

**Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería**

USO DE NANOPARTÍCULAS COMO HERRAMIENTAS PARA LA TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

**Entregado como requisito para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología**

**Enya Ravera Sellanes - 194845
María Lucía Gera Lanzillotti - 208910**

**Tutoras:
Ana Paula Mulet
Lorena Betancor**

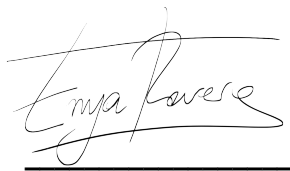
2022

Declaración de autoría

Nosotras, Enya Ravera Sellanes y María Lucía Gera Lanzillotti, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano.

Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el trabajo final de carrera de la Ingeniería en Biotecnología.
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad.
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra.
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas.
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros.
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Enya Ravera Sellanes



María Lucía Gera Lanzillotti

Montevideo, 10 de agosto de 2022

Agradecimientos

En primer lugar, quisiéramos agradecer a nuestras tutoras Ana Paula Mulet y Lorena Betancor por su amabilidad y disposición, y sobre todo por su paciencia a lo largo de este desafiante proyecto.

A nuestras familias, por su cariño, comprensión y motivación. Nada de esto hubiese sido posible sin su apoyo.

A nuestros amigos y compañeros de trabajo, que aún sin entender qué es la biotecnología y por qué pasamos tantas horas en el laboratorio, nos apoyaron de forma incondicional en todo momento.

A todo el equipo del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT y sus colaboradores, por su buena disposición y ayuda.

A nuestros compañeros tesisistas y de generación, por volver amenas las jornadas en el laboratorio y por transitar con nosotras toda la carrera.

A Karen Perelmuter y Paula Céspedes del Institut Pasteur de Montevideo por su disposición y ayuda con el citómetro de flujo.

Resumen

El uso de líneas celulares de mamíferos como modelos *in vitro* ha revolucionado la investigación científica debido a sus diversas aplicaciones, ya que son ampliamente utilizadas en la producción de proteínas recombinantes y anticuerpos, estudios de función y regulación génica, producción de vacunas, entre otros. Sin embargo, muchas de estas aplicaciones requieren que las líneas celulares a utilizar sean modificadas genéticamente, normalmente mediante el empleo de diferentes técnicas de transfección celular. Ahora bien, la eficacia, toxicidad y reproducibilidad, así como también la limitada capacidad de transporte de ADN, siguen siendo aspectos críticos que generan una creciente demanda en tecnologías de transfección más avanzadas. En los últimos años se ha visto que, debido a sus numerosas ventajas, las nanopartículas se presentan como potenciales vehículos para la transfección de líneas celulares.

En este trabajo se propuso desarrollar nanovehículos a base de oro y sílica, y comparar su potencial como herramientas de transfección en células de mamíferos frente a métodos tradicionales. Para ello se estudió la unión entre el ADN y las nanopartículas, así como también el efecto citotóxico de estas sobre las líneas celulares NM2C5-GFP y HEK-293. Adicionalmente, se realizaron ensayos de transfección empleando nanopartículas como vehículo para el *delivery* del sistema CRISPR-Cas9 en ambas líneas celulares, y se evaluó la eficiencia de la mutación generada en relación con la obtenida bajo el uso de lipofectamina como agente de transfección. Mientras que la línea celular NM2C5-GFP no pudo ser modificada bajo ninguno de los métodos estudiados, si se logró generar una mutación en el gen CASP8AP2 de la línea celular HEK-293 mediante el uso de lipofectamina y un nanovehículo a base de sílica a concentraciones de 62,5 µg/mL y 125 µg/mL.

Palabras clave

Nanopartículas de oro, nanopartículas de sílica, transfección celular, citometría de flujo, cultivo celular, citotoxicidad, CRISPR-Cas9.

Abreviaciones

°C: grados Celsius

ADN: ácido desoxiribonucleico

APS: Persulfato de Amonio

ARN: ácido ribonucleico

sgARN: ácido ribonucleico guía

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATCC: *American Type Culture Collection*

AuNPs: nanopartículas de oro

BSA: seroalbúmina bovina (del inglés *bovine serum albumin*)

CASP8AP2: proteína 2 asociada a la caspasa 8 (del inglés *caspase 8 associated protein 2*)

cm: centímetro

CH₃COOH: ácido acético

CO₂: dióxido de carbono

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGFP: proteína verde fluorescente mejorada (del inglés *enhanced green fluorescent protein*)

Fw: del inglés, *forward*

g: gramo

GFP: proteína verde fluorescente (del inglés *green fluorescent protein*)

HAuCl₄.3H₂O: hidrógeno tetracloroaurato trihidrato

HBS: *buffer* HEPES salino

HCl: ácido clorhídrico

IP: ioduro de propidio

kb: kilobase

KCH₃CO₂: acetato de potasio

KO: *knock-out*

L: litro

LB: Luria Bertani

M: molar

min: minuto

mg: miligramo

mL: mililitros

mM: milimolar

MPM: marcador de peso molecular

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio

M_w : peso molecular (de inglés *molecular weight*)

m/v: porcentaje masa/volumen

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: citrato trisódico dihidrato

NaCl: cloruro de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

ng: nanogramo

nm: nanómetro

OD: densidad óptica (del inglés *optical density*)

ON: durante la noche (del inglés *overnight*)

pb: pares de bases

PBS: *buffer* fosfato salino (del inglés *phosphate saline buffer*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

PEI: polietilenimina

pH: logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones de una solución

PNK T4: polinucleótido quinasa T4 (del inglés *polynucleotide kinase*)

Rv: reverso (del inglés, *reverse*)

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo

SDS: dodecilsulfato sódico (del inglés *sodium dodecyl sulfate*)

SEM: microscopía electrónica de barrido (del inglés *scanning electron microscopy*)

SFB: suero fetal bovino

SiNPs: nanopartículas de sílica

SPR: resonancia de plasmón superficial (de inglés *surface plasmon resonance*)

TAE: tris-acetato-EDTA

T_{amb}: temperatura ambiente

TBE: tris-borato-EDTA

T_m: Temperatura *melting*

TEM: microscopía electrónica de transmisión (del inglés *transmission electron microscopy*)

TMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TMOS: tetrametilortosilicato

Tris: trisaminometano

µg: microgramo

µL: microlitro

µm: micrómetro

UV: ultravioleta

V: Volts

Vis: visible

v/v: porcentaje volumen/volumen

xg: aceleración gravitatoria

Índice

1. Introducción	13
1.1. Uso de líneas celulares en investigación	13
1.2. Modificación genética de líneas celulares por transfección	13
1.3. Métodos de transfección convencionales	14
1.4. Sistema CRISPR-Cas	16
1.4.1. Sistema CRISPR-Cas en la naturaleza	16
1.4.2. Sistema CRISPR-Cas como herramienta de edición genética	17
1.5. Nanotecnología y sus aplicaciones	18
1.5.1. Nanopartículas	18
1.5.1.1. Nanopartículas basadas en carbono	18
1.5.1.2. Nanopartículas orgánicas	19
1.5.1.3. Nanopartículas inorgánicas	19
1.5.1.3.1. Nanopartículas de oro	19
1.5.1.3.2. Nanopartículas de sílica	21
2. Objetivos	22
2.1. Objetivo general	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. Materiales y metodología	23
3.1. Materiales utilizados	23
3.1.1. Soluciones	23
3.1.2. <i>Buffers</i>	23
3.1.3. Antibióticos	24
3.1.4. Medios de cultivo	24
3.1.5. Líneas celulares	24
3.2. Procedimientos generales	25
3.2.1. Descongelado de células	25
3.2.2. Cultivo de células	25
3.2.3. Extracción de ADN genómico	25
3.2.4. Electroforesis de ADN	25
3.2.4.1. Electroforesis en gel de agarosa	25
3.2.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	26
3.3. Nanopartículas de oro como posible vehículo de transfección celular: preparación de insumos	26
3.3.1. Síntesis del nanovehículo de oro	26
3.3.1.1. Síntesis de AuNPs	26
3.3.1.2. Caracterización de AuNPs	26
3.3.1.2.1. Espectroscopía Ultravioleta - Visible (UV-Vis)	26

