

Abstract

The development and improvement of non-viral vectors on genetic engineering has been the subject of study of many researchers due to its advantages as compared to its viral counterparts.

Among the numerous studied non-viral vectors, hydroxyapatite particles (HAP) have been traditionally used for genetic transfection assays due to its strong interactions with nucleic acids, low cost, low toxicity, high biocompatibility and ease of fabrication.

Amid employed vector synthesis techniques, chemical co-precipitation is most popular. It consists of apatite crystal formation as a consequence of precipitation reactions brought upon by addition of a phosphate source to an aqueous calcium solution. DNA adsorption occurs on the surface of the generated apatite material.

However attractive, chemical co-precipitation presents various shortcomings such as poor morphology control, poor particles size control, aggregates formation and DNA exposure. All these characteristics have been pointed out by several authors as some of the factors contributing and leading to low transfection levels.

Within this context, the present study exhibits the successful encapsulation of DNA with HAP nanoparticles produced by a synthesis protocol based on chemical precipitation. The obtained nanocapsules showed a primarily spherical morphology and good dispersion.

Moreover, the protecting effect of HAP capsule material upon DNA integrity was confirmed by endonucleases attack studies as well as genetic material liberation under acidic biomimetic environment.

Finally, the transfection viability of the synthesized nanoparticles was successfully evaluated by means of bacterial transformation under *in-vitro* conditions, thus demonstrating the biotechnological potential as non-viral vectors.

Resumen

El desarrollo y perfeccionamiento de vectores no virales en ingeniería genética es sujeto de estudio por muchos investigadores debido a las ventajas que estos podrían ofrecer respecto a sus contrapartes virales.

De entre los muchos vectores no virales estudiados, las partículas de hidroxiapatita (HAP) han sido utilizadas tradicionalmente en ensayos de transfección génica debido a que las mismas presentan fuertes interacciones con los ácidos nucleicos, bajo costo asociado, baja toxicidad y alta biocompatibilidad ; además de su fácil fabricación. .

Entre las diversas técnicas empleadas en la síntesis de estos vectores, la coprecipitación química es una de las más utilizadas. Este método consiste en la formación de cristales apatíticos mediante la reacción de precipitación que ocurre al adicionarse una fuente de fosfato y otra de calcio, para posteriormente adsorber el ADN en la superficie del material formado.

Sin embargo, aspectos como el difícil control de la morfología, tamaño de las partículas, formación de agregados y la exposición del ADN adherido, han sido señalados por varios autores como algunos de los factores responsables de los bajos niveles de transfección alcanzados con este tipo de vectores.

Bajo este panorama, en el presente estudio se logra encapsular satisfactoriamente el ADN en el interior de partículas de HAP mediante un protocolo de síntesis basado en la precipitación química, generando nanocápsulas de morfología mayoritariamente esférica y con una buena dispersión.

Además, se consigue comprobar el efecto protector que este encapsulamiento tiene sobre el ADN al verse expuesto al ataque de endonucleasas y la posible liberación del material genético bajo condiciones ácidas biomiméticas.

Finalmente, se alcanza evaluar la viabilidad de transfección de las nanopartículas sintetizadas mediante la transformación exitosa de bacterias en condiciones *in vitro*, demostrando su potencial como vector no viral.

Contenido

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
CONTENIDO	4
1 GLOSARIO	7
2 INTRODUCCIÓN	9
2.1 Objetivos del proyecto.....	9
2.2 Alcance del proyecto.....	9
2.3 Vectores no virales.....	10
2.4 Transformación.....	12
2.5 Hidroxiapatita.....	15
2.5.1 Características y propiedades.....	15
2.5.2 Estructura y morfología.....	16
2.5.3 Formación.....	18
2.5.4 Síntesis por precipitación química.....	19
2.5.5 Estabilidad química.....	21
2.5.6 Uso como vector no viral.....	23
3 METODOLOGÍA	29
3.1 Materiales.....	29
3.2 Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita.....	30
3.2.1 Efecto de la concentración de los reactivos.....	30
3.2.2 Efecto de la sonicación.....	31
3.2.3 Efecto del uso de surfactantes.....	31
3.3 Encapsulación de ADN durante la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita.....	33
3.3.1 Fotografías de TEM y SEM.....	35
3.3.2 Espectroscopía FT-IR.....	36
3.3.3 Espectroscopía UV-Vis.....	36
3.4 Caracterización de las nanopartículas de hidroxiapatita sintetizadas.....	37
3.4.1 Morfología.....	37
3.4.2 Composición.....	37
3.4.3 Estabilidad química.....	38
3.5 Determinación <i>in-vitro</i> de la liberación del ADN encapsulado.....	39
3.5.1 Espectroscopía UV-Vis.....	39

3.5.2	Electroforesis	39
3.6	Transfección bacteriana mediante las nanopartículas sintetizadas	40
3.6.1	Transfección y crecimiento bacteriano en placas de Petri con ampicilina como marcador.....	40
3.6.2	Confirmación de la transfección	41
4	RESULTADOS	43
4.1	Síntesis de nanopartículas de HAP	43
4.1.1	Efecto de la concentración de los reactivos.....	43
4.1.2	Efecto de la sonicación del medio.....	45
4.1.3	Efecto del uso de surfactantes	47
4.2	Encapsulación de ADN durante la síntesis de nanopartículas de HAP	49
4.3	Caracterización de las nanopartículas de HAP mediante la evaluación de su morfología, composición y estabilidad química.....	58
4.3.1	Evaluación de la morfología	58
4.3.2	Composición	62
4.3.3	Estabilidad química.....	66
4.4	Determinación <i>in vitro</i> de la liberación del ADN encapsulado.....	66
4.5	Transfección bacteriana	68
5	CONCLUSIONES	73
6	AGRADECIMIENTOS	75
7	BIBLIOGRAFÍA	77
	Bibliografía complementaria.....	80

1 Glosario

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ATR	Reflexión total atenuada.
CAP	Ortofosfato de calcio.
CaP	Partículas de fosfato de calcio.
CHA	Hidroxiapatita carbonatada.
CMC	Concentración micelar crítica.
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
DNAasa	Desoxirribonucleasa.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
EDX	Energía dispersiva de rayos X.
FT-IR	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier.
HAP	Hidroxiapatita.
HAP 500 mM	Partículas de hidroxiapatita obtenidas a partir de reactivos en concentraciones 500 mM en calcio y fosfato.
HAP 50 mM	Partículas de hidroxiapatita obtenidas a partir de reactivos en concentraciones 50 mM en calcio y fosfato.
HAP 5 mM	Partículas de hidroxiapatita obtenidas a partir de reactivos en concentraciones 5 mM en calcio y fosfato.
HAP 0.5 mM	Partículas de hidroxiapatita obtenidas a partir de reactivos en concentraciones 0.5 mM en calcio y fosfato.

HAP-ADN	Partículas de hidroxiapatita con ADN <i>fish sperm</i> de alto peso molecular en su interior.
HAP-pUC19	Partículas de hidroxiapatita con el plásmido pUC19 en su interior.
OPC	Fosfato octacálcico.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SEM	Microscopía de barrido electrónico.
TCP	Fosfato tricálcico.
TEM	Microscopía de transmisión electrónica.
U.A.	Unidades arbitrarias.
UV-Vis	Ultravioleta – visible.

2 Introducción

2.1 Objetivos del proyecto

El proyecto tiene como objetivo general producir un vector no viral basado en hidroxiapatita. Este vector ha de cumplir con la particularidad de transportar el ADN de manera encapsulada.

Para alcanzar el objetivo general, se proponen lo siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita.
- Encapsular moléculas de ADN durante la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita.
- Caracterizar las nanopartículas de hidroxiapatita sintetizadas mediante la evaluación de su morfología, composición y estabilidad química.
- Determinar in-vitro la liberación del ADN encapsulado.
- Evaluar la eficacia de la transformación bacteriana utilizando las nanopartículas sintetizadas.

2.2 Alcance del proyecto

El presente trabajo estudia la aplicación de un protocolo de síntesis basado en el método de coprecipitación química para obtener nanopartículas de hidroxiapatita capaces de encapsular ADN, así como la evaluación del uso de estas partículas como vectores no virales. Los productos obtenidos serán caracterizados y evaluados mediante diversas técnicas como la microscopía electrónica de barrido (observación de estructuras, morfología, dispersión y tamaño de las partículas), la microscopía electrónica de transmisión (observación de estructuras, morfología y dispersión de las partículas), la microscopía óptica (observación del efecto dispersivo del uso de ultrasonido durante la síntesis de las partículas), la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (detección de grupos funcionales, composición de las nanopartículas, detección de ADN encapsulado), la

espectroscopía ultravioleta-visible (detección de ADN encapsulado, ensayos de liberación *in vitro* del ADN), la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (análisis elemental de las partículas), la electroforesis en gel de agarosa (ensayos de liberación *in vitro* de ADN, confirmación de la incorporación del ADN por parte de las bacterias) y la transformación de bacterias competentes (evaluación de la viabilidad del vector).

2.3 Vectores no virales

La terapia génica se presenta actualmente como una herramienta para la cura de algunas enfermedades como el cáncer, sida, enfermedades cardiovasculares, fibrosis quística, deficiencia de adenosin desaminasa, entre otras [13].

Este tipo de terapia consiste en el encapsulamiento o adsorción del gen de interés en un vehículo o vector, la entrada de este a la célula objetivo y la liberación del ADN dentro de la célula para que se lleven a cabo los procesos de transcripción y traducción, que generarán finalmente la proteína de interés [27].

En este campo, es común el uso de dos tipos de vectores para el transporte de ADN exógeno al interior de la célula: los vectores virales y los vectores no virales.

Debido a su importancia, estos vehículos o “carriers” han sido estudiados por varios años, generando así numerosas técnicas enfocadas en mejorar el proceso de la transfección génica.

El vector ideal es definido como aquel que posee alta especificidad celular, mínima respuesta inmune, liberación eficiente del ADN dentro de la célula y alta capacidad de carga de ADN [9]; además de que sea capaz de proteger el ADN hasta que este alcance su objetivo [13].

De los dos tipos de vectores mencionados, los vectores virales como los virus atenuados, los retrovirus y los adenovirus han sido más utilizados que la mayoría de los vectores no virales, debido principalmente a su mayor eficiencia en la expresión génica [9]. Sin embargo, algunos inconvenientes como las respuestas inmunológicas específicas que dificultan la entrega del ADN, la generación de reacciones inflamatorias y la integración no específica en el genoma huésped [9], han hecho que los esfuerzos se enfoquen en la

generación de nuevos vectores no virales que eviten estos problemas.

A pesar de que el uso de vectores no virales evita o limita los inconvenientes asociados al uso de vectores virales, estos a su vez presentan algunos factores claves a ser mejorados como la especificidad por la célula objetivo, la optimización de los mecanismos de entrada del vector en la célula, la eficiencia de liberación del gen y la minimización de la respuesta inmunológica [27]. Por tanto, son diversos los trabajos que se pueden encontrar en la bibliografía en donde se busca mejorar uno o varios de estos aspectos de los vectores no virales, ya sea con el diseño de nuevos vectores o con la modificación de otros ya existentes.

A grandes rasgos, entre los mecanismos no virales de entrega de ADN se pueden mencionar el uso de ADN desnudo, vectores no virales basados en polímeros catiónicos y los vectores no virales basados en lípidos [27].

El uso de técnicas basadas en ADN desnudo presentan menor inmunogenicidad que las basadas en los otros tipos de vectores no virales, lo que las hace una alternativa atractiva. Sin embargo, este tipo de vectores no virales hacen que el ADN sea más propenso al ataque de endonucleasas que provocan su degradación y por tanto, reducen la eficiencia de la expresión del gen de interés en comparación con aquellos mecanismos no virales en los que el material genético se encuentra encapsulado [27]. Algunos ejemplos de este tipo de mecanismos de transfección son el “gene gun”, la electroporación, la inyección jet, el uso de campos magnéticos, el ultrasonido, el “laser beam gene transduction” (LBST), la inyección hidrodinámica, entre otras.

Los polímeros catiónicos y los lípidos catiónicos son los dos tipos de vectores no virales más investigados [13]. En ambos, se aprovechan las interacciones electrostáticas entre el ADN cargado negativamente y la carga permanentemente positiva del vector, generándose complejos denominados poli- ó lipoplejos.

Según Roy *et al.* [24], las nanopartículas de fosfato de calcio o de materiales similares como la hidroxiapatita (HAP), representan una clase única de vectores no virales.

Este tipo de vectores adhiere o encapsula adecuadamente el ADN en nanopartículas que

evitan el ataque de desoxirribonucleasas (DNAasas) y permiten la transferencia del material genético al interior de la célula tanto en condiciones *in vivo* como en condiciones *in vitro* [24].

Adicionalmente, la superficie de estas nanopartículas puede ser sujeta a alteraciones que permitan la adhesión de algunos polímeros, que a su vez pueden ser modificados para mejorar la afinidad por cierto tipo de célula.

2.4 Transformación

La introducción de material genético exógeno al interior de células como bacterias o virus, producido u obtenido por cualquier técnica, es el pilar de las técnicas de ADN recombinante utilizadas en ingeniería genética.

El término transfección es definido como “la asimilación por parte de una célula de ADN aislado o de ADN presente en el ambiente del microorganismo, referida como transformante” [27] y se ha reportado como el primer proceso de intercambio genético descubierto en bacterias [8].

Madigan *et al.* [13] definen transformación como “el proceso mediante el cual ADN libre es incorporado en una célula receptora, provocando en esta un cambio genético”.

El término “transformación” es comúnmente confundido con el de “transfección” debido a que originalmente este último era utilizado para hacer alusión a la inclusión de ácidos nucleicos virales tanto a células eucariotas como a bacterias. Posteriormente el término “transfección” quedó limitado a la introducción de ADN en células de mamífero, incluso cuando no hay ninguna clase de ácido nucleico viral involucrado [13].

A parte de la transducción y de la conjugación, la transformación es uno de los mecanismos de intercambio genético en células procariontas. En este proceso, el ADN por incorporarse enfrenta tres posibles escenarios: i) degradación por parte de enzimas de restricción, ii) auto-replicación (sólo si posee origen de replicación) y iii) recombinación con el cromosoma huésped [13].

Esta transferencia génica es un fenómeno natural en una variedad de géneros bacterianos como *Camoylobacter*, *Neisseria* y *Streptomyces*, entre otros [27]. No obstante, algunas familias de bacterias que naturalmente no son transformables, pueden ser inducidas a incorporar ADN exógeno a su interior mediante técnicas como el tratamiento químico o la electroporación.

En este sentido, la bacteria *Escherichia coli*, que naturalmente no es capaz de sufrir alguna transformación, puede ser sujeta a alguna de estas técnicas con el fin de debilitar su membrana celular, haciendo al organismo propenso al fenómeno de transformación artificial. Esto es importante ya que *E. coli* es uno de los organismos más estudiados y más utilizados en biotecnología.

A la habilidad de una célula para incorporar ADN exógeno a su interior se le denomina competencia; y es desarrollada sólo bajo ciertas condiciones [8].

El tratamiento con una alta concentración de iones de calcio sobre bacterias no competentes y su posterior enfriamiento, provoca un debilitamiento de la membrana celular que permite la eficiente entrada de ADN plasmídico en el organismo y por tanto su transformación. Esta incorporación de ADN se reporta como 1000 veces mayor que la que podría experimentar una célula no competente [13].

El mismo resultado puede ser alcanzado mediante la electroporación, que consiste en la aplicación de un alto voltaje en cortos pulsos sobre las células, alterando la conformación de la membrana y creando huecos por donde el ADN puede pasar [8].

El proceso de integración del ADN transformante consiste primeramente en la unión del ADN sobre la superficie celular mediante proteínas de unión especializadas, seguido de la inclusión del material genético íntegro o parcialmente degradado. Después de la inclusión en el interior de la célula, el ADN se une a proteínas de competencia específicas que lo protegen del ataque de nucleasas hasta alcanzar el cromosoma donde la proteína RecA lo toma e incorpora en el genoma por recombinación genética [13].

En la Figura 2.1 se muestra un esquema representativo del proceso de transformación bacteriana.

En las ensayos de transfección, es común el uso de vectores plásmidos a los cuales les fue incorporado el gen o genes de interés. Estos plásmidos consisten en ADN de doble cadena, relativamente pequeño y de forma circular, que contienen como características importantes, un origen de replicación capaz de ser reconocido por la maquinaria genética del microorganismo a transformar, así como algún gen reportero o “marcador” que indica si la transformación fue exitosa o no.

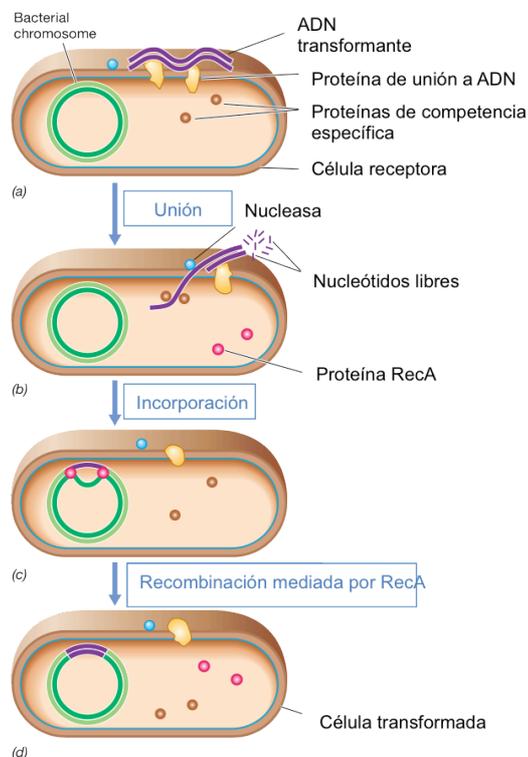


Figura 2.1 Mecanismo de transformación en bacterias gram-positivas: a) Unión del ADN de doble cadena mediante proteínas de unión a ADN, b) Paso de una de las dos cadenas al interior celular mientras la otra es degradada por nucleasas, c) Unión de proteínas específicas a la cadena sencilla y recombinación con zonas homólogas del cromosoma bacteriano por medio de la proteína RecA, d) Célula transformada. (Adaptado de Fig. 10.13 de [13])

La presencia de un gen marcador es importante en los ensayos de transformación ya que sólo una de cada diez mil células incorpora satisfactoriamente el plásmido [8], siendo los marcadores de resistencia a antibióticos muy utilizados. La popularidad de estos se debe a la fácil selección de los microorganismos transformados ya que sólo es necesario colocar la suspensión de células sobre un medio de cultivo que contenga el antibiótico, de manera que sólo sobrevivirán aquellas colonias que hayan incorporado el gen marcador.

