no conjugados al ser introducidos a la célula pueden competir por los sitios de internalización nuclear con los complejos formados, por lo que es muy importante determinar su concentración óptima para asegurar que no exista competencia en los receptores que pueda afectar la transfección (Bremner et al., 2004).

Entonces, por un lado, es más conveniente la incorporación de péptidos mediante interacción electrostática, ya que de este modo se evita la modificación de los ácidos nucleicos dada por el enlace covalente con el péptido. Y, por otro lado, esta interacción electrostática con el pDNA debe ser utilizando la concentración adecuada de cariofílico y que se lleve a cabo previamente a la adición del quitosán, el cual es necesario para que se lleve a cabo completamente la compactación del pDNA y puedan obtenerse nanopartículas con forma y tamaño capaces tanto de proteger adecuadamente al pDNA como de ingresar a la célula de manera más eficiente. De este modo, al saber la concentración adecuada de péptido cariofílico, y al no quedar expuesto gracias a la interacción posterior con el quitosán, podría aminorarse el efecto citotóxico reportado al aumentar la concentración de péptido cariofílico utilizado.

Con base en esto, se evaluaron las características y funcionalidad de nanopartículas a base de quitosán de bajo peso molecular, a las que se les incorporaron electrostáticamente péptidos cariofílicos de diferentes secuencias y tamaños mediante interacción electrostática con el pDNA, con el fin de evaluar el efecto de estos péptidos, su secuencia y longitud, en las características físicas y funcionalidad biológica de estas nanopartículas a base de quitosán y pDNA como vectores no virales para terapia génica.

En primer lugar, se determinaron las concentraciones óptimas de los péptidos cariofílicos a utilizar (Péptido 1 (P1): CGGGPKKKRKVED; Péptido 2 (P2): PAAKRVKLD) con el plásmido pEGFP-N1. Esto se realizó mediante ensayos de retardo, los cuales se basaron en una electroforesis en gel de agarosa donde se analizó, con base en parámetros conocidos (Hernandez-Baltazar et al., 2012), qué tanto se retrasa la migración del pDNA a una concentración constante (64 nM) en función de la concentración de péptido. Posteriormente, se determinó la concentración óptima de quitosán a utilizar con los complejos pDNA/cariofílico mediante ensayos de retención. En estos ensayos, los complejos pDNA/cariofílico se sometieron a interacción electrostática con concentraciones crecientes de quitosán, y de igual forma, mediante una electroforesis, se determinó su concentración óptima, la cual corresponde a la primera que es capaz de generar la ausencia de migración electroforética del pDNA (Aranda-Barradas et al., 2022). Una vez definidas las concentraciones y relaciones molares óptimas pDNA:péptido cariofílico:quitosán, se ensamblaron nanopartículas por coacervación compleja, y se realizó su caracterización física y la evaluación de su funcionalidad biológica mediante ensayos de transfección *in vitro*, utilizando la línea celular HeLa, de cáncer cervicouterino (Figura 4).