3.3.1.2.2. Estudio de movilidad de AuNPs por electroforesis en gel de agarosa	27
3.3.2. Generación de la línea celular NM2C5-KO-GFP	27
3.3.2.1. Caracterización de los plásmidos	27
3.3.2.1.1. Minipreparación de ADN plasmídico	27
3.3.2.1.2. Digestión enzimática	27
3.3.2.2. Ensayos de transfección en la línea celular NM2C5-GFP por métodos tradicionales	27
3.3.2.2.1. Transfección basada en lípidos	27
3.3.2.2.2. Transfección por el método de co-precipitación con fosfato de calcio	28
3.3.2.2.3. Análisis mediante citometría de flujo	28
3.4. Nanopartículas de sílica como posible vehículo de transfección celular	29
3.4.1. Síntesis del nanovehículo de sílica	29
3.4.1.1. Síntesis de SiNPs	29
3.4.1.2. Estimación de la concentración de las SiNPs	29
3.4.1.3. Ensayo de adsorción de ADN plasmídico sobre SiNPs	29
3.4.2. Ensayos sobre la línea celular NM2C5-GFP	30
3.4.2.1. Ensayo de citotoxicidad	30
3.4.2.2. Ensayo de transfección utilizando el nanovehículo de sílica	30
3.4.2.3. Evaluación de la eficiencia de mutación	30
3.4.2.3.1. Ensayo de restricción de heteroduplex	30
3.4.3. Ensayos sobre la línea celular HEK-293	31
3.4.3.1. Método <i>Golden Gate</i>	31
3.4.3.1.1. Digestión y desfosforilación de plásmido	31
3.4.3.1.2. Fosforilación y <i>annealing</i> de los oligonucleótidos	32
3.4.3.1.3. Ligación de las guías dentro del plásmido	32
3.4.3.1.4. Clonación en <i>E. coli</i>	32
3.4.3.1.4.1. Generación de bacterias quimiocompetentes	32
3.4.3.1.4.2. Transformación de bacterias quimiocompetentes	32
3.4.3.1.4.3. <i>Colony</i> PCR	33
3.4.3.1.4.4. Minipreparación de ADN plasmídico	33
3.4.3.1.4.5. PCR	33
3.4.3.2. Ensayos de citotoxicidad	34
3.4.3.2.1. Ensayo con MTT	34
3.4.3.2.2. Ensayo con Cristal Violeta	34
3.4.3.2.2.1. SiNPs desnudas	34
3.4.3.2.2.2. SiNPs con ADN	35
3.4.3.3. Ensayos de transfección utilizando el nanovehículo de sílica	35
3.4.3.4. Evaluación de la eficiencia de la mutación	36

3.4.3.4.1. PCR	36
3.4.3.4.2. Ensayo de restricción del heteroduplex	36
3.4.3.4.3. Ensayo de movilidad del heteroduplex	37
3.5. Análisis estadístico	37
4. Resultados obtenidos y discusión	38
4.1. Nanopartículas de oro como posible vehículo de transfección celular: preparación de insumos	38
4.1.1. Síntesis del nanovehículo de oro	39
4.1.1.1. Síntesis de AuNPs	39
4.1.1.2. Caracterización de AuNPs	40
4.1.1.2.1. Espectroscopía Ultravioleta - Visible (UV-Vis)	40
4.1.1.2.2. Estudio de movilidad de AuNPs por electroforesis en gel de agarosa	41
4.1.1.3. Generación de la línea celular NM2C5-KO-GFP	43
4.1.1.3.1. Caracterización de los plásmidos	43
4.1.1.3.2. Ensayos de transfección en la línea NM2C5-GFP por métodos tradicionales	44
4.2. Nanopartículas de sílica como posible vehículo de transfección celular	47
4.2.1. Síntesis del nanovehículo de sílica	48
4.2.1.1. Síntesis y estimación de la concentración de SiNPs	48
4.2.1.2. Ensayo de adsorción de ADN plasmídico sobre SiNPs	49
4.2.2. Ensayos sobre la línea celular NM2C5-GFP	51
4.2.2.1. Ensayo de citotoxicidad	51
4.2.2.2. Ensayo de transfección utilizando el nanovehículo de sílica	52
4.2.2.2.1. Evaluación de la eficiencia de la mutación	53
4.2.3. Ensayos sobre la línea celular HEK-293	55
4.2.3.1. Método <i>Golden Gate</i>	56
4.2.3.2. Ensayos de citotoxicidad	63
4.2.3.2.1. Ensayo con MTT	63
4.2.3.2.2. Ensayos con Cristal Violeta	66
4.2.3.2.2.1. SiNPs desnudas	66
4.2.3.2.2.2. SiNPs con ADN	66
4.2.3.3. Ensayos de transfección utilizando el nanovehículo de sílica	68
4.2.3.3.1. Evaluación de la eficiencia de la mutación	68
4.2.3.3.1.1. PCR	68
4.2.3.3.1.2. Ensayos de restricción y movilidad del heteroduplex	69
5. Conclusiones	73
6. Perspectivas a futuro	74

7. Referencias bibliográficas	75
8. Anexo	80
8.1. Seguimiento de los <i>batches</i> A - E de AuNPs a lo largo del tiempo	80
8.2. Mapas de los plásmidos utilizados	82
8.3. Secuencias de los <i>primers</i> utilizados	85
8.4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados	86

1. Introducción

1.1. Uso de líneas celulares en investigación

El término línea celular se utiliza para definir una población celular ya sea animal o vegetal, que ha sido modificada para mantenerse en cultivo durante un periodo de tiempo prolongado, conservando la estabilidad de ciertos fenotipos y funciones. El uso de líneas celulares como modelos *in vitro* ha revolucionado la investigación científica, ya que proporcionan una población homogénea, son relativamente fáciles de cultivar y se pueden subcultivar de forma continua para obtener un gran número de células en un corto periodo de tiempo, lo que permite obtener muestras consistentes y resultados reproducibles. Es por estos motivos que son ampliamente utilizadas en la producción de vacunas, estudios del metabolismo y la citotoxicidad de diferentes fármacos, producción de proteínas recombinantes y anticuerpos, estudios de función y regulación génica, y generación de tejidos artificiales, entre otros (1–3).

En los últimos años la demanda de biofármacos ha ido en aumento. Esto ha despertado el interés de las compañías farmacéuticas y los investigadores en desarrollar sistemas de producción de proteínas recombinantes que sean inocuas, efectivas y rentables (4,5). Los sistemas de expresión basados en células de mamíferos suelen ser los más elegidos debido a su maquinaria celular, que les permiten producir proteínas grandes y complejas con modificaciones postraduccionales. Además, presentan la ventaja de que la mayoría de las proteínas pueden secretarse al medio de cultivo, evitando pasos de lisis y posterior replegamiento, como es el caso de aquellas producidas en sistemas bacterianos (4,6).

Las líneas celulares muroideas CHO, BHK, NS0 y SP2-0 son las más utilizadas en la industria biofarmacéutica debido a su eficacia y bioseguridad. Sin embargo, las proteínas recombinantes sintetizadas en estos sistemas presentan diferencias en el patrón de glicosilación con respecto a las proteínas humanas, por lo que su uso en terapias puede resultar inmunogénico en humanos. Por este motivo, los investigadores se centran cada vez más en generar sistemas de producción de proteínas recombinantes basados en líneas celulares humanas. Dentro de estas, las más utilizadas son HEK-293, HT-1080, HuH-7, HKB-11, PER C6 y CAP (4,6).

