



Centro Singular de Investigación
en Química Biolóxica e
Materiais Moleculares

Trabajo de Fin de Grado

***Nanocarriers* para el transporte de moléculas con relevancia biológica: ARN**

Grado en Química

Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica y Materiales Moleculares
(CiQUS). Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Santiago
de Compostela

Verónica Feteira Montero

Julio 2021

El trabajo objeto de la presente memoria fue llevado a cabo entre los meses de diciembre de 2020 y junio de 2021 en las instalaciones del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS), con ubicación en:

C/ Jenaro de la Fuente s/n (esquina con Avda. Mestre Mateo)

Campus Vida

Universidade de Santiago de Compostela

15782 Santiago de Compostela

España

Las directoras de este Trabajo de Fin de Grado, **Dr. BEATRIZ PELAZ**, Investigadora Ramón y Cajal del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Santiago de Compostela e Investigadora Principal del CIQUS (Grupo BionanoTools) y **Dr. ESTER POLO** del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela e Investigadora del grupo BionanoTools del CIQUS.

CERTIFICAN QUE: el trabajo “**Nanocarriers para el transporte de moléculas con relevancia biológica: ARN**” realizado para la consecución del título del Grado en Química, ha sido desarrollado por Verónica Feteira Montero bajo su supervisión en el laboratorio P1L6 del CIQUS. Ambas autorizan, por tanto, la presentación formal de dicho trabajo en la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman el presente informe en Santiago de Compostela a día 5 de julio de 2021.

Dr. Beatriz Pelaz

Dr. Ester Polo

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Sistemas biomiméticos de transporte molecular	10
1.1.1. Hidrogeles.....	10
1.1.2. Micelas	11
1.1.3. Dendrímeros.....	12
1.1.4. Polimersomas.....	12
1.1.5. Liposomas.....	13
1.1.6. Nanomembranas.....	14
1.2. <i>Cellsomas</i> y sus aplicaciones	15
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	16
3. METODOLOGÍA	17
3.1. Cultivo celular.....	17
3.2. Preparación de <i>cellsomas</i>	17
3.2.1. Obtención de las membranas celulares	17
3.2.2. Formación de los <i>cellsomas</i>	19
3.3. Funcionalización de <i>cellsomas</i>	20
3.4. Encapsulación de <i>cargo</i>	20
3.4.1. Dextrano.....	20
3.4.2. ARN total	21
3.5. Purificación de <i>cellsomas</i>	21
3.6. Caracterización de <i>cellsomas</i>	22
3.6.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)	22
3.6.2. Dispersión de luz dinámica (DLS)	23
3.6.3. Ensayo Bradford	23

3.6.4.	Espectroscopía de fluorescencia.....	24
3.7.	Internalización celular	25
3.7.1.	Duración del tratamiento	25
3.7.2.	Incubación post-tratamiento.....	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1.	Síntesis de <i>cellsomas</i> a partir de células MRC-5.....	27
4.2.	Caracterización inicial de <i>cellsomas</i>	29
4.2.1.	Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)	29
4.2.2.	Dispersión de luz dinámica (DLS)	30
4.2.3.	Ensayo Bradford	31
4.3.	<i>Cellsomas</i> funcionalizados con un fluoróforo	32
4.4.	Encapsulación de dextrano como molécula modelo	34
4.5.	Encapsulación de ARN	36
4.6.	Estudio de interacción celular con <i>cellsomas</i>	40
4.7.	Internalización celular de RNA encapsulado en <i>cellsomas</i>	42
5.	CONCLUSIONES.....	44
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	46

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius

× g: fuerza g o fuerza centrífuga relativa (RCF, por sus siglas en inglés, *Relative Centrifuge Force*)

Adar: adenosina deaminasa que actúa sobre ARN (*Adenosine Deaminase Acting on RNA*)

Aprox.: aproximadamente

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BSA: albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CCD: dispositivo de carga acoplada (*charge-coupled device*)

dKO: doble inactivación (*double knockout*)

DLS: dispersión de luz dinámica (*Dynamic Light Scattering*)

DMEM: medio de cultivo basal modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Ec.: ecuación

Ej.: ejemplo

ESCs: células troncales embrionarias (*Embryonic Stem Cells*)

Etc.: etcétera

Exp.: experimento

FBS₁: síntesis biomimética funcional (*functional biomimetic synthesis*)

FBS₂: suero bovino fetal (*fetal bovine serum*)

Fig.: figura

ISOs: Organizaciones de estándares Internacionales (*International Standards Organizations*)

KDa: kilodalton (unidad de masa)

mESCs: células troncales embrionarias de ratón (*mouse Embryonic Stem Cells*)

MFI: intensidad de fluorescencia media (*mean fluorescence intensity*)

min: minutos (unidad de tiempo)

mL: mililitros (unidad de volumen)

µg: microgramos (unidad de masa)

µL: microlitros (unidad de volumen)

MRC-5: línea celular de fibroblastos humanos desarrollada por el Consejo de Investigación Médica de Reino Unido (*Medical Research Council-5*)

mW: milivatios (unidad de potencia)

nm: nanómetros (unidad de longitud)

NTA: análisis de seguimiento de nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis*)

PBS₁: síntesis biomimética de proceso
(*process biomimetic synthesis*)

PBS₂: tampón fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*)

Pdl: índice de polidispersidad
(*Polydispersity Index*)

PIC: cóctel inhibidor de proteasas
(*Protease Inhibitor Cocktail*)

PLGA: copolímero de ácido láctico y glicólico (*poly lactic-co-glycolic acid*)

RITC: rodamina B isotiocianato
(*Rhodamine B isothiocyanate*)

RT-qPCR: reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa a tiempo real
(*Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*)

sCMOS: semiconductor de óxido metálico complementario científico
(*scientific complementary metal oxide semiconductor*)

SD: desviación estándar (*Standard Deviation*)

Vol.: volumen

WT: genotipo salvaje (*wild type*)

RESUMEN

El desarrollo de sistemas biomiméticos de transporte a escala nanométrica ha mejorado sustancialmente el tratamiento de enfermedades como el cáncer, así como el desarrollo de nuevas vacunas. El objetivo para estos sistemas es alcanzar la máxima semejanza posible entre el transportador y la célula con el fin de simular la funcionalidad de la membrana celular en el medio biológico durante el tratamiento. La posibilidad de transportar la carga hasta las células diana sin dañar el tejido sano circundante supone un incremento de la eficacia de los fármacos al mismo tiempo que reduce su toxicidad. Entre las múltiples alternativas existentes de sistemas biomiméticos, destacan las nanovesículas o nanomembranas ensambladas a partir de membranas biológicas completas de las células de interés. En este trabajo, se utilizó la tecnología de las nanomembranas para formar *cellsomas* (nanoportadores de carga creados a partir de membranas celulares) en los que se encapsuló el polímero natural ARN para determinar la eficiencia del sistema de transporte mediante experimentos de internalización celular. Finalmente, se observó que los *cellsomas* constituyen un sistema biomimético de transporte estable que permite la introducción de compuestos exógenos funcionalmente activos en el interior celular.

RESUMO

O desenvolvemento de sistemas biomiméticos de transporte a escala nanométrica mellorou substancialmente o tratamento de enfermidades coma o cancro, así como o desenvolvemento de novas vacinas. O obxectivo para estes sistemas é acadar a máxima semellanza posible entre o transportador e a célula coa fin de simular a funcionalidade da membrana celular no medio biolóxico durante o tratamento. A posibilidade de transportar a carga ata as células diana sen danar o tecido san circundante supón un incremento da eficiencia dos fármacos ao mesmo tempo que reduce a súa toxicidade. Entre as múltiples alternativas existentes de sistemas biomiméticos, destacan as nanovesículas ou nanomembranas ensambladas a partir de membranas biolóxicas completas das células de interese. Neste traballo, empregouse a tecnoloxía das nanomembranas para formar *cellsomas* (nanoportadores de carga creados a partir de membranas celulares) nos que se encapsulou o polímero natural ARN para determinar a eficiencia do sistema de transporte mediante experimentos de internalización celular.

Finalmente, observouse que os *cellsomas* constitúen un sistema biomimético de transporte estable que permite a introdución de compostos exógenos funcionalmente activos no interior celular.

ABSTRACT

The development of biomimetic transport systems at the nanoscale has substantially improved the treatment of diseases such as cancer, as well as the development of new vaccines. The goal for these systems is to achieve the closest possible resemblance between the carrier and the cell to simulate the functionality of the cell membrane in the biological environment during treatment. The possibility of transporting the cargo to the target cells without damaging the surrounding healthy tissue increases the efficacy of the drugs while reducing their toxicity. Among the many existing alternatives for biomimetic systems, nanovesicles or nanomembranes assembled from complete biological membranes of the cells of interest stand out. In this work, nanomembrane technology was used to form cellsomes (nanocarriers made from cellular membranes) in which the natural polymer RNA was encapsulated to determine the efficiency of the transport system by means of cell internalisation experiments. Finally, it was observed that cellsomes constitute a stable biomimetic transport system that allows the introduction of functionally active exogenous compounds into the cell interior.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el avance de la ciencia en el campo de la nanotecnología y la nanomedicina ha supuesto un gran salto en el diagnóstico y tratamiento de todo tipo de enfermedades. La necesidad de una mayor eficacia y selectividad de los fármacos ha impulsado el diseño de nuevos sistemas de transporte de moléculas con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas a la vez que se reduce la toxicidad de los agentes activos¹.

En este aspecto, los sistemas transportadores a escala nanométrica se muestran como una alternativa muy prometedora a la hora de suministrar fármacos a nivel local y de forma continuada en el tiempo, liberando al individuo de la necesidad de ser inoculado con sucesivas dosis de fármaco por vía externa².

Sin embargo, la función intrínseca del sistema inmune del organismo supone un importante inconveniente para el avance de los nanotransportadores hasta los tejidos diana. La fagocitosis de nanopartículas exógenas por parte de los macrófagos es la principal vía de retirada de nanopartículas del sistema circulatorio, conocida como “limpieza inmunológica” o *immunological clearance* en inglés³. Frente a este problema, se han diseñado diferentes materiales que evitan el reconocimiento de las partículas como estructuras exógenas y permiten evadir el ataque de las células del sistema inmune, aumentando así la eficacia terapéutica *in vivo*⁴ (**Fig. 1**).

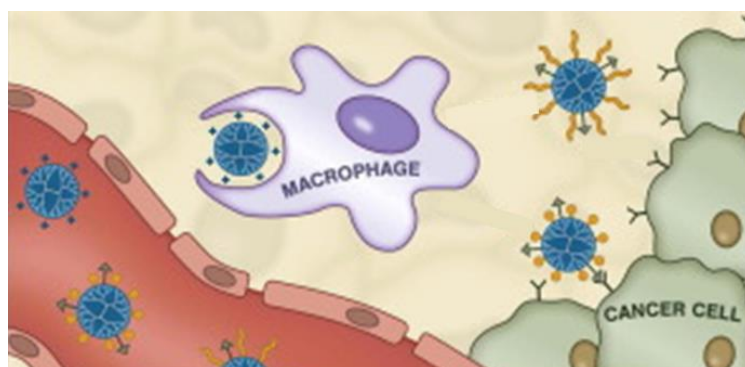


Figura 1: Limpieza inmunológica de nanopartículas de dendrímero llevada a cabo por los macrófagos en el sistema circulatorio. Las nanopartículas (en azul) no neutralizadas por adición de polímeros en la superficie (en naranja) son eliminadas por los macrófagos mientras que las nanopartículas neutralizadas esquivan el ataque y consiguen llegar a las células cancerígenas diana. Adaptado de ⁵.

1.1. Sistemas biomiméticos de transporte molecular

La biomimética fue definida por primera vez por Otto Schmitt en 1969 como “un acercamiento a los problemas de la tecnología utilizando la teoría y tecnología de las ciencias biológicas”⁶. Desde entonces, la naturaleza ha servido de inspiración para la resolución de muchos problemas de origen humano, dando lugar a materiales, herramientas, estructuras, mecanismos, sistemas y procesos, entre otros⁷.

Actualmente, la aplicación de la biomimética en el campo de la medicina y farmacéutica se encuentra en auge con el fin de atajar los problemas presentes en el tratamiento de enfermedades como el cáncer⁸.

Con este fin, surgen dos interpretaciones de la síntesis de materiales biomiméticos: síntesis biomimética “de proceso” (PBS, por sus siglas en inglés, *Process Biomimetic Synthesis*) y síntesis biomimética “funcional” (FBS, por sus siglas en inglés, *Functional Biomimetic Synthesis*). La primera hace referencia a la síntesis de nanomateriales o estructuras imitando los procedimientos y rutas sintéticas propios de sustancias y materiales naturales. La segunda, por el contrario, pretende replicar propiedades específicas de materiales, estructuras o sistemas naturales empleando diferentes sustancias y métodos⁹.

En este trabajo, nos centraremos en este segundo enfoque de la biomimética (FBS) con el propósito de sintetizar un nanotransportador basado en membranas celulares capaz de transportar un *cargo* sensible sin comprometer la integridad de este ni las propiedades de la membrana plasmática.

No obstante, existen en la actualidad múltiples líneas de investigación que persiguen este mismo objetivo empleando diferentes tipos de nanotransportadores biomiméticos. Entre ellos, destacan los hidrogeles, micelas, dendrímeros, liposomas, polimersomas y nanomembranas^{8,10}.

1.1.1. Hidrogeles

Los hidrogeles son materiales poliméricos hidrofílicos, de origen natural o artificial, que poseen una enorme capacidad de absorción de fluidos acuosos mientras permanecen en disolución gracias a la presencia de enlaces intercatenarios en su estructura¹⁰ (**Fig. 2**). Se trata de materiales blandos, flexibles, de porosidad modificable y biocompatibles,

lo que los convierte en perfectos transportadores de biomoléculas como proteínas o péptidos¹⁰. La liberación de *cargo* puede estar controlada por parámetros físicos como la absorción o la difusión, o químicos como la hidrólisis de las cadenas poliméricas¹¹.