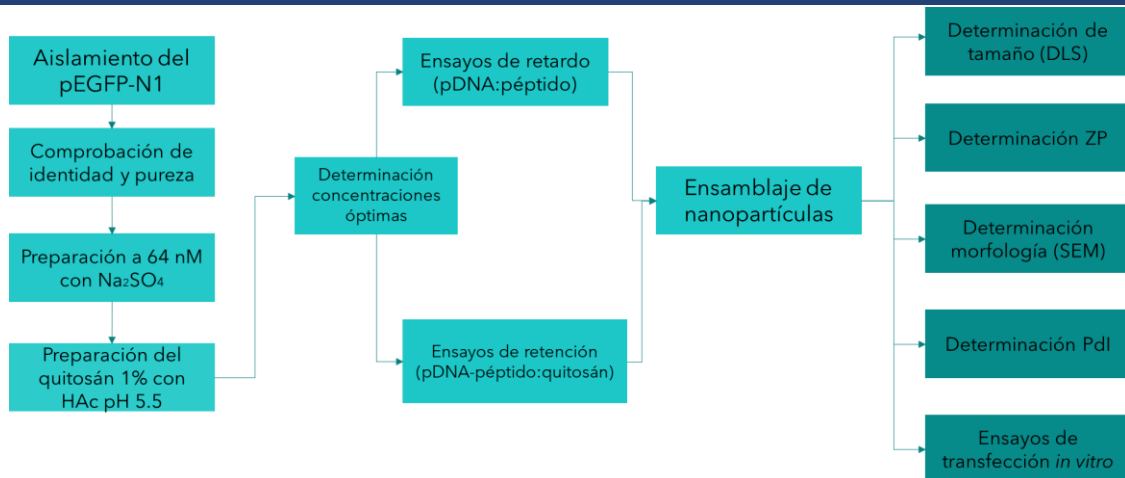


Figura 4. Metodología general utilizada. HAC: ácido acético; DLS: Dispersión dinámica de luz; ZP: Potencial zeta (determinado por movilidad electroforética acoplada a láser Doppler); SEM: Microscopía Electrónica de Barrido; Pdl: Índice de polidispersión (determinado por DLS).

Se encontró que las características físicas (tamaño, potencial zeta e índice de polidispersión) de las nanopartículas ensambladas con el péptido 2 se mantuvieron

constantes o bien, mejoraron en comparación con el control al adicionar dicho péptido, en contraste con lo ocurrido usando el péptido 1 (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización de nanopartículas. Valores obtenidos a partir de las mediciones de tamaño de partícula (nm), potencial Z e índice de polidispersión en cada uno de los grupos de nanopartículas y análisis estadístico prueba T de Student, de color verde se encuentran señalados los grupos que presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$). NPs: nanopartículas

	Tamaño (nm)	P dos colas	ZP (mV)	P dos colas	Pdl	P dos colas
NPs Control	218 ± 18	0.007	19.69 ± 1.3	0.621	0.105 ± 0.038	0.044
NPS P1	300 ± 20		19.64 ± 1.2		0.213 ± 0.03	
NPs Control	218 ± 18	0.837	19.69 ± 1.3	0.192	0.105 ± 0.038	0.0003
NPS P2	221 ± 19		20.76 ± 1.4		0.078 ± 0.018	
NPS P1	300 ± 20	0.008	19.64 ± 1.2	0.234	0.213 ± 0.03	0.049
NPS P2	221 ± 19		20.76 ± 1.4		0.078 ± 0.018	

Se analizó la morfología de las nanopartículas con P1 o con P2 mediante microscopía electrónica de barrido, donde se confirmó que la incorporación de estos péptidos no alteró la forma esférica que se había reportado

previamente de las nanopartículas (Aranda-Barradas et al., 2022), y no se perciben diferencias en este parámetro entre el uso de P1 o P2 (Figura 5).

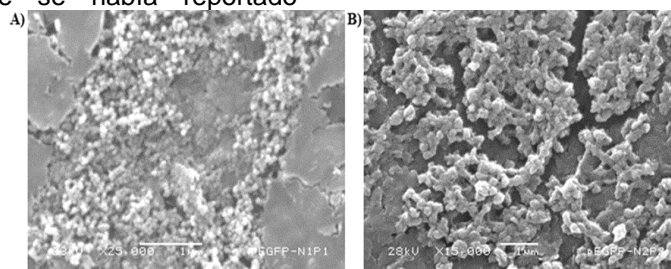


Figura 5. Morfología de las nanopartículas evaluada por Microscopía Electrónica de Barrido. A) Nanopartículas P1; B) Nanopartículas P2. Fotografías obtenidas por: M. en C.: Alicia Del Real López (CFATA-UNAM)

De igual manera, las nanopartículas con P2 mostraron una eficiencia de transfección

cualitativamente mayor en comparación con las nanopartículas control y las que contienen

P1 (Figura 6), lo cual correlaciona con las características fisicoquímicas reportadas.