1.2. Modificación genética de líneas celulares por transfección

La transfección celular se define como el proceso mediante el cual se introducen ácidos nucleicos foráneos tales como ADN o ARN en células eucariotas. Durante las últimas décadas, la transfección se ha consagrado como una poderosa herramienta analítica para el estudio de la función y la regulación de genes o productos génicos (7). Esto ha permitido comprender las vías moleculares de muchas enfermedades y descubrir biomarcadores útiles para su diagnóstico, así como también el desarrollo de nuevos fármacos y terapias génicas alternativas (8).

Las transfecciones pueden clasificarse según si son estables o transitorias. Una transfección estable implica que el material genético introducido se integra al genoma de la célula huésped (o se mantiene dentro de ella como un elemento extracromosómico), permitiendo una expresión a largo plazo. Para lograrlo, suelen utilizarse genes marcadores de selección. Por el contrario, una transfección transitoria sólo permite expresar los genes transfectados durante un periodo de tiempo limitado, debido a que estos no se integran al genoma de la célula huésped y se pierden por factores ambientales o por división celular (7–9).

1.3. Métodos de transfección convencionales

Los métodos de transfección convencionales pueden clasificarse en físicos, químicos y biológicos. Cada uno posee ventajas y desventajas, y su rendimiento depende del diseño experimental, por lo que la elección del método dependerá de la línea celular a estudiar, el objetivo de la transfección, el material a introducir y la disponibilidad del equipamiento adecuado. Se considera que un método es óptimo para una determinada línea celular cuando permite una alta eficiencia de transfección, al mismo tiempo que genera una baja toxicidad y produce efectos mínimos sobre la fisiología normal de las células. Además, debe ser reproducible y fácil de aplicar (7,9,10).

Los métodos de transfección físicos utilizan diversas herramientas físicas para entregar los ácidos nucleicos a las células. Ejemplos de esto son la microinyección, biobalística, transfección mediada por láser (también conocida como fototransfección) y electroporación. Los métodos químicos son los más utilizados en investigación y se basan en emplear compuestos cargados positivamente para encapsular a los ácidos nucleicos que se encuentran cargados negativamente. Estos complejos son atraídos hacia la membrana celular que también se encuentra cargada negativamente y la atraviesan mediante mecanismos de endocitosis y fagocitosis. Estos métodos se basan en el uso de fosfato de calcio, polímeros y lípidos catiónicos, entre otros (7,9).

Por último, los métodos biológicos aprovechan los procesos celulares naturales, aunque a menudo se mejora su eficiencia mediante técnicas de laboratorio. El método más conocido para la transfección de células de mamíferos es la transfección mediada por virus (mayormente conocida como transducción), y se basa en el uso de un vector viral que es capaz de infectar células y transportar el ADN directamente a su núcleo. Los vectores virales más utilizados son lentivirus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y herpesvirus (7-9).

En la Tabla 1 presentada a continuación, se detallan las principales características de los métodos de transfección convencionales más utilizados.

Tabla 1. Métodos de transfección convencionales.

Método	Descripción	Ventajas	Desventajas
Métodos Físicos ^{a,b}			
Microinyección	Se inyecta el material genético en el citoplasma o el núcleo de las células	El material es inyectado a una dosis precisa y la eficiencia es cercana al 100%	Proceso laborioso. No es posible inyectar más de 100 - 200 células por tratamiento
Biobalística	Los ácidos nucleicos se conjugan con partículas de oro y luego son disparados hacia las células a alta velocidad	Permite transfecciones <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , ya que es capaz de superar barreras físicas como la epidermis	Equipamiento costoso. Se generan daños en los tejidos circundantes al transfectar células pequeñas
Transfección mediada por láser	Mediante un pulso láser se generan poros transitorios en las membranas celulares, permitiendo así incorporar por diferencias osmóticas a los ácidos nucleicos presentes en el medio	Ha demostrado ser más simple que otros métodos físicos, alcanzando una efectividad comparable. Además, permite transfectar células pequeñas e individuales	Equipamiento costoso

Método	Descripción	Ventajas	Desventajas
Electroporación	Se aplica un campo eléctrico que permeabiliza las membranas celulares de forma temporal y permite la entrada de los ácidos nucleicos presentes en el medio	Es fácil y rápido. Permite transfectar una gran cantidad de células en poco tiempo, tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i>	La efectividad es menor en comparación a otros métodos físicos, y genera una alta tasa de muerte celular
Métodos Químicos ^{a,b}			
Fosfato de calcio	Se generan precipitados entre el ADN y el cloruro de calcio dentro de un <i>buffer</i> fosfato	Es económico y tiene alta eficiencia. Puede usarse en una gran variedad de líneas celulares	Pequeños cambios de pH en el medio pueden comprometer la eficiencia
Polímeros catiónicos	Se forman poliplejos entre las moléculas de ADN y los polímeros mediante interacciones electrostáticas	La condensación del ADN dentro de los poliplejos es más eficiente que otros métodos y previene la degradación por nucleasas celulares	Algunos materiales presentan problemas de solubilidad, agregación, citotoxicidad y biodegradación
Lípidos catiónicos	Se emplean liposomas catiónicos que interactúan electrostáticamente con las moléculas de ADN y presentan alta afinidad por la membrana celular	Es fácil de aplicar sobre una gran variedad de líneas celulares	La eficiencia depende de la cantidad y calidad del material genético, el tiempo de incubación y la densidad celular
Métodos Biológicos ^{a,b,c}			
Transfección mediada por virus (transducción)	Se utiliza un vector viral que infecta a las células y transporta el material genético al núcleo	Altas tasas de eficiencia, incluso sobre células difíciles de transfectar. Algunos vectores virales permiten generar transfecciones estables	Laborioso, presentan toxicidad, el éxito depende del tropismo del virus utilizado y la capacidad de empaquetamiento del ADN es un factor limitante. Se requieren laboratorios con nivel de bioseguridad 2 o superior

Nota: ^a Fus-Kujawa et al.(2021), ^b Kim y Eberwine (2010), ^c Chong et al.(2021).

Como se evidencia, la eficacia, toxicidad y reproducibilidad, así como también la limitada capacidad de transporte de ADN, siguen siendo aspectos críticos que generan una creciente demanda en tecnologías de transfección más avanzadas. Estudios recientes han demostrado que los vectores híbridos (compuestos de elementos virales y no virales) presentan tasas de transfección significativamente más altas que algunos métodos químicos. Por otra parte, el uso de nanopartículas como método de transfección ha demostrado ser prometedor debido a su versatilidad y baja toxicidad (7,8).

1.4. Sistema CRISPR-Cas

El descubrimiento y el desarrollo de enzimas programables para la manipulación de secuencias de ADN ha impulsado una revolución biotecnológica. Un ejemplo de esto es el sistema CRISPR-Cas, que se encuentra en la naturaleza y actúa como el sistema inmune adaptativo de numerosas bacterias y arqueas, protegiéndolos de agentes invasores mediante la identificación y la degradación de secuencias de ADN exógenas. Se ha visto que el uso de este sistema simplifica en gran medida la edición de los genomas eucariotas y es muy prometedor en otras áreas de aplicación, como la ingeniería de células madre, terapia génica, modelos de enfermedades animales y de tejidos, y la ingeniería de plantas transgénicas resistentes a enfermedades (11–13).

1.4.1. Sistema CRISPR-Cas en la naturaleza

Frente a una primera infección, la inmunidad es adquirida mediante la incorporación de pequeños fragmentos de ADN exógeno (denominados espaciadores) entre secuencias palindrómicas cortas (denominadas repetidos), dentro del genoma bacteriano. El *locus* CRISPR, donde se encuentran codificados los elementos del sistema CRISPR-Cas, consiste en una región promotora que se encarga de modular la transcripción de todos los elementos, los espaciadores, los repetidos y los genes que codifican a las proteínas Cas (14). Ante la presencia de un agente invasor conocido, la región CRISPR se transcribe y se procesa en pequeños ARN CRISPR interferentes (crARN) los cuales se combinan con un ARN transactivante (tracrARN), formando un complejo con la proteína Cas que luego reconocerá específicamente a los ácidos nucleicos extraños y los destruirá mediante su actividad endonucleolítica (15). Para que la escisión ocurra, es necesaria la presencia un sitio adicional de reconocimiento, denominado PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), compuesto por una secuencia corta de ADN (de 3 pb - 5 pb), adyacente a la secuencia *target*, que es reconocido tanto por los crRNA como por la proteína Cas (Figura 1) (14).