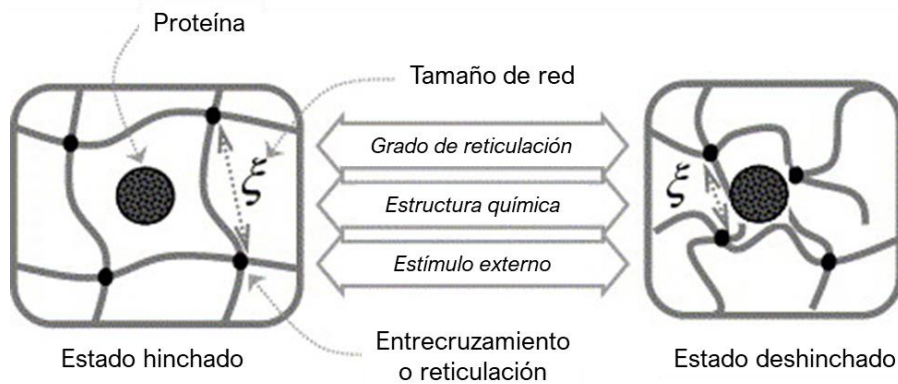


Figura 2: Cambio en la estructura química de un hidrogel desde la conformación de transporte de *cargo* a la liberación del *cargo* por alteraciones en las condiciones externas. Adaptado de ¹¹.

1.1.2. Micelas

Las micelas son estructuras formadas por componentes anfífilos y dotadas de un núcleo hidrofóbico y una pared externa hidrofílica^{8,10} (**Fig. 3**). El interior hidrofóbico permite encapsular y solubilizar fármacos hidrofóbicos, proteínas o material genético; mientras que la cara hidrofílica externa se encuentra en contacto con los fluidos biológicos acuosos¹⁰.

Actualmente se está llevando a cabo una intensa labor de investigación sobre las micelas poliméricas. Estas nanopartículas formadas por copolímeros de bloque autoensamblados, no solo son capaces de encapsular y transportar fármacos, sino también de modificarlos¹². Así, la estructura química de los copolímeros altera las características fisicoquímicas del *cargo*, la patofisiología de la enfermedad y el método de liberación del *cargo* según el fármaco en ubicaciones específicas¹⁰.

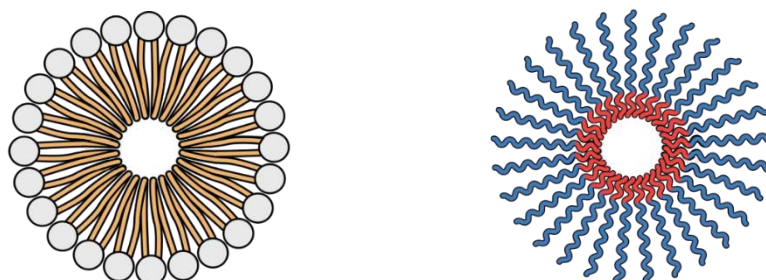


Figura 3: Representación esquemática de la estructura de una micela lipídica (izquierda) y una micela polimérica (derecha).

1.1.3. Dendrimeros

Los dendrimeros son polimeros sinteticos ramificados en forma arborescente con una alta funcionalidad y versatilidad^{10,13}. Están compuestos por un núcleo iniciador, generaciones o capas internas y una funcionalidad terminal asociada a la generación más externa¹³. Gracias a esta última y a la forma esférica de la molécula (**Fig. 4**), los dendrimeros son muy útiles para el transporte y entrega de fármacos, los cuales pueden ser encapsulados en el interior de la estructura o bien pueden adherirse a la superficie externa por interacción con los grupos funcionales^{10,14}.

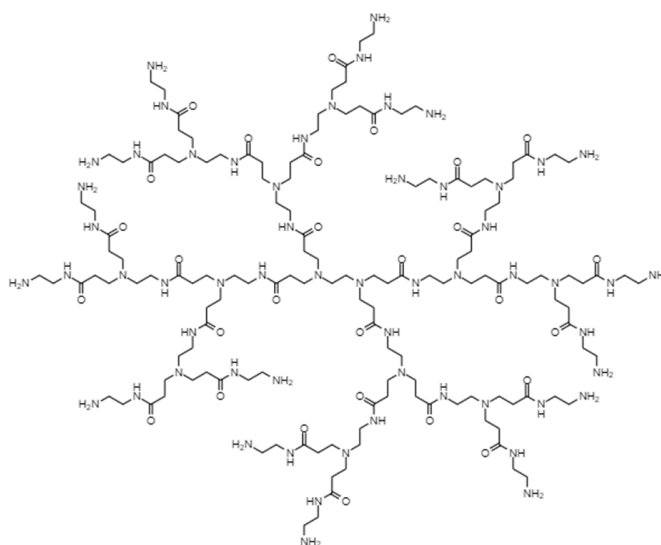


Figura 4: Estructura química de un ejemplo de dendrimer con aplicación en transporte de fármacos: dendrimer de poli(amidoamina) o PAMAM (generación 2).

1.1.4. Polimersomas

Los polimersomas son vesículas anfífilas sintetizadas artificialmente a partir del autoensamblaje de copolimeros de bloque¹⁵ (**Fig. 5**). A su vez, los copolimeros de bloque consisten en la agrupación de bloques de subunidades o monómeros diferentes a lo largo de la cadena polimérica.

Los polimersomas poseen propiedades interesantes para el transporte de fármacos entre las que destacan una fácil producción a nanoescala, una elevada capacidad de carga, permiten la descarga del contenido de forma controlada y son susceptibles de modificaciones químicas en su superficie gracias a los grupos funcionales terminales¹⁰. Además, bajo la elección adecuada de polimeros conformadores, los polimersomas han demostrado ser el sistema idóneo para la descarga de fármacos de forma continuada en el tiempo sin necesidad de administrar dosis sucesivas¹⁵.

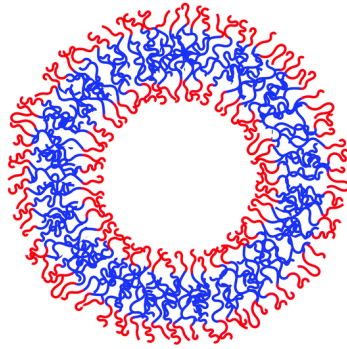


Figura 5: Representación esquemática de un polimersoma formado a partir de un copolímero de bloque. Las zonas coloreadas en azul o en rojo se corresponden con dos monómeros distintos. Adaptado de ¹⁶.

1.1.5. Liposomas

Los liposomas son vesículas formadas por lípidos naturales, en su mayoría fosfolípidos, que se autoensamblan para dar lugar a una bicapa esférica¹⁶ (**Fig. 6**). Dada su similitud en cuanto a composición con las membranas celulares, este tipo de nanotransportadores presenta una gran biocompatibilidad y una baja toxicidad, motivo por el cual son uno de los sistemas de transporte de fármacos más estudiados hasta la fecha⁸.

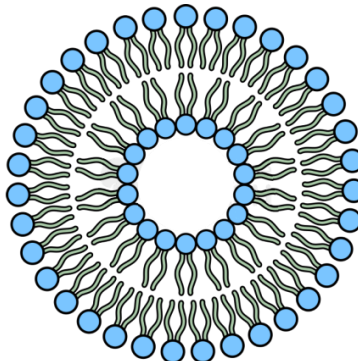


Figura 6: Representación esquemática de un liposoma formado por fosfolípidos. Los círculos azules representan las cabezas polares (zona hidrofílica) y las colas grises representan las cadenas de ácidos grasos (zona hidrofóbica).

Sin embargo, la fluidez característica de las membranas celulares disminuye considerablemente la estabilidad y retención de *cargo* de los liposomas, pudiendo llegar a sufrir importantes pérdidas en su contenido¹⁶. Para solucionarlo, se añaden diferentes moléculas a la bicapa lipídica que aportan las propiedades deseadas (ej.: mayor estabilidad, descarga dirigida hacia las células diana, etc.) en un proceso denominado “funcionalización”¹⁷.

1.1.6. Nanomembranas

Aunque la funcionalización de los liposomas mejora sustancialmente sus propiedades como nanotransportadores, estas no son comparables a las de una membrana celular original. Por este motivo, en los últimos años se han diseñado nuevos materiales biomiméticos empleando directamente las membranas biológicas originales¹⁸.

En este aspecto surgen los revestimientos de membrana celular o *cell membrane coating*, en inglés. Esta técnica permite revestir las nanopartículas de interés con la totalidad de las membranas plasmáticas de la línea celular en cuestión para optimizar la interacción de las nanopartículas con el medio biológico y mejorar así su biocompatibilidad¹⁸.

En 2011, Hu et al.¹⁹ revistieron, por primera vez, nanopartículas de copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) con membranas de glóbulos rojos (**Fig. 7**).

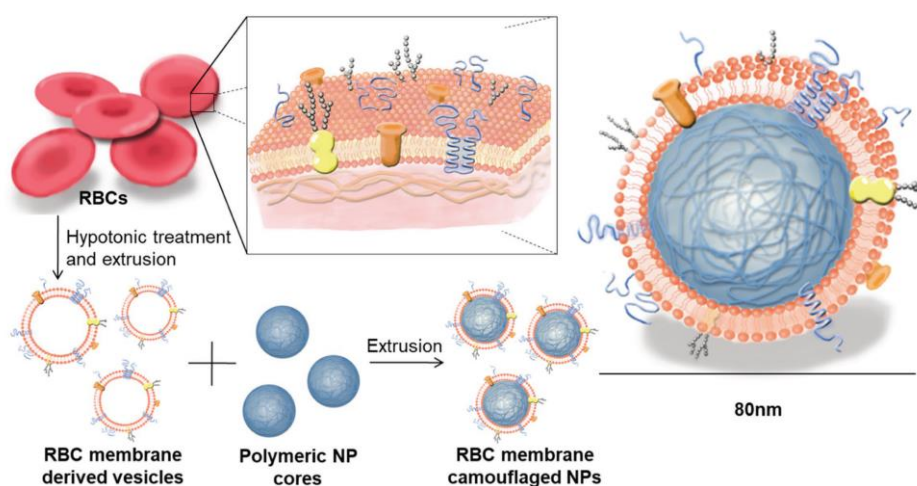


Figura 7: Proceso de revestimiento de nanopartículas de PLGA con membranas plasmáticas de glóbulos rojos sanguíneos. Adaptado de ¹⁹.

Los eritrocitos se caracterizan por presentar una larga esperanza de vida en humanos, una propiedad que está mediada por marcadores de superficie presentes en la cara externa de la membrana plasmática. Al revestir el núcleo polimérico con la membrana celular, la nanopartícula adquiere las funciones de la membrana, incluida la capacidad de interaccionar con el entorno. Tras inyectar las nuevas nanopartículas en ratones, se observó un notable aumento de la esperanza de vida en el torrente sanguíneo respecto a las nanopartículas sin revestimiento^{18,19}.

Estos experimentos fueron el inicio de una intensa investigación, que sigue hasta la fecha, sobre nanopartículas con diferentes tipos revestimiento de membranas celulares.

1.2. *Cellsomas* y sus aplicaciones

En 2020, Soprano et al.²⁰ plantean un nuevo material derivado de membranas celulares que denominamos *cellsomas* (**Fig. 8**). Estos nanotransportadores están formados a partir de membranas autoensambladas por extrusión, de modo que el transportador conserva las propiedades de la membrana celular²⁰.

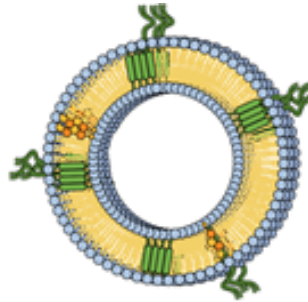


Figura 8: Representación esquemática de un *cellsoma* formado por ensamblaje de membranas celulares. Las estructuras coloreadas en verde representan proteínas de membrana mientras que las estructuras anaranjadas representan moléculas glucídicas.

En este primer trabajo, se observó que los *cellsomas* pueden ser fácilmente modificados mediante la adición de las moléculas de interés a la solución de membranas celulares antes de la extrusión. Además, demostraron que es posible la encapsulación de compuestos en el interior de los nanotransportadores y su posterior introducción en el interior de células vivas sin comprometer su integridad²⁰.

A raíz de estos resultados, el presente trabajo pretende explorar las posibles aplicaciones de los *cellsomas* como transportadores de compuestos biológicamente activos. Esta idea supone la dificultad añadida de mantener la funcionalidad del compuesto encapsulado. Es decir, la carga debe ser internalizada en su forma activa para producir una reacción en la célula.

Para este proyecto, se escogió el ácido desoxirribonucleico (ARN) como carga a encapsular por tratarse de una biomolécula que provoca importantes alteraciones de la expresión génica tras ser internalizado de forma exógena²¹.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La posibilidad de transportar material genético (ej.: ARNm) al interior celular ofrece innumerables aplicaciones médicas. Entre estas, destacan las terapias de reemplazamiento de proteínas e inmunoterapia contra el cáncer, las vacunas, la medicina regenerativa o la edición genómica. Este es el motivo por el cual existe en la actualidad una intensa actividad investigadora en el campo de la nanotecnología y los materiales biomiméticos. La búsqueda de nanotransportadores biomiméticos que permitan una entrega eficiente y segura de material genético exógeno en el interior celular sigue siendo uno de los mayores retos de la medicina moderna²².

Dentro de la misma línea, el objetivo de este trabajo es, en primer lugar, optimizar la encapsulación (en el interior de nanoestructuras biomiméticas que denominamos *cellsomas*) del ARN total proveniente de una línea celular distinta a la empleada para sintetizar los propios nanotransportadores; así como la posterior purificación de la suspensión de *nanocarriers* para eliminar cualquier resto celular o material genético que haya podido quedar sin encapsular.