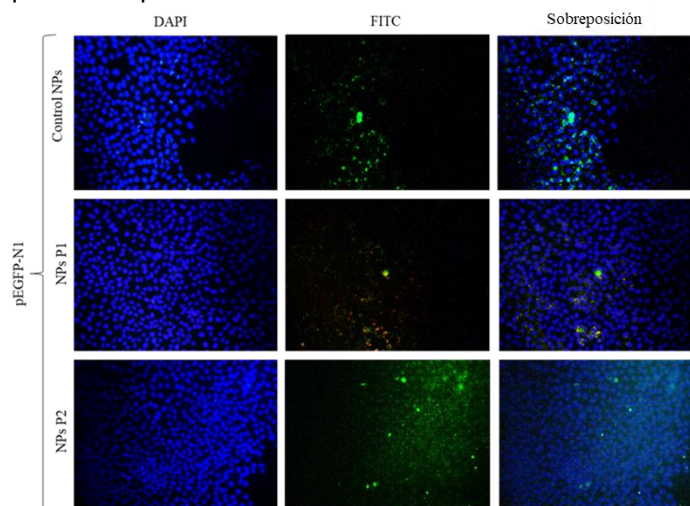


Figura 6. Ensayos de transfección en células HeLa. Tinción DAPI utilizada para los núcleos, se observa en el filtro FITC la presencia de la proteína verde fluorescente propia del plásmido pEGFP – N1. Micrografías de fluorescencia; aumento: 20X. NPs: nanopartículas

Estos resultados demuestran que, si bien los péptidos cariofílicos pueden mejorar las características físicas de los vectores no virales y a su vez favorecer la transfección, las secuencias de aminoácidos son determinantes para obtener buenos resultados, pues a mayor cantidad de residuos con carga neta positiva la condensación del DNA será mejor, y una gran cantidad de aminoácidos con carga neta negativa o neutra, no podrán interactuar con ningún componente del complejo, afectando directamente las propiedades de la nanopartícula final y por lo tanto su transfección (Olivo-Escalante, 2022).

Conclusiones

Teniendo en cuenta que las células no permiten la entrada a cualquier tipo de complejos, aunado a la serie de mecanismos que protegen a la célula de material genético externo y las propias características del vector, el desarrollo de vectores no virales para terapia génica es un trabajo complejo, ya que las características requeridas para que actúen como vectores óptimos son bastante específicas.

Es importante buscar la forma de aprovechar todas las características del quitosán como vector mejorando su capacidad de entregar genes terapéuticos con la adición de péptidos.

Pero es importante considerar que, si bien la adición de péptidos cariofílicos aumenta la eficiencia de la transfección en vectores no virales como el quitosán (como el ejemplo de P2), este aumento también es dependiente de una buena elección de péptido, del uso de la concentración adecuada, del método de acoplamiento y de las propiedades físicas resultantes de la interacción péptido – DNA - quitosán.

Referencias

- Aranda-Barradas, M. E., Trejo-López, S. E., Real, A. Del, Álvarez-Almazán, S., Méndez-Albores, A., García-Tovar, C. G., González-Díaz, F. R., & Miranda-Castro, S. P. (2022). Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical, morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100228>
- Bremner, K. H., Seymour, L. W., Logan, A., & Read, M. L. (2004). Factors Influencing the Ability of Nuclear Localization Sequence Peptides to Enhance Nonviral Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 15(1), 152–161. <https://doi.org/10.1021/bc034140k>
- Cartier, R., & Reszka, R. (2002). Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer

systems. *Gene Therapy*, 9, 157–167.
<https://doi.org/10.1038/sj/gt/3301635>

Golan, R., Pietrasanta, L. I., Hsieh, W., & Hansma, H. G. (1999). DNA toroids: Stages in condensation. *Biochemistry*, 38(42), 14069–14076. <https://doi.org/10.1021/bi990901o>

Hernandez-Baltazar, D., Martinez-Fong, D., & Trudeau, L. E. (2012). Optimizing NTS-Polyplex as a Tool for Gene Transfer to Cultured Dopamine Neurons. *PLoS ONE*, 7(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051341>