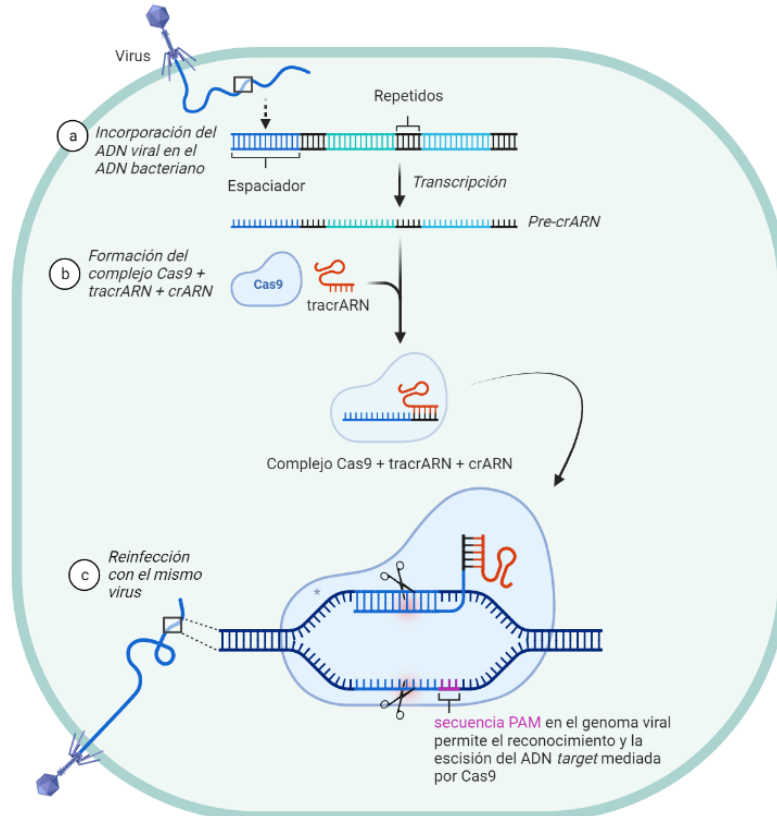


Figura 1. Funcionamiento del sistema CRISPR-Cas en la naturaleza. Creado en BioRender.com.

1.4.2. Sistema CRISPR-Cas como herramienta de edición genética

Se demostró que la secuencia de ADN *target* del sistema CRISPR se podía modificar cambiando el crARN y que se podían reducir los componentes del sistema, utilizando un único ARN guía (sgARN) que combina la especificidad de dirección del crARN con las propiedades estructurales del tracrARN. Esto permitió que el sistema CRISPR-Cas se convirtiera en una herramienta robusta y versátil para la edición de genomas eucariotas, permitiendo modificar, eliminar o reemplazar genes defectuosos (11,12,14,15). Hasta la fecha se han identificado seis tipos distintos de sistemas CRISPR-Cas (I-VI) basados en el mecanismo molecular que emplean para el reconocimiento del DNA y la forma en que se unen al mismo. El sistema CRISPR-Cas9 de tipo II derivado de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) es uno de los mejor caracterizados y más utilizados para edición genética (14). SpCas9 es una endonucleasa de ADN la cual forma un complejo con un sgARN que le permite reconocer la secuencia NGG como sitio PAM y generar una rotura de doble cadena (DSB) de extremo romo. A continuación, este corte es reparado por la maquinaria celular mediante reparación dirigida por homología (HDR) cuando se cuenta con un molde de reparación de ADN, o por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Cuando la reparación ocurre por NHEJ se generan inserciones o deleciones azarosas, mientras que por HDR se pueden insertar secuencias exógenas de ADN (Figura 2) (14,16).

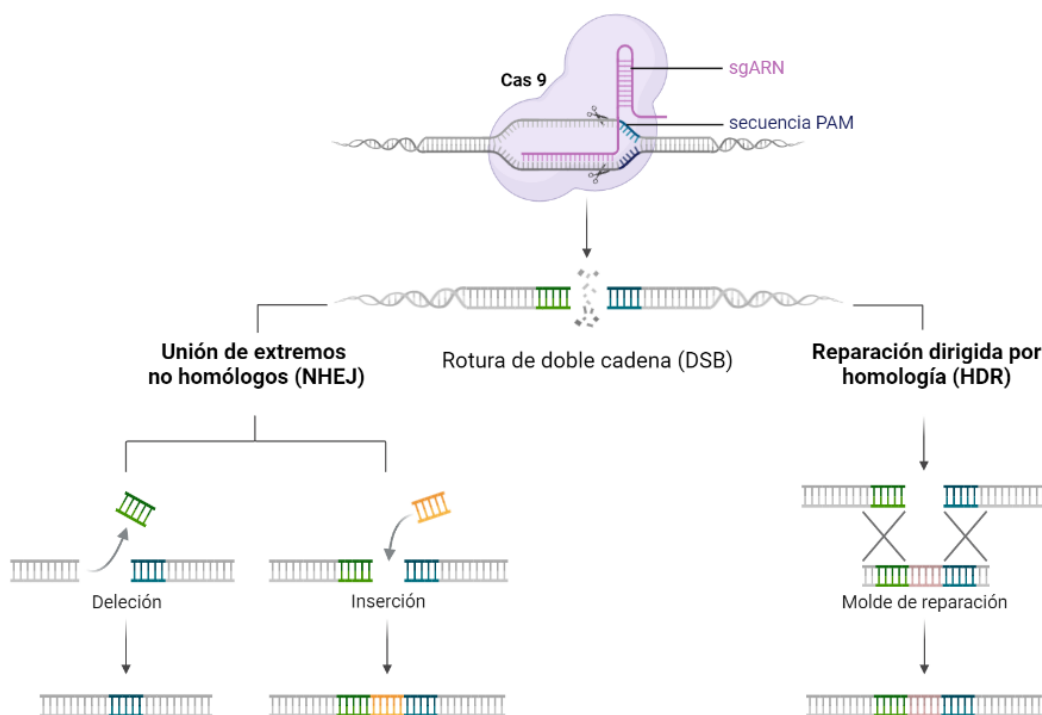


Figura 2. Funcionamiento del sistema CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genética y posibles métodos de reparación. Creado en BioRender.com.

Si bien esta tecnología es una herramienta muy versátil, uno de los mayores problemas, en especial para las aplicaciones terapéuticas, es la alta frecuencia de mutaciones inducidas fuera de sitio por el reconocimiento de secuencias distintas a la secuencia blanco (*off-targets*), así como también la baja frecuencia de HDR en células de mamíferos (17). A su vez, para que cualquier método basado en CRISPR-Cas sea útil clínicamente, las enzimas Cas, los sgARN asociados y cualquier molde de reparación de ADN deben llegar hasta las células objetivo. Como consecuencia, el método de *delivery* sigue siendo el mayor cuello de botella para la edición genómica de células somáticas (12). Actualmente, los métodos más utilizados son la electroporación (en forma de ribonucleoproteína o plásmidos), los vectores virales (típicamente virus adenoasociados) y las nanopartículas (18).

1.5. Nanotecnología y sus aplicaciones

La nanotecnología se basa en el diseño, caracterización y manipulación de materiales a escala nanométrica (entre 1 nm - 100 nm). Se ha visto que los materiales a escala nanométrica presentan propiedades fisicoquímicas diferentes a las que exhiben en escalas micro y macrométricas, que pueden ser de tipo mecánicas, térmicas, magnéticas, electrónicas, ópticas y catalíticas. Estas propiedades únicas hacen que los nanomateriales sean atractivos en una gran variedad de aplicaciones (19–22).