En segundo lugar, se busca optimizar el proceso de internalización celular del contenido de los *cellsomas* para lograr una entrega efectiva y localizada del *cargo* en las células diana.

Para una óptima organización, se dividió el trabajo en cuatro tareas sucesivas de diferente duración, pudiendo variar entre un rango de pocas horas a pocos días. La gran diferencia temporal se debe a la adaptación experimental al ciclo de división celular de las líneas utilizadas. De este modo, aquellas tareas con una dependencia directa del cultivo celular (ej.: tarea 4), abarcaron un intervalo de tiempo mayor que aquellas en las que los componentes celulares ya habían sido extraídos previamente o, simplemente, no se requerían (ej.: tareas 1, 2 y 3).

Así, el plan de trabajo se corresponde con la siguiente distribución de tareas:

- **Tarea 1:** Síntesis y preparación de *cellsomas*
- **Tarea 2:** Caracterización de *cellsomas*
- **Tarea 3:** Encapsulación de *cargo* (dextrano y ARN total)
- **Tarea 4:** Interacción de *cellsomas* (con y sin *cargo*) con células en cultivo

Este procedimiento se repitió para cada réplica experimental.

3. METODOLOGÍA

3.1. Cultivo celular

Las líneas celulares escogidas para la realización de este trabajo fueron fibroblastos derivados de tejido pulmonar humano de origen fetal (MRC-5) y células troncales embrionarias de ratón (*mouse Embryonic Stem Cells* o mESCs, en inglés) *Adar* WT y *Adar* dKO (generadas en el grupo *Stem Cells and Human Diseases* del CiMUS, a través de la tecnología CRISPR/Cas9). Las primeras (MRC-5) fueron empleadas para la obtención de membranas celulares necesarias para la preparación de *cellsomas*. Las segundas, se utilizaron como fuente de material genético (ARN) que sería posteriormente encapsulado en el interior de los *cellsomas*.

De este modo, las células MRC-5 fueron cultivadas en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado con penicilina y estreptomina (50 U/mL) y suero bovino de origen fetal al 10% (FBS, por sus siglas en inglés *Fetal Bovine Serum*) (Gibco #10270106); bajo condiciones constantes de temperatura (37 °C) y presión de CO₂ (5%).

El cultivo y extracción del material genético de las células troncales embrionarias (ESCs) fue llevado a cabo previamente en las instalaciones del CiMUS. Por tanto, en lo que concierne a este trabajo, el ARN empleado se obtuvo en forma pura y liofilizado en agua.

3.2. Preparación de *cellsomas*

La síntesis de los *nanocarriers* a partir de membranas celulares se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Soprano et al.²⁰ utilizando células de la línea MRC-5 (fibroblastos derivados de tejido pulmonar humano de origen fetal) como fuente de membranas lipídicas.

3.2.1. Obtención de las membranas celulares

Una vez expandidas las células MRC-5 y habiendo alcanzado un 70-80% de confluencia (frasco T-175 con aproximadamente 12 millones de células), se procedió a levantar las células de la placa mediante adición de 2 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco #25200056) y posterior incubación durante 3 minutos. A continuación se cortó el efecto de la tripsina

por adición de 10 mL de medio de cultivo DMEM para, seguidamente, realizar al menos un lavado con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) (pH 7,4) (Gibco #14190094). En cada lavado fue necesaria la resuspensión de las células antes de proseguir con una centrifugación a $500 \times g$ durante 5 minutos. Tras el último lavado, el *pellet* fue resuspendido en 10 mL de una disolución 0,25× de PBS en agua y 100 μ L de un cóctel inhibidor de proteasas (PIC, por sus siglas en inglés, *Protease Inhibitor Cocktail*) (Pierce protease inhibitor mini #A32953) para luego ser sometido a un baño de hielo durante 10 minutos (**Fig. 9**). La reducción en la concentración de sales del tampón fisiológico somete a las células a un primer choque osmótico e inicia el proceso de lisis celular. Por su parte, la adición de PIC es necesaria para evitar la degradación de las proteínas de membrana en caso de que se liberen proteasas del interior celular al medio como consecuencia de la citólisis. Además, la bajada de temperatura debido al baño de hielo contribuye en la reducción de la actividad enzimática de las proteasas.

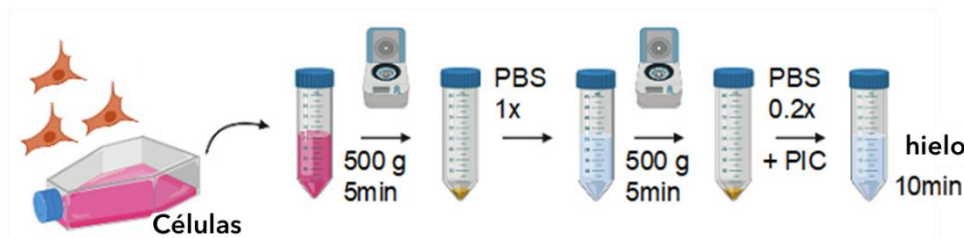


Figura 9: Representación esquemática del proceso de separación de las membranas de los restos celulares. Tras la recolección y lavado de las células se realizaron dos centrifugaciones sucesivas para obtener los componentes de las membranas celulares.

A continuación, se prosiguió con la rotura de las membranas celulares mediante cuatro ciclos de congelación-descongelación alterna utilizando nitrógeno líquido ($-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y baño de agua ($37 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (**Fig. 10**). El alto contraste de temperaturas provoca la lisis térmica complementaria a la presión osmótica generada por la entrada de agua en la célula en presencia del tampón hipotónico (PBS 0,25×). En cada ciclo, las células fueron congeladas en nitrógeno líquido durante 1 minuto para luego ser descongeladas durante 10 minutos en un baño de agua. Para finalizar la lisis, las células se sumergieron en un baño con sonicación durante 5 minutos (*VWR ultrasonic cleaner USC-TH*).

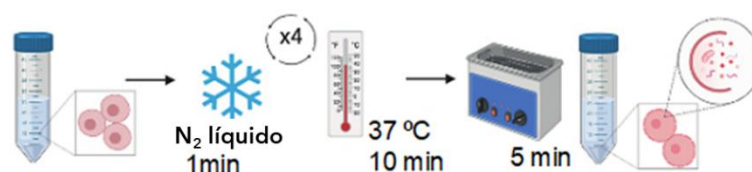


Figura 10: Representación esquemática del proceso de lisis celular mediante el método de congelación-descongelación. El proceso se compone de 4 ciclos de congelación de las células en nitrógeno líquido y descongelación posterior en baño a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se completa la lisis con sonicación.

Como método de purificación de las membranas lipídicas se llevaron a cabo una secuencia de centrifugaciones sucesivas. En primer lugar, la suspensión celular fue centrifugada a $700 \times g$ durante 10 minutos a 4°C para descartar los núcleos celulares y los componentes más pesados de la célula, así como cualquier célula restante sin lisar. A continuación, el sobrenadante fue recogido y centrifugado a $15\,000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C para precipitar los restos de membranas celulares de interés. Como resultado, se obtuvo un *pellet* con las membranas lipídicas citoplasmáticas intactas.

3.2.2. Formación de los *cellsomas*

Las membranas fueron resuspendidas en 1 mL de PBS para a continuación ser sometidas a 10 ciclos de extrusión (**Fig. 11**). La extrusión es un proceso de moldeado de materiales basado en la presión. En la síntesis de nanomateriales, el material se hace pasar a través de una membrana con poros de tamaño nanométrico, permitiendo controlar parámetros como el tamaño, forma y estructura de las nanopartículas resultantes²³.

En este trabajo, se utilizó el mini extrusor Avanti® con membranas de policarbonato de 800 nm de tamaño de poro. Según el protocolo inicial, eran necesarios al menos 7 ciclos de extrusión para obtener una suspensión monodispersa de nanopartículas. Sin embargo, gracias a la previa optimización del proceso de síntesis de *cellsomas*, se vio que la suspensión alcanzaba mejores índices de dispersión tras 10 ciclos de extrusión.

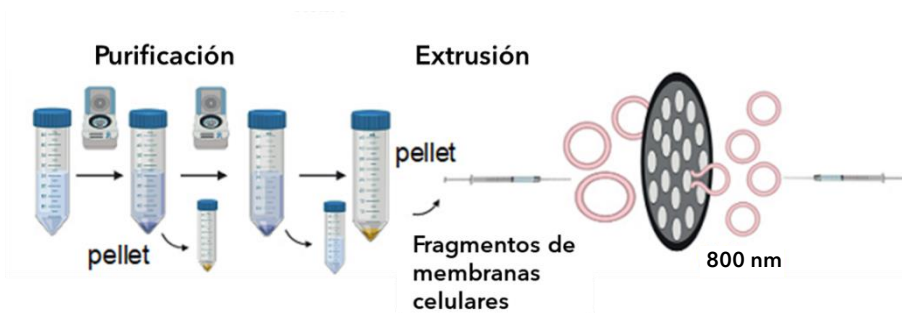


Figura 11: Representación esquemática de los procesos de purificación y extrusión de las membranas celulares para formar una suspensión monodispersa de *cellsomas*. Tras la purificación de las membranas mediante centrifugaciones sucesivas, la suspensión se realizaron 10 ciclos de extrusión haciendo pasar las membranas celulares a través de una membrana porosa de 800 nm de diámetro de poro.

3.3. Funcionalización de *cellsomas*

La composición de la membrana de los *cellsomas* se puede modificar añadiendo lípidos de manera exógena. En este trabajo, se añadió el fosfolípido DOPE (del inglés *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoetanolamine*) previamente modificado con un marcador de fluorescencia verde Atto488 (Sigma-Aldrich #67335) y el fosfolípido DOTAP (del inglés *1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane*) (Avanti #890895P) (**Fig. 12**).

Para ello, a una suspensión de *cellsomas* (1 mL), se añadieron 1 μ L de una solución de 10 mg/mL de DOTAP en cloroformo y 20 μ L de una solución stock de 1 mg/mL de DOPE marcado con Atto488 en diclorometano. A continuación, se mezcló bien el conjunto y se sonicó durante 5 minutos. Una vez homogeneizada la mezcla, se siguió el protocolo original y se realizaron 10 ciclos de extrusión utilizando un Avanti® mini Extruder con una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 800 nm para reducir la polidispersidad de la muestra.

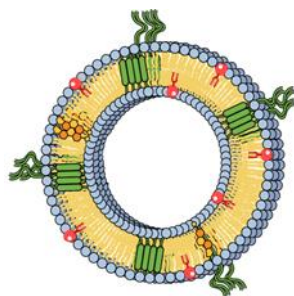


Figura 12: Representación esquemática de un *cellsoma* marcado por fluorescencia con DOPE-Atto488.

3.4. Encapsulación de *cargo*

Con el fin de encapsular diversas moléculas en el interior de los nanotransportadores, se llevó a cabo una segunda incubación de los *cellsomas* ya funcionalizados con el *cargo* a introducir, para después continuar con el protocolo de síntesis inicial.

3.4.1. Dextrano

Se incubaron 100 μ g de dextrano-RITC (en inglés, *Rhodamine B isothiocyanate – Dextran*) (Sigma-Aldrich #R9379) con 750 μ L de una suspensión de *cellsomas* en PBS durante una hora. A continuación, se sonicó la mezcla durante 5 minutos y se sometió a 10 ciclos de extrusión utilizando un Avanti® mini extruder con una membrana de policarbonato de tamaño de poro 800 nm.

3.4.2. ARN total

Para encapsular las muestras de ARN total previamente extraído de mESCs, se incubaron durante una hora los correspondientes extractos de material genético (**Tabla 1**) con 1 mL de suspensión de *cellsomas*. Todos los experimentos se hicieron en paralelo con extractos de ARN proveniente de células mESC *Adar* WT y ARN proveniente de células mESCs *Adar* dKO. Seguidamente, ambas mezclas (WT y dKO) fueron sometidas a 10 ciclos de extrusión utilizando un Avanti® mini extruder y una membrana de policarbonato de 800 nm de tamaño de poro.

<i>Muestras Exp. 1</i>	<i>Concentración (ng/μL)</i>	<i>Volumen usado (μL)</i>
<i>ARN WT</i>	4693,5	31
<i>ARN dKO</i>	2741,9	31

<i>Muestras Exp. 2</i>	<i>Concentración (ng/μL)</i>	<i>Volumen usado (μL)</i>
<i>ARN WT</i>	3995,4	35
<i>ARN dKO</i>	3868,0	35

Tabla 1: Concentración y volumen usado de los extractos de ARN proveniente de células mESCs *Adar* WT y ESCs *Adar* dKO. El experimento 1 señala los extractos de ARN empleados en experimentos con tiempos de incubación largos como 24h, 48h y 72h; mientras que el experimento 2 señala los extractos utilizados en experimentos de tiempos de incubación cortos como 3h y 6h.

3.5. Purificación de *cellsomas*

Tras la funcionalización y/o encapsulación de *cargo*, fue necesario un paso de purificación de la suspensión final de *cellsomas* con el fin de eliminar cualquier resto de moléculas no incorporadas a la membrana de la nanopartícula, o bien, no encapsuladas por la misma. El método de purificación escogido fue la filtración centrífuga.

Para ello, se utilizaron filtros de centrifuga de 100 KDa (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, #UFC910024) siguiendo los pasos descritos a continuación. En primer lugar, los filtros fueron lavados con 500 μL de PBS y centrifugados a 10 000 × g y 4 °C durante 5 minutos. El filtrado se descartó. Seguidamente, se añadió al filtro un volumen de 500 μL de la suspensión de *cellsomas* con el *cargo* encapsulado y se centrifugó a 6 000 × g y 4 °C durante 5 minutos. El filtrado con el *cargo* no encapsulado se guardó para análisis posteriores. Sobre el concentrado se añadió más muestra para repetir la centrifugación a 6 000 × g y 4 °C durante 5 minutos. Se repitió el paso de centrifugación hasta que se hubo filtrado la totalidad del volumen de muestra. Una vez terminada la muestra, se lavó

el concentrado con 500 μL de PBS y se centrifugó a $6\,000 \times g$ y $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. El filtrado de lavado se descartó y el concentrado total correspondiente a la suspensión pura de *cellsomas* con *cargo* encapsulado se guardó para su posterior caracterización y uso en experimentos de internalización celular.