Se reporta que la máxima eficiencia de transformación obtenida ha sido de alrededor de un 20 % de la población, mientras que los valores más usuales suelen oscilar entre 0.1 y 1.0 % [13]. Además, se sabe que la mínima concentración de ADN que lleva a la detección de colonias transformantes es de 0.01 ng/mL [13].

2.5 Hidroxiapatita

2.5.1 Características y propiedades

La hidroxiapatita (HAP) es un material cerámico con fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ perteneciente a la familia de las apatitas $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})_2$; los cuales son materiales complejos y diversos en el que hay un interés creciente en su uso como biomateriales [21].

La HAP posee una pK_{PS} (K_{PS} = producto de solubilidad) de 58.65 a 37 °C y es considerada entre los otros tipos de apatitas existentes, la forma más estable de ortofosfato cálcico en rangos de pH de 4.2 a 12.4 [29].

La HAP se encuentra presente de forma natural en los huesos y dientes, confiriéndoles a estos su rigidez característica. Se trata entonces del principal componente del tejido óseo en donde el mineral apatítico se encuentra en forma de cristales laminares muy pequeños y cilíndricos para el caso de la dentina [1] [19] [21] [35].

Características como alta capacidad de unión al tejido óseo, comportamiento osteoconductor, bioabsorción, nulos efectos sobre el organismo humano, biocompatibilidad, alta fuerza de compresión, entre otros, hacen de este biocerámico un buen candidato para aplicaciones en biomedicina como en la fabricación de material de relleno para huesos,

como cobertor en implantes quirúrgicos, en la fabricación de prótesis y como vehículo para aplicaciones médicas y genéticas [1] [19] [21]. También, la HAP ha sido utilizada en campos no relacionados con la medicina como en sensores para gases, en fenómenos de catálisis, como material de soporte para láseres, en remediación de aguas residuales y en cromatografía [26] [35].

La síntesis de HAP se puede hacer mediante diversas técnicas reportadas en la literatura como la precipitación química [5] [35], síntesis de sol-gel [11], síntesis de estado sólido [36], síntesis hidrotérmica [12], síntesis mecano-química [31], entre otras; en donde la metodología empleada ha demostrado afectar considerablemente variables como la morfología del sólido, su superficie específica, la estequiometría del compuesto y su cristalinidad [19].

Es conocido que la HAP es escasamente soluble en disoluciones neutras o alcalinas y forma cristales con una alta energía libre, algo característico en sales poco solubles. Además, presenta bajos valores de disolución/cristalización que pueden ser observados experimentalmente [29].

2.5.2 Estructura y morfología

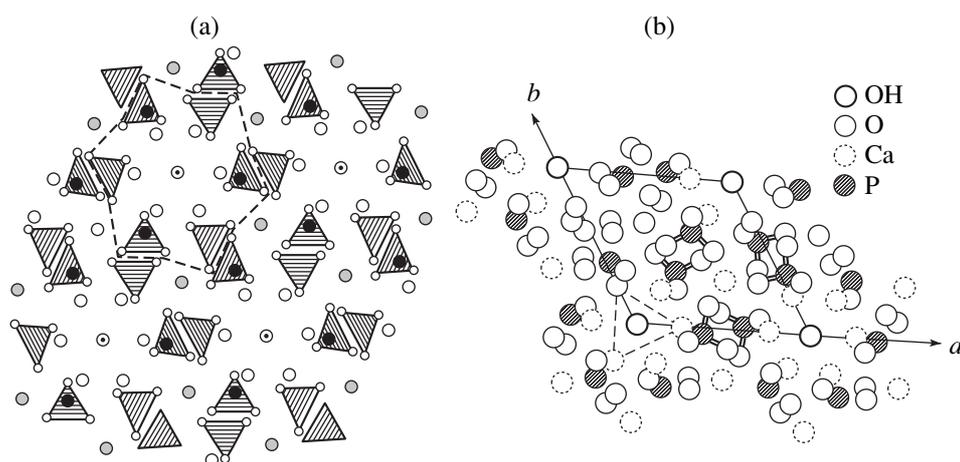


Figura 2.2. (a) Estructura atómica de la HAP y (b) su proyección sobre el eje c. (Tomado de Fig. 1. de [19])

La hidroxiapatita posee una estructura hexagonal con parámetros de celda $a = 0.942$ nm y $c = 0.687$ nm [19]. En la Figura 2.2 se pueden observar la posición de los átomos de calcio en la estructura: 6 átomos por celda unitaria en la posición Ca(II) y 4 átomos para la posición Ca(I). En este último caso, los átomos están localizados en el eje triple y coordinados por nueve oxígenos de los grupos fosfato. Por su parte, los átomos Ca(II) forman triángulos equiláteros.

La HAP sintetizada presenta por lo general un amplio rango de tamaños de partícula y morfologías (ver Figura 2.3), causado parcialmente por la agregación en la etapa de crecimiento y parcialmente por la lenta cristalización, que dificulta evitar el traslape entre las etapas de nucleación y crecimiento [29]. Así, encontrar las condiciones propicias para sintetizar nanopartículas de HAP con tamaños y morfologías reproducibles es todo un reto a nivel de investigación, teniendo en consideración que la morfología de las partículas determina en gran medida el comportamiento de cierto material [22].

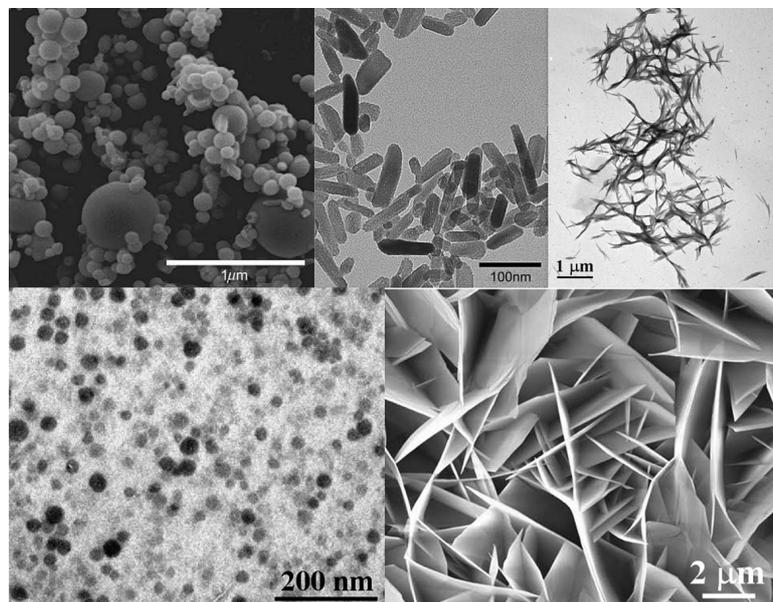


Figura 2.3. Distintas morfologías adoptadas por la HAP. Arriba izquierda: cúmulos compuestos por partículas esféricas; arriba centro: nano-bastones; arriba derecha: agrupación en forma de astillas o filamentos; abajo izquierda: nanopartículas esféricas; abajo derecha: agregado de astillas y platos. (Tomado de Fig. 3. de [29])

El tamaño y la morfología de las partículas de HAP juegan un papel importante según la aplicación deseada para el material. Por ejemplo, se ha reportado que las partículas de HAP en escala nanométrica pueden ser cinéticamente estables en fluidos biológicos [34] y que las geometrías esféricas evitan procesos inflamatorios así como una mejor integración ósea [19].

2.5.3 Formación

Según [29], poco se sabe acerca del proceso de formación de la HAP en el caso de las metodologías que involucran formación por precipitación a bajas sobresaturaciones, aún y cuando se trate de estudiar el mecanismo sin la presencia de aditivos.

Este proceso presenta alta sensibilidad incluso a ligeras variaciones de las condiciones experimentales como lo pueden ser la cantidad y naturaleza de impurezas ó la textura y tipo de material del que está compuesto el recipiente de reacción [29]. Así, varios investigadores enfocan sus esfuerzos al entendimiento del mecanismo químico en la formación del material, tanto a nivel *in vitro* como en condiciones biológicas.

Sin embargo, se sabe que la velocidad de nucleación en la fase menos estable (cuando el límite de sobresaturación es excedido) puede ser predicha por la regla de Ostwald-Lussac's y que el proceso implica primeramente la precipitación de ortofosfato de calcio (CAP), seguido de su transformación en estado sólido a fosfato octocálcico (OPC) que finalmente se convertirá en HAP [29]. A su vez, una segunda fase puede involucrar la formación de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ó fosfato tricálcico (TCP) dependiendo de la relación estequiométrica Ca/P, según la concentración de iones presentes en la disolución [29].

Así mismo se ha reportado que el sistema, en suspensión acuosa y a pH constante, tiene comportamientos en el estado estable durante pequeños intervalos de tiempo, en donde se da una polinucleación superficial descrita en términos de la actividad iónica de la disolución [7]. La velocidad de crecimiento lateral es compensada mediante la formación de iones hidroxilo por disociación de las moléculas de agua atrapadas en los sitios hidroxilos situados por debajo de la capa superficial creciente del cristal [7].

Se ha observado que las partículas que precipitan inicialmente en la fase amorfa poseen forma redondeada con diámetros de 20-30 nm que pueden alcanzar incluso los 120 nm, compuestas a su vez de partículas más pequeñas de aproximadamente 4 nm [29]; en donde el incremento de los tiempos de reposo conlleva la agregación de revestimientos esféricos y la formación de partículas CAP con morfologías tipo aguja de unos 20 nm de longitud [29].

Entre todos los factores que afecta la formación de HAP, la temperatura, la fuerza iónica, el pH, la relación molar Ca/P, la sobresaturación, la concentración y presencia de aditivos se reportan como los más críticos [29].

El pH afecta la precipitación de la HAP al afectar la cantidad de grupos hidroxilos libres y su balance con las especies fosfato (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- y H_3PO_4), en la que por ejemplo, bajos niveles de pH llevan a la protonación de la mayoría de estas especies, desfavoreciendo la formación del material, además de provocar variaciones en la carga superficial de las partículas al alterar la presencia de iones H^+ y OH^- en la interfase hidratada [29].

La relación molar Ca/P afecta la formación de HAP primeramente como resultado de la presencia no equitativa de cationes y aniones, que provoca alteraciones en la velocidad de crecimiento de los cristales, además de que promueve la precipitación de fases específicas e induce la transformación en estado sólido de una fase en particular [29].

Por su parte, la temperatura afecta la velocidad de transformación entre una fase sólida y otra acortando o alargando los tiempos de conversión entre cada una, siendo más rápida la transición entre mayor sea la temperatura de síntesis [29].

2.5.4 Síntesis por precipitación química

Las metodologías basadas en la precipitación química involucran procedimientos de química húmeda en la que se mezclan disoluciones acuosas de compuestos que contienen los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} a pH superior a 7, seguido por una recuperación del precipitado formado.

Entre las disoluciones utilizadas como fuentes de calcio se encuentran el CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$; mientras que en el caso del fosfato las disoluciones más utilizadas suelen ser las de H_3PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Na_3PO_4 y K_3PO_4 . El pH de la disolución es ajustado previamente con gas amonio, NH_4OH o NaOH [19].

El proceso de formación de HAP mediante reacciones de precipitación puede ser dividido en las siguientes etapas: (i) nucleación homogénea, (ii) agregación de partículas CAP amorfas en unidades esféricas, (iii) agregación de esferas en estructuras tipo cadena; (iv) crecimiento de estas estructuras, (v) precipitación secundaria y fase de transformación [29].

En este tipo de técnica de síntesis al igual que en otras, el proceso de cristalización de la HAP se ve influenciado por varios factores como la concentración inicial de las sales, la secuencia de mezclado, la velocidad del mezclado, el pH de la disolución, la temperatura de reacción y el tiempo de reposo.

A manera general, se habla de que el precipitado obtenido en la etapa inicial del proceso difiere en composición con respecto al obtenido posteriormente debido a los factores anteriores, por lo que el control de todos estos parámetros es esencial si se quieren obtener resultados reproducibles [19].

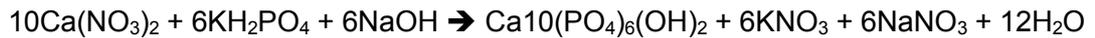
De entre todas las técnicas de precipitación, una de las más utilizadas es la que utiliza $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ como fuente de Ca^{2+} y estos procedimientos, con algunas modificaciones, son lo que más se reportan y patentan en la síntesis de HAP [19].

La reacción en la que generalmente están basados estos procedimientos se describe en la Ecuación 2.1.



Ecuación 2.1

Así mismo, otros autores mencionados por Orlovskii *et al.* [19] recomiendan la reacción:



Ecuación 2.2

Posterior a un crecimiento gradual de los cristales, el precipitado de HAP obtenido es recogido sobre un papel de filtro, lavado con agua y etanol, y finalmente secado a 40-50 °C.

2.5.5 Estabilidad química

En condiciones *in vivo*, la formación de minerales de hidroxiapatita (principalmente carbonatada) en la generación de huesos es llevada a cabo por los osteoblastos, mientras que la reabsorción de estos materiales se da por la acción de los osteoclastos. Éste último fenómeno es importante ya que permite la disolución del cerámico para así evitar la deposición cálcica en sistemas vasculares.

La acumulación de estos minerales en el organismo puede llevar a complicaciones clínicas como estenosis o regurgitación de las aortas y las válvulas mitrales, así como la oclusión coronaria y de vasos periféricos [9].

A pesar de que la fase mineral de HAP ha sido bastante estudiada y caracterizada, existe todavía poco entendimiento acerca de los factores que afectan las propiedades de disolución del material; de manera que la imitación de mecanismos mediante los cuales los osteoclastos disuelven la HAP pueden llevar a un mejor entendimiento del proceso en general, así como de los factores gobernantes.

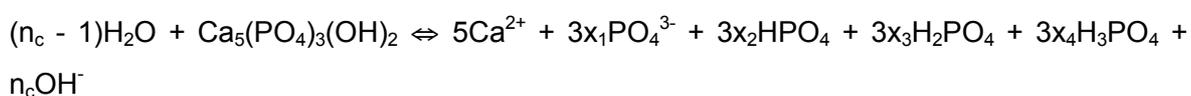
Se sabe que el mecanismo de acción aplicado por los osteoclastos para la disolución de partículas de HAP carbonatadas (CHA) se basa en la excreción de iones H^+ mediante el uso de una bomba de protones regulada por ATP [9]. Así, los iones hidronio liberados proveen una acidificación localizada que lleva a la disolución de la HAP.

Entre los factores encontrados en la literatura que afectan el proceso de disolución de la HAP se pueden mencionar: la concentración de iones hidronio, osmolalidad, temperatura, área superficial, agitación, relación Ca/P, inclusión de impurezas, entre otros.

Algunas sustituciones como $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{Mg}^{2+}$, Sr^{2+} ; $\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{CO}_3^{2-}$ ó $\text{OH}^- \rightarrow \text{Cl}^-$ han reportado un debilitamiento del material y un aumento de su solubilidad [29].

En términos generales, se dice que la HAP es ligeramente soluble en agua o disoluciones acuosas de ácido, en donde valores por debajo de pH 4 han demostrado incrementar considerablemente la velocidad de disolución del material [30].

Según Wang [30], la reacción general de disolución de HAP en agua puede ser descrita como un equilibrio de HAP, Ca^{2+} , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , H_3PO_4 e iones OH^- :

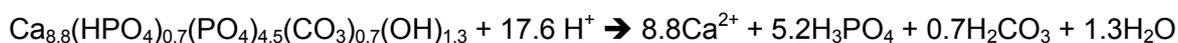


Ecuación 2.3

donde n_c = número de moles de protones consumidos al disolver 1 mol de HAP; x_i ($i = 1-4$) = fracciones molares de las diferentes formas de fosfato presentes en la disolución.

En el caso de la CHA, se dice que la velocidad de disolución del material es altamente dependiente del pH de la disolución en la que es disuelta [9].

La disolución se da por la protonación de los grupos carbonato y fosfato para formar ácido carbónico y ácido fosfórico, respectivamente. La ecuación que describe este proceso se describe en la Ecuación 2.4.



Ecuación 2.4

En cuanto a la cinética de degradación de la HAP, se conoce además que el proceso es controlado principalmente por difusión, en donde la superficie del material juega un importante papel en la cinética de degradación [30]. La velocidad de la reacción a pH constante se dice que es más rápida inicialmente para luego declinar continuamente hasta

un nivel bastante bajo, que es aún más bajo que la velocidad basada en una cinética de primer orden [30].

Además, se reporta que el orden de reacción varía con el tiempo de disolución y el grado de saturación pasando de valores de 5 o más a 1 [30].

De esta forma, se han planteado distintos modelos matemáticos que expliquen la cinética de degradación (primer, segundo, tercer orden, entre otros) ajustándose a los valores experimentales durante varios periodos de tiempo, sin embargo, ninguno de ellos ha logrado ajustarse a todos los datos en cada caso y bajo todas las condiciones [30].

2.5.6 Uso como vector no viral

Entre la diversidad de vectores no virales utilizados en ingeniería genética, la coprecipitación de ADN con fosfato de calcio (CaP) es comúnmente utilizada en los laboratorios para transfecciones *in vitro*.

Diversos estudios sobre este cerámico han sido realizados debido al atractivo uso de estas partículas como vectores no virales, a pesar de que presenten bajas tasas de transfección en comparación con otros medios.

Entre las ventajas que presentan este tipo de vectores se mencionan su fácil y bajo costo de fabricación, fáciles condiciones de almacenamiento, alta biodegradabilidad, solubilidad y baja toxicidad.

Presentan a su vez una mejor estabilidad y robustez que los liposomas comúnmente utilizados, así como una mayor biocompatibilidad al compararse con los polímeros [29].

En la técnica de coprecipitación con CaP, se aprovecha la carga divalente positiva del catión calcio que forma complejos iónicos con los fosfatos de las cadenas de laterales de ADN [24]. El fosfato de calcio forma entonces complejos superficiales con el esqueleto que tienden a estabilizar las cadenas de ácidos nucleicos.

El vector formado pueden viajar a través de la membrana celular por endocitosis mediada por canal iónico [24] u algún otro mecanismo como el mencionado por Motskin *et al.* [16] en su estudio con monocitos humanos. Estos autores proponen que las nanopartículas de HAP son secuestradas mediante un compartimiento especializado llamado SCC (compartimiento conectado a la superficie) que se trata de una paso de membrana similar a un laberinto, conectado directamente al espacio extracelular. Se dice que su formación se da con el fin de remover altas cantidades de material del espacio extracelular, para su posterior degradación, ya que de lo contrario se podría causar daño excesivo a células circundantes o tejidos.