Los nanomateriales se sintetizan utilizando dos estrategias diferentes: *top-down* y *bottom-up*. En el enfoque *top-down* se parte de materiales a macro o micro escala, los cuales se descomponen mediante técnicas de reducción de tamaño hasta alcanzar la nanoescala, mientras que en el enfoque *bottom-up* se parte de átomos o moléculas que se ensamblan hasta lograr estructuras moleculares en el rango nanométrico (23). A su vez, los nanomateriales se pueden clasificar de acuerdo con la cantidad de dimensiones que presentan a escala nanométrica. Según este parámetro existen cuatro categorías (22,24):

- Nanomateriales de dimensión cero: sus tres dimensiones se encuentran dentro de la nanoescala. Algunos ejemplos son las nanopartículas, nanoarcillas, fullerenos y *quantum-dots*.
- Nanomateriales unidimensionales: una de sus dimensiones se encuentra fuera de la nanoescala. Algunos ejemplos son los nanotubos, nanofibras, nanocables, entre otros.
- Nanomateriales bidimensionales: dos de sus dimensiones se encuentran fuera de la nanoescala. Son materiales en forma de láminas, como por ejemplo grafeno y *nanofilms*.
- Nanomateriales tridimensionales: no presentan ninguna dimensión dentro de la nanoescala, pero están compuestos por unidades nanométricas. Algunos ejemplos son las dispersiones de nanopartículas y conjuntos de nanotubos.

1.5.1. Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son nanomateriales de dimensión cero, generalmente compuestos de formulaciones poliméricas, liposomales o metálicas (12). Estas han sido objeto de investigación científica en diversos campos debido a sus propiedades únicas, por ejemplo, gracias a su alta relación superficie-volumen son capaces de encapsular múltiples compuestos de moléculas pequeñas. Al mismo tiempo, su superficie puede ser funcionalizada con numerosos ligandos, tales como cadenas de ADN o ARN, péptidos, aptámeros o anticuerpos (25–27).

Las NPs pueden integrar distintas categorías según su morfología, dimensionalidad, tamaño, propiedades físicas y químicas. De acuerdo con su composición química, las NPs se clasifican en tres categorías principales: basadas en carbono, orgánicas e inorgánicas (27,28).

1.5.1.1. Nanopartículas basadas en carbono

Las NPs a base de carbono se componen únicamente por átomos de carbono conjugados en geometrías particulares, que les otorgan propiedades muy diferentes según la estructura sintetizada. De esta forma, las NPs de carbono se sub-clasifican en grafeno, fullerenos, nanotubos de carbono y nanofibras de carbono, entre otros (28).

1.5.1.2. Nanopartículas orgánicas

Las NPs orgánicas se componen de polímeros como dendrímeros, micelas y liposomas. Estas dos últimas suelen denominarse nanocápsulas ya que en su interior presentan un núcleo hueco. La utilización de NPs orgánicas en biomedicina presenta varias ventajas, ya que estas se caracterizan por ser biodegradables, no tóxicas, poco inmunogénicas, presentar una gran capacidad de encapsulación y sensibilidad frente a la radiación térmica y electromagnética (28).

1.5.1.3. Nanopartículas inorgánicas

Las NPs inorgánicas se basan en distintos metales u óxidos metálicos. Casi todos los metales pueden ser utilizados para sintetizar NPs, pero los más utilizados son el aluminio, cobre, oro, hierro, plomo, plata y zinc. Por otra parte, las NPs a base de óxidos metálicos se sintetizan para modificar las propiedades de sus respectivas NPs metálicas debido a que presentan una mayor reactividad y eficiencia. Las más comunes son el óxido de aluminio, óxido de hierro, magnetita, dióxido de silicio, óxido de titanio y óxido de zinc (12,28).

A diferencia de las NPs orgánicas, las inorgánicas pueden alcanzar tamaños más pequeños, pueden formar estructuras cristalinas y amorfas, y pueden adoptar formas esféricas y cilíndricas. Además, se caracterizan por sus superficies inmunológicamente inertes y de fácil funcionalización, su alta estabilidad en entornos fisiológicos y, en algunos casos, la presencia de propiedades magnéticas, ópticas y térmicas, que resultan de gran utilidad en aplicaciones biomédicas (12,28).

Algunos investigadores plantean el uso de cubiertas poliméricas junto con estas NPs, ya que les permiten transportar de forma segura varios compuestos, dirigirlos a sitios de interés, mejorar su biocompatibilidad y ajustar algunas propiedades fisicoquímicas como su carga superficial (25).

1.5.1.3.1. Nanopartículas de oro

En comparación con otras NPs metálicas, las nanopartículas de oro (AuNPs) son las más estables (29,30). Si bien estas cuentan con varias características interesantes, quizá la más atractiva radica en sus propiedades ópticas. Bajo el estímulo de un haz de luz, los electrones de conducción del oro oscilan colectivamente, fenómeno que recibe el nombre de plasmón. Cuando la frecuencia del fotón incidente es resonante con la oscilación de los electrones de conducción se genera una banda de absorción que se denomina plasmón de resonancia. A escalas nanométricas, dicha oscilación ocurre en la superficie del metal, lo que se conoce como plasmón de resonancia superficial (SPR) (31). Es debido a esta propiedad que las AuNPs exhiben diferentes colores dependiendo de su forma y tamaño. Por ejemplo, las AuNPs esféricas monodispersas de tamaño pequeño (~ 30 nm) presentan un SPR que les permite absorber la luz de la porción azul-verde del espectro electromagnético (longitud de onda de ~ 450 nm) y reflejar la luz roja (longitud de onda de ~ 700 nm) que les proporciona su color característico (32).

A medida que el tamaño de las AuNPs aumenta, se absorben longitudes de onda más altas (cerca del rojo) y se reflejan las más bajas (cerca de la porción violeta-azul) (32). Gracias a esta propiedad, también se pueden evidenciar los efectos de agregación de las AuNPs en solución debido a un cambio de color desde el rojo al azul, ya que las nubes electrónicas se superponen y las AuNPs agregadas se comportan como una única partícula más grande (Figura 3) (33).

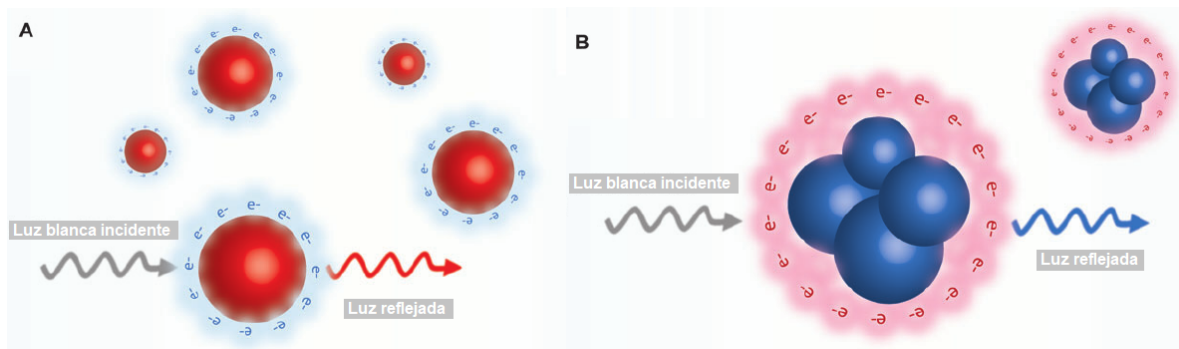


Figura 3. Color de una solución de AuNPs según su SPR. (A) AuNPs dispersas, (B) AuNPs agregadas. Extraído y adaptado de “Gold Nanoparticles in the clinical laboratory: principles of preparation and applications” (33).