3.6. Caracterización de *cellsomas*

La caracterización de los *cellsomas* se llevó a cabo teniendo en cuenta diferentes parámetros fisicoquímicos como el tamaño de las partículas formadas, la concentración y dispersión de la suspensión, la cantidad de proteína presente en las membranas o la fluorescencia emitida en caso de que las nanopartículas hubieran sido marcadas por fluorescencia.

3.6.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés *Nanoparticle Tracking Analysis*) es una técnica que combina la espectroscopía de dispersión de luz láser con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés *charge-coupled device*) que permite visualizar y grabar las partículas en suspensión. El equipo es capaz de analizar individualmente el movimiento Browniano de cada partícula para medir con precisión su tamaño entre 30 y 1000 nm. La relación entre el movimiento y el tamaño de partícula viene dada por la ecuación de Stokes-Einstein (**Ec. 1**)²⁴:

$$\overline{(x, y)^2} = \frac{2k_B T}{3r_h \pi \eta}$$

Ecuación 1: Ecuación de Stokes-Einstein que relaciona el movimiento de una partícula con su tamaño. En ella, $\overline{(x, y)^2}$ es la media de la velocidad de la luz al cuadrado de la partícula a una temperatura T , en un medio de viscosidad η y con un radio hidrodinámico r_h ; k_B es la constante de Boltzman.

De este modo, se utilizó el dispositivo *NanoSight NS300 (Malvern Instruments, UK)* equipado con un láser de 488 nm de longitud de onda, una cámara sCMOS (en inglés, *scientific complementary metal oxide semiconductor*) y una bomba de inyección para medir las muestras. La suspensión de *cellsomas* fue diluida hasta 1:1000 en agua milli-Q filtrada (filtro de 200 nm) para dar un volumen total de 1 mL de muestra a insertar en la cámara de medición con una velocidad de flujo de 50. Las mediciones fueron llevadas

a cabo mediante la toma de 3 vídeos de 60 segundos por muestra. Los datos obtenidos fueron analizados con el software de *NanoSight NS300* (10-100 partículas/fotograma).

3.6.2. Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*) es una técnica que permite medir el tamaño hidrodinámico de las partículas de una suspensión, así como la estabilidad coloidal y polidispersidad de la misma²⁵. Su funcionamiento está basado en la interacción de la luz con las partículas del coloide, de manera que un haz de luz láser se ve dispersado en un ángulo θ al atravesar la muestra (Fig. 13)²⁶. A continuación, la luz dispersada es recogida en un detector para llevar a cabo un análisis de la variación de la intensidad de luz frente al tiempo. Como resultado, se obtienen estimaciones del tamaño hidrodinámico de las partículas y de la estabilidad coloidal^{26,27}.

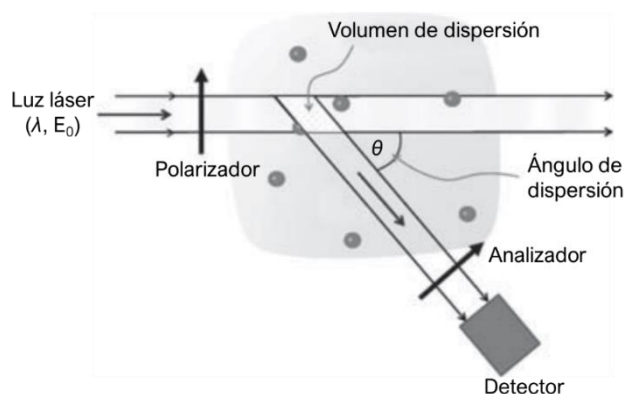


Figura 13: Vista superior de un montaje de DLS. La mayor parte de la luz de entrada pasa a través de la muestra inalterada mientras que una pequeña fracción es dispersada y cae sobre un pequeño detector. Adaptado de ²⁶.

Los *cellsomas* fueron caracterizados por dispersión de luz dinámica (DLS) antes de su funcionalización con lípidos marcados por fluorescencia. Las muestras se analizaron en medio a pH fisiológico 7,4 (PBS) y 37° usando el equipo *DLS Malvern Zetasizer Nano ZSP* (*Malvern Instrument Ktd.*) dotado de un láser de He-Ne 10 mW con longitud de onda 633 nm y un ángulo de dispersión θ fijo de 173°.

3.6.3. Ensayo Bradford

El ensayo Bradford es un método de cuantificación proteica por colorimetría muy útil en muchas áreas de la biología y bioquímica. Esta técnica permite analizar la cantidad de

proteína de una muestra de forma rápida y sencilla mediante el uso de un marcador *Coomassie Brilliant Blue G-250*²⁸. Este interacciona con los aminoácidos y provoca un cambio en el máximo de absorción (de 465 nm a 595 nm) que altera el color de la solución (rojo, en ausencia de proteína; y azul, en presencia de proteína)^{28,29}. La cantidad de proteína se calcula mediante regresión lineal a partir de una recta de calibrado de la proteína³⁰.

En este trabajo, se realizó un ensayo Bradford sobre las proteínas de membrana como parte de la caracterización inicial de los *cellsomas*. Para ello se utilizó el kit *Pierce Coomassie Plus Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, #23236) y se midió la absorción de las muestras a 570 nm en un lector de placas (Infinite 200 PRO, Tecan).

Las 5 diluciones analizadas se prepararon sobre una placa de 96 pocillos con los volúmenes indicados en la **Tabla 2**:

Dilución muestra	0	1:1000	1:50	1:20	1:10	1:5
Vol. muestra (μL)	0	1,5	3	7,5	15	30
Vol. agua (μL)	150	148,5	147	142,5	135	120
<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> (μL)	150	150	150	150	150	150
Vol. Total (μL)	300	300	300	300	300	300

Tabla 2: Volúmenes de reactivos empleados para preparar las diluciones analizadas por colorimetría.

Tras añadir el reactivo *Coomassie Brilliant Blue G-250*, se dejaron reposar las muestras en oscuridad durante 10 minutos antes de medir la absorbancia a 570 nm en el lector de placas (Infinite 200 PRO, Tecan).

3.6.4. Espectroscopía de fluorescencia

Se tomaron medidas de la emisión verde del marcador asociado a fosfolípidos de la membrana de los nanoportadores mediante espectroscopía de fluorescencia usando un lector de placas (Infinite 200 PRO, Tecan). El marcador en cuestión, Atto488 (cuyo máximo de absorción se encuentra a 488 nm), se encuentra unido a un fosfolípido DOPE para una fácil inserción en la membrana de los *cellsomas* durante el paso de extrusión en el proceso de síntesis. La intensidad de fluorescencia se midió a una longitud de onda de 530 nm tras la excitación de la muestra a 485 nm.

En el caso de las muestras de *cellsomas* con *cargo*, se midió, además, la fluorescencia de los marcadores fluorescentes asociados a las moléculas encapsuladas. De este modo, se midió la emisión (a 610 nm) de la suspensión de *nanocarriers* con dextrano-RITC tras la excitación a 560 nm (máximo de absorción de la Rhodamina). Las muestras de filtrado guardadas en el paso de purificación también fueron también analizadas y todos los resultados se compararon con una recta de calibrado del compuesto fluorescente aislado (dextrano-RITC).

De igual forma, se midió la fluorescencia de las muestras de *nanocarriers* con ARN WT o dKO encapsulado. En este caso, se midió la fluorescencia (tras la filtración centrífuga) de los concentrados (*cellsomas* con ARN) y filtrados (ARN sin encapsular) obtenidos, en presencia del marcador fluorescente de ARN “LUCS13, Lumiprobe” (500 nM) bajo una excitación de 485 nm. Se realizó una curva de calibrado 10 µL de ambos extractos de ARN puros. En el caso de *cellsomas* con ARN encapsulado, fue necesario realizar un blanco con *cellsomas* vacíos debido a la superposición de la emisión fluorescente de LUCS13 con la emisión de los marcadores lipídicos asociados a las membranas de los *cellsomas* (Atto488).

3.7. Internalización celular

3.7.1. Duración del tratamiento

En un primer experimento, y con el fin de determinar el tiempo de incubación y la dosis óptimos de *nanocarriers* en cultivo celular, se sembraron 50 000 células MRC-5 por pocillo en una placa de 24 pocillos en medio DMEM y se cultivaron a 37 °C y 5% CO₂. En duplicados, se incubaron las células en presencia de 3 dosis distintas de *cellsomas* vacíos marcados con fluorescencia (DOPE-Atto488) durante 4 intervalos de tiempo diferentes. Además, se dejaron 2 pocillos sin tratar a modo de control (**Fig. 14**):

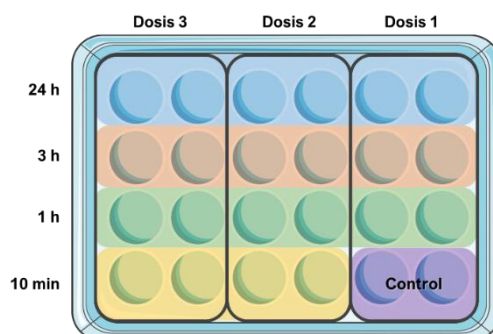


Figura 14: Representación esquemática de la distribución de las distintas condiciones sobre la placa de 24 pocillos.

- **Dosis 1:** 500 *cellsomas* por célula
- **Dosis 2:** 5 000 *cellsomas* por célula
- **Dosis 3:** 50 000 *cellsomas* por célula
- **Tiempo 1:** 24 horas
- **Tiempo 2:** 3 horas
- **Tiempo 3:** 1 hora
- **Tiempo 4:** 10 minutos

Transcurrido el tiempo necesario, se retiró el medio de los pocillos y se lavaron con 500 μ L de PBS. A continuación, se añadieron 75 μ L de tripsina-EDTA en cada pocillo y se incubaron durante 2 minutos para luego cortar el efecto de la tripsina con 150 μ L de PBS. Las muestras de células en suspensión (aprox. 200 μ L) se pasaron a una placa de 96 pocillos para medir la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo (Guava EasyCyte HR *Flow cytometer*).

3.7.2. Incubación post-tratamiento

Una vez establecidos la dosis y el tiempo de tratamiento celular óptimo en presencia de *cellsomas*, se llevaron a cabo una serie de experimentos de internalización de ARN en las células con el fin de estimar el intervalo de tiempo de espera entre la aplicación del tratamiento con *cellsomas* y la ejecución de una reacción de respuesta frente al ARN exógeno por parte de la célula.

En estos experimentos, se escogió una dosis de 100 000 *cellsomas* por célula para tratar aproximadamente un total de 30 000 células por pocillo. Los *cellsomas* funcionalizados, caracterizados y con el *cargo* correspondiente encapsulado (ARN WT, ARN dKO o vacíos), fueron incubados durante una hora con células MRC-5 en las proporciones indicadas. A continuación se retiró el medio con *cellsomas* y se añadió medio fresco DMEM para realizar una segunda incubación de las células de duración variable (3h, 6h, 24h, 48h y 72h). Concluidos los diferentes tiempos de incubación, las células fueron recolectadas: se retiró el medio de cultivo, se añadió el volumen correspondiente de tripsina-EDTA (según el volumen del pocillo) y se incubaron las células durante 3 minutos. A continuación se cortó la acción de la tripsina con 3 veces el volumen de medio de cultivo que de tripsina y se precipitaron las células por centrifugación. Por último, el medio de cultivo fue aspirado y los *pellets* se resuspendieron en 350 μ L de TRK *Lysis Buffer* (Omega Bio-Tek #PR021) con el fin de lisar las células para llevar a cabo el consiguiente análisis de expresión génica por RT-qPCR en las facilidades del CiMUS.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La internalización celular de agentes exógenos puede resultar muy compleja según las características y propiedades que estos posean. En concreto, algunas características fisicoquímicas del compuesto a introducir, como el tamaño, resultan claves en la capacidad del mismo para atravesar la membrana celular y llegar al citosol³¹. En este trabajo, proponemos el uso de *cellsomas* (nanotransportadores biomiméticos sintetizados a partir de la membrana plasmática de las células diana) para facilitar el paso de moléculas grandes e inestables como el ARN al interior celular.

La ventaja de los *cellsomas* frente a otros sistemas de transporte similares, como los liposomas, radica en la composición del propio nanotransportador. Mientras que los liposomas son sintetizados de manera artificial en el laboratorio a base de fosfolípidos y colesterol¹, los *cellsomas* están formados a partir de membranas celulares intactas de origen natural. De esta forma, los *cellsomas* conservan todos los componentes de las membranas biológicas originales y, por tanto, conservan también las propiedades asociadas a estas, como son la regulación de la señalización celular, del transporte o la respuesta inmune²⁰.

La capacidad de reconocimiento de otras células del mismo tipo y la adhesión célula-célula resultan de gran interés para este trabajo y serán clave en los experimentos de internalización celular.

4.1. Síntesis de *cellsomas* a partir de células MRC-5

El proceso de síntesis de los *cellsomas* consta de cuatro pasos fundamentales ya descritos en la sección de metodología: cultivo celular de las células donantes, obtención de las membranas plasmáticas, extrusión y purificación.

La línea celular de fibroblastos humanos MRC-5 (por sus siglas en inglés, *Medical Research Council – 5*) fue escogida como donadora de membrana y, a su vez, como células diana en los experimentos posteriores de internalización celular. Estas células, de forma estrellada y alargada (**Fig. 15**), fueron cultivadas en condiciones estándar (37 °C y 5% CO₂) para ser posteriormente lisadas para ser utilizadas como fuente de membranas en la síntesis de *cellsomas* (**Fig. 9**).