Otros mecanismos conocidos para la absorción de partículas en células son los mediados por fagocitosis, transportadores de fase líquida o por endocitosis mediada por receptores.

En la Figura 2.4 se muestra un esquema en donde se puede apreciar la interacción entre el ADN y la HAP.

Es importante aclarar que la interacción propuesta hace que la secuencia de nucleótidos sea indiferente, siendo la longitud, hibridación y estructura secundaria del ADN, factores de mayor importancia [23].

El fenómeno de afinidad entre el material apatítico y los ácidos nucleicos ha sido estudiado debido a su importancia en diversas ramas.

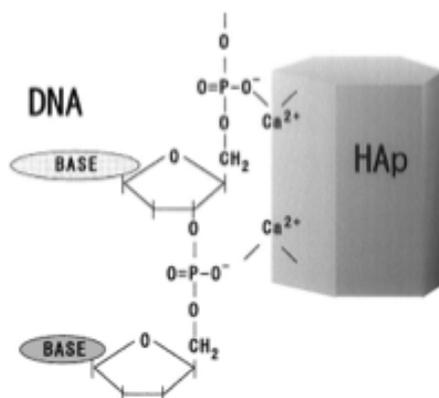


Figura 2.4. Modelo estructural de la interacción entre cristales de HAP y ADN (Tomado de Fig. 8. de [20]).

Así por ejemplo, Brundin *et al.* [1] reportan el fenómeno de afinidad de unión específica entre el ADN y la HAP, en donde encontraron que el decaimiento en el tiempo del ADN es más lento y que además hace que el material genético sea menos susceptible a la degradación por serum y nucleasas, lo que podría explicar el fenómeno de persistencia de ADN encontrado en huesos y dientes en muestras centenarias.

En otro estudio, Okasaki *et al.* [20] demostraron el fenómeno de afinidad entre el ADN y la HAP concluyendo que la interacción entre los mismos es más de tipo superficial, al no haber muestras de cambios en la red cristalina de la hidroxiapatita y tampoco evidencia de la formación de complejos cristalinos.

Teniendo en cuenta la interacción electrostática entre el material cerámico y el ADN, se han propuesto algunas estrategias para la formación de HAP utilizando las moléculas de ADN como molde [4] [20] [23].

En estos casos la formación de la HAP se lleva a cabo sobre la superficie de las moléculas de ADN en donde estas últimas pueden formar micelas disolución acuosa. Así, se aprovecha la interacción electrostática que ocurre entre los segmentos de ADN, cargados negativamente, con el calcio presente en la disolución, de manera que el catión queda adsorbido en la superficie de las micelas. A continuación se adiciona una fuente de fosfato que reaccionará con el calcio adsorbido para formar finalmente la HAP, quedando el ADN en su interior (ver Figura 2.5).

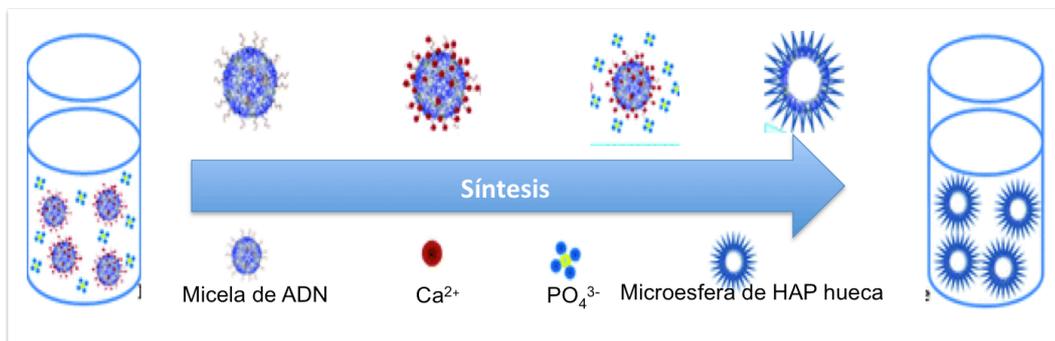


Figura 2.5 Ilustración de la estrategia de síntesis hidrotérmica de microesferas de HAP huecas utilizando ADN como molécula molde (*Adaptado de Scheme 1 de [4]*).

Mediante esta técnica, Chao *et al.* [4] hicieron uso del ADN como molde para la síntesis de micro-esferas huecas mediante el método hidrotermal, en donde, debido a las condiciones de la metodología, el ADN es hidrolizado generando el espacio vacío dentro de las partículas.

En cuanto al uso de este tipo de vectores, se menciona que a pesar de que las partículas de fosfato de calcio han sido ampliamente investigadas para su aplicación en la transfección génica, su aplicación clínica no ha sido popular debido a la baja capacidad de control de la preparación de los complejos CaP-ADN a escala nanométrica y a su baja eficiencia de transfección [33].

Varios investigadores han reportado la síntesis de nanoestructuras de CaP que en la mayoría de los casos han resultado amorfas, siendo difícil el control de su forma y la prevención de aglomeraciones, especialmente en la síntesis de precipitación convencional.

Por otro lado, existen planteamientos como el presentado por Chowdhury *et al.* [6], en donde los investigadores proponen que las apatitas carbonatadas poseen una elevada tasa de transfección al ser utilizadas como vectores no virales, pudiendo contener grandes cantidades de ADN plasmídico y desestabilizando el endosoma, facilitando así la liberación del material genético. Estos autores justifican este aumento de la eficiencia de transfección al pequeño tamaño de las partículas sintetizadas que como se ha demostrado, son fagocitadas con mayor facilidad por parte de la célula que las partículas grandes. Este pequeño tamaño es beneficiado por la presencia de carbonatos en la apatita, que ha demostrado tener un efecto retardante en el crecimiento de los cristales. Además argumentan que la alta disolución de la CHA puede provocar la desestabilización del endosoma y la liberación del ADN al citoplasma ya que la alta acumulación de protones liberados activa un mecanismo de paso de cloruros al endosoma que lo inflaman y lo rompen.

El desarrollo de mecanismos de síntesis que permitan un buen control de la morfología de las partículas como vector es importante para elevar la eficiencia de transfección génica. Debido a esto, Wu *et al.* [33] utilizan el copolímero PLGA-mPEG con el fin de obtener partículas de HAP en forma de bastoncillos uniformes mediante el método hidrotermal, en

donde el ADN puede ser adsorbido posteriormente, demostrando que el vector posee una alta capacidad de carga, buena capacidad de transfección y baja toxicidad.

Aparte del control de la morfología y tamaño, y en vista de que las nano-estructuras de HAP han demostrado ser superiores que otros vectores de transfección génica en términos de inmunogenicidad y toxicidad, se hace importante mejorar la eficiencia de transfección mediante la regulación de otras propiedades como la unión del ADN, el comportamiento de disolución de las fases de HAP, y la encapsulación del ADN.

En este sentido Revilla-López *et al.* [23] han realizado simulaciones de dinámica molecular en donde los resultados indicaron la posibilidad de encapsular ADN-B de doble hélice dentro de nano-poros de HAP sin provocar distorsiones significativas en los apilamientos de las bases nitrogenadas ni en los puentes de hidrógeno entre ambas cadenas. En su estudio, sugieren la formación de cúmulos de HAP en la superficie del ADN molde, en donde las interacciones electrostáticas entre los grupos fosfato del ADN y el Ca^{2+} son esenciales para la formación de complejos iónicos estables, que son el punto de partida para la incorporación de PO_4^{3-} desde el medio de reacción. Esta propuesta de estabilidad estructural del ADN encapsulado es a su vez un aporte importante para el diseño eficiente de algunas terapias biomédicas y para el mejor entendimiento de otros fenómenos descubiertos recientemente, como lo es el mecanismo de captura de partículas de HAP utilizado por células cancerígenas.

Por su parte Roy *et al.* [24] reportaron en 2003 un caso exitoso de encapsulamiento del ADN dentro de HAP mediante el método de microemulsión. En este estudio se comprobó el efecto protector del material apatítico sobre el ADN, haciéndolo menos propenso a su degradación y logrando eficiencias de transfección mayores que el método de coprecipitación en el que el material genético es adsorbido sobre la superficie de las partículas. Además, demostraron la viabilidad del uso de este vector para realizar transfecciones *in vivo* mediante la funcionalización del mismo para su reconocimiento por parte de células hepáticas.

3 Metodología

3.1 Materiales

Los reactivos utilizados en los distintos experimentos incluyeron *fish sperm* DNA de alto peso molecular, desoxirribonucleasa I de páncreas bovino (DNAasa I, > 400 Kunitz units/mg), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), dodecil sulfato de sodio (SDS), fosfato ácido de di-amonio ((NH₄)₂HPO₄), nitrato de calcio tetrahidratado (Ca(NO₃)₂•4H₂O), hidróxido de amonio (NH₄OH), cloruro de sodio (NaCl), ácido clorhídrico (HCl), etanol (CH₃CH₂OH), agua milliQ®, hidroxiapatita comercial (HAP), plásmido de alta copia pUC19.

La DNAasa I y el CTAB fueron proporcionados por Sigma-Aldrich, el SDS por Fluka BioChemika, la HAP comercial por BioRad, las bacterias DH5 α y el plásmido pUC19 por Invitrogen y el resto de los reactivos por Panreac.

Todos los reactivos utilizados en la purificación de ADN fueron proporcionados por QIAGEN.

Todos los reactivos fueron de grado analítico y fueron utilizados sin purificaciones o modificaciones posteriores.

Las imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de los distintos ensayos fueron tomadas mediante un microscopio electrónico Philips TECNAI 10 operado a 80 kV en modo de campo luminoso. Las micrografías fueron tomadas mediante una cámara digital SIS MegaView II.

Para el caso de las imágenes de microscopía de barrido electrónico (SEM) fueron obtenidas mediante un microscopio de haz de iones focalizados (Focused Ion Beam Zeiss Neon40) con doble columna iónica y electrónica, acoplado a una columna GEMINI SEM con filamento de emisión de campo Shottky: 4pA-20nA, 0.1-30kV, resolución 1.1nm a 20kV.

3.2 Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita

La síntesis de nanopartículas de HAP se llevó a cabo valorando el efecto de la concentración de los reactivos, el efecto de la aplicación de ultrasonido en el proceso de formación de la HAP y la adición de surfactantes.

En todos los casos la metodología empleada se trató de una modificación sobre el método de síntesis a bajas temperaturas descrito por Zhang & Lu [35]. El método de síntesis utilizado se presenta a continuación:

- 1) Se prepararon disoluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50, 5 y 0.5 mM en etanol (pH >10 ajustado con NH_4OH concentrado) y de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 50, 5 y 0.5 mM en agua.
- 2) Se adicionaron 3 volúmenes de la disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ por cada 5 volúmenes de la disolución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ de la misma concentración para cada reactivo, de manera que se trabajó con una relación molar Ca/P = 1.67.
- 3) Se agitaron las mezclas resultantes magnéticamente por un periodo de 1 hora a temperatura ambiente.
- 4) Se dejaron las muestras "overnight" a 37 °C.
- 5) Las muestras fueron lavadas con agua milliQ, etanol al 60% v/v y DNAasa I, procurando resuspender el sólido en cada uno de los lavados y separando mediante centrifugación el sobrenadante.
- 6) Las muestras fueron finalmente secadas por liofilización.

3.2.1 Efecto de la concentración de los reactivos.

El efecto de la concentración de los reactivos en la formación de HAP se valoró mediante la observación de fotografías de microscopía de transmisión electrónica (TEM) y de microscopía de barrido electrónico (SEM).

Las imágenes TEM fueron obtenidas a partir de una muestra de 50 μ L del licor madre de la reacción, depositada en una rejilla recubierta con carbono.

Las imágenes SEM se generaron a partir de una muestra del mismo volumen que la anterior, depositada sobre un disco recubierto con carbono tomada también del mismo licor madre.

Las imágenes de las distintas muestras fueron comparadas entre sí para evaluar el efecto de la concentración de los reactivos en la morfología y grado de dispersión de las partículas.

3.2.2 Efecto de la sonicación.

Para comprobar el efecto de la sonicación de las partículas, muestras de HAP 50 y 5 mM fueron sonicadas por un periodo de 30' y 60' mediante el uso de una fuente de ultrasonido BANDELIN electronic UW 2200.

Para ello, la reacción química fue llevada a cabo mediante sonicación del medio de reacción a una potencia del 20% por el periodo de tiempo mencionado. Posteriormente una muestra de 500 μ L fue observada en un microscopio óptico Acioskop 40 con una cámara digital axioCam MRc 5 ZEISS a 400x.

Las imágenes obtenidas fueron comparadas entre sí para determinar los efectos sobre la dispersión y morfología de las partículas.

3.2.3 Efecto del uso de surfactantes.

En los ensayos realizados para comprobar el efecto del uso de surfactantes, se utilizó el surfactante aniónico SDS y el surfactante catiónico CTAB. En ambos casos, se buscó evitar que la concentración de estos compuestos en la mezcla de reacción superase la concentración micelar crítica (CMC) la cual ha sido reportada 1 mM para el CTAB y 8.2 mM para el SDS.

La adición de cada uno de estos surfactantes al medio de reacción se hizo considerando la carga del tensoactivo. De esta forma, el CTAB al tratarse de un compuesto catiónico,

fue agregado previamente a la disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, mientras que el SDS se adicionó previamente a la disolución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Se utilizaron concentraciones de los reactivos de 5 mM y 0.5 mM, manteniendo una relación molar Ca/P = 1.67 en cada caso y trabajando con volúmenes totales de reacción de 8 mL.

En el Cuadro 3.1 se describe el procedimiento empleado tanto para las pruebas del surfactante catiónico como aniónico:

Cuadro 3.1 Procedimiento para la determinación del efecto del uso de los surfactantes SDS y CTAB sobre la formación de nanopartículas de HAP.

SDS*	CTAB*
1) Se pesaron 0.0059 g de SDS.	1) Se pesaron 0.0005 g de CTAB.
2) Se adicionaron 5 mL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 5 mM y se agitó con vortex.	2) Se adicionaron 3 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5 mM y se agitó con vortex.
3) Se adicionaron 3 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5 mM y se agitó con vortex.	3) Se adicionaron 5 mL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 5 mM y se agitó con vortex.
4) Se dejó la mezcla en agitación magnética por 1 hora.	4) Se dejó la mezcla en agitación magnética por 1 hora.
5) Se colocó la muestra en la estufa a 37 °C, durante toda la noche.	5) Se colocó la muestra en la estufa a 37 °C, durante toda la noche.

*Se utilizaron los mismos volúmenes y condiciones para los ensayos con concentraciones de reactivos de 0.5 mM.

Las imágenes TEM fueron obtenidas a partir de una muestra de 50 μL de la suspensión final de la reacción, depositada en una rejilla recubierta con carbono.

3.3 Encapsulación de ADN durante la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita

El ADN utilizado en los ensayos de encapsulación se trató de *fish sperm* DNA de alto peso molecular y del plásmido de alta copia pUC19, con marcador de resistencia a ampicilina. El primero de estos se empleó para la evaluación general del fenómeno de encapsulación del material genético (caracterización de las partículas sintetizadas, viabilidad de encapsulación, desarrollo del protocolo de encapsulación), mientras que el segundo fue utilizado para los ensayos de transfección bacteriana y la determinación de la liberación *in vitro* del ADN encapsulado.

Para la determinación de la encapsulación del ADN dentro de las partículas de HAP formadas, se realizaron ensayos con concentraciones de reactivos 5 mM y 0.5 mM, una relación molar Ca/P de 1.67 y volúmenes totales de reacción de 8 mL.

Para cada una de estas concentraciones se evaluaron a su vez dos cargas de ADN *fish sperm* en relación con la cantidad de calcio adicionado y en todos los casos, el CTAB fue utilizado como surfactante ya que fue el que presentó mejores resultados según ensayos anteriores.

De la misma forma que en el caso del apartado anterior, se evitó que la concentración del surfactante superase la CMC.

La síntesis se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la sección 3.2 pero haciendo interaccionar primeramente la disolución de nitrato de calcio con el ADN (disolución A) y por aparte la disolución de fosfato ácido de di-amonio con el CTAB (disolución B).

Posteriormente se adicionó la disolución A sobre la B y se siguió según el procedimiento comentado.

En el Cuadro 3.2 se muestran las condiciones para cada una de las reacciones efectuadas.

Cuadro 3.2 Características de las reacciones efectuadas en el encapsulamiento de ADN en nanopartículas de HAP.

Muestra	Concentración de los reactivos (mM)	Carga de ADN adicionada (g ADN/mmol Ca^{2+})
A	0.5	0.152
B	0.5	1.440
C	5.0	0.030
D	5.0	0.003

A continuación se describe el procedimiento general empleado para los ensayos de encapsulación:

- 1) Se realizó la reacción instantánea entre el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y el ADN, agitando rápidamente con vortex. Se marcó el recipiente como disolución (1).
- 2) Se realizó la reacción instantánea entre el $(\text{NH}_2)_2\text{HPO}_4$ y el CTAB. Se marcó el recipiente como disolución (2) y se agitó rápidamente con vortex.
- 3) Se adicionó la disolución (1) a la disolución (2) de forma instantánea y se agitó rápidamente con vortex.
- 4) La disolución fue puesta en agitación magnética por espacio de 1 h.
- 5) Se dejó la suspensión toda la noche a 37 °C.
- 6) La muestra fue centrifugada para posteriormente ser lavada con agua MilliQ, etanol al 60% v/v y DNAasa I; en este mismo orden.
- 7) La muestra fue finalmente liofilizada.