Las AuNPs pueden formar enlaces químicos estables con grupos que contienen moléculas de azufre y nitrógeno, lo que les permite unirse a una amplia variedad de ligandos con funciones específicas (31). Ejemplos de estos pueden ser proteínas, péptidos, drogas, ADN u otras biomoléculas. Las uniones entre las AuNPs y los ligandos pueden ocurrir tanto a través de interacciones no covalentes (electrostáticas, hidrofóbicas y de afinidad) como a través de interacciones covalentes (34).

En cuanto a su biocompatibilidad y toxicidad, numerosos autores han confirmado que el núcleo de las AuNPs puede ser considerado como un material no tóxico tanto *in vivo* como *in vitro* (35). Sin embargo, algunos estudios han reportado que la toxicidad de las AuNPs está directamente relacionada con su tamaño, indicando que el uso de AuNPs de tamaños inferiores a 2 nm resulta en necrosis y apoptosis celular. Se ha visto que la toxicidad también depende de la concentración de la solución, en particular las concentraciones elevadas de estas AuNPs de tamaño pequeño, ya que pueden resultar aún más tóxicas debido a las lesiones que pueden provocar sobre los orgánulos citoplasmáticos. A pesar de esto, gran cantidad de estudios han observado que no existen signos específicos de toxicidad ni se presentan cambios significativos en el funcionamiento celular cuando se utilizan AuNPs en un rango de tamaño de entre 5 nm - 20 nm (36).

Entre los métodos convencionales de síntesis de AuNPs, el más popular es el planteado por Turkevich, que consiste en la reducción de derivados de Au^{3+} utilizando agentes como el peróxido de hidrógeno o la hidracina. Además, se recomienda utilizar agentes estabilizadores como el citrato de sodio o el polietilenglicol (PEG) que evitan la agregación de las AuNPs mediante repulsiones electrostáticas o impedimentos estéricos, respectivamente. Siguiendo este método se obtienen AuNPs de un tamaño aproximado de 20 nm (23,37).

Varios autores han descrito a las AuNPs esféricas como vehículos específicos, eficientes y selectivos para el sistema CRISPR-Cas9, ya que se pueden sintetizar fácilmente, es posible ajustar su tamaño y su forma, y se pueden modificar las propiedades de superficie mediante la funcionalización con diferentes biomoléculas. Además, exhiben baja citotoxicidad, no desencadenan una respuesta inmunitaria y permiten entregas selectivas al núcleo celular, evitando así la degradación por nucleasas (38).

1.5.1.3.2. Nanopartículas de sílica

Junto con las nanopartículas basadas en carbono y plata, las nanopartículas de sílica (SiNPs) se consideran uno de los tres nanomateriales más utilizados en la industria (39). Propiedades como la biocompatibilidad, baja toxicidad, el tamaño ajustable de los poros y la fácil funcionalización de superficie demuestran su gran potencial en el área de la biomedicina, razón por la cual se han llevado a cabo numerosos estudios que aplican a las SiNPs en imagenología y como sistemas de administración de fármacos, ADN y ARN (40–42).

En los últimos años se han logrado sintetizar SiNPs con múltiples morfologías, tamaños y estructura de poros. El método de síntesis húmeda más utilizado es el planteado por Stöber, que involucra la hidrólisis de alcóxidos de silicio (usualmente tetraetil/tetrametil ortosilicato) en una mezcla de alcohol y agua utilizando amoníaco como catalizador. Siguiendo este método y realizando diversos ajustes en las condiciones de síntesis, se pueden obtener SiNPs de diámetros nanométricos hasta unos pocos micrómetros (41,43,44).

Los métodos tradicionales para la síntesis de SiNPs suelen estar asociados a procesos largos, el uso de solventes orgánicos y temperaturas elevadas (40). Por estos motivos, se han investigado alternativas que utilicen condiciones de reacción más leves, como por ejemplo, los métodos de síntesis biomimética, que se basan en imitar la producción de sílica que ocurre en microorganismos marinos como diatomeas y esponjas (45). Además, se ha visto que la presencia de algunas biomoléculas en el medio de reacción permite controlar la formación de sílica en sistemas acuosos *in vitro* bajo condiciones suaves de temperatura y pH (46). *Jackson et al.* utilizaron seroalbúmina bovina (BSA) como molde para dirigir la síntesis de SiNPs, y encontraron que la misma permite obtener nanopartículas más pequeñas y monodispersas que aquellas que carecen del núcleo proteico (40).

De acuerdo a varios investigadores, las SiNPs sin modificaciones superficiales no son capaces de actuar como métodos para el *delivery* de ácidos nucleicos, debido a que contienen grupos hidroxilo en su superficie que les confieren carga negativa. De todos modos, se ha visto que es posible utilizar polímeros catiónicos, por ejemplo polietilenoimina (PEI) para modificar los grupos superficiales y así poder unir el ADN a través de interacciones electrostáticas (47). *Kneuer et al.* reportaron que las SiNPs coloidales con modificaciones superficiales catiónicas podrían aplicarse en las transfecciones de ADN plasmídico (48). Por su parte, *Bharali et al.* lograron sintetizar una suspensión acuosa estable de nanopartículas de ORMOSIL (NPs de sílica modificadas orgánicamente), cuya superficie se encontraba funcionalizada con grupos amino, y demostraron que estas eran capaces de unirse al ADN y actuar de forma eficiente como un vector no viral para la administración génica *in vivo* (49).

Teniendo en cuenta la creciente demanda de tecnologías de transfección más avanzadas y la necesidad de mejorar el método de entrega del sistema CRISPR-Cas a las células *target*, las nanopartículas surgen como potencial alternativa para el desarrollo de vehículos eficientes y selectivos. Por estos motivos, este proyecto pretende investigar el uso de nanopartículas como método para la transfección de células de mamíferos, permitiendo además explorar nuevas técnicas para el *delivery* del sistema CRISPR-Cas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es evaluar el uso de nanovehículos como métodos de transfección de líneas celulares de mamíferos, utilizando el sistema CRISPR-Cas9 como técnica de edición genética.

2.2. Objetivos específicos

Para cumplir con el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar nanopartículas de oro y de sílica.
- Unir moléculas de ADN a las nanopartículas sintetizadas.
- Determinar el efecto citotóxico de las nanopartículas sobre las líneas celulares NM2C5-GFP y HEK-293.
- Evaluar y comparar las eficiencias de transfección en las líneas celulares NM2C5-GFP y HEK-293, utilizando un método novedoso basado en nanopartículas y métodos de transfección tradicionales.

3. Materiales y metodología

3.1. Materiales utilizados

3.1.1. Soluciones

- **PBS 10X:** NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 18 mM.
- **EDTA 0,5 M:** 9,305 g de EDTA en 50 mL de agua ultrapura, pH 8.
- **Acrilamida 30%:** 14,5 g de acrilamida y 0,5 g de bisacrilamida en 50 mL de agua destilada.
- **APS 10%:** 50 mg de persulfato de amonio en 500 µL de agua destilada.
- **PEI 10%:** 2 g de PEI ($M_w \sim 1300$, *Sigma-Aldrich*, #482595) en 20 mL de *buffer* fosfato de sodio, pH 8.
- **BSA (1 mg/mL):** 100 µL de Ultrapure™ BSA 50 mg/mL (*ThermoFisher*, #AM2616) en 4,9 mL de agua ultrapura estéril.
- **TMOS hidrolizado:** 154 µL de TMOS (*Sigma-Aldrich*, #341436) y 1 mL de HCl 1 mM.
- **MTT:** 0,17 g de MTT en 100 mL de PBS esteril.
- **SDS 10%:** 2 g de SDS (*Sigma Aldrich*, #71729) en 20 mL de agua ultrapura.
- **Cristal Violeta:** 75 mg de Cristal Violeta en 100 mL de metanol 40%.