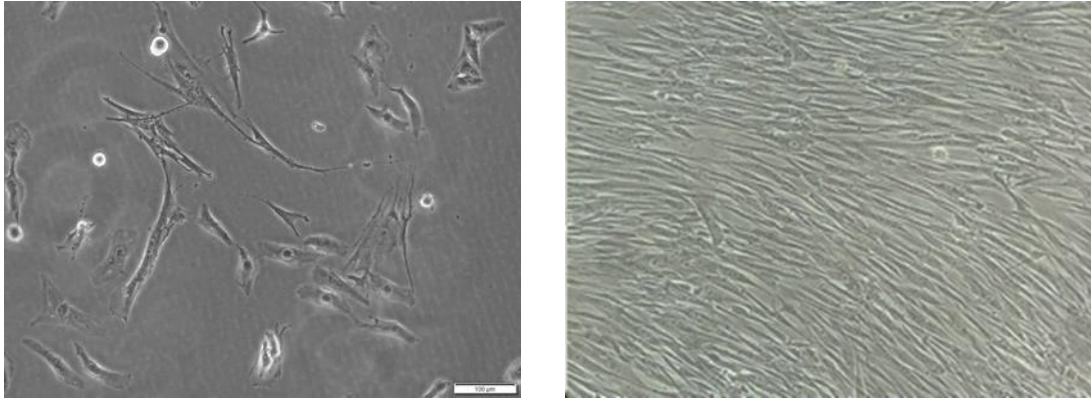


Figura 15: Imágenes representativas en campo claro de los fibroblastos MRC-5. Izquierda: células a baja confluencia. Derecha: células a alta confluencia.

Con el fin de aislar las membranas plasmáticas, se provocó la lisis celular mediante la alteración de la presión osmótica y del equilibrio térmico de las células. De este modo, la exposición celular a un tampón hipotónico como PBS 0,25% generó una elevada presión osmótica causada por la entrada de agua hacia el interior de las células. A continuación, los cambios extremos de temperatura provocaron la congelación y descongelación brusca de los componentes celulares, que resultó en la lisis celular y la liberación de los componentes celulares al medio con la ayuda de una breve sonicación (**Fig. 10**). Las membranas plasmáticas fueron entonces separadas por centrifugación y extrusadas utilizando un mini extrusor Avanti® para dar lugar a los *cellsomas* listos para su uso (**Fig. 11**). La extrusión es un paso clave en la síntesis de sistemas coloidales como el estudiado en este trabajo, pues permite no solo fijar el tamaño de partícula por debajo de 1 micrómetro (0,000001 metros), sino obtener sistemas coloidales homogéneos y con un bajo índice de polidispersidad.

El índice de polidispersidad (Pdl) es un indicador de la homogeneidad en cuanto al tamaño de partícula de una suspensión coloidal. Sin embargo, la polidispersidad de una muestra puede ser debida a una gran variación entre los tamaños de partículas de la muestra o a la formación de agregados durante el proceso de síntesis de o de caracterización. Según las ISOs (*del inglés, International Standards Organizations*) se ha establecido que las muestras monodispersas presentan un índice Pdl $<0,05$ (ISO 22,412:2017) mientras que las muestras polidispersas presentan un índice Pdl $>0,7$ (ISO 22,412:201)³². De este modo, cuanto mayor sea el valor de Pdl, mayor será la polidispersidad.

La importancia del tamaño de las partículas recae en sus múltiples aplicaciones en medicina. Los *nanocarriers* o nanotransportadores son sistemas de transporte a nivel molecular que permiten internalizar un compuesto de interés en la célula diana de manera mucho más “sencilla” y precisa que el paso de la molécula por sí misma a través de la membrana plasmática (en caso de que la entrada sea posible). Por tanto, un menor tamaño del transportador supone una gran ventaja a la hora de controlar la dosis del compuesto administrado a la célula, pues sería posible encapsular una sola molécula por transportador. Asimismo, un mayor tamaño dificultaría el movimiento de la partícula en condiciones *in vivo* y podría quedar bloqueado en su ruta hacia la célula diana pudiendo llegar a impedir la entrega del compuesto.

4.2. Caracterización inicial de *cellsomas*

Es importante realizar una exhaustiva caracterización de la suspensión de nanopartículas para conocer detalladamente las características y propiedades del nanomaterial sintetizado. En este trabajo, se llevaron a cabo diferentes técnicas que permitieron obtener información en cuanto a la estabilidad y homogeneidad del coloide, al tamaño promedio de las partículas, la concentración de partículas en la muestra o la cantidad de *cargo* encapsulado (si procede).

4.2.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

Como se ha descrito en la sección 3.6.1. del apartado “Metodología”, la técnica de NTA resulta muy útil para tomar medidas precisas de la concentración de partículas en la muestra, así como la estimación de un valor promedio del tamaño de partículas.

Para analizar las muestras por NTA fue necesario una primera dilución de la muestra hasta 1:1000 en 1 mL de agua milli-Q filtrada debido a la elevada sensibilidad del equipo.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para una muestra de *cellsomas* vacíos sintetizados a partir de membranas plasmáticas de células MRC-5 (**Fig. 16**).

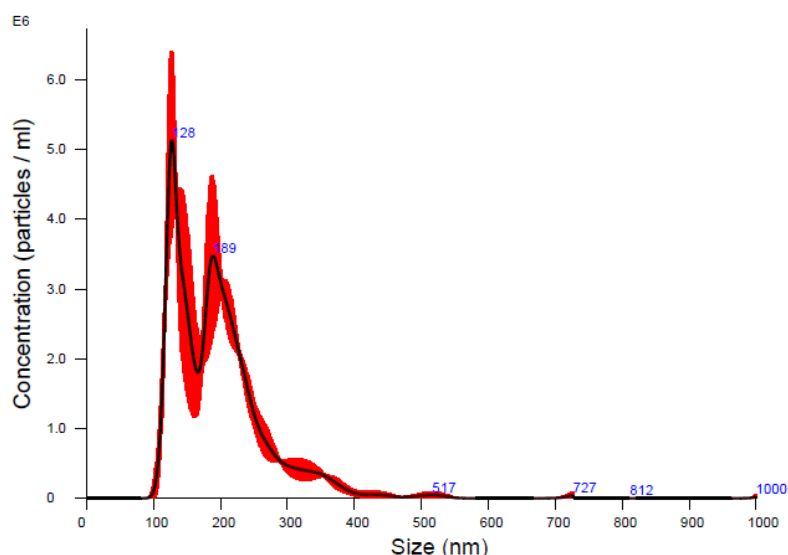


Figura 16: Representación gráfica de la concentración (partículas/mL) frente a la distribución de tamaños de partícula (nm).

Se obtuvo un valor de tamaño medio de las partículas de $195,8 \pm 2,5$ nm y una concentración de partículas en la muestra de $(4,61 \pm 0,066) \times 10^{11}$ partículas/mL. Por tanto, la muestra presenta un tamaño de partícula entre 100 y 200 nm a concentraciones muy elevadas, lo cual nos permite ser optimistas en cuanto a potenciales aplicaciones médicas.

4.2.2. Dispersión de luz dinámica (DLS)

La técnica DLS proporciona información relevante acerca del tamaño hidrodinámico promedio ponderado (*Z-Average*) de las partículas, así como el índice de polidispersidad (*Pdl*) y la distribución de diámetros hidrodinámicos según la intensidad (*Intensity mean*) o el número (*Number Mean*).

Tras analizar tres réplicas de la muestra anterior por DLS se obtuvieron los siguientes resultados (**Tabla 3**):

	<i>Z-Average (nm)</i>	<i>Pdl</i>	<i>Intensity Mean (nm)</i>	<i>Number Mean (nm)</i>
<i>Media</i>	107,3	0,157	128,8	50,82
<i>SD</i>	2,15	0,03	3,667	18,39

Tabla 3: Resultados del diámetro hidrodinámico medio para las distribuciones de dispersión de luz dinámica (DLS) en número, intensidad e intensidad ponderada (Z-Average), así como el índice de polidispersidad (Pdl). Los datos de la tabla se corresponden con la media de 3 mediciones de la muestra. La desviación estándar (SD) se calculó para las tres réplicas (n=3).

Estos resultados indican que la muestra presenta un tamaño de partículas esperado (100 – 200 nm) y que se corresponde con las anteriores mediciones por NTA. Además, el bajo índice de polidispersidad (<0,2) indica una elevada homogeneidad de la muestra en cuanto a tamaño de partículas (la muestra es monodispersa).

4.2.3. Ensayo Bradford

Con el fin de cuantificar la cantidad de proteína presente en las membranas de los *cellsomas*, se llevó a cabo un ensayo Bradford de la muestra utilizando el colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (**Fig. 17**). En presencia de proteína, este compuesto sufre un cambio en su máximo de absorción y el color de la solución vira de rojo a azul.

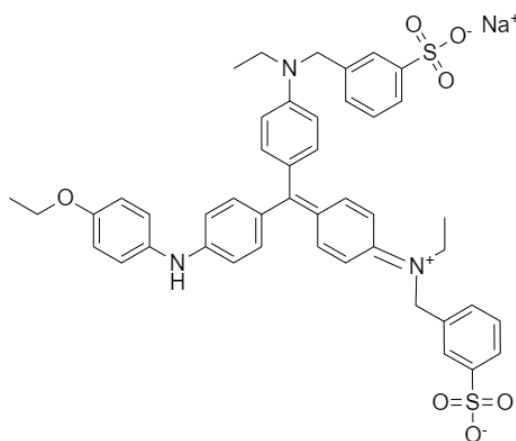


Figura 17: Estructura molecular del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

Para realizar la prueba se prepararon 5 diluciones de una suspensión de *cellsomas* y se midió la absorción a 570 nm por triplicado. Se realizó una curva de calibrado estándar utilizando una solución de proteína albúmina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) de concentración conocida 2 mg/mL con el fin de establecer una relación entre la cantidad de proteína presente en las membranas celulares (**Fig. 18**).

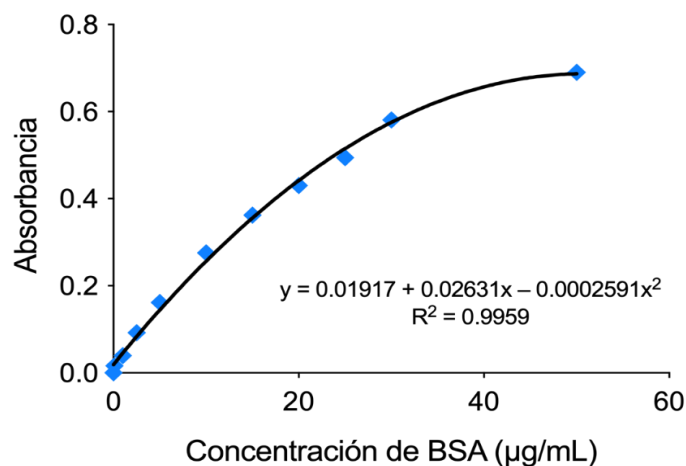


Figura 18: Curva de calibrado de absorción para una solución stock de 2 mg/mL de proteína BSA.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4**.

Dilución	Cellsomas/mL	Absorbancia \pm SD	Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)
1:100	20613,32	0,289 \pm 0,004	11,58
1:50	41226,65	0,300 \pm 0,004	12,12
1:20	103066,62	0,329 \pm 0,002	13,59
1:10	206133,24	0,372 \pm 0,004	15,9
1:5	412266,59	0,437 \pm 0,001	19,71

Tabla 4: Resultados obtenidos en el ensayo Bradford para calcular la concentración de proteína de una suspensión de cellsomas. La concentración de las diluciones en *cellsomas*/mL se calculó utilizando el valor de concentración de la muestra original obtenido por NTA ($4,61 \times 10^{11}$ *cellsomas*/mL) y el volumen empleado para preparar cada dilución (Tabla 2). Los valores de absorbancia se dan con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de los resultados obtenidos para cada triplicado de las diluciones ($n=3$). El cálculo de concentración de proteína se realizó empleando la ecuación obtenida en la curva de calibrado de la proteína BSA.

Como cabe esperar, se observó una relación directa entre la cantidad de membranas y la cantidad de proteína por muestra, pues a medida que aumenta la concentración de *cellsomas* en la muestra, también lo hace la concentración de proteína.

4.3. *Cellsomas* funcionalizados con un fluoróforo

Para los estudios de interacción con células se funcionalizaron las membranas de los *cellsomas* añadiendo los fosfolípidos DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano) (10 μL) y DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) (20 μL) marcado con el fluoróforo verde Atto488 antes del paso de extrusión en la síntesis de las nanopartículas.

El resto de la síntesis se llevó a cabo siguiendo el protocolo habitual. Tras la purificación por filtración centrífuga, el concentrado se guardó para su caracterización por espectroscopía de fluorescencia (**Tabla 5**) y NTA (**Fig. 19**).

<i>Cellsomas-DOPE-Atto488</i>	<i>Agua milli-Q (blanco)</i>
42272	197

Tabla 5: Resultados de intensidad de fluorescencia registrados para la muestra de cellsomas funcionalizados frente a un blanco con el disolvente en que se encuentran (agua milli-Q).