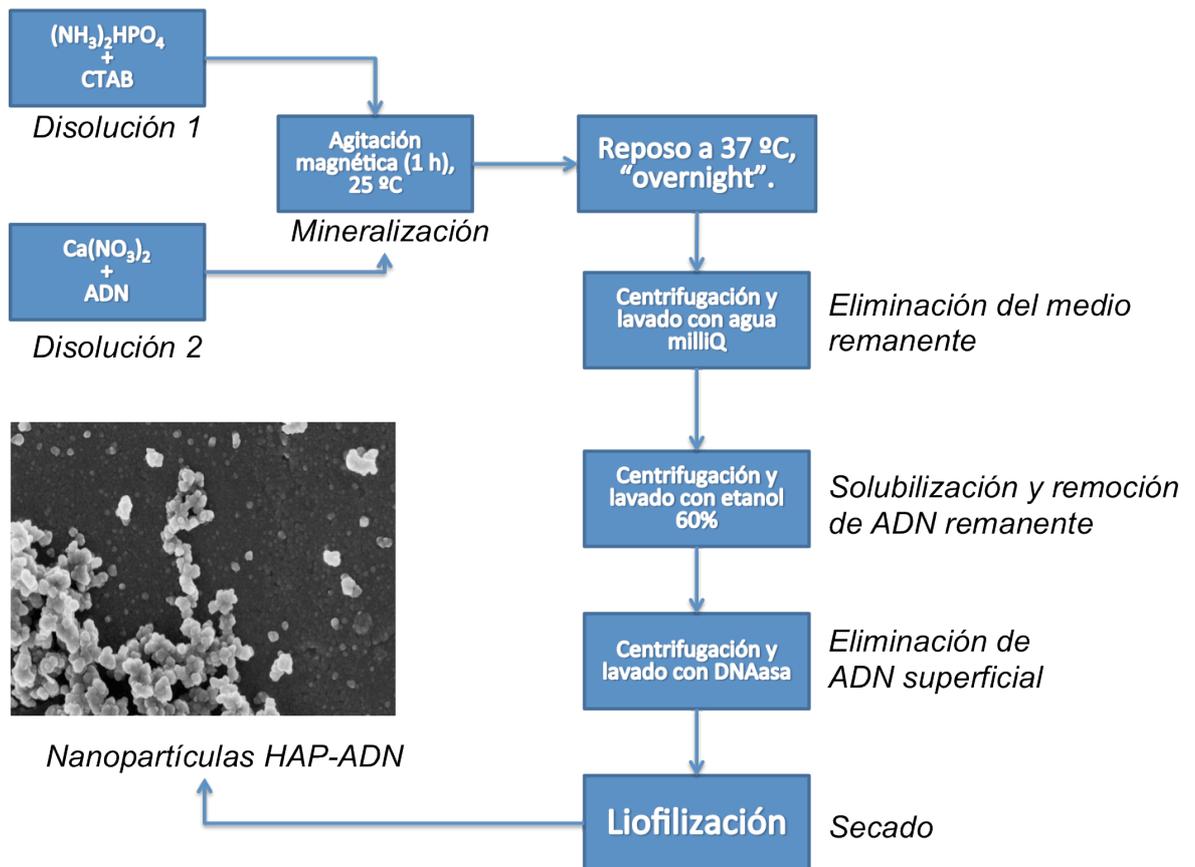


Figura 3.1 Diagrama general del proceso de síntesis de las nanopartículas HAP-ADN.

El mismo procedimiento fue aplicado para el encapsulamiento del plásmido pUC19 (a excepción de la adición de CTAB), en donde se trabajó con concentraciones de reactivos 500 mM en Ca^{2+} y PO_4^{3-} , con una carga de ADN de 1.6 y 8.0 mg.

Un diagrama general del proceso de síntesis es presentado en la Figura 3.1.

3.3.1 Fotografías de TEM y SEM

Se tomaron imágenes TEM de una muestra de 50 μL de la suspensión final de reacción, depositada sobre una rejilla recubierta con carbono.

Además, se obtuvieron imágenes SEM de una suspensión de partículas de 50 μL colocada sobre un soporte recubierto de carbono. La suspensión fue obtenida del licor madre, concluido el proceso de cristalización.

3.3.2 Espectroscopía FT-IR

Se realizaron análisis de espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) a las muestras obtenidas para confirmar la encapsulación del ADN en las nanopartículas de HAP.

En estos análisis, las muestras analizadas fueron lavadas con antelación según el procedimiento descrito anteriormente en esta sección, de forma que se asegura que las señales obtenidas corresponden exclusivamente al ADN encapsulado y no a ADN adsorbido en la superficie de las partículas. Se siguió el mismo protocolo sin la adición de ADN para obtener las nanopartículas de HAP utilizadas como control.

Los espectros de absorción fueron obtenidos a partir de muestras en polvo con un espectrómetro de Transformada de Fourier FTIR 4100 Jasco en el rango de 1800-800 cm^{-1} , acoplado a un sistema Specac de reflexión total atenuada (ATR) modelo MKII Golden Gate equipado con un plato calentado Diamond ATR.

3.3.3 Espectroscopía UV-Vis

Se realizaron mediciones espectrofotométricas UV-Vis a muestras de una suspensión acuosa de 0.5 mg de nanopartículas de HAP-ADN secas en 1 mL de agua milliQ estéril.

Adicionalmente, se adquirieron espectros después de la disolución de las nanopartículas mediante la adición de 100 μL de una disolución ácida 100 mM en HCl y 5 mM en NaCl (300 mOsmol) directamente en la cubeta del aparato.

Las muestras fueron homogenizadas por pipeteo y mantenidas a temperatura ambiente durante 5-10 min antes de ser leídas. Al igual que en la obtención de los espectros FT-IR, las muestras de HAP-ADN fueron lavadas previamente con agua milliQ, etanol al 60% y

digeridas con DNAasa para eliminar el ADN adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas.

Los espectros de absorción UV-Vis fueron tomados mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-3600 UV-Vis-NIR controlado mediante el software UVProbe 2.31 a temperatura ambiente, en un rango de longitud de onda de 200-400 nm, a un ancho de banda de 2nm y con una velocidad de barrido de 600 nm/min.

3.4 Caracterización de las nanopartículas de hidroxiapatita sintetizadas.

3.4.1 Morfología

La evaluación de la morfología de las nanopartículas producidas se realizó mediante la observación de distintas imágenes obtenidas por microscopía de barrido y de transmisión electrónica.

Adicionalmente, se realizó una medición estadística del tamaño de las nanopartículas a partir de fotografías SEM de HAP, haciendo uso del software Origin v. 8.5.0.

Las imágenes TEM fueron obtenidas de una muestra de 50 μ L de la suspensión final de reacción, depositada en una rejilla de recubierta con carbono.

Las imágenes SEM se obtuvieron de muestras de 50 μ L sobre un soporte de silicio previamente limpiado con peróxido de hidrógeno y ácido fluorhídrico. Las muestras fueron tomadas a partir de la suspensión obtenida una vez concluido el proceso de cristalización.

3.4.2 Composición

Los análisis elementales de las nanopartículas producidas se realizaron mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX). Para ello, muestras de 50 μ L de

una suspensión acuosa de las partículas fueron depositadas sobre un soporte de silicio previamente limpiado con peróxido de hidrógeno y ácido fluorhídrico.

El análisis EDX fue llevado a cabo mediante un microscopio de haz de iones focalizados (Focused Ion Beam Zeiss Neon40) con doble columna iónica y electrónica, con detector EDS (INCAPentaFETx3, 30mm², ventana ATW2) para análisis elemental de OXFORD INSTRUMENTS.

Paralelamente por espectroscopía FT-IR, se realizó una comparación cualitativa de los espectros de las nanopartículas producidas respecto al generado para una HAP comercial.

3.4.3 Estabilidad química

La estabilidad química de las partículas producidas se determinó mediante la inmersión de una masa de HAP previamente pesada en una disolución ácida 100 mM en HCl y 50 mM en NaCl, con una osmolalidad de 300 mOsmol. Esta disolución ácida fue utilizada en los ensayos debido a que sus características de osmolalidad y pH han sido descritas como similares a las encontrados en sistemas biológicos capaces de disolver este tipo de materiales cerámicos [9].

En un vaso de precipitados abierto y con agitación magnética constante, muestras de 122 y 100 mg de HAP fueron colocadas en una membrana de diálisis de 1000 Da de porosidad e inmersa en un volumen de disolución ácida que contenía el doble de la cantidad estequiométrica de ácido necesaria para la disolución completa del material. Se tomaron alícuotas de 1mL en distintos intervalos de tiempo a las que posteriormente se les determinó la concentración de Ca²⁺ disuelto mediante el uso de un kit Visocolor® HE Calcium CA 20 de MACHEREY-NAGEL.

3.5 Determinación *in-vitro* de la liberación del ADN encapsulado

3.5.1 Espectroscopía UV-Vis

La liberación del ADN encapsulado en las nanopartículas de HAP se logró mediante la obtención de espectros UV-Vis una vez adicionados 100 μ L de una disolución ácida 100 mM en HCl y 5 mM en NaCl (300 mOsmol) sobre una suspensión de 0.5 mg de nanopartículas de HAP-ADN en 1 mL de agua milliQ estéril.

Las muestras fueron homogenizadas por pipeteo y sus espectros recogidos 5 min después de la adición del ácido mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-3600 UV-Vis-NIR controlado mediante el software UVProbe 2.31 a temperatura ambiente, en un rango de longitud de onda de 200-400 nm, a un ancho de banda de 2nm y con una velocidad de barrido de 600 nm/min.

3.5.2 Electroforesis

Muestras de 5 mg de partículas HAP 500 mM-pUC19 (1.6 y 8.0 mg) lavadas previamente con agua MilliQ, etanol al 60% v/v y DNAasa I, fueron disueltas mediante la adición de 900 μ L de disolución ácida 0.1 M en HCl y 0.5 M en NaCl. Después de la observación de su disolución, se adicionó etanol en una concentración final del 70 % v/v con el fin de precipitar el ADN y se dejaron las mismas en reposo por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y lavadas con 300 μ L de etanol al 70 %, dejando secar el pellet por evaporación y resuspendiendo finalmente en 100 μ L de agua milliQ.

20 μ L de cada muestra fueron depositados en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL de gel) en un buffer de tris-borato-EDTA (TBE) 1X, junto con 5 μ L de buffer de carga. Adicionalmente a manera de control, se cargaron 20 μ L de una suspensión de plásmido pUC19 y 20 μ L de la suspensión de partículas HAP 500 mM-pUC19 (1.6 y 8.0 mg) sin adición de ácido, también con 5 μ L de buffer de carga.

3.6 Transfección bacteriana mediante las nanopartículas sintetizadas

3.6.1 Transfección y crecimiento bacteriano en placas de Petri con ampicilina como marcador

Para evaluar el uso del vector en la transformación de bacterias, se realizó la transfección de bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α con las nanopartículas HAP 500 mM-pUC19 basado en el protocolo “Subcloning Efficiency DH5 α Competent Cells” de Invitrogen.

Para ello, se preparó una suspensión de partículas mediante el pesado de 5.4 mg de HAP 500 mM-pUC19 (1.6 mg) y de HAP 500 mM-pUC19 (8.0 mg), sintetizadas previamente según el protocolo descrito en la sección 3.3. A cada muestra de partículas se le agregaron 250 μ L de agua milliQ y 5 μ L de DNAasa I, dejando digerir por un periodo de 15 minutos. A continuación las muestras fueron centrifugadas y lavadas con 1 mL de agua milliQ para finalmente resuspender las partículas en 100 μ L de agua milliQ.

El procedimiento empleado en los ensayos de transfección se presenta a continuación:

- 1) Se colocaron muestras de 10 μ L de bacterias competentes en tubos eppendorf.
- 2) Se adicionó a cada muestra 20 μ L de una suspensión de partículas HAP 500 mM-pUC19 (54 mg/mL), una muestra para las partículas con carga de plásmido de 1.6 mg y la otra para la de 8.0 mg.
- 3) Se mezclaron las muestras mediante pipeteo y se colocaron en un baño maría a 42 °C por 5 minutos, dejando enfriar 1 minuto a temperatura ambiente cada 2 min.
- 4) Las muestras fueron colocadas en hielo a 4 °C durante 2 minutos y posteriormente se adicionaron 200 μ L de medio de cultivo LB.
- 5) Se dejaron las muestras en agitación a 37 °C por espacio de 1 hora.

6) Finalmente se tomaron de cada muestra 100 μL y se sembraron en placas LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y sin ampicilina, dejándolas en reposo a 37 °C por 24 horas.

El anterior procedimiento fue seguido para los controles del ensayo que consistieron en una muestra de bacterias competentes sin la adición de ningún plásmido o partícula, y en otra muestra de las mismas bacterias a la que le fue adicionada plásmido pUC19.

La determinación del crecimiento bacteriano en las placas sembradas se realizó mediante simple observación de las mismas, 24 horas después, comparando a su vez con los respectivos controles.

3.6.2 Confirmación de la transfección

Con el fin de confirmar la integridad del plásmido y si la transfección realizada fue exitosa, se picaron colonias de bacterias transfectadas y se pusieron a crecer en 10 mL de un medio de cultivo LB con de ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las colonias fueron tomadas de las placas Petri con ampicilina unas vez transcurridas 24 horas desde su siembra. El ensayo se realizó por duplicado.

Las muestras fueron dejadas a 37 °C por espacio de 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se procedió a la purificación del ADN incorporado por las bacterias. Para ello, las muestras fueron centrifugadas y lavadas con 500 μL de agua milliQ.

La purificación se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por QIAGEN®: “QIAprep Spin Miniprep Kit” y que se describe a continuación:

- 1) El pellet de bacterias obtenido anteriormente fue resuspendido en 250 μL de buffer P1.
- 2) Se adicionaron 250 μL de buffer P2 y se agitaron las muestras por inversión del tubo 4-6 veces.
- 3) Se agregaron 350 μL de buffer N3 y se agitó por inversión del tubo 4-6 veces.

- 4) Se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 13 000 rpm en una microcentrífuga.
- 5) El sobrenadante del paso anterior fue adicionado a una columna QIAprep spin column, dejando la permeación del mismo.
- 6) La columna fue centrifugada 60 segundos y posteriormente el filtrado fue descartado.
- 7) La columna fue a continuación lavada con 500 μ L de buffer PB y centrifugada por 60 segundos. Se descartó el filtrado obtenido.
- 8) Se lavó la columna con 700 μ L de buffer PE y se centrifugó por 60 segundos.
- 9) El filtrado fue eliminado y la columna se volvió a centrifugar por 60 segundos.
- 10) El ADN retenido en la columna fue finalmente eluído dos veces mediante la adición de 50 μ L de buffer EB, el reposo de la muestra por 1 minuto, la centrifugación de la columna, y su recolección en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

Una vez purificado el material genético se procedió a realizar una prueba de electroforesis que permitiera la confirmación de la incorporación del plásmido por parte de las bacterias.

En este ensayo, se preparó un gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL de gel) en un buffer de tris-borato-EDTA (TBE) 1X. En el mismo se depositaron 20 μ L de la suspensión de ADN obtenida anteriormente junto con 5 μ L de buffer de carga; los mismo volúmenes de muestra y buffer de carga fueron depositados para el control de pUC19. Las muestras se dejaron correr a través del gel por electroforesis y se evaluó el patrón resultante.

4 Resultados

4.1 Síntesis de nanopartículas de HAP

La síntesis de nanopartículas de HAP se llevó a cabo exitosamente según el procedimiento desarrollado y mostrado en la sección 3.2.

Mediante este protocolo se logró generar partículas con características similares pero con algunas diferencias sobre todo en la dispersión de las mismas y en la formación de agregados.

En términos generales se pudo apreciar que las nanopartículas producidas presentaron una morfología mayoritariamente esférica, que en algunos de los casos se encontraban como partículas independientes o formando agregados.

Se pudo observar también que los agregados de HAP con menor densidad se encontraron compuestos de nanopartículas esféricas, mientras que estas formas se pierden en conglomerados más densos en los que fue más común encontrar partículas apiladas más cristalinas, como bastoncillos o algunas otras formas de tipo filamentosas. Este efecto puede observarse claramente en la Figura 4.1 a).

4.1.1 Efecto de la concentración de los reactivos

En la Figura 4.1 se muestra el efecto de la concentración de los reactivos en la dispersión y morfología de las partículas obtenidas.

En la misma, es posible observar cómo al aumentarse la dilución de las fuentes de calcio y fosfato, se logró una mayor dispersión con predominancia de formas esféricas y con menor formación de agregados.

Además, con este proceso de dilución se lograron partículas esféricas más definidas como las de las imágenes Figura 4.1 e) y Figura 4.1 f), con diámetros que rondan los 17-18 nm.

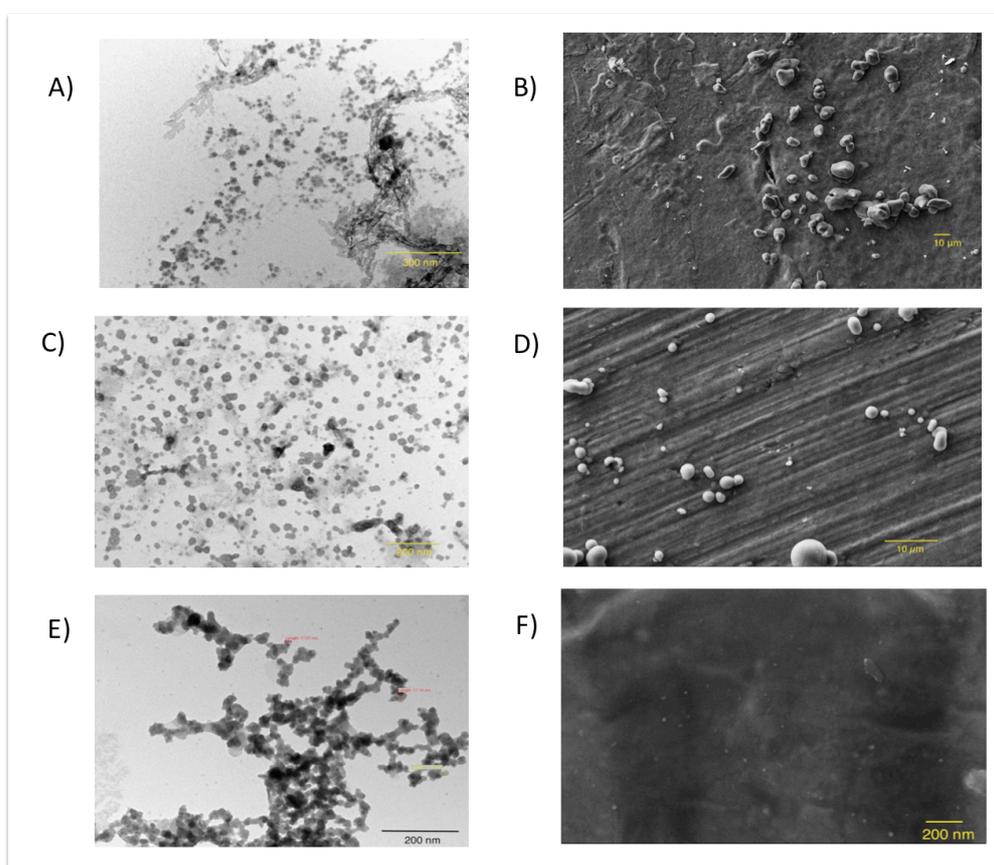


Figura 4.1 Efecto de la concentración de los reactivos sobre la morfología y dispersión de las partículas de HAP producidas: A) Imagen TEM de nanopartículas HAP 50 mM; B) Imagen SEM de nanopartículas HAP 50 mM; C) Imagen TEM de nanopartículas HAP 5 mM; D) Imagen SEM de nanopartículas HAP 5 mM; E) Imagen TEM de nanopartículas HAP 0.5 mM; F) Imagen SEM de nanopartículas HAP 0.5 mM.