3.1.2. Buffers

- **Buffer de lisis:** Tris 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM pH 8, SDS 0,5%, Proteinasa K 500 µg/mL (*Promega*, #MC5005).
- **Buffer TBE 5X:** Tris 0,445 M, H₃BO₃ 0,445 M, EDTA 0,01 M.
- **Buffer TAE 50X:** Tris-HCl 2 M, CH₃COOH 1 M, EDTA 50 mM.
- **Buffer de carga 6X:** Azul de bromofenol 0,25% (m/v), Xileno cianol 0,25% (m/v), Glicerol 30% (v/v).
- **Buffer HBS 2X:** 0,8 g de NaCl, 0,027 g de Na₂HPO₄·2H₂O y 1,2 g de HEPES en 100 mL de agua ultrapura. En condiciones de esterilidad fue pasado por un filtro estéril de 0,22 µm.
- **Buffer fosfato:** Na₂HPO₄·2H₂O 0,2 M, NaH₂PO₄·H₂O 0,2 M.
- **Buffer P1:** Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, RNAsa A 0,1 mg/mL (*Sigma Aldrich*, #R4875).
- **Buffer P2:** NaOH 0,2 M, SDS 1%.
- **Buffer P3:** KCH₃CO₂ 3 M, CH₃COOH 11,5%.

3.1.3. Antibióticos

- **Ampicilina 100 mg/mL:** 1 g de ampicilina en 10 mL de agua ultrapura. En condiciones de esterilidad fue pasado por un filtro estéril de 0,22 µm.
- **Puromicina 10 mg/mL:** 0,1 g de puromicina en 10 mL de agua ultrapura. En condiciones de esterilidad fue pasado por un filtro estéril de 0,22 µm.

3.1.4. Medios de cultivo

- **DMEM sin suplementar:** DMEM alto en Glucosa (4.5 g/L) con L-Glutamina y Piruvato de Sodio (*Capricorn Scientific, DMEM-HPA*).
- **DMEM completo:** DMEM alto en Glucosa (4.5 g/L) con L-Glutamina y Piruvato de Sodio (*Capricorn Scientific, DMEM-HPA*) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (*Capricorn Scientific, SFB11A*).
- **DMEM 2X completo:** 13,44 g de DMEM alto en glucosa (*ThermoFisher, #12100046*) y 3,7g de NaHCO₃ en 1 L de agua destilada. En condiciones de esterilidad fue pasado por un filtro estéril de 0,22 µm. Finalmente suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (*Capricorn Scientific, SFB11A*).
- **LB:** Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L.
- **LB Agar:** Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, Agar bacteriológico 15 g/L.

3.1.5. Líneas celulares

- **NM2C5-GFP**

Se adquirió la línea celular NM2C5-GFP (ATCC, CRL-2919) derivada de melanoma humano que expresa de forma estable la proteína GFP. Estas células son de morfología epitelial adherente y fueron cultivadas en botellas con medio DMEM completo, a 37°C con atmósfera controlada de 5% de CO₂ y humedad saturada. Tienen un tiempo de duplicación estimado de 29 horas.

- **HEK-293**

El Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay proporcionó la línea celular HEK-293, derivada de células humanas embrionarias de riñón. Estas son de morfología epitelial adherente y fueron cultivadas en botellas con medio DMEM completo, a 37°C con atmósfera controlada de 5% de CO₂ y humedad saturada. Tienen un tiempo de duplicación estimado de 24 horas.

Todos los demás materiales utilizados fueron de grado analítico.

3.2. Procedimientos generales

3.2.1. Descongelado de células

Partiendo de crioviales almacenados en un tanque de nitrógeno líquido (*Taylor Wharton CRYO REFRIGERATOR HC20, Fisher Scientific*) conteniendo las líneas celulares de interés, se comenzó descongelando los criotubos en un baño de agua a 37 °C. A continuación, en una cabina de flujo laminar se transfirió el contenido del criotubo a un tubo cónico que contenía medio DMEM sin suplementar. Posteriormente, el tubo cónico fue centrifugado a 200 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en medio DMEM completo. Por último, se tomó una alícuota para hacer recuento celular y evaluar la viabilidad celular.

3.2.2. Cultivo de células

Las células fueron cultivadas en botellas o placas de cultivo conteniendo medio DMEM completo y se las incubó en una estufa (*Thermo Scientific Forma® Series II Water Jacketed CO₂ Incubator*) a 37°C con atmósfera controlada de 5% de CO₂ y humedad saturada.

3.2.3. Extracción de ADN genómico

Al finalizar los ensayos de transfección correspondientes en las células de mamíferos, el medio de cultivo fue removido, se realizó un lavado con PBS 1X y se tripsinizaron las células. Las fracciones obtenidas se centrifugaron a 200 xg, y a partir de los *pellets* celulares se realizó una extracción de ADN genómico, incubando las muestras con un *buffer* de lisis durante 16 horas a 65°C. Luego de transcurrido el tiempo, se adicionó NaCl 5 M y se incubó en hielo durante 10 minutos. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 9500 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se agregó etanol 95% a -20°C y se centrifugó a 14000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. El *pellet* obtenido se lavó dos veces con etanol 70% a -20°C durante 5 minutos. Para eliminar el etanol residual, los tubos se secaron completamente en un termobloque a 55°C. Finalmente, el ADN obtenido fue resuspendido en agua ultrapura.

3.2.4. Electroforesis de ADN

3.2.4.1. Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa en *buffer* TAE o TBE 0,5X, según se indique. Los porcentajes de agarosa utilizados varían en cada caso para la correcta separación y visualización de las muestras. Por cada 35 mL de solución de agarosa se añadieron 1,5 µL de *GoodView™* (*SBS Genetech Co. Ltd., #HGV2*). Las muestras fueron cargadas en los geles utilizando *buffer* de carga 6X y se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler DNA LadderMix™* (*Thermo Scientific, #SM0331*). Los geles se corrieron en la cuba electroforética *Bioer Mini Run (GE-100)* utilizando *buffer* TAE o TBE 0,5X, según se indique. El tiempo de corrida se determinó de acuerdo al tamaño de las muestras. Para la visualización y el registro fotográfico de los geles se utilizó el *Transiluminador UV 312 (#ZFD015)* y el *E Gel™ Imager System (Thermo Scientific, #4466611)*, respectivamente.

3.2.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se prepararon geles de acrilamida al 10% de 1 mm de espesor en *buffer* TAE 1X según lo establecido en la Tabla 2. Las muestras fueron cargadas en los geles utilizando *buffer* de carga 6X y se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler DNA LadderMix™* (Thermo Scientific, #SM0331). Los geles se corrieron en la unidad de electroforesis *Bio-Rad Mini-PROTEAN®* utilizando *buffer* TAE 1X. El tiempo de corrida se determinó de acuerdo al tamaño de las muestras. Para la visualización y el registro fotográfico de los geles se utilizó el *E Gel™ Imager System* (Thermo Scientific, #4466611).

Tabla 2. Volúmenes utilizados para la preparación de un gel de acrilamida al 10%.

Componente	Volumen
Acrilamida (30%)	3,3 mL
TAE 50X	200 µL
Agua destilada	6,3 mL
APS (10%)	165 µL
TEMED (<i>Thermo Scientific</i> , #17919)	8 µL

3.3. Nanopartículas de oro como posible vehículo de transfección celular: preparación de insumos

3.3.1. Síntesis del nanovehículo de oro

3.3.1.1. Síntesis de AuNPs

Se realizaron cinco síntesis individuales de AuNPs (*batches* A - E) utilizando el método de síntesis húmeda planteado por Turkevich. Para esto, en un matraz protegido de la luz se preparó una solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (hidrógeno tetracloroaurato trihidrato) al 0,01% en agua ultrapura y se la llevó a ebullición en una placa agitadora. A continuación, se añadió una solución de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (citratato trisódico dihidrato) al 1% en agua ultrapura, manteniendo la temperatura durante un período de 15 a 20 minutos. Por último, la solución de AuNPs se dejó enfriar a temperatura ambiente.