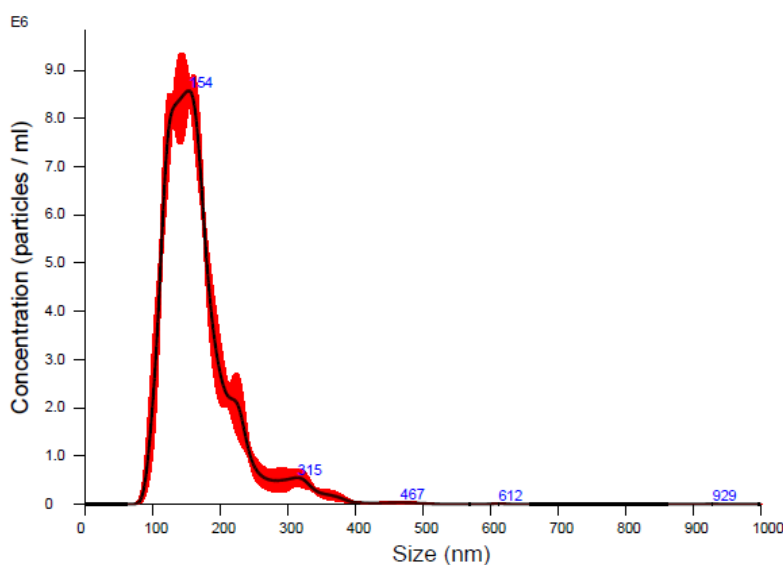


Figura 19: Distribución de la concentración de partículas (partículas/mL) respecto al tamaño de partícula (nm) de una muestra de *cellsomas-DOPE-Atto488* de células MRC-5. La gráfica muestra los valores promedio calculados a partir del análisis de 3 vídeos de 60 segundos cada uno. Dilución de la muestra 1:1000.

Tras ajustar los resultados a la dilución inicial, se obtuvo una concentración de partículas de $(8,02 \pm 0,31) \times 10^{11}$ partículas/mL y un tamaño medio de partícula de $167,5 \pm 1,6$ nm. El tamaño medio de partícula es similar a los obtenidos en experimentos anteriores, por lo que podemos afirmar que la presencia de fosfolípidos marcados no afecta al tamaño de los *cellsomas*.

4.4. Encapsulación de dextrano como molécula modelo

En un primer experimento de encapsulación de *cargo* se escogió como molécula modelo una estructura polimérica compleja por analogía con la del polímero natural que se pretende encapsular en última instancia, el ARN. El polímero modelo en cuestión, el dextrano, es un polisacárido ramificado formado por un número variable de moléculas de glucosa unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow6)$ y con ramificaciones en enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ (**Fig. 20**)³³.

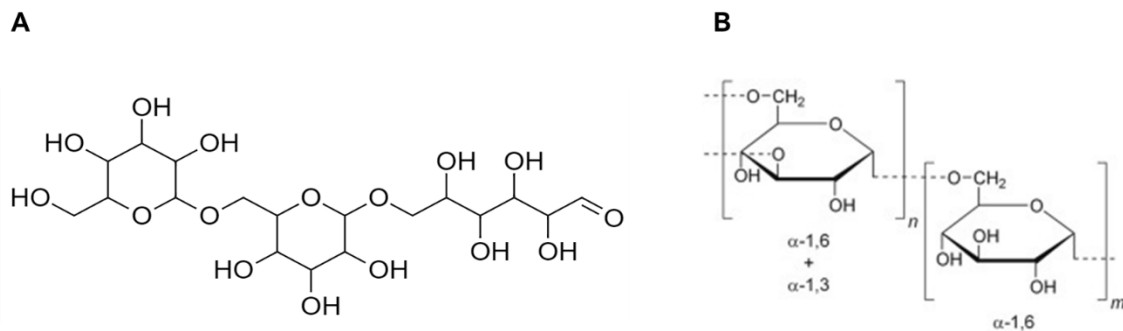


Figura 20: Representaciones estructurales del polisacárido dextrano. A. Estructura de una molécula de Dextrano 40. B. Estructura polimérica de un dextrano con ramificaciones en posición $\alpha(1\rightarrow4)$. Adaptado de ³⁴.

Para llevar a cabo esta primera encapsulación, se preparó 1 mL de disolución de 11 mg/mL de dextrano marcado por fluorescencia con rodamina B isotiocianato (**Fig. 21**) (dextrano-RITC) en agua. A continuación se añadió el volumen equivalente a 100 μg de dextrano-RITC a 750 μL de la suspensión de *cellsomas* previamente preparada y de concentración conocida $4,61 \times 10^{11}$ partículas/mL. Tras una hora de incubación y posterior extrusión de la mezcla, se purificó la suspensión de *cellsomas* con *cargo* mediante filtración centrífuga.

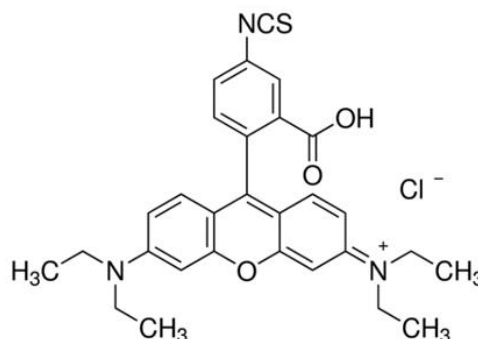


Figura 21: Estructura molecular del fluoróforo rodamina B isotiocianato (RITC o RBITC).

El concentrado y filtrado obtenidos tras la filtración se analizaron en paralelo mediante espectroscopía de fluorescencia para detectar posibles restos de dextrano-RITC libre y comprobar la eficiencia del proceso de encapsulación. Para poder analizar los resultados se realizó una curva de calibrado a partir de una disolución de dextrano-RITC en agua de la misma concentración que la administrada a los *cellsomas* (Fig. 22).

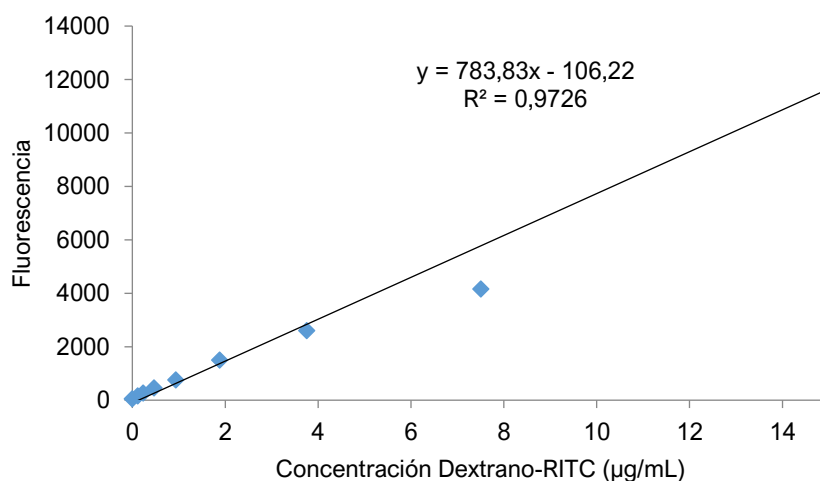


Figura 22: Curva de calibrado para una solución de 15 µg/mL de dextrano-RITC en agua milli-Q (ex/em 560/610 nm).

A continuación se midió la fluorescencia de las muestras en duplicados a 610 nm, excitando a una longitud de onda de 560nm, coincidiendo con el máximo de absorción del fluoróforo rodamina B. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6).

Muestra	Fluorescencia	Concentración dextrano-RITC (µg/mL)
Concentrado 1	12626±421	16,24
Concentrado 2	13267±465	17,06
Filtrado 1	40574±1448	51,90
Filtrado 2	41678±1597	53,3

Tabla 6: Resultados de la intensidad de fluorescencia y la concentración de *cargo* (dextrano-RITC) en el concentrado y el filtrado obtenidos tras la purificación de la suspensión de *nanocarriers* por filtración centrífuga. La intensidad de fluorescencia se muestra acompañada de la desviación estándar calculada para 3 mediciones por muestra (n=3).

El cálculo de la concentración de dextrano-RITC en las muestras se realizó a partir de la ecuación obtenida en la curva de calibrado (Fig. 22). Los resultados muestran una mayor concentración de *cargo* en los filtrados con respecto a los concentrados, lo cual indica

que una importante cantidad de dextrano-RITC no se ha podido encapsular en el interior de los *cellsomas*, como era de esperar, puesto que se añadió un gran exceso de moléculas de dextrano-RITC por número de *cellsomas* (2500 dextrano-RITC/*cellsoma*).

No obstante, la existencia de emisión de fluorescencia a 560 nm en los concentrados indica que parte del *cargo* sí ha sido encapsulado, pues solamente las partículas grandes (>100 kDa) como los *cellsomas* pueden quedar retenidas en los filtros de centrifuga (en presencia de restos de dextrano-RITC libre, este pasaría a través de los poros del filtro y se acumularía en el filtrado, como ya se ha comentado). Por tanto, podemos decir que la encapsulación de moléculas grandes en el interior de *cellsomas* es posible, en este caso se obtuvo un porcentaje de encapsulación del 16 – 17 % para el dextrano-RITC, lo que corresponde a 400 moléculas de dextrano-RITC por *cellsomas*. El alto número de moléculas de dextrano encapsuladas es un indicador de la potencialidad de estos sistemas como transportadores de fármacos. Por lo tanto, se procedió a la encapsulación del ARN celular extraído.

4.5. Encapsulación de ARN

Una vez comprobada la posibilidad de encapsulación de *cargo* en el interior de los *cellsomas*, se propuso encapsular ARN con el objetivo de poder introducirlo en el interior de células MRC-5 en experimentos posteriores. Con este objetivo en mente, se decidió encapsular ARN de origen murino, concretamente de células troncales embrionarias (ESCs), para poder distinguirlo del material genético propio de las futuras células diana (fibroblastos MRC-5 de origen humano).

Como línea celular donante del material genético se escogieron células troncales embrionarias de ratón (mESCs, del inglés *mouse Embryonic Stem Cells*) debida a una mayor facilidad de distinción respecto al ARN de origen humano de las células MRC-5 que posteriormente se utilizarían como células hospedadoras. Para detectar la entrada de ARN exógeno en las células diana, se llevaron a cabo análisis genéticos por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR, por sus siglas en inglés, *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*) de los genes de respuesta inmune innata celular de las células diana MRC-5 a distintos intervalos de tiempo después de la exposición a *cellsomas*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de forma paralela con dos tipos de ARN:

- ARN de tipo salvaje (WT, por sus siglas en inglés, *wild type*) para los genes *Adar*, proveniente de células troncales embrionarias de ratón (mESCs)
- ARN modificado por delección de los genes *Adar1* y *Adar2* (dKO, por sus siglas en inglés, *double knock out*), proveniente de células troncales embrionarias de ratón (mESCs)

Para llevar a cabo la encapsulación, se utilizó una muestra de *cellsomas* previamente preparados a partir de células MRC-5 como se indica en la sección 3.2. y se llevó a cabo la correspondiente caracterización de esta. A continuación se muestran los resultados de NTA obtenidos para la suspensión de *cellsomas* sintetizados a partir de membranas plasmáticas de células MRC-5 (**Fig. 23**).

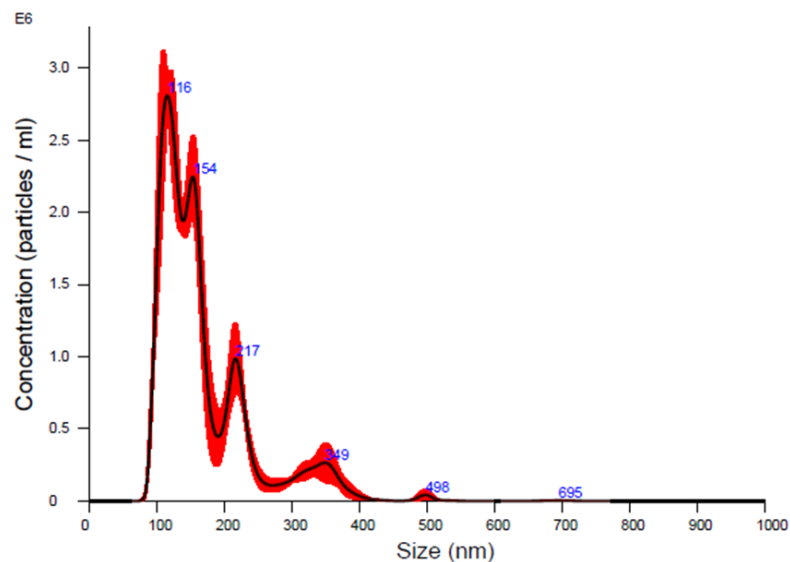


Figura 23: Distribución de la concentración de partículas (partículas/mL) respecto al tamaño de partícula (nm) de una muestra de *cellsomas* de células MRC-5. La gráfica muestra los valores promedio calculados a partir del análisis de 3 videos de 60 segundos cada uno. Dilución de la muestra 1:1000.

Una vez ajustados los resultados a la dilución inicial, se obtuvo una concentración de partículas de $(2,42 \pm 0,06) \times 10^{11}$ partículas/mL y un tamaño promedio de partícula de $168,1 \pm 4,5$ nm.

A continuación se llevó a cabo un análisis por DLS para confirmar el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas y la homogeneidad de la muestra (**Tabla 7**).

	Z-Average (nm)	Pdl	Intensity Mean (nm)	Number Mean (nm)
Media	251,4	0,447	523	98,82
SD	25,94	0,096	152	51,52

Tabla 7: Resultados del diámetro hidrodinámico medio para las distribuciones de dispersión de luz dinámica (DLS) en número, intensidad e intensidad ponderada (Z-Average), así como el índice de polidispersidad (Pdl). Los datos de la tabla se corresponden con la media de 6 mediciones de la muestra. La desviación estándar (SD) se calculó para las tres réplicas (n=6).

Una vez caracterizada la suspensión de *nanocarriers* a utilizar, se procedió a encapsular el ARN. Se prepararon las suspensiones de *cellsomas* marcados por fluorescencia (DOPE-Atto488) para a continuación encapsular ambos tipos de ARN (*Adar* WT y *Adar* dKO) de forma paralela. Además, se preparó una suspensión de *cellsomas* vacíos como control. Se midió la concentración y tamaño de partículas por NTA (Fig. 24).