En el caso de las muestras HAP 50 mM (Figura 4.1 a y Figura 4.1 b) se observaron conglomerados formados por bastones y astillas, mientras que las partículas más dispersas presentaron una forma más esférica. En esta muestra, la dispersión del material fue bastante pobre y se encontró predominancia de estos conglomerados en cada una de las ventanas analizadas por TEM.

En comparación con el caso anterior, la muestra HAP 5 mM (Figura 4.1 c y Figura 4.1 d) presentó mejoría en cuanto a la dispersión de las partículas, en donde se logró apreciar la presencia de nanoesferas de HAP formando parte de los conglomerados del material, que en este caso resultaron encontrarse en un menor número a lo largo de las ventanas observadas.

La muestra 0.5 mM (Figura 4.1 e y Figura 4.1 f) fue la que presentó la mayor dispersión de partículas. En esta muestra, la aparición de grandes conglomerados fue escasa y los pequeños cúmulos encontrados mostraron estar compuestos también por esferas .

Teniendo en cuenta que las condiciones de temperatura, pH, tiempos de reposo y la relación molar Ca/P para cada una de las muestras fue la misma, el efecto de la dilución de los reactivos en la dispersión y morfología de las partículas se podría explicar mediante la actividad iónica del medio de reacción.

Así, una mayor dilución de los reactivos implicaría una menor actividad iónica de la disolución resultante, lo que conllevaría a que las etapas de agregación finales en el proceso de formación del cerámico sean limitadas y por tanto, habría una predominancia de partículas en etapas iniciales de formación como lo son la nucleación homogénea, la agregación de partículas CAP amorfas en unidades esféricas y la agregación de esferas en estructuras tipo cadena; morfologías y distribuciones que concuerdan con las observaciones de los distintos ensayos.

4.1.2 Efecto de la sonicación del medio

Los ensayos para la evaluación del efecto de la sonicación del medio de reacción en la formación de las partículas de HAP se muestran en la Figura 4.2.

En la misma puede apreciarse como las muestras sonicadas presentan una mayor dispersión con respecto a aquellas no sonicadas y cómo esta dispersión aumenta conforme aumenta también el tiempo de sonicación.

Este efecto se ve más claramente en los ensayos con la muestra HAP 50 mM en la que la mayor cantidad de partículas presentes permiten apreciar mejor el fenómeno de dispersión.

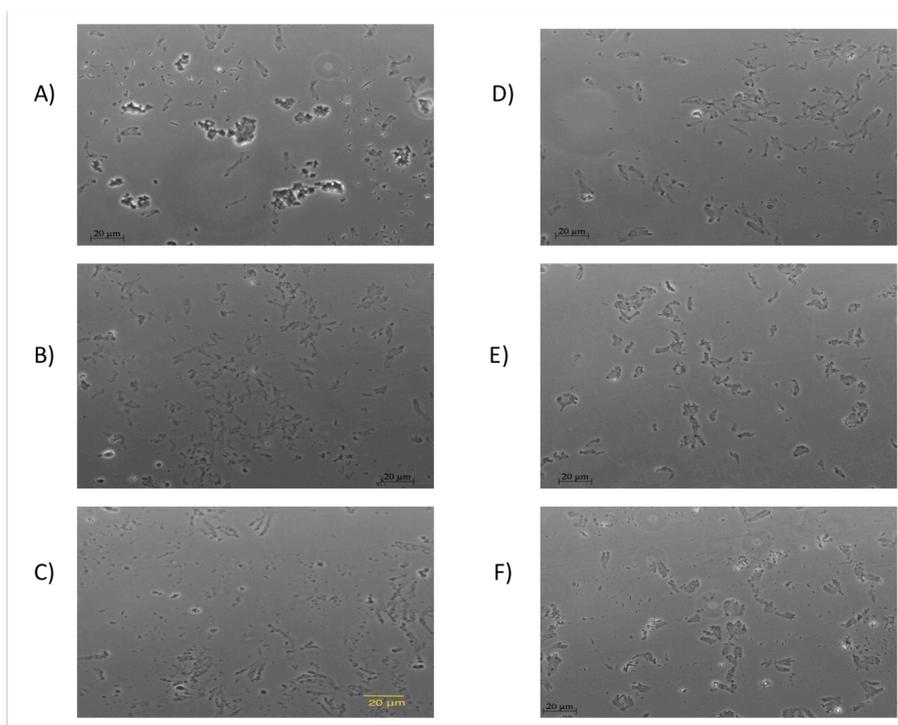


Figura 4.2. Efecto de la sonicación sobre la dispersión de las partículas de HAP producidas: A) Imagen de microscopía óptica de partículas de HAP 50 mM sin sonicación; B) Imagen de microscopía óptica de partículas de HAP 50 mM con 30 minutos de sonicación; C) Imagen de microscopía óptica de partículas de HAP 50 mM con 60 minutos de sonicación; D) Imagen de microscopía óptica de partículas de HAP 5 mM sin sonicación; E) Imagen de microscopía óptica de partículas de HAP 5 mM 30 minutos de sonicación; F) Imagen de microscopía óptica de partículas de HAP 5 mM con 60 minutos de sonicación.

De esta forma y como es de esperarse, la muestra HAP 5 mM sonicada durante 60 minutos fue la que mostró la mayor dispersión al poseer el mayor tiempo de exposición a las ondas sónicas y al tratarse también de la muestra más diluida en estos ensayos.

Es importante mencionar que el efecto de esta sonicación no representó una mejoría sustancial en cuanto a la dispersión de las nanopartículas, lograda contundentemente con la

disminución en la concentración de los reactivos. A su vez, tampoco se logró apreciar un cambio significativo en la morfología de las partículas.

Algunos autores como Rouhani *et al.* [24] han hecho mención del efecto de la sonicación en la generación de partículas más esféricas y pequeñas, al proponer que la radiación ultrasónica afecta la fase cristalina de las mismas; además de ser propuesta como parte de otros procedimientos desarrollados para la síntesis de HAP [14].

No obstante, este efecto no es mencionado como uno de los principales factores en la formación de HAP como sí lo son el pH, fuerza iónica, temperatura, concentración y tipo aditivos, la relación Ca/P y las sobresaturaciones [29], lo que concuerda con las observaciones realizadas.

4.1.3 Efecto del uso de surfactantes

En la Figura 4.3 se muestra el efecto del uso de los surfactantes CTAB y SDS sobre la dispersión de las partículas.

Se puede apreciar como el CTAB (Figura 4.3 c y f) provocó una buena dispersión de las nanopartículas de HAP disminuyendo la formación de conglomerados y generando una mayor cantidad de partículas sueltas de forma esférica; mientras que las muestras a las que se le adicionó SDS como surfactante (Figura 4.3 b y e) tendieron a formar más agregados que las expuestas a la acción del CTAB.

Nuevamente se puede observar el efecto conjunto de la dilución de los reactivos en el proceso de formación de la HAP, en donde la muestra que presenta la mejor dispersión y esfericidad de las partículas resultó ser la más diluida al ser usada en conjunto con el CTAB (ver Figura 4.3 f)

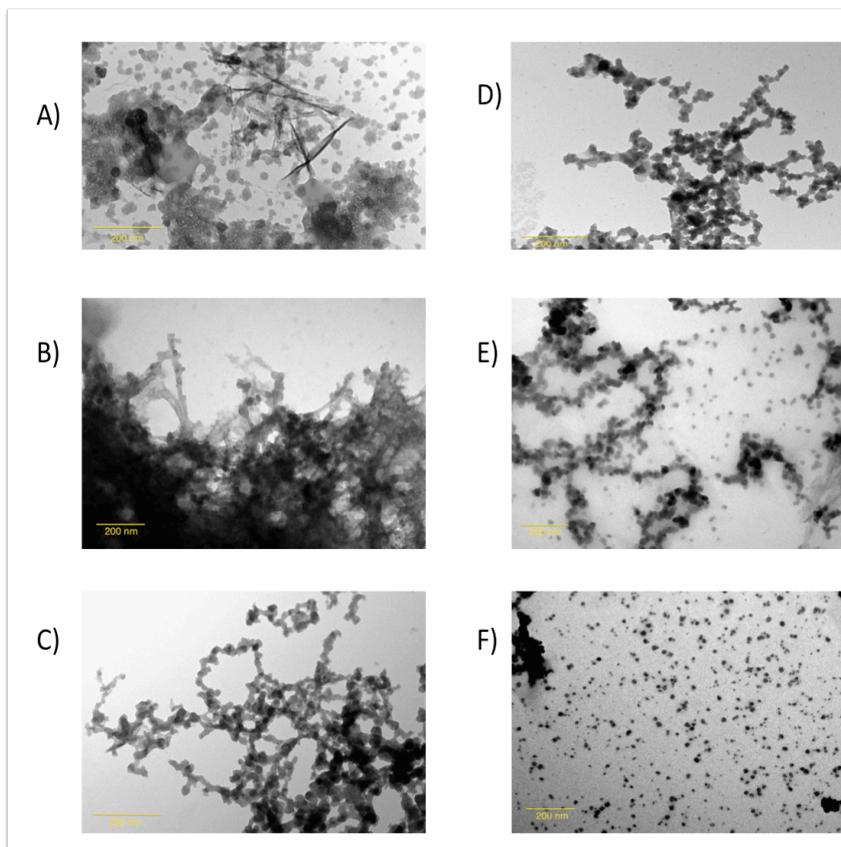


Figura 4.3 Efecto del uso de un surfactante en la síntesis de partículas de HAP vistas por TEM: A) HAP 5 mM sin surfactante; B) HAP 5 mM con SDS como surfactante; C) HAP 5 mM con CTAB como surfactante; D) HAP 0.5 mM sin surfactante; E) HAP 0.5 mM con SDS como surfactante; F) HAP 0.5 mM con CTAB como surfactante.

También, es posible ver la tendencia observada en otros ensayos en donde las zonas que presentan alta densidad de material muestran morfologías de aguja o bastones y como en zonas menos densas se empieza a apreciar la aparición de morfologías de tipo esferas en cadena hasta llegar a visualizar partículas esféricas libres como las vistas en la Figura 4.3 f.

El CTAB al ser adicionado primeramente a la fuente de fosfato y al tratarse de un tensoactivo catiónico, logra interactuar electrostáticamente o por complementariedad estequiométrica con los aniones HPO_4^{2-} , provocando una mejor dispersión y estabilización de los mismos de manera que al adicionarse finalmente los iones Ca^{2+} , se obtienen

partículas de HAP más dispersas y esféricas. Este efecto se logra ver al comparar las muestras con y sin el surfactante.

4.2 Encapsulación de ADN durante la síntesis de nanopartículas de HAP

Los ensayos de encapsulación de ADN durante la síntesis de HAP en distintas proporciones ADN/Ca²⁺ se muestran en la Figura 4.4. En la misma, es posible observar el efecto de la concentración de los reactivos y de la cantidad de ADN adicionado sobre la morfología de las nanopartículas.

En las imágenes de la Figura 4.4 a), se nota una buena dispersión de partículas con formación de algunos conglomerados compuestos principalmente por partículas tipo esferas encadenadas, en las que es posible observar el ADN en su interior. Estas partículas no son completamente esféricas y presentan diámetros variables de entre 18 y 36 nm.

Para estas mismas condiciones de dilución, un aumento de aproximadamente 10 veces en la concentración de ADN mostró afectar la morfología general de la muestra en donde se distingue la formación de cúmulos globulares de 110-240 nm, así como cápsulas de HAP-ADN en disposiciones similares a la muestra anterior (ver la Figura 4.4 b).

En muestras de HAP menos diluidas como las de las imágenes de la Figura 4.4 c) y la Figura 4.4 d), es posible observar la aparición de grandes cantidades de material apilado, en donde se distinguen principalmente cristalizaciones de tipo astilla y algunos cúmulos globulares (Figura 4.4 d, derecha). En estas muestras no fue posible distinguir estructuras capsulares como las vistas en las muestras más diluidas y con una proporción ADN/Ca²⁺ mayor.

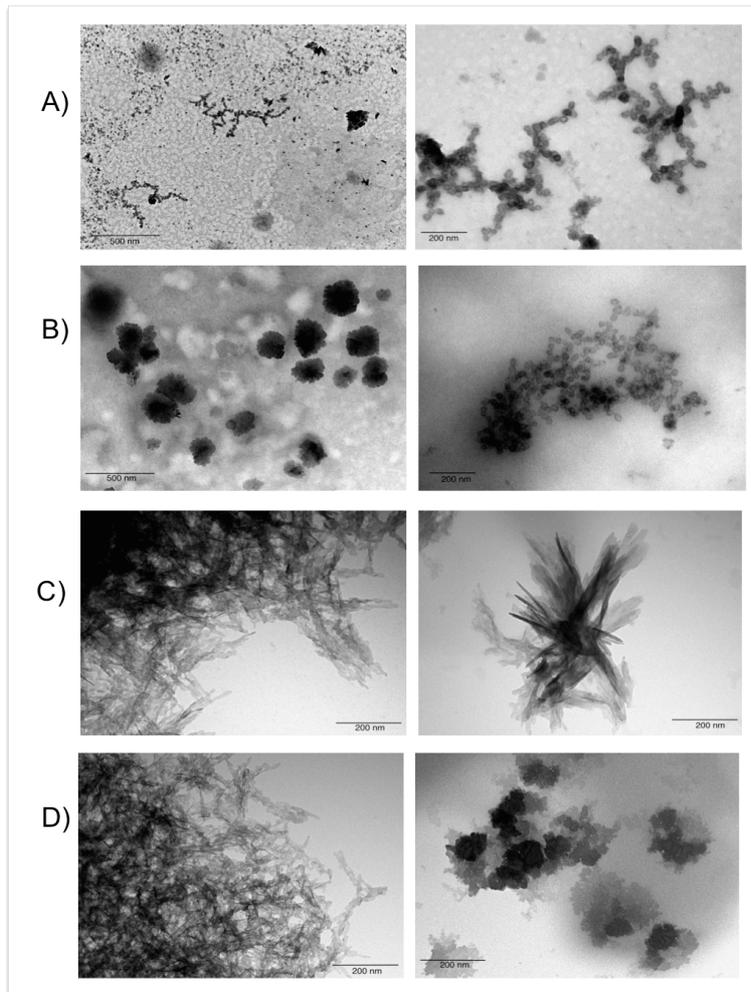


Figura 4.4 Imágenes TEM de ADN encapsulado en nanopartículas de HAP a partir de distintas concentraciones de calcio y fósforo; así como distintas proporciones ADN- Ca^{2+} : A) HAP 0.5 mM–0.152 g ADN/mmol Ca^{2+} ; B) HAP 0.5 mM–1.440 g ADN/mmol Ca^{2+} ; C) HAP 5 mM–0.030 g ADN/mmol Ca^{2+} ; D) HAP 5 mM–0.003 g ADN/mmol Ca^{2+} .

Según las imágenes analizadas para cada condición, el comportamiento de la morfología del material continuó presentando la misma tendencia que en los ensayos de determinación del efecto de la concentración de los reactivos, de forma que a concentraciones más diluidas de reactivos, se mejora la dispersión de las partículas y estas tienden a adquirir una forma más esférica, mientras que las zonas en las que el material tiende a apilarse se generan formas más cristalinas tipo astilla. Por otra parte, es importante tener en cuenta que las

reacciones fueron llevadas a cabo a un pH alto, lo que favorece las morfologías redondeadas.

Las zonas de las muestras en las que fue posible la observación por microscopía TEM del ADN encapsulado correspondieron a aquellas en las que las morfologías fueron más esféricas, tipo nanocápsula, como las mostradas en la Figura 4.5 a. No obstante, no se puede descartar la presencia de ADN en el interior de los cúmulos globulares u otros apilamientos de HAP en donde la alta densidad obstaculiza la observación del material genético.

Además, se puede apreciar cierta tendencia a formar cúmulos de HAP al fijar la concentración y disminuir la cantidad de ADN adicionado (ver Figura 4.4), lo que hace indicar que para obtener nanocápsulas de HAP-ADN, debe haber un equilibrio entre la concentración de los reactivos utilizados y la cantidad de ADN, en donde las moléculas orgánicas ejercerían una acción de molde para que se dé el proceso de nucleación de la HAP en su superficie, afectando de esta forma el proceso de cristalización y finalmente la morfología de las partículas. Además, tampoco se puede descartar la influencia que tiene en el fenómeno de encapsulación, la conformación y el tamaño que presente el ADN utilizado.

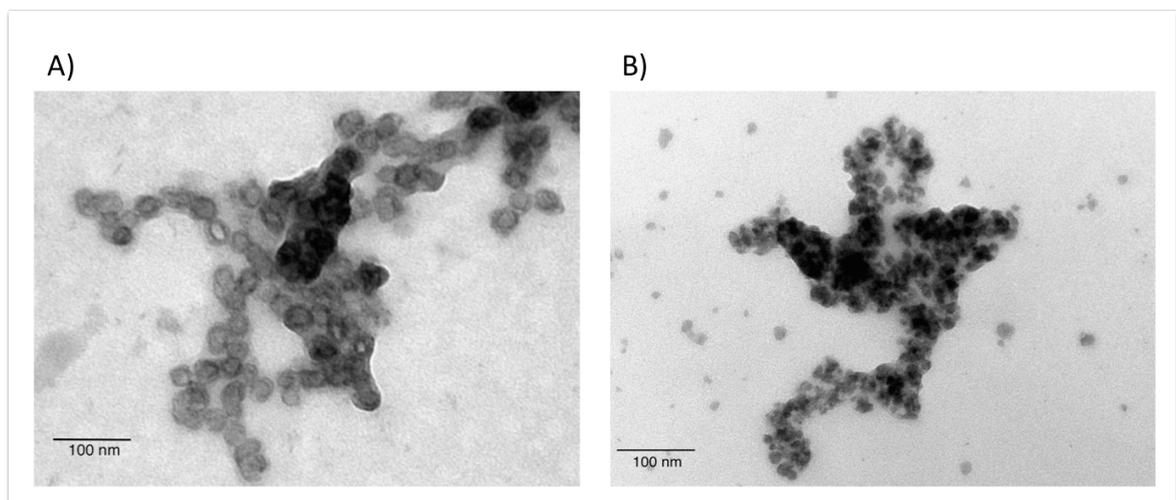


Figura 4.5 Imágenes TEM de nanopartículas de HAP 0.5 mM con CTBA como surfactante: A) HAP 0.5 mM - ADN; B) HAP 0.5 mM.

En el caso de los distintos experimentos, los mejores resultados se obtuvieron al procurarse una relación $\text{ADN}/\text{Ca}^{2+} = 0.152 \text{ g ADN/mmol Ca}^{2+}$.