Holzerny, P., Ajdini, B., Heusermann, W., Bruno, K., Schuleit, M., Meinel, L., & Keller, M. (2012). Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: Profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 297–304.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.023>

Islam, N., Dmour, I., & Taha, M. O. (2019). Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. In *Heliyon* (Vol. 5, Issue 5). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01684>

Katas, H., Nik Dzulkefli, N. N. S., & Sahudin, S. (2012). Synthesis of a new potential conjugated TAT-peptide-chitosan nanoparticles carrier via disulphide linkage. *Journal of Nanomaterials*, 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/134607>

Köping-Höggård, M., Vårum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. E., Stokke, B. T., & Artursson, P. (2004). Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Therapy*, 11(19), 1441–1452.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302312>

Liu, W. G., & De Yao, K. (2002). C hitosan and its derivatives-a promising non-viral vector for gene transfection. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 83).
www.elsevier.com/locate/jconrel

Ma, C. C., Wang, Z. L., Xu, T., He, Z. Y., & Wei, Y. Q. (2020). The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. In *Biotechnology Advances* (Vol. 40). Elsevier

Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107502>

Oliveira, A. V., Rosa da Costa, A. M., & Silva, G. A. (2017). Non-viral strategies for ocular gene delivery. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 77, pp. 1275–1289). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.068>

Olivo-Escalante, K. D. (2022). *Evaluación del efecto de dos péptidos cariográficos en el ensamblaje y funcionalidad de nanopartículas para terapia génica a base de quitosán utilizando el plásmido pEGFP-N1*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

Opanasopit, P., Rojanarata, T., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., & Ruktanonchai, U. (2009). Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1–2), 291–295.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.029>

Patil, S., Gao, Y. G., Lin, X., Li, Y., Dang, K., Tian, Y., Zhang, W. J., Jiang, S. F., Qadir, A., & Qian, A. R. (2019). The development of functional non-viral vectors for gene delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215491>

Pellis, A., Guebitz, G. M., & Nyanhongo, G. S. (2022). Chitosan: Sources, Processing and Modification Techniques. In *Gels* (Vol. 8, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/gels8070393>

Perez Ruiz de Garibay, A. (2016). Endozytose in der Gentherapie mit nichtviralen Vektoren. In *Wiener Medizinische Wochenschrift* (Vol. 166, Issues 7–8, pp. 227–235). Springer-Verlag Wien.
<https://doi.org/10.1007/s10354-016-0450-5>

Raik, S. V., Andranovitš, S., Petrova, V. A., Xu, Y., Ka-Wing Lam, J., Morris, G. A., Brodskaja, A. V., Casettari, L., Kritchenkov, A. S., & Skorik, Y. A. (2018). Comparative Study of Diethylaminoethyl-Chitosan and Methylglycol-Chitosan as Potential Non-Viral Vectors for Gene Therapy. *Polymers*, 10, 0.
<https://doi.org/10.3390/polym10040000>

Artículos

Santos-Carballal, B., Fernández, E. F., & Goycoolea, F. M. (2018). Chitosan in non-viral gene delivery: Role of structure, characterization methods, and insights in cancer and rare diseases therapies. *Polymers*, *10*(4), 1–51.

<https://doi.org/10.3390/polym10040444>

Saukkonen, K., & Hemminki, A. (2004). Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. In *Expert Opinion on Biological Therapy* (Vol. 4, Issue 5, pp. 683–696).

<https://doi.org/10.1517/14712598.4.5.683>

Soliman, O. Y., Alameh, M. G., De Cresenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2020). Efficiency of Chitosan/Hyaluronan-Based mRNA Delivery Systems In Vitro: Influence of Composition and Structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *109*(4).

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.12.020>

Yao, J., Fan, Y., Li, Y., & Huang, L. (2013). Strategies on the nuclear-targeted delivery of genes. In *Journal of Drug Targeting* (Vol. 21, Issue 10, pp. 926–939).

<https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.830310>

Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy.

Nature Reviews Genetics, *15*(8), 541–555.

<https://doi.org/10.1038/nrg3763>