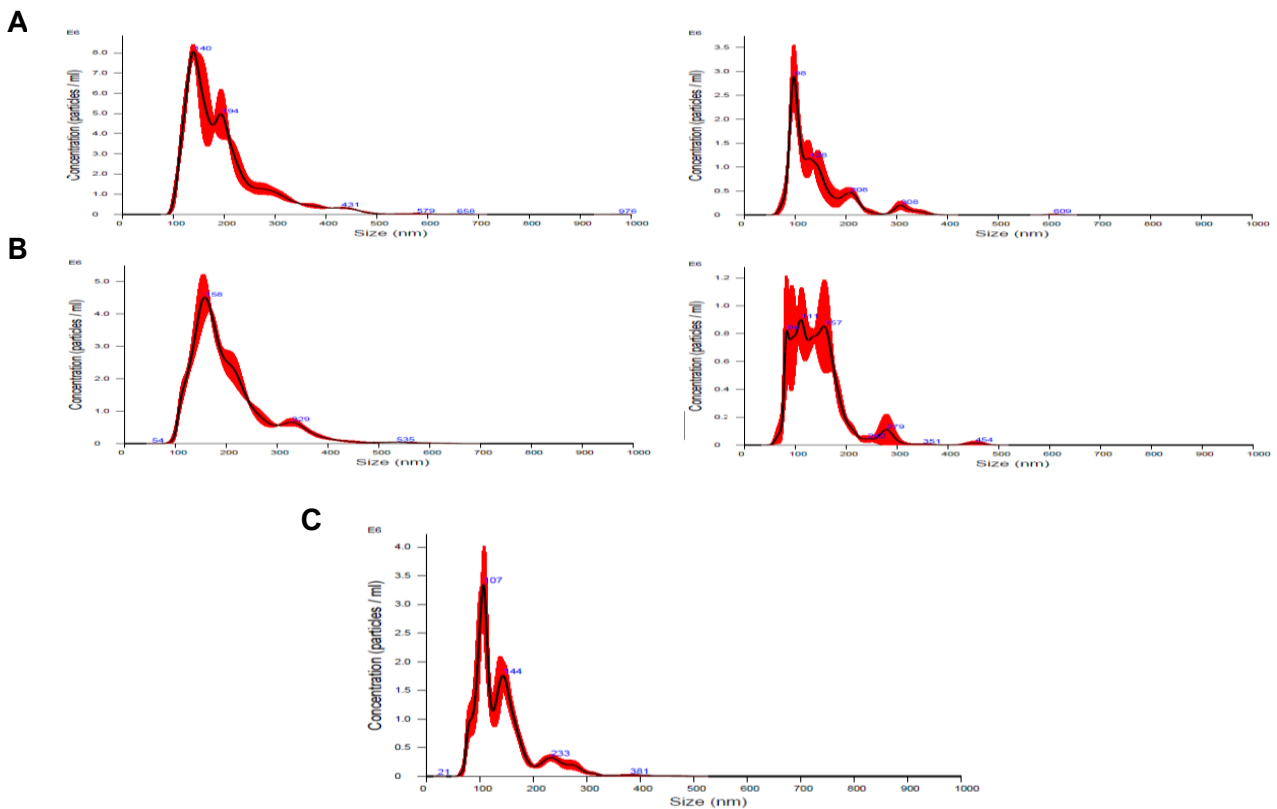


Figura 24: Distribución de la concentración de partículas (partículas/mL) respecto al tamaño de partícula (nm) de las muestras de *cellsomas* de células MRC-5 con y sin ARN encapsulado. A. Gráficas para 2 muestras de *cellsomas*-ARN *Adar* WT encapsulado. B Gráficas para 2 muestras de *cellsomas*-ARN *Adar* dKO encapsulado. C. Gráfica para una muestra de *cellsomas* vacíos como control. Todas las gráficas muestran los valores promedio calculados a partir del análisis de 3 videos de 60 segundos cada uno. Dilución de las muestras 1:1000.

Tras ajustar los resultados a la dilución inicial, se obtuvieron los siguientes resultados de concentración de partículas y tamaño medio de partícula (**Tabla 8**):

Muestra	Concentración (partículas/mL)	Tamaño de partícula (nm)
<i>Cellsomas-ARN Adar WT</i>	$(8,06 \pm 0,60) \times 10^{11}$	$197,1 \pm 1,1$
	$(1,56 \pm 0,09) \times 10^{11}$	$142,4 \pm 5,0$
<i>Cellsomas-ARN Adar dKO</i>	$(4,90 \pm 0,31) \times 10^{11}$	$201,8 \pm 1,0$
	$(9,64 \pm 0,04) \times 10^{11}$	$143,0 \pm 3,3$
<i>Cellsomas vacíos</i>	$(1,92 \pm 0,05) \times 10^{11}$	$140,8 \pm 3,7$

Tabla 8: Datos de concentración de nanopartículas en cada muestra y el tamaño promedio de cada partícula obtenidos por análisis de seguimiento de partículas (NTA).

Se observó que el tamaño medio de las partículas con ARN encapsulado es superior al de las partículas vacías. Aunque los datos obtenidos para el mismo tipo de *cargo* varían entre réplicas, el rango de tamaño se mantiene igualmente entre 100 y 200 nm.

De igual forma que en experimentos previos, se llevó a cabo un análisis de la intensidad de fluorescencia de las suspensiones tras el paso de purificación por filtración centrífuga. Se realizaron las curvas de calibrado para cada tipo de ARN (**Fig. 25**).

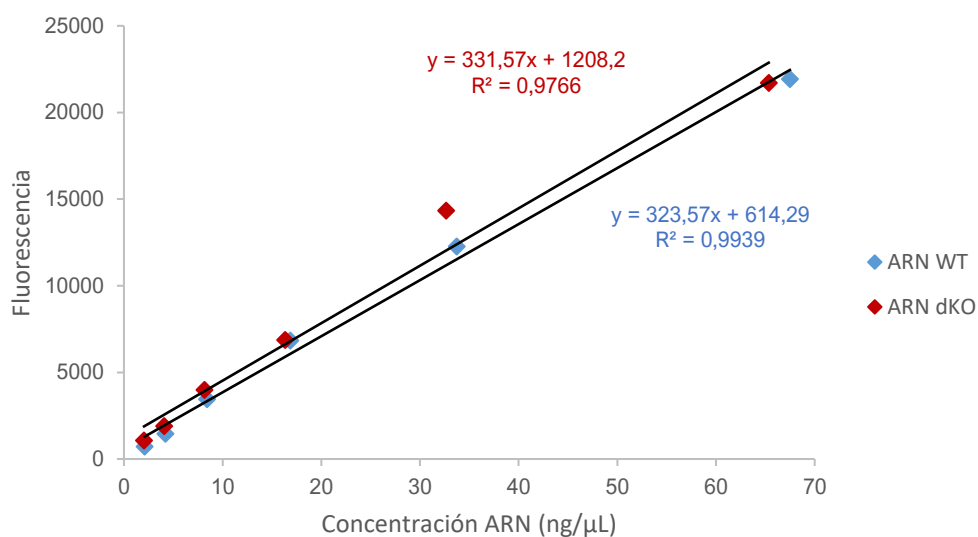


Figura 25: Rectas de calibrado para las soluciones de ARN *Adar* WT y ARN *Adar* dKO libres.

A continuación se muestran los resultados de las mediciones para los filtrados y concentrados de una muestra respecto al control correspondiente de ARN libre (*Adar* WT o *Adar* dKO) y *cellsomas* vacíos (**Tabla 9**). Los cálculos de concentraciones de ARN

se realizaron utilizando las correspondientes ecuaciones obtenidas en las rectas de calibrado previas (**Fig. 25**).

<i>Muestra</i>	<i>Fluorescencia</i>	<i>Concentración ARN (ng/μL)</i>
<i>Concentrado cellsomas-ARN Adar WT</i>	8807	25,32
<i>Concentrado cellsomas-ARN Adar dKO</i>	13295	36,45
<i>Filtrado ARN Adar WT</i>	18436	55,08
<i>Filtrado ARN Adar dKO</i>	18661	52,64

Tabla 9: Resultados de la intensidad de fluorescencia y la concentración de cargo (ARN) en las soluciones obtenidas tras la purificación de las suspensiones de *nanocarriers* por filtración centrífuga. Debido a que solamente se ha realizado una medida de la fluorescencia de cada muestra, no se incluyen los cálculos estadísticos de desviación estándar.

Se observó emisión fluorescente en los concentrados de *cellsomas* tras la purificación, lo cual indica que la encapsulación de ARN ha sido satisfactoria en ambos casos. No obstante, también se observó una elevada intensidad de fluorescencia en los filtrados, lo que hace pensar que parte del ARN no ha sido encapsulado.

Fue posible estimar el porcentaje de encapsulación de ARN a partir de la cantidad de ARN añadida inicialmente a cada muestra (**Tabla 10**):

	<i>ARN Adar WT</i>	<i>ARN Adar dKO</i>
<i>Concentración inicial ARN (ng/μL)</i>	139,8	135,4
<i>Concentración ARN encapsulado (ng/mL)</i>	25,3	36,5
<i>Porcentaje de encapsulación (%)</i>	18	27

Tabla 10: Resultados del cálculo de porcentaje de encapsulación de ARN *Adar WT* y *Adar dKO* en el interior de *cellsomas*.

4.6. Estudio de interacción celular con *cellsomas*

Dado que el objetivo final de este trabajo es la internalización celular de ARN exógeno a través de *nanocarriers*, se realizó un primer estudio de la interacción *cellsoma*-célula para determinar la cantidad de *cellsomas* necesarios por célula tratada así como el tiempo de incubación de ambos para optimizar la entrada del *cargo* al interior celular.

En este experimento, se utilizaron los *cellsomas* preparados según el apartado 4.3.

Para determinar el tiempo y dosis óptimos de la administración de *cellsomas*, se escogieron 4 tiempos (10 minutos, 1 hora, 3 horas y 24 horas) y 3 dosis (500

cellsomas/célula, 5000 *cellsomas*/célula y 50 000 *cellsomas*/célula) para analizar en un experimento de interacción *cellsoma*-célula.

En este estudio, se sembraron 50 000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se añadieron los volúmenes correspondientes a las dosis indicadas de *cellsomas*-DOPE-Atto488 (**Fig. 14**). Tras la incubación (de duración variable), se recogieron las células para analizar su fluorescencia por citometría de flujo (**Fig. 26**).

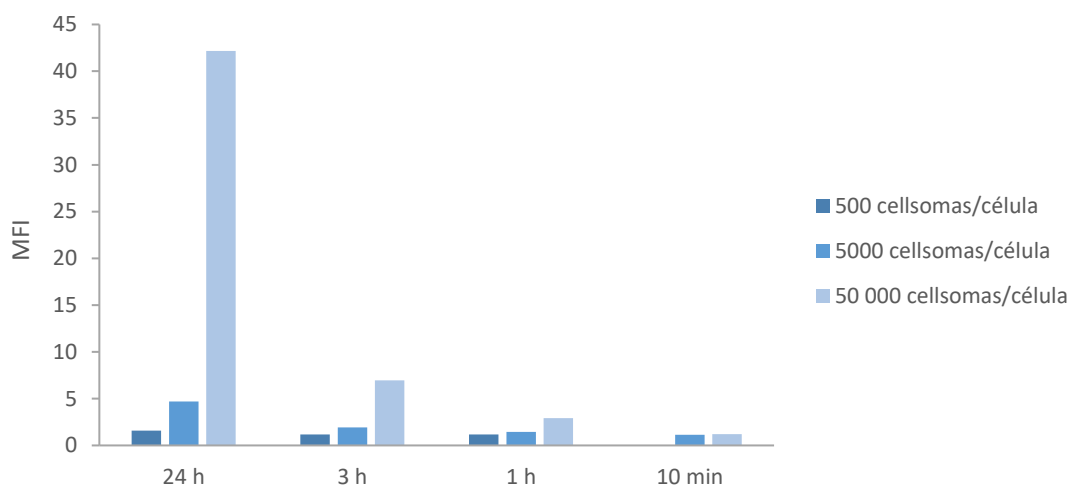


Figura 26: Representación de la intensidad de fluorescencia (MFI) como *fold increase* de las células MRC-5 después de haber sido tratadas con *cellsomas* fluorescentes a distintas dosis y tiempos. El cálculo de *fold increase* se hizo en base a un control de células MRC-5 sin tratar.

Los resultados de la intensidad de fluorescencia mostraron que la dosis de *cellsomas* más alta (50 000 *cellsomas*/célula) durante el tiempo de incubación más largo (24 h), provocó el mayor aumento en la emisión fluorescente de las células. Esto indica que, bajo estas condiciones, las células internalizaron mayor cantidad de *cellsomas*-DOPE-Atto488 que en el resto de los casos.

A priori se podría esperar que a mayor internalización de partículas en las células, mayor efectividad del tratamiento. No obstante, un intervalo de tiempo de espera tan largo sería poco práctico a la hora de realizar futuros experimentos y aplicaciones. De este modo, se observó que tras 1 hora de incubación de las células MRC-5 con la dosis más alta de *cellsomas* (50 000 *cellsomas*/célula) se triplica la intensidad de fluorescencia de las células. Este cambio en la señal es suficiente para introducir una cantidad detectable de *cargo* en el interior celular. Por este motivo, se escogió la dosis de 50 000 *cellsomas*/célula durante 1 hora como el tratamiento óptimo a aplicar en futuros experimentos de internalización.

4.7. Internalización celular de RNA encapsulado en *cellsomas*

Los resultados satisfactorios obtenidos en los experimentos previos, demostraron que la encapsulación y transporte de moléculas complejas en *cellsomas* hacia el interior celular es factible. En este último experimento, se decidió encapsular ARN, una biomolécula compleja e inestable, incapaz de atravesar la membrana plasmática por sí misma. Al ser englobada en nanomembranas, la molécula queda aislada por completo evitando cualquier tipo de interacción repulsiva con la célula diana. De este modo, los *cellsomas* podrían constituir un buen método de transporte de material genético exógeno al interior celular.