De esta forma, es posible que las moléculas de ADN formen micelas en disolución y que los iones calcio presentes en el medio de reacción se adsorban sobre la superficie de estas micelas mediante interacciones electrostáticas. La formación de cristales de HAP se daría entonces sobre estas micelas al adicionarse la fuente de fosfato, que reaccionaría con los Ca^{2+} adsorbidos. La Figura 4.5 a muestra nanoesferas huecas, con diámetros aproximados de 20-30 nm, que pueden contener ADN en su interior. Por el contrario, nanoesferas sólidas de un tamaño similar fueron obtenidas bajo las mismas condiciones de experimentación pero sin adición de ADN a ninguna de las disoluciones iniciales (ver La Figura 4.5 b).

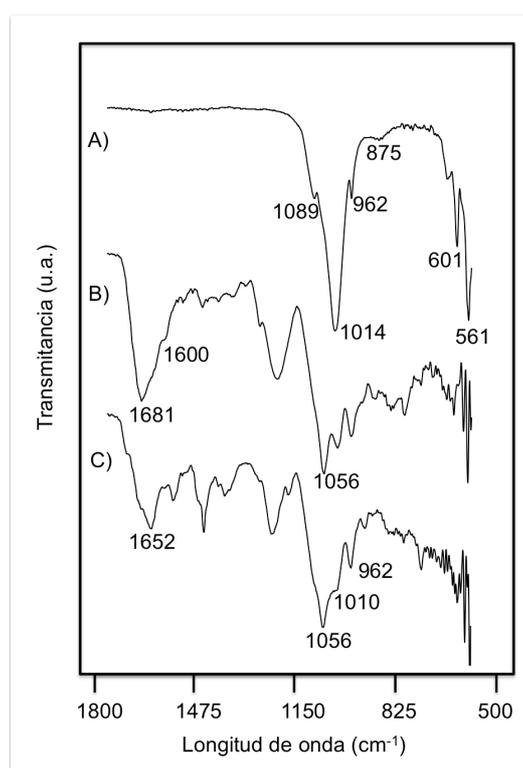


Figura 4.6 Espectroscopía FT-IR de las nanopartículas HAP-DNA producidas: A) HAP comercial, B) DNA, C) HAP 0.5 mM-DNA.

Con el fin de demostrar la incorporación del ADN dentro de las nanopartículas de HAP, se hizo uso de otras técnicas como la espectroscopía FT-IR y UV-Vis (ver Figura 4.6 - Figura 4.9).

En la Figura 4.6 se presenta una imagen comparativa de los espectros IR de las nanopartículas HAP-ADN con respecto a una HAP comercial y al ADN utilizado en los ensayos de encapsulación. En la misma es posible observar algunas señales características de la HAP como lo son las correspondientes a los iones fosfato en 561, 601, 962, 1010 y 1056 cm^{-1} [4] [20] [33], además de una banda clara en 1558 y 1652 cm^{-1} atribuida al estrechamiento de los grupos amida [4] [20] pertenecientes al material genético encapsulado. Igualmente es posible observar otras señales atribuidas a estrechamientos NH y de metilenos en 1480-1300, 1220-1210 y 890-840 cm^{-1} .

Estas nanopartículas de HAP-ADN fueron previamente digeridas con desoxirribonucleasa con el fin de remover cualquier ADN adsorbido sobre la superficie de las partículas, de manera que se puede asegurar que las señales de material orgánico corresponden exclusivamente al localizado en el interior de las capsulas. Así mismo, se puede atribuir la detección y relativa alta intensidad de estas señales al presumible poco grosor de las paredes de HAP.

Para los ensayos de transfección bacteriana y de liberación *in vitro* de ADN se encapsuló el plásmido pUC19 siguiendo el mismo procedimiento de síntesis de las nanocápsulas anteriores, digiriendo también con desoxirribonucleasa las partículas sintetizadas para eliminar el ADN adsorbido superficialmente. En este caso, se trabajó con concentraciones de reactivos 500 mM con el objetivo de generar material manipulable y en una cantidad suficiente para los distintos ensayos.

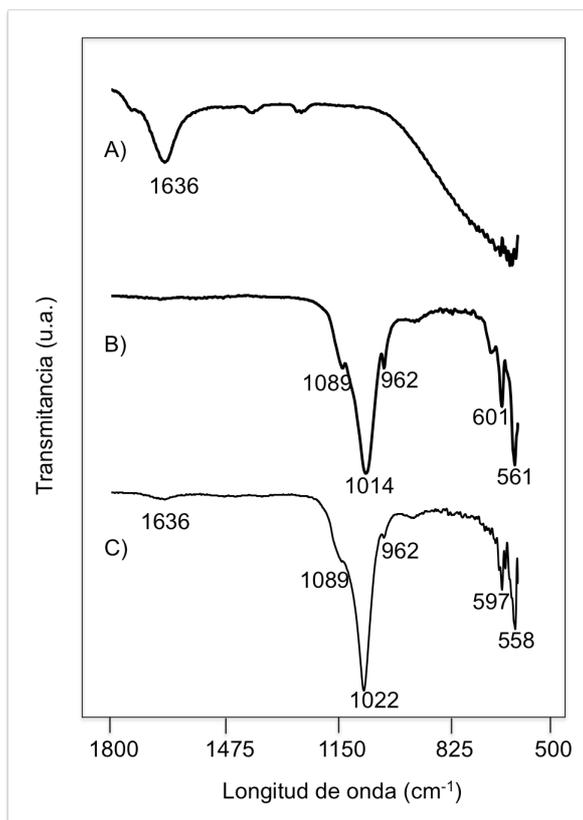


Figura 4.7 Espectroscopía FT-IR de nanopartículas HAP 500 mM-pUC19: A) pUC19, B) HAP comercial, C) HAP-pUC19.

En la Figura 4.7 se muestra el espectro IR de las partículas HAP-pUC19 sintetizadas, en donde se pueden apreciar bandas características de fosfatos de HAP en 558, 597, 962, 1022 y 1089 cm⁻¹, así como una banda en 1636 cm⁻¹ que corresponde exactamente con la banda característica de las amidas del plásmido (Figura 4.7 a); lo que hace prever el encapsulamiento del plásmido dentro de las partículas de HAP.

Vale la pena mencionar en este caso, que el espectro IR obtenido en estas muestras presenta señales más definidas y con un alto grado de correlación respecto a la HAP sin material genético (Figura 4.7 b), lo que se podría deber a la mayor concentración de reactivos utilizados en la síntesis. De esta forma, es de esperarse que las paredes que

recubren el material genético posean un grosor mayor que el previsto para las muestras HAP 0.5 mM-DNA.

A manera de ensayos paralelos que permitieran confirmar el encapsulamiento del ADN, se realizaron pruebas con una disolución ácida 100 mM en HCl y 50 mM en NaCl con el fin de liberar el ADN del interior de las partículas y comprobar el fenómeno mediante el cambio de absorción UV de la banda característica a 260 cm^{-1} .

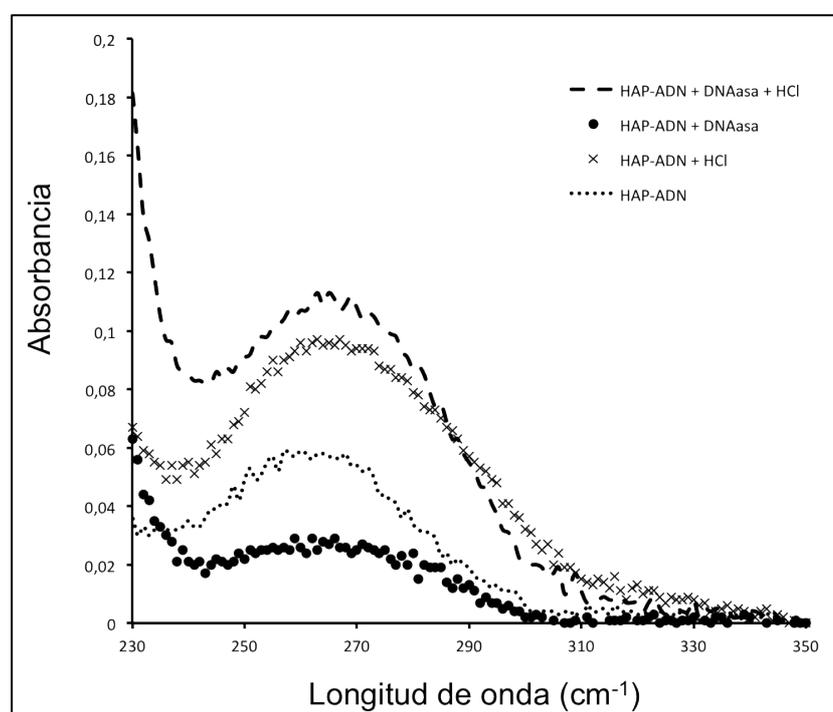


Figura 4.8 Espectrofotometría UV-Vis de distintas muestras de nanopartículas HAP 0.5 mM-ADN antes y después de su tratamiento con HCl 0.1M y con DNAasa.

Como se puede ver en la Figura 4.8, se da un claro aumento de aproximadamente 0.037 unidades de absorbancia al aplicar la disolución ácida sobre las nanopartículas de HAP-ADN sin tratamiento con DNAasa, lo que equivale a un aumento de la concentración de ADN en el medio de $1.85\text{ }\mu\text{g/mL}$. En este caso, la disolución ácida es capaz de disolver la HAP que recubre el material genético mediante una reacción química similar a la descrita en

la Ecuación 2.4, liberando al medio el ADN con el cual ha interactuado durante la síntesis y exponiendo así las bases nitrogenadas responsables del aumento de absorción en esta longitud de onda.

Por otro lado, cuando la disolución ácida fue adicionada a las mismas muestras de HAP-ADN con tratamiento con DNAasa se da un aumento de 0.083 unidades de absorbancia equivalente a 4.17 μg ADN/mL de disolución. En este caso, la digestión con la desoxirribonucleasa degrada el ADN adsorbido sobre la superficie de la HAP provocando una disminución de la absorbancia de 0.03 unidades (1.7 μg ADN/mL) respecto a la muestra sin digerir, como es de esperarse.

Los datos anteriores terminan de confirmar la eliminación efectiva de ADN superficial mediante la digestión con DNAasa, la encapsulación del ADN dentro de las partículas de HAP y la liberación del ADN encapsulado por la adición de la disolución ácida.

Así mismo, si se evalúa la absorbancia leída para la muestra HAP-ADN tratada con DNAasa, la suspensión de partículas depositada en la cubeta y conociendo que una concentración de 50 μg ADN/mL presenta una absorbancia de una unidad leída a 260 nm, es posible calcular la cantidad de ADN encapsulado de la siguiente forma:

$$\mu\text{g ADN/mL} = A \times 50 \times \text{FD}$$

Ecuación 4.1

Donde A = absorbancia leída, FD = factor de dilución utilizado.

$$\mu\text{g ADN / mg HAP} = (\mu\text{g ADN/mL}) / (\text{mg HAP/mL})$$

Ecuación 4.2

De esta forma, para una absorbancia de 0.03, un factor de dilución de 1 y una suspensión de partículas HAP-ADN 0.5 mg/mL, se puede establecer la tasa de encapsulación en 3 μg ADN/mg HAP.

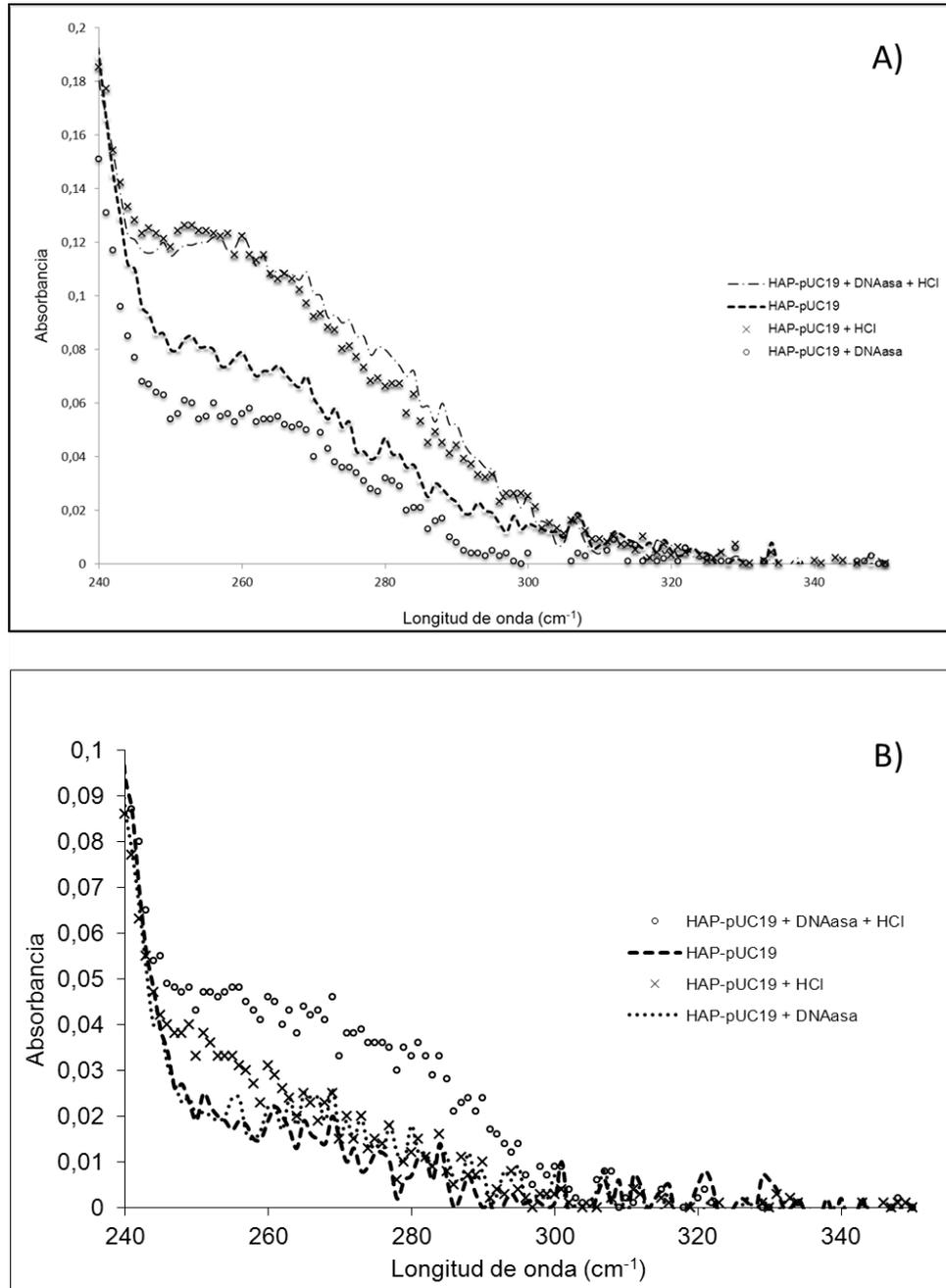


Figura 4.9 Espectrofotometría UV-Vis de distintas muestras de nanopartículas HAP-pUC19 antes y después de su tratamiento con HCl 0.1M y con DNAasa: A) HAP 500 mM – pUC19 (8.0 mg), B) HAP 500 mM – pUC19 (1.6 mg).

El mismo fenómeno de degradación de la cobertura de HAP y la consecuente liberación del material genético al adicionar ácido fue observado en los ensayos realizados a las partículas cargadas con plásmido pUC19 (ver Figura 4.9).

Así, las muestras HAP 500 mM-pUC19 (8.0 mg) y HAP 500 mM-pUC19 (1.6 mg) presentaron aumentos en la concentración de ADN al de 2.22 $\mu\text{g/mL}$ y 0.43 $\mu\text{g/mL}$ al agregarse ácido, respectivamente. Otros incrementos en la concentración de material genético en el medio se dieron también al agregar la disolución ácida a las mismas partículas lavadas previamente con DNAasa, generando aumentos de 3.33 $\mu\text{g/mL}$ para la muestra HAP 500 mM-pUC19 (8.0 mg) y 1.19 $\mu\text{g/mL}$ HAP 500 mM-pUC19 (1.6 mg).

Haciendo uso de la Ecuación 4.1 y de la Ecuación 4.2 se puede establecer también una tasa de encapsulamiento de 4.62 $\mu\text{g ADN/mg HAP}$ y 1.61 $\mu\text{g ADN/mg HAP}$ para las muestras HAP 500 mM-pUC19 (8.0 mg) y HAP 500 mM-pUC19 (1.6 mg), respectivamente.

Estos resultados se asemejan a los mostrados en la Figura 4.8 para el caso de las partículas HAP 0.5 mM-ADN, confirmando el encapsulamiento del material genético tanto para el plásmido como para el ADN comercial, así como la posible liberación de este material en un medio ácido.

4.3 Caracterización de las nanopartículas de HAP mediante la evaluación de su morfología, composición y estabilidad química

4.3.1 Evaluación de la morfología

En la Figura 4.10 se presentan imágenes representativas de las principales morfologías observadas en la síntesis de HAP sin ADN mediante la metodología propuesta.

En imágenes obtenidas mediante SEM, fue posible la observación del material hidroxiapatítico de color blanco en forma de material disperso, esférico (Figura 4.10, izquierda), y formando agregados como los de la Figura 4.10, derecha.

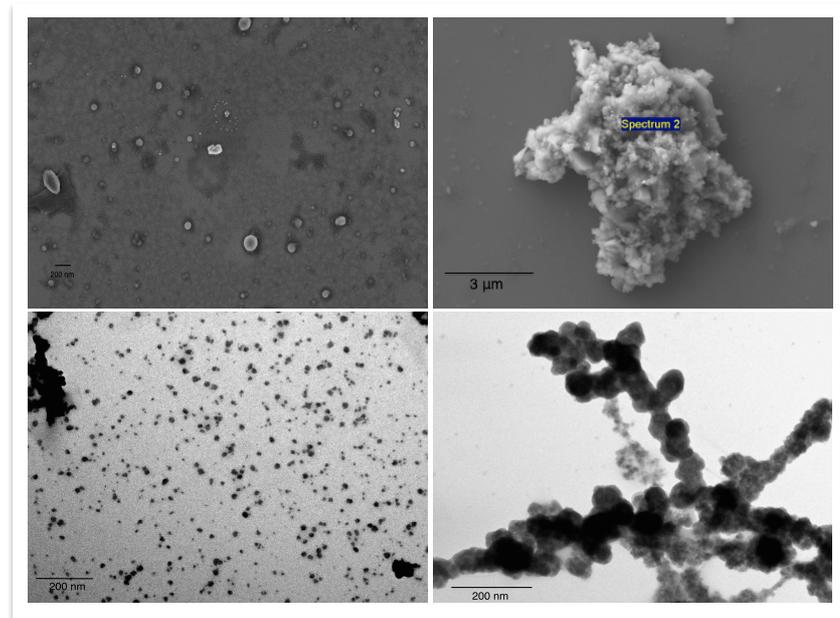


Figura 4.10 Fotografías de las nanopartículas HAP 0.5 mM sintetizadas. Arriba: imágenes SEM; abajo: imágenes TEM.

Los conglomerados a su vez demostraron, en la mayoría de los casos, estar compuestos por partículas esféricas unidas entre sí a manera de cadenas, como puede observarse en la imágenes TEM obtenidas. En otros casos, los apilamientos se encontraron formados por estructuras más cristalinas tipo astillas o bastoncillos, sobre todo en zonas de alta acumulación de material.

Las observaciones confirman el efecto de la concentración de los reactivos y pH del medio de reacción sobre las formas que adquiere la HAP al sintetizarse, en donde las condiciones de elevada dilución del medio y el relativamente alto pH, demostraron promover el ordenamiento del material en formas esféricas.

La dilución del medio de reacción implicaría una menor actividad iónica en la disolución y es conocido que este es uno de los factores que más influye en el proceso de formación de la HAP al afectar la etapa de nucleación [7], sin embargo, el mecanismo que describe el proceso general aún no es comprendido en su totalidad. Así las cosas, el menor acceso a

los iones en disolución podría provocar una limitación en algunas de las etapas finales del proceso de cristalización de la HAP y favoreciendo estados primigenios, en donde sería más común encontrar formas de tipo esféricas. Además, este efecto podría verse incrementado en caso de que la HAP formada haya incorporado CO_3^{2-} en su estructura ya que ha sido reportado su efecto retardante en la velocidad de crecimiento del cristal [29].

Asociado a lo anterior, el alto pH del medio de reacción implicaría una mayor cantidad de iones OH^- disponibles y por tanto, un aumento en la probabilidad de adsorción superficial necesaria para la formación y el crecimiento de los cristales de HAP. Este aumento en la probabilidad de la adsorción de grupos hidroxilos ha sido mencionado por Zhang *et al.* [34] como favorecedor de crecimiento isotrópico o anisotrópico leve, además de haber sido propuesto por Christoffersen *et al.* [7], en uno de sus modelos, como responsable del crecimiento lateral de los cristales.

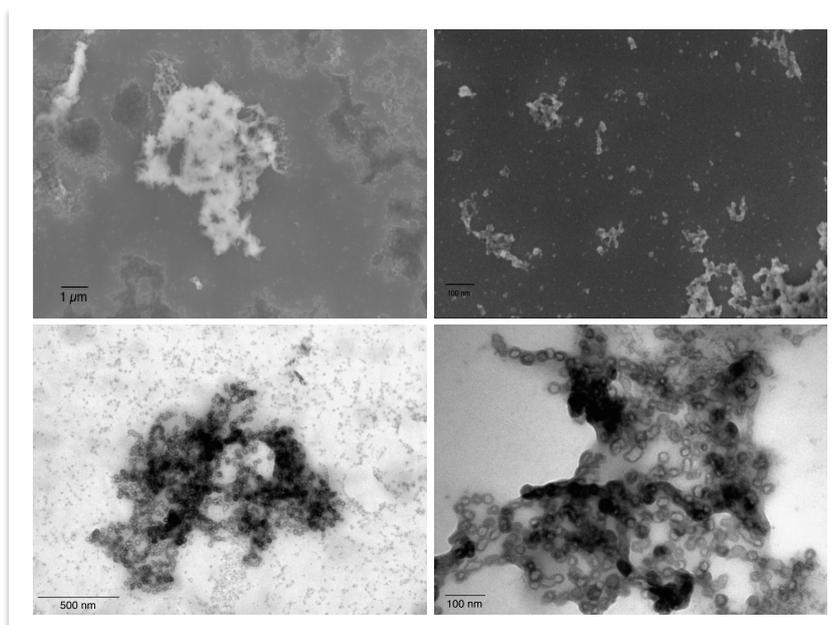


Figura 4.11 Fotografías de las nanopartículas HAP-ADN sintetizadas. Arriba: imágenes SEM; abajo: imágenes TEM.

Por otro lado, partículas similares fueron obtenidas al hacer la reacción de formación de HAP en conjunto con ADN, en donde el material genético puede servir como molde o centro de nucleación a la formación del cerámico, generando estructuras formadas por nanocápsulas (ver Figura 4.11). Estas estructuras se encontraron, al igual que en el caso anterior, como cápsulas individuales o como agregados amorfos de más de 1 μm de diámetro y presentaron un color blanco.

En cuanto al tamaño de partícula, la evaluación estadística realizada a partir de las imágenes SEM mostraron un predominio de estructuras dispersas de 27.6 nm de diámetro en promedio para el caso de la HAP 0.5 mM y de 38.3 nm de diámetro para la HAP-ADN (ver Figura 4.12).

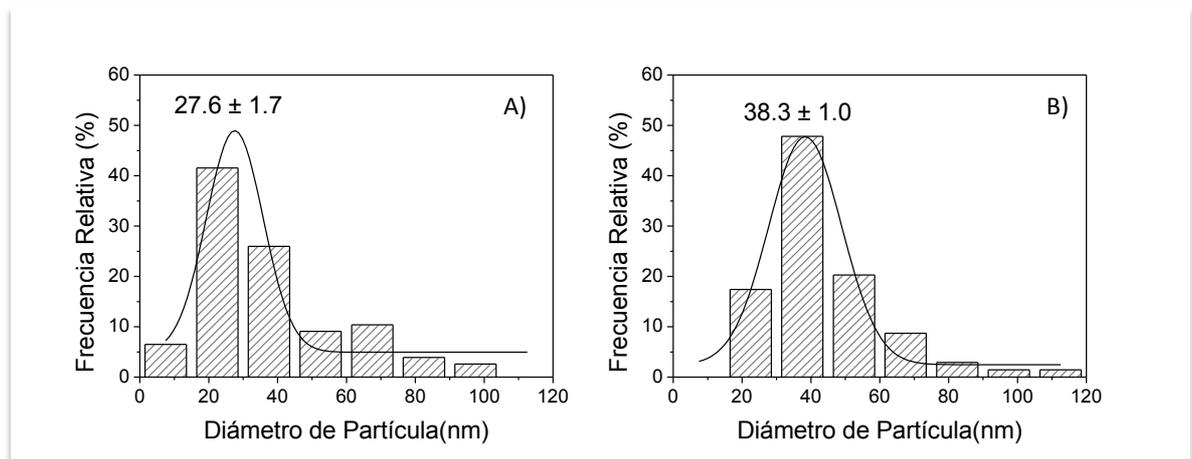


Figura 4.12 Distribución estadística del diámetro de las nanopartículas de HAP sinterizadas: A) HAP 0.5 mM; B) HAP – ADN.

Como puede observarse, existe una tendencia al incremento del diámetro de partícula al generarse la reacción de precipitación en presencia del ADN, lo que puede deberse al efecto de molde que esta macromolécula ejerce al permitir la formación del material sobre su superficie.

El diámetro final de la partícula sintetizada dependerá entonces del tamaño y ordenamiento de la micela de ADN formada previo a la mineralización de la cobertura de HAP, además de los otros factores ya mencionados en este trabajo. De igual forma, no se puede descartar la

influencia de la conformación del material genético encapsulado, su tamaño, su integridad o la posibilidad de formación de agregados del mismo.

4.3.2 Composición

En la Figura 4.13 se pueden ver los espectros IR para dos muestras de HAP sintetizadas a partir de distintas concentraciones de calcio y fosfato.

En ambos espectros es posible observar las bandas características de los fosfatos de la HAP alrededor de $558\text{-}601\text{ cm}^{-1}$ y $960\text{-}1092\text{ cm}^{-1}$, así como la similitud entre estas curvas y la correspondiente a una HAP comercial.

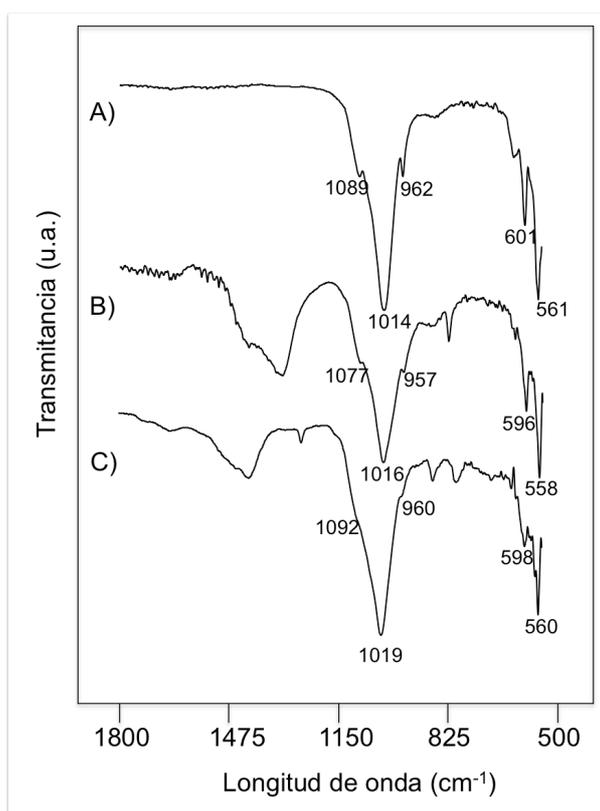


Figura 4.13 Espectroscopía FT-IR de las nanopartículas de HAP 500 mM y HAP 0.5 mM: A) HAP comercial, B) HAP 500 mM, C) HAP 0.5 mM.

Al igual que como pudo apreciarse en la Figura 4.7, la resolución de los picos mejora conforme se aumenta la concentración de los reactivos como es posible comprobar al visualizar las señales en ~ 962 , ~ 1014 y ~ 1089 cm^{-1} , lo que hace prever que hay una mejor lectura del equipo en muestras con mayor apilamiento de HAP o cuando la cantidad de muestra analizada es mayor.

Igualmente puede observarse la aparición de bandas en ~ 1460 cm^{-1} , asociadas a grupos CO_3^{2-} , lo cuales pueden formarse debido al CO_2 atmosférico presente durante la síntesis. Este, al entrar en contacto con el medio acuoso, puede formar $\text{H}_2\text{CO}_{3(\text{ac})}$ que al disociarse, sería el responsable del aporte de los grupos carbonato a la estructura de la HAP. Precisamente por este fenómeno, los carbonatos han sido reportados en la literatura como la principal impureza en la síntesis de HAP por procedimientos de precipitación realizados en sistemas abiertos [29].

Los análisis elementales EDX efectuados a la HAP sintetizada (Cuadro 4.1 y Cuadro 4.2) muestran presencia de elementos propios de la estructura como Ca, P y O, así como de pequeñas cantidades de otros elementos traza que podrían deberse a contaminación de la muestra y/o del soporte de silicio, ó a impurezas incluidas en la red cerámica.

Vale la pena mencionar que las partículas analizadas poseen un tamaño muy pequeño, lo que dificulta el análisis EDX de la muestras. Esta limitación es de tipo instrumental ya que en muchos casos, el rango de escaneo que hace el aparato es mayor al tamaño de las partículas lo que provoca que también se detecten elementos propios del soporte.

En el caso de la HAP sin ADN (Cuadro 4.1), el material sintetizado mostró una relación Ca/P de 1.69, el cual que difiere ligeramente del 1.67 reportado para la HAP [1] y más característico de hidroxiapatitas carbonatadas.

Además de los elementos propios de la HAP (Ca, O, P), el análisis mostró presencia de otros elementos como carbono, sodio, silicio y azufre.

En el caso del silicio, su detección se atribuye al soporte utilizado (de este mismo material), mientras que la aparición de azufre puede deberse a contaminación de la muestra y/o el soporte.

Cuadro 4.1 Determinación elemental de las nanopartículas HAP 0.5 mM mediante espectroscopía EDX.

Elemento	Concentración aparente	Intensidad	% Peso	% Peso sigma	% Atómico
C	126.805	0.5641	14.965	0.25	26.14
O	236.235	16108.5	10.95	0.16	15.805
Na	10.255	19320.5	0.395	0.045	0.395
Si	1.067.045	11825.5	66.88	0.3	53.3
P	30.185	13533.5	1.635	0.1	1.175
S	19.845	0.48835	1.615	0.05	1.215
Ca	46.735	0.97595	3.55	0.2	1.985
				Ca/P =	1.69

El sodio ha sido reportado como una impureza común en la formación de HAP, encontrada en rangos de 0.5-1.0 % en peso [29], por lo que es posible que la detección de este elemento se deba a su inclusión en la matriz del material.

En cuanto al carbono, existe la posibilidad de que el mismo haya sido incorporado a la matriz de la HAP en forma de carbonato, generando una especie similar a la descrita en la Ecuación 2.4 y que presentaría una relación Ca/P = 1.69.

La determinación elemental de las partículas HAP-ADN se muestra en el Cuadro 4.2. En el mismo se puede observar presencia de carbono, nitrógeno, silicio y cloro, aparte de los ya esperados calcio, fósforo y oxígeno inherentes a la HAP.

En este caso, la aparición de silicio se atribuye igualmente al soporte utilizado, mientras que la presencia de cloro es mínima si se compara con otros elementos y la misma podría ser producto de la inclusión de esta impureza en la matriz de HAP, ya que se ha reportado su presencia en HAP en valores que van desde el 0.01 % hasta el 0.3 % en peso [29].

Cuadro 4.2 Determinación elemental de las nanopartículas HAP 0.5 mM-ADN mediante espectroscopía EDX.

Elemento	Concentración aparente	Intensidad	% Peso	% Peso sigma	% Atómico
C	130.59	0.7571	12.05	0.22	21.33
N	9.45	0.3792	1.74	0.4	2.64
O	573.45	15.469	25.9	0.22	34.42
Si	596.63	11.599	35.94	0.25	27.2
P	189.24	14.215	9.3	0.14	6.38
Cl	5.41	0.8437	0.45	0.07	0.27
Ca	204.72	0.9782	14.62	0.24	7.76
				Ca/P =	1.22

Por otro lado, la existencia de carbono y nitrógeno es importante ya que se debería a la incorporación del material genético en el interior de las partículas, confirmando de esta forma el encapsulamiento del ADN.

En cuanto a la relación Ca/P, la misma presentó un valor de 1.22, inferior al 1.67 característico de las HAP.

La disminución en el valor de esta relación se podría deber a dos factores: i) la competencia entre el ADN y los iones fosfato provenientes del $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ por el calcio presente en disolución, en donde algunos cationes que interaccionan con el material genético no llegarían a formar HAP al agregarse la fuente de fosfatos, perdiéndose posteriormente en los lavados; y ii) el aporte de fósforo por parte del ADN encapsulado, que aumentaría su proporción respecto al calcio añadido.

Al igual que en el caso de la HAP sin ADN y si se analizan las señales en $\sim 1460 \text{ cm}^{-1}$ (ver Figura 4.6 c), existe la posibilidad de incorporación de carbonatos en la estructura del cerámico. De ser así, esto representaría una ventaja al utilizarse estas nanopartículas como un vector ya que la CHA es más bioactiva que la HAP pura [29]. La sustitución de grupos

PO_4^{3-} por CO_3^{2-} debilita el material haciéndolo más soluble y por tanto más fácil de degradar por parte de las células, aumentando la biocompatibilidad y facilitando la liberación del ADN.

4.3.3 Estabilidad química

La HAP sintetizada logró ser degradada mediante la disolución ácida 100 mM en HCl y 50 mM en NaCl, con una osmolalidad de 300 mOsmol, determinándose una tasa de degradación variable en el tiempo que va desde los 0.02 mg HAP/min hasta los 0.16 mg HAP/min.

Al igual que lo mencionado en la sección 2.5.5, se notó una mayor velocidad de degradación en las etapas iniciales del proceso pero la misma varía con el tiempo, de manera que se hace imposible determinar de forma clara la cinética o cinéticas involucradas.

A pesar de esto, los ensayos realizados demostraron que la disolución ácida utilizada es capaz de disolver el material cerámico y que la misma, al poseer condiciones de pH y osmolalidad similares a las encontradas en ambientes biológicos, puede dar alguna idea de la degradación que sufriría el material al ser degradado en el interior celular.

4.4 Determinación *in vitro* de la liberación del ADN encapsulado

Los ensayos para la liberación *in vitro* del ADN se basaron en la adición de una disolución ácida biomimética capaz de degradar la cobertura de HAP mineralizada sobre el material genético, de manera que las nanocápsulas se degeneran liberando en el proceso el ADN al medio, tal y como sucedería en condiciones *in vivo*.

En la Figura 4.14 se presenta el patrón electroforético obtenido en el ensayo. En la misma se aprecia como las partículas sin tratamiento ácido no corren por el gel y por el contrario, dejan una marca clara en el pozo atribuida al plásmido encapsulado (línea C). Cuando estas mismas partículas fueron tratadas con ácido, se logra la disolución del material hidroxiapatítico y la liberación del plásmido. Así, el ADN puede ahora correr por el gel

generando el patrón de electroforesis mostrado en la línea D, con un alto grado de similitud al dejado por el plásmido control (línea B).

También, vale la pena señalar que en el patrón obtenido para las partículas sin adición de ácido (línea C) la única marca se encuentra presente en el pozo, lo que implica la ausencia de ADN superficial y por tanto que el total del material genético (responsable de la banda luminosa) se encuentra encapsulado en las partículas.

En el caso del plásmido control, la marca superior se asocia a la conformación circular del plásmido mientras que la inferior se atribuye a la conformación súper enrollada. Este súper enrollamiento implicaría una menor resistencia a la migración a través del gel, lo que se traduce en un avance más rápido que la conformación circular.



Figura 4.14 Patrón electroforético de las nanocápsulas HAP-pUC19: A) Marcador de peso molecular, B) pUC19 control, C) HAP 500 mM – pUC19 (8.0 mg), D) HAP 500 mM – pUC19 (8.0 mg) + HCl 0.1 M.

Si se comparan las bandas superior e inferior de la línea D, se puede observar cómo las mismas coinciden exactamente con las descritas para el plásmido control, de forma que se atribuyen a las mismas conformaciones circular y súper enrollada. Además, es posible apreciar también una marca intermedia que puede ser asociada a alguna otra conformación como lo podría ser una linealización del plásmido sufrida durante la mineralización o la adición de ácido. No obstante, se puede distinguir cómo esta banda tiene una intensidad menor que las otras dos, lo que implica que la presencia de este tipo de conformación es menor que las típicas del plásmido pUC19 y por tanto, existe buena conservación de la integridad del mismo.