Los *cellsomas* con ARN encapsulados, preparados en el apartado 4.5, se incubaron durante una hora con células MRC-5 tal y como se describió en la sección 4.5.2. Pasado el tiempo, se retiró el medio celular con *cellsomas* y se añadió medio fresco a las células para incubarlo a 37 °C y 5 % CO₂ durante diferentes intervalos de tiempo: 3 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h.

Tras la incubación, se recogieron muestras celulares para analizar el efecto del ARN exógeno sobre la activación de la respuesta inmune innata celular de los fibroblastos y comprobar así la entrada efectiva del ARN en las células sin pérdida alguna de propiedades o estructura.

El análisis de la expresión génica de elementos clave en la respuesta inmune innata celular (en este caso, los genes *IFIH1* e *IFIT1*) se realizó externamente en las facilidades de CiMUS mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Esta técnica permite amplificar los fragmentos genéticos de interés a la vez que cuantifica la cantidad de gen expresado mediante espectroscopía de fluorescencia.

A continuación se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos por RT-qPCR para el tratamiento de 50 000 fibroblastos MRC-5 con ARN *Adar* WT y *Adar* dKO encapsulado en *cellsomas* a una concentración de 100 000 *cellsomas*/célula (**Fig. 27**).

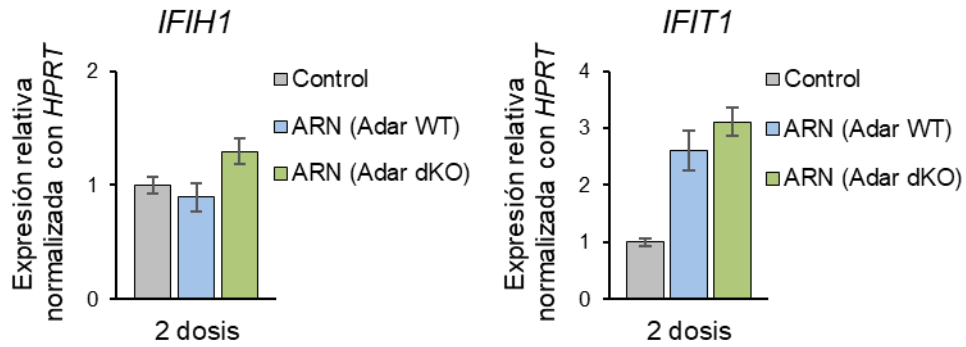


Figura 27: Resultados de la expresión génica de los genes de respuesta inmune innata celular *IFIH1* e *IFIT1* analizados por RT-qPCR a partir de muestras celulares de fibroblastos MRC-5 tras su incubación con ARN encapsulado en *cellsomas* durante 1 hora y posterior incubación en medio fresco durante 48 horas. Tras 24 h, se administró una segunda dosis de *cellsomas* para intentar prolongar el efecto del ARN exógeno en las células. Los datos se presentan normalizados frente a un control de células sin tratamiento con *cellsomas*.

Los resultados obtenidos por RT-qPCR muestran un aumento significativo en la expresión de los genes de respuesta inmune innata celular, en especial de *IFIT1*, donde se llega a triplicar su expresión frente a la de las células control MRC-5 cultivadas en ausencia de *cellsomas*. Por tanto, la entrada de ARN al interior celular ha sido efectiva y los *cellsomas* resultan viables como medio de transporte al interior celular de carga sensible como el material genético.

Estos resultados son muy prometedores y abren la puerta a nuevas líneas de investigación sobre las posibles aplicaciones de este tipo de *nanocarriers* en campos como la nanomedicina o biotecnología.

5. CONCLUSIONES

A raíz de los resultados obtenidos en este trabajo, hemos llegado a la conclusión de que los *cellsomas* constituyen un sistema coloidal estable, homogéneo y con un protocolo de síntesis eficaz y altamente reproducible.

La naturaleza de las membranas biológicas que conforman los *nanocarriers* les confiere diversas cualidades entre las que destaca la capacidad de transporte de compuestos. En este trabajo, hemos explorado de manera satisfactoria la posibilidad de encapsular polímeros complejos de origen sintético (dextrano) y de origen natural (ARN).

Además, se comprobó que el *cargo* encapsulado en el interior de los *cellsomas* mantiene intacta su estabilidad, así como su estructura y funcionalidad. De esta manera, resulta posible la internalización celular de moléculas y compuestos en su forma activa.

Estos resultados sugieren potenciales aplicaciones para los *cellsomas* tanto en medicina preventiva, en forma de vacunas, como en el tratamiento de enfermedades oncológicas de una forma específica y dirigida hacia las células afectadas. No obstante, en ambos casos es necesaria más investigación al respecto.

CONCLUSIÓNS

En base aos resultados obtidos neste traballo, chegamos á conclusión de que os *cellsomas* constitúen un sistema coloidal estable, homoxéneo e cun protocolo de síntese eficaz e altamente reproducible.

A natureza das membranas biolóxicas que conforman os *nanocarriers* confírelles diversas calidades entre as que destacan a capacidade de transporte de compostos. Neste traballo, exploramos de xeito satisfactorio a posibilidade de encapsular polímeros complexos de orixe sintética (dextrano) e de orixe natural (ARN).

Ademais, comprobouse que o *cargo* encapsulado no interior dos *cellsomas* mantén intacta a súa estabilidade, así como a súa estrutura e funcionalidade. Desta maneira, resulta posible a internalización celular de moléculas e compostos na súa forma activa.

Estes resultados suxiren potenciais aplicacións para os *cellsomas* tanto en medicina preventiva, en forma de vacinas, coma no tratamento de enfermidades oncolóxicas dun

xeito específico e dirixido cara as células afectadas. Non obstante, en ambos casos é preciso máis investigación ao respecto.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained in this work, we have concluded that cellsomes constitute a stable, homogeneous colloidal system with an efficient and highly reproducible synthesis protocol.

The nature of the biological membranes that build these nanocarriers provide them with several characteristics, among which the ability of transporting compounds stands out. In this work, we have successfully explored the possibility of encapsulating complex polymers with both a synthetic origin (dextran) and a natural origin (RNA).

In addition, it was found that the encapsulated cargo inside the cellsomes maintains its stability, as well as its structure and functionality. Due to that, cellular internalisation of active molecules and compounds becomes possible.

These results suggest potential cellsomes applications both in preventive medicine (in the form of vaccines) and as a specific treatment of oncological diseases targeting affected cells. However, both cases require further research on the matter.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Beltrán-Gracia, E., López-Camacho, A., Higuera-Ciapara, I., Velázquez-Fernández, J. B., Vallejo-Cardona, A. A. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnol.* **2019**, *10*(11). doi: 10.1186/s12645-019-0055-y
2. Kirtane, A. R., Verma, M., Karandikar, P., Furin, J., Langer, R., Traverso, G. Nanotechnology approaches for global infectious diseases. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16*, 369-384. doi: 10.1038/s41565-021-00866-8
3. Gustafson, H. H., Holt-Casper, D., Grainger, D. W., Ghandehari, H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* **2015**, *10* (4), 487-510. doi: 10.1016/j.nantod.2015.06.006
4. Sushnitha, M., Evangelopoulos, M., Tasciotti, E., Taraballi, F. Cell Membrane-Based Biomimetic Nanoparticles and the Immune System: Immunomodulatory Interactions to Therapeutic Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 627. doi: 10.3389/fbioe.2020.00627
5. Rattan, R., Bhattacharjee, S., Zong, H., Swain, C., Siddiqui, M. A., Visovatti, S. H., Kanthi, Y., Desai, S., Pinsky, D. J., Goonewardena, S. N. Nanoparticle-macrophage interactions: A balance between clearance and cell-specific targeting. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25* (16), 4487-4496. doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.040
6. Schmitt, O. H. Some interesting and useful biomimetic transforms, *Proc. 3rd Int. Biophysics Congress* (Boston, MA, 29 Aug. to 3 Sept.) **1969**, p. 297
7. Bar-Cohen, Y. (ed) *Biomimetics - Biologically Inspired Technologies*, Boca Raton FL, CRC Press, **2005**, 1-552. ISBN: 9780849331633
8. Rasheed, T., Nabeel, F., Raza, A., Bilal, M., Iqbal, H. M. N. Biomimetic nanostructures/cues as drug delivery systems: a review, *Materials Today Chemistry* **2019**, *13*, 147-157. doi: 10.1016/j.mtchem.2019.06.001
9. Zan, G., Wu, Q. Biomimetic and Bioinspired Synthesis of Nanomaterial/Nanostructures, *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 2099-2147 doi: 10.1002/adma.201503215
10. Sheikhpour, M., Barani, L., Kasaeian, A. Biomimetics in drug delivery systems: A critical review, *Journal of Controlled Release* **2017**, *253*, 97-109. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.026

11. Lin, C. C., Metters, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58* (12-13), 1379-1408. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.004
12. Aliabadi, H. M., Lavasanifar, A. Polymeric micelles for drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2006**, *3*(1), 139-162. doi: 10.1517/17425247.3.1.139
13. Garg, T., Singh, O., Arora, S., Murthy, R. S. R. Dendrimer - a novel scaffold for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2011**, *7*(2), 211-220.
14. Najlah, M., D'Emanuele, A. Synthesis of dendrimers and drug-dendrimer conjugates for drug delivery. *Current opinion in drug discovery & development* **2007**, *10*, 756-767.
15. Zhang, X. Y., Zhang, P. Y. Polymersome sin Nanomedicine – A Review, *Current Nanoscience* **2017**, *13*, 124-129. doi: 10.2174/1573413712666161018144519
16. Rideau, E., Dimova, R., Schwille, P., Wurm, F. R., Landfester, K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 8572-8610. doi: 10.1039/C8CS00162F
17. Vabbilisetty, P., Sun, X. L. Liposome surface functionalization based on different anchoring lipids via Staudinger ligation. *Organic & biomolecular chemistry* **2014**, *12*(8), 1237-1244. doi: 10.1039/c3ob41721b
18. Fang, R. H., Kroll, A. V., Gao, W., Zhang, L. Cell membrane coating nanotechnology. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1706759. doi: 10.1002/adma.201706759
19. Hu, C. M., Zhang, L., Aryal, S., Cheung, C., Fang, R. H., Zhang, L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108* (27), 10980-10985. doi: 10.1073/pnas.1106634108
20. Soprano, E., Alvarez, A., Pelaz, B., del Pino, P., Polo, E. Plasmonic Cell-Derived Nanocomposites for Light-Controlled Cargo Release inside Living Cells. *Adv. Biosys.* **2020**, *0*(1900260). doi: 10.1002/adbi.201900260
21. O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S. et al. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21*, 585-606. doi: 10.1038/s41580-020-0251-y
22. Li, B., Zhang, X., Dong, Y. Nanoscale platforms for messenger RNA delivery. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol* **2019**, *11* (e1530). doi: 10.1002/wnan.1530

23. Guo, P., Huang, J., Zhao, Y., Martin, C. R., Zare, R. N., Moses, M. A. Nanomaterial Preparation by Extrusion through Nanoporous Membranes. *Small* **2018**, *14* (1703493). doi: 10.1002/sml.201703493
24. Filipe, V., Hawe, A., Jiskoot, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm Res* **2010**, *27*, 796-810. doi: 10.1007/s11095-010-0073-2
25. Zhu, J. Y., Zheng, D. W., Zhang, M. K., Yu, W. Y., Qiu, W. X., Hu, J. J., Feng, J., Zhang, X. Z. Preferential Cancer Cell Self-Recognition and Tumor Self-Targeting by Coating Nanoparticles with Homotypic Cancer Cell Membranes. *Nano Lett.* **2016**, *16*(9), 5895-901. doi: 10.1021/acs.nanolett.6b02786
26. Tomaszewska, E., Soliwoda, K., Kadziola, K., Tkacz-Szczesna, B., Celichowski, G., Cichomski, M., Szmaja, W., Grobelny, J. Detection Limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in Characterization of Polydisperse Nanoparticles Colloids. *Journal of Nanomaterials* **2013**, *2013* (313081). doi: 10.1155/2013/313081
27. Eiser, E. Dynamic Light Scattering. En: *Multi Length-Scale Characterisation*, Bruce, D. W., O'Hare, D., Walton, R. I. (eds), **2014**. ISBN: 9781118683972. doi: 10.1002/9781118683972.ch5
28. Kruger, N. J. The Bradford Method For Protein Quantitation. En: *The Protein Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks*, Walker, J. M. (eds). Humana Press, Totowa, NJ, **2009**. ISBN: 9781597451987. doi: 10.1007/978-1-59745-198-7_4
29. Marion, M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72* (1-2), 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
30. Ernst, O., Zor, T. Linearization of the bradford protein assay. *Journal of visualized experiments: JoVE* **2010**, *38* (e1918). doi: 10.3791/1918
31. Mosquera, J., García, I., Liz-Marzán, L. M. Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size. *Acc Chem Res.* **2018**, *51*(9), 2305-2313. doi: 10.1021/acs.accounts.8b00292
32. Mudalige, T., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S. M., Paredes, A., Ingle, T. Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. En: *Micro and Nano Technologies, Nanomaterials for Food Applications*, López Rubio, A., Fabra Rovira, M. J., Martínez Sanz, M., Gómez Gómez-Mascaraque, L. (eds), Elsevier,

- 2019**, 313-353. ISBN: 9780128141304. doi: 10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7
33. Neely, W. B. Dextran: Structure and Synthesis, En: *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Wolfrom, M. L., Tipson, R. S. (eds), Academic Press, **1961**, Volume 15, 341-369. ISBN: 9780120072156. doi: 10.1016/S0096-5332(08)60191-5
34. Zarrintaj, P., Saeb, M. R., Jafari, S. H., Mozafari, M. Application of compatibilized polymer blends in biomedical fields, En: *Compatibilization of Polymer Blends*, Ajitha, A.R., Thomas, S. (eds), Elsevier, **2020**, 511-537, ISBN: 9780128160060, doi: 10.1016/B978-0-12-816006-0.00018-9