La integridad del material genético posterior a la adición de ácido es importante en caso del uso de estas partículas como vector de transfección. Esta integridad es necesaria si se quiere una adecuada integración del gen de interés en el material genético de la célula huésped al utilizarse este vector y por tanto, una adecuada expresión del producto de interés.

Estos resultados, en conjunto con los mostrados en las Figura 4.8 y Figura 4.9, terminan de confirmar la exitosa encapsulación del ADN dentro de las partículas de HAP, el efecto protector del vector y la posible liberación del material genético en condiciones similares a las encontradas a nivel intracelular.

4.5 Transfección bacteriana

Los ensayos de transfección bacteriana en los que se utilizó el vector sintetizado resultaron exitosos, observándose un buen crecimiento bacteriano en las placas de Petri 24 horas después de plaqueadas las muestras (ver Figura 4.15).

Este crecimiento resultó bastante significativo, en donde incluso fue imposible distinguir colonias puntuales, pareciéndose más al homogéneo crecimiento de las muestras control sin ampicilina.

Como el plásmido pUC19 posee en su construcción un gen de resistencia a ampicilina, sólo es posible que crezcan colonias de bacterias que expresen el gen de resistencia al

antibiótico y que por tanto, que hayan incorporado el plásmido en su material genético mediante el uso del vector.

En estos ensayos, se descarta que el ADN incorporado por las bacterias provenga de ADN adsorbido en la superficie de las partículas ya que las mismas fueron digeridas previamente con DNAasa y además confirmado mediante las pruebas electroforéticas de la sección anterior (ver Figura 4.14), como ya fue discutido.

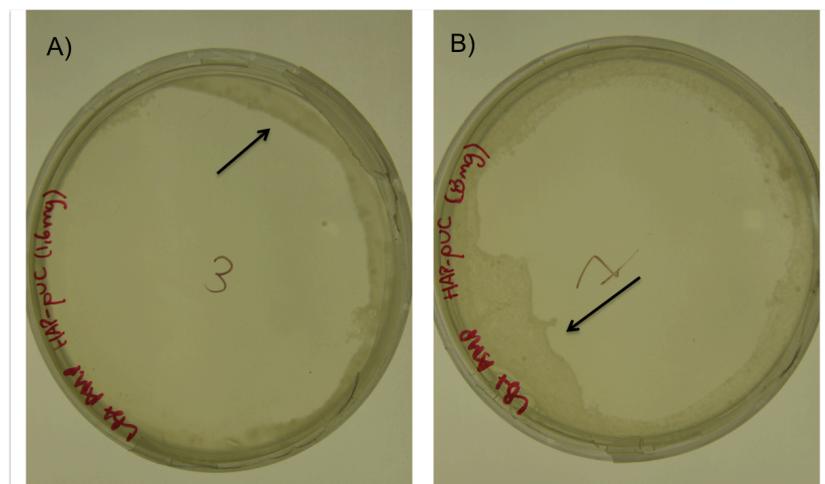


Figura 4.15 Placas de Petri con medio LB + ampicilina, sembradas con las bacterias transformadas mediante las partículas HAP-pUC19: A) Transformación con HAP 500 mM – pUC19 (1.6 mg), B) Transformación con HAP 500 mM – pUC19 (8.0 mg).

Para confirmar que el crecimiento bacteriano en las placas se debió exclusivamente a la incorporación del pUC19 y no al aporte de algunas bacterias resistentes, varias colonias de estas placas fueron sembradas en un medio de cultivo LB con una concentración de ampicilina de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ evaluando su crecimiento después de 24 horas al dejarse en reposo a 37 °C.

Tras 24 horas de haberse efectuado la siembra de las colonias, se detectó turbidez en los tubos de ensayo empleados, signo de crecimiento bacteriano. En este caso, el crecimiento fue mayor para las bacterias transfectadas con las partículas HAP 500 mM – pUC19 (8.0

mg) que para aquellas transfectadas con las HAP 500 mM – pUC19 (1.6 mg), algo que era de esperarse debido a la mayor cantidad de ADN encapsulado en las primeras y que por cuestión de probabilidades, transfectarían un mayor número de bacterias.

Posteriormente se procedió a la extracción y purificación del ADN bacteriano siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.6.2, para finalmente comprobar si este material genético estaba o no asociado al plásmido encapsulado.

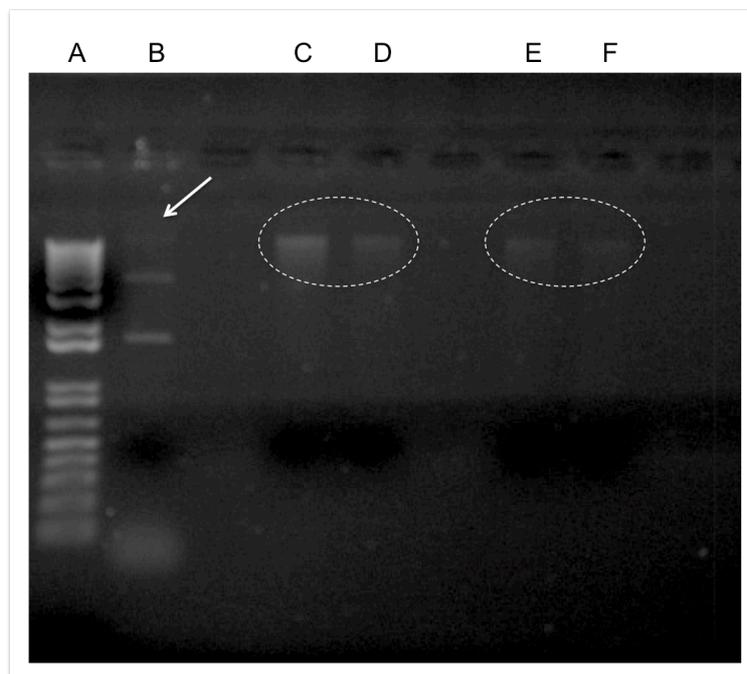


Figura 4.16 Patrón electroforético del ADN de las bacterias transfectadas con las partículas HAP-pUC19: A) Marcador de peso molecular, B) pUC19 control, C-D) Bacterias transformadas con HAP 500 mM – pUC19 (8.0 mg), E-F) Bacterias transformadas con HAP 500 mM – pUC19 (1.6 mg)

En la Figura 4.16 se muestra el patrón electroforético obtenido en estos ensayo en donde es posible observar claramente unas bandas coincidentes con una de las conformaciones del plásmido pUC19. Las mismas presentan una mayor intensidad para el caso de la

transfección realizada con las partículas HAP 500 mM – pUC19 (8.0 mg) debido al mayor crecimiento de estas bacterias y por tanto, a una mayor cantidad de ADN purificado.

En el caso del patrón presentado por el plásmido control, las bandas inferiores son asociadas a las conformaciones circular y súper enrollada, mientras que la leve marca superior puede deberse a alguna conformación producto de agregación entre el mismo plásmido. De esta forma, los resultados hacen prever que el ADN incorporado por las bacterias y encapsulado en las nanopartículas responsables de la transfección, se trata del que presenta esta última conformación y que la misma no afecta su funcionalidad.

Además, se puede apreciar como el patrón es coincidente también para cada uno de los carriles y como también en todos los casos hay ausencia de bandas en los pozos, descartando así alguna posible contaminación de ADN genómico al momento de la transfección.

Adicionalmente, la concordancia de las bandas del ADN bacteriano con la del control vendría a demostrar la integridad del material genético una vez finalizado el proceso general: encapsulación del plásmido, liberación en el interior bacteriano, incorporación y expresión.

5 Conclusiones

Mediante el protocolo propuesto se logró sintetizar partículas de HAP de forma mayoritariamente esférica, con una buena dispersión y un tamaño promedio de 26.7 nm, que se pueden encontrar de forma aislada o formando agregados.

El efecto de la dilución de los reactivos demostró ser el principal factor que afecta la dispersión y morfología del material, detectándose partículas más esféricas, más dispersas y con menos formación de agregados conforme se aumenta la dilución.

Los ensayos de espectroscopía UV-Vis, espectroscopía FT-IR, espectroscopía EDX y electroforesis en conjunto con las microfotografías de transmisión electrónica obtenidas, demostraron la encapsulación exitosa tanto del ADN comercial *fish sperm* como del ADN plasmídico pUC19, lográndose por primera vez la encapsulación de material genético mediante el método de coprecipitación química.

Tanto las partículas sin carga genética como aquellas en las que el ADN fue encapsulado mostraron una morfología principalmente esférica, en donde los diámetros resultaron ligeramente mayores para las partículas cargadas con el ácido nucleico.

Indiferentemente de la adición o no de ADN durante el proceso de síntesis, las partículas obtenidas presentan indicios de incorporación de carbonatos en su estructura, aumentando su solubilidad y mejorando su rendimiento como vector no viral.

Las pruebas electroforéticas y de espectroscopía UV-Vis demostraron la factible liberación ADN encapsulado bajo condiciones ácidas biomiméticas, así como el efecto protector de la cobertura de HAP sobre el material genético al ser sometido a la acción de endonucleasas.

Los diferentes ensayos de transfección y su comprobación mediante electroforesis indican la exitosa transformación de las bacterias al utilizarse las nanopartículas HAP-ADN, demostrando de esta forma su potencial como vector no viral.

6 Agradecimientos

Agradezco a mi tutor el Dr. Luis Javier del Valle Mendoza por toda la ayuda y confianza depositada en mí durante la realización de este proyecto. Su calidad humana y profesional, han sido determinantes en el desarrollo de este trabajo.

A todo el personal del grupo de investigación PSEP del departamento de Ingeniería Química del ETSEIB que siempre se mostraron anuentes a ayudarme, en especial a la Dra. María Teresa Casas y al Dr. Jordi Puiggali.

A mis compañeros de la Maestría en Ingeniería Biotecnológica que durante los últimos 2 años han sido mi segunda familia, a los cuales les tengo gran cariño y a los que recordaré el resto de mi vida.

A mis padres Vilma y Gerardo, a mi hermana Fabiola, por ser lo más importante en mi vida, por amarme como lo hacen, por enseñarme a luchar por mis sueños y por todo su apoyo incondicional. Gracias por todo.

A la Agencia de Cooperación Española Internacional para el Desarrollo (AECID) y al Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (MAEC) por haberme elegido como becario del programa de becas de postgrado MAEC-AECID y darme así esta oportunidad.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra forma me motivaron a cumplir con esta meta.

7 Bibliografía

- [1] BRUNDIN, M., FIGDOR, D., SUNDQVIST, G., SJÖGREN, U. *DNA Binding to Hydroxyapatite: A Potential Mechanism for Preservation of Microbial DNA. Journal of endodontics*, Vol. 39 (2), february 2013, p. 211-216.
- [2] BYRAPPA, K., OHACHI, T. *Crystal Growth Technology*. William Andrew Inc., New York, 2003, p. 525-559.
- [3] CAO, H., ZHANG, L., ZHENG, H., WANG, Z. *Hydroxyapatite Nanocrystals for Biomedical Applications. Journal of Physical Chemistry C*, Vol. 114, 2010, p. 18352–18357.
- [4] CHAO, Q., ZHU, Y-J., LU, B-Q., ZHAO, X-Y., CHEN, F. *Hydroxyapatite nanosheet-assembled porous hollow microspheres: DNA-templated hydrothermal synthesis, drug delivery and protein adsorption*, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 22, 2012, p. 22642-22650.
- [5] CHOI, D., KUMTA, P. *An Alternative Chemical Route for the Synthesis and Thermal Stability of Chemically Enriched Hydroxyapatite. American Ceramic Society*, Vol. 89(2), 2006, p. 444–449.
- [6] CHOWDHURY, E.H., AKAIKE, T. *High Performance DNA nano-carriers of carbonate apatite: Multiple factors in regulation of particle synthesis and transfection efficiency. International Journal of Nanomedicine*, Vol. 2 (I), 2007, p. 101-106.
- [7] CHRISTOFFERSEN, M., DOHRUP, J., CHRISTOFFERSEN, J. *Kinetics of growth and dissolution of calcium hydroxyapatite in suspensions with variable calcium to phosphate ratio. Journal of crystal growth*, Vol. 186, 1998, p. 283-290.
- [8] GLAZER, A., NIKAIKO, H. *Microbial Biotechnology, Second Edition*. Cambridge University Press, New York, 2007, p. 91-92, 98.
- [9] HANKERMAYER, C., OHASHI, K., DELANEY, D., ROSS, J., CONSTANTZ, B. *Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid. Biomaterials*, Vol. 23, 2002, p. 743-750.
- [10] HUANG, L., HUNG, M., WAGNER, E. *Non viral vectors for gene therapy, Second*

Edition: Part I, Advances in genetics. Elsevier Inc., Vol. 53, 2005, p. 4.

- [11] KALITA, S., AND BHATT, H. *Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: synthesis and characterization.* *Materials Science & Engineering C*, Vol. 27, 2007, p. 837-848.
- [12] MA, M-G. *Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity.* *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 7, 2012, p. 1781–1791.
- [13] MADIGAN, M., MARTINKO, J., STAHL, D., CLARK, D. *Brock. Biology of Microorganisms, Thirteenth Edition.* San Francisco, 2012, p. 273, 275-276 , 303.
- [14] MANSOURI, S.; LAVIGNE, P.; CORSI, K.; BENDENDOUR, M.; BEAUMONT, E.; FERNANDES, J. *Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy,* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 57, 2004, p. 1–8.
- [15] MATEUS, A., BARRRIAS, C., RIBEIRO, C., FERRAZ, M., MONTEIRO, F., *Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications,* *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 86 (2), 2008, p. 483-493.
- [16] MATEUS, A., FERRAZ, M., MONTEIRO, F. *Microspheres based on hydroxyapatite nanoparticles aggregates for bone regeneration,* *Key Engineering Materials*, Vol. 330-332, 2007, p. 243-246.
- [17] MOTSKIN, M., MÜLLER, K., GENOUD, C., MONTEITH, A., SKEPPER, J. *The sequestration of hydroxyapatite nanoparticles by human monocyte-macrophages in a compartment that allows free diffusion with the extracellular environment,* *Biomaterials*, Vol. 32, 2011, p. 9470-9482.
- [18] ORLOVSKII, V., BARINOV, S. *Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Matrix Ceramics: A survey,* *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, Vol. 46 (2), 2001, p. 129-149.
- [19] ORLOVSKII, V., KOMLEV, V., BARINOV, S. *Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-based ceramics,* *Inorganic Materials.* Vol.38 (10), 2002, p. 1159-1172.

- [20] OKASAKI, M., YOSHIDA, Y., YAMAGUCHI, S., KANENO, M., ELLIOTT, J.C. *Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals*, *Biomaterials*, Vol. 22, 2001, p. 2459-2464.
- [21] PEROOS, S., DU, Z., DE LEEUW, N. *A computer modelling study of the uptake, structure and distribution of carbonate defects in hydroxy-apatite*, *Biomaterials*. Vol. 27, 2006, p. 2150-2161.
- [22] PRABAKARAN, K., RAJESWARI, S. *Spectroscopic investigations on the synthesis of nano-hydroxyapatite from calcined eggshell by hydrothermal method using cationic surfactant as template*, *Spectrochimica Acta Part A*, Vol. 74, 2009, p. 1127-1134.
- [23] REVILLA-LOPEZ, G., CASANOVAS, J., BERTRAN, O., TURON, P., PUIGGALI, J., ALEMAN, C. *Modeling biominerals formed by apatites and DNA*, *Biointerphases*, Vol. 8 (10), 2013, p. 1-15.
- [24] ROUHANI, P., TAGHAVINIA, N., ROUHANI, S. *Rapid growth of hydroxyapatite nanoparticles using ultrasonic irradiation*, *Ultrasonics Sonochemistry*. Vol. 17, 2010, p. 853-856.
- [25] ROY, I., MITRA, S., MAITRA, A., MOZUNDAR, S. *Calcium phosphate nanoparticles as novel non-viral vectors for targeted gene delivery*, *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, Vol. 250, p. 25-33.
- [26] SALIMIA, M., ANUARA, A. *Characterizations of Biocompatible And Bioactive Hydroxyapatite Particles*. *Procedia Engineering*, Vol. 53, 2013, p. 192 – 196.
- [27] SMITH, J.E. *Biotechnology. Fifth Edition*. Cambridge University Press, New York, 2009, p. 30, 36.
- [28] TAIRA, K.; KATAOKA, K.; NIIDOME, T. *Non-viral gene therapy. Gene desing and delivery*. Springer-Verlag, Tokio, 2005, p. 3-7.
- [29] USKOKOVIC´, V., USKOKOVIC´, D. *Review Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents*. *Journal of Biomedical Materials Research B*, Vol. 96B(1), 2011, p. 152-191.
- [30] WANG, H. *Hydroxyapatite degradation and biocompatibility*. Tesis de doctorado

en Ciencias de materiales e ingeniería, The Ohio State University, 2004, p. 1-205.

- [31] WANG, L., NEMOTO, R., SENNA, M. *Microstructure and chemical states of hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposites synthesized via a wet mechanochemical route. Journal of Nanoparticle Research*, Vol. 4, 2002, p. 535-540.
- [32] WANG, Y., ZHANG, S., WEI, K., ZHAO, N., CHEN, J., WANG, X. *Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template, Materials Letters*, Vol. 60, 2006, p. 1484-1487.
- [33] WU, G-J., ZHOU, L-Z., WANG, K-W., CHEN, F., SUN, Y., DUAN, Y-R., ZHU, Y-J., GU, H-C. *Hydroxylapatite nanorods: An efficient and promising carrier for gene transfection, Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 345, 2010, p. 427-432.
- [34] ZHANG, C., YANG, J., QUAN, Z., YANG, P., LI, C., HOU, Z., LIN, J. *Hydroxyapatite nano- and microcrystals with multiform morphologies: controllable synthesis and luminescence properties, Crystal Growth & Desing*, Vol. 9 (6), 2009, p. 2725-2733.
- [35] ZHANG, Y., LU, J. *A simple method to tailor spherical nanocrystal hydroxyapatite at low temperatura, Journal of Nanoparticle Research*, Vol. 9, 2007, p. 589-594.
- [36] ZHAN, J., TSENG, Y-H., JERRY, C., CHAN, C., MOU, C-Y. *Biomimetic Formation of Hydroxyapatite Nanorods by a Single-Crystal-to-Single-Crystal Transformation, Advanced Functional Materials*, Vol. 15, 2005, p. 2005-2010.

Bibliografía complementaria

- G-Biosciences – Descripción CTAB:
<http://www.gbiosciences.com/CTAB-desc.aspx>
- Invitrogen – Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells. Cat. No. 18265-017.

- Pierce – Technical Resource:

http://www.fishersci.ca/uploadedFiles/Whats_New/pierce_detergent.pdf

- QIAGEN – Bench Protocol: QIAprep Spin Miniprep Kit Using a Microcentrifuge.