3.3.1.2. Caracterización de AuNPs

3.3.1.2.1. Espectroscopía Ultravioleta - Visible (UV-Vis)

Las AuNPs sintetizadas fueron caracterizadas según su SPR, mediante la realización de un espectro de absorción desde 300 nm hasta 800 nm utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso. Para esto se utilizó el espectrofotómetro *SHIMADZU UVmini 1240*. Además, se tomaron medidas por duplicado durante un periodo aproximado de 15 días, con el fin de evaluar su estabilidad en el tiempo.

3.3.1.2.2. Estudio de movilidad de AuNPs por electroforesis en gel de agarosa

Las AuNPs fueron centrifugadas en un rango de 2000 rpm - 5000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se sembraron 25 μ L de cada muestra en un gel de agarosa al 1,5%. A su vez, se sembraron diferentes volúmenes sin centrifugar en un rango de 5 μ L - 25 μ L. En ambos casos, las muestras fueron mezcladas con glicerol al 10% para lograr una siembra adecuada. Las electroforesis fueron llevadas a cabo a 100 V durante 30 minutos, utilizando *buffer* TBE 0,5X.

3.3.2. Generación de la línea celular NM2C5-KO-GFP

3.3.2.1. Caracterización de los plásmidos

3.3.2.1.1. Minipreparación de ADN plasmídico

Se obtuvieron cultivos en placa de *E.coli* conteniendo los plásmidos pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 y pFYF1320 EGFP. El plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 fue donado por Feng Zhang (*Addgene plasmid #62988*; <http://n2t.net/addgene:62988>; *RRID:Addgene_62988*), mientras que el plásmido pFYF1320 EGFP fue donado por Keith Joung (*Addgene plasmid #47511*; <http://n2t.net/addgene:47511>; *RRID:Addgene_47511*). En adelante se referirá a ellos como plásmidos 2A-Puro y EGFP respectivamente.

El plásmido 2A-Puro codifica la Cas9 de *S. pyogenes*, mientras que EGFP codifica un sgARN dirigido al gen EGFP (ver Figuras A1 y A2 del Anexo). A partir de estos cultivos en placa, se prepararon precultivos en medio LB con ampicilina a 100 μ g/mL y se incubaron en un *shaker* de mesada a 200 rpm durante 24 horas a 37°C. A continuación, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el *kit ZR plasmid Miniprep™-Classic* (*Zymo Research, #D4015*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, se determinó la concentración del ADN obtenido midiendo la absorbancia a 260 nm, utilizando el lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant* (*Tecan*), la placa *NanoQuant Plate* y el *software i-control*.

3.3.2.1.2. Digestión enzimática

Utilizando el *software NEBcutter* se seleccionaron las enzimas EcoRI (*Thermo Scientific, #ER0271*) y NcoI (*Thermo Scientific, #ER0571*) para digerir el plásmido 2A-Puro purificado. Por otra parte, para digerir el plásmido EGFP purificado se eligió la enzima HinfI (*Thermo Scientific, #ER0801*). Todas las digestiones se incubaron durante 2 horas a 37°C. Los fragmentos obtenidos fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 100 V durante una hora.

3.3.2.2. Ensayos de transfección en la línea celular NM2C5-GFP por métodos tradicionales

3.3.2.2.1. Transfección basada en lípidos

En una placa de 24 pocillos se sembraron 1×10^5 células en un volumen total de 500 μ L por pocillo. Luego de incubarlas por 24 horas en medio DMEM completo, las células fueron transfectadas con 0,5 μ g de ADN empleando como reactivo de transfección *Lipofectamine® 2000* (*Invitrogen, #11668019*) según las instrucciones del fabricante y utilizando relaciones ADN (μ g):lipofectamina (μ L) de 1:2 y 1:4. Se realizaron controles sin transfectar y controles de transfección sin ADN. A continuación, las células fueron incubadas con los complejos de transfección durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, el medio de transfección fue retirado de todos los pocillos, se lavó la monocapa con PBS 1X y se añadió medio DMEM completo. La placa se incubó nuevamente durante 24 horas.

En una segunda instancia se repitió el ensayo realizando los mismos controles, pero incubando las células con los complejos de transfección durante 6 horas, dejándolas recuperar en medio de cultivo DMEM completo durante 48 horas.

3.3.2.2.2. Transfección por el método de co-precipitación con fosfato de calcio

En una placa de 24 pocillos se sembraron 1×10^5 células en un volumen total de 500 μL por pocillo, y se incubaron durante 24 horas en medio DMEM completo. A continuación, se prepararon los complejos de transfección mezclando 0,5 μg de ADN con CaCl_2 2,5 M y agua ultrapura estéril, añadiendo además *buffer* HBS 2X por goteo. Los tubos se mezclaron vigorosamente y se incubaron durante 30 minutos. Luego, las soluciones de transfección se agregaron a las células por goteo y se incubó durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, el medio de transfección fue retirado de todos los pocillos, se lavó la monocapa con PBS 1X y se añadió medio DMEM completo. La placa se incubó nuevamente durante 24 horas. Se realizaron los mismo controles que en el punto 3.1.3.2.1.

En una segunda instancia se repitió el ensayo realizando los mismos controles, pero utilizando una concentración de 0,75 μg de ADN. Además, la incubación con los complejos de transfección se realizó durante 48 horas, sin tiempo de recuperación.

3.3.2.2.3. Análisis mediante citometría de flujo

Al finalizar los ensayos de transfección, las células transfectadas fueron analizadas por citometría de flujo utilizando el equipo *BD Accuri™ C6 flow cytometer* perteneciente al Institut Pasteur de Montevideo y su *software* correspondiente. Momentos antes de pasar las muestras por el equipo, se agregaron 2 μL de Ioduro de Propidio (IP) a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con el fin de descartar el porcentaje de células muertas del estudio. Se tomaron 10000 eventos por muestra y los datos obtenidos se analizaron mediante gráficos de puntos e histogramas.

En primer lugar, para separar la población celular de interés del debris, se graficaron los canales FSC en función de SSC, que determinan el tamaño y la complejidad celular respectivamente. Luego, se descartaron los dobletes celulares mediante un gráfico de FSC-H en función de FSC.

La intensidad de fluorescencia de la proteína GFP fue detectada mediante el canal FL1 (detecta emisiones de 533 nm - 530 nm), mientras que la fluorescencia emitida por el IP se detectó mediante el canal FL3 (detecta emisiones mayores a 670 nm). A partir del control de células sin transfectar (teñidas con IP y sin teñir), se identificaron las regiones del gráfico FL1 en función de FL3 donde se encontraban las células viables y las células muertas.

Finalmente, para cada muestra analizada, se tomó la región de células viables y se realizó un histograma de la intensidad de fluorescencia detectada en FL1 en función de la cantidad de eventos.

3.4. Nanopartículas de sílica como posible vehículo de transfección celular

3.4.1. Síntesis del nanovehículo de sílica

3.4.1.1. Síntesis de SiNPs

Se utilizó el método de síntesis propuesto por *Jackson et al.* Para ello, en primer lugar se preparó una solución de polietilenimina (PEI) al 10% y una solución de BSA de grado molecular 1 mg/mL, ambas en *buffer* fosfato 0,1 M pH 8. Seguidamente, se preparó una solución de ácido silícico, mediante la hidrólisis de tetrametilortosilicato (TMOS) con HCl 1 mM. La mezcla de síntesis consistió en 1 mL de la solución de BSA, 250 μ L de la solución de PEI y 250 μ L de la solución de TMOS hidrolizado. Para mantener las condiciones de esterilidad, todas las soluciones preparadas se pasaron por un filtro de 0,2 μ m (excepto el TMOS) y la manipulación se llevó a cabo en cabina de flujo laminar. Una vez sintetizadas, las SiNPs se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos, se removió el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de NaCl 500 mM en *buffer* fosfato 0,1 M pH 8. Por último, se realizaron tres lavados con agua ultrapura estéril y se sonicó la solución obtenida durante 5 minutos.

3.4.1.2. Estimación de la concentración de las SiNPs

Se realizó una reacción de síntesis de SiNPs por duplicado según lo establecido en el punto 4.1.1. Posteriormente, se colocaron los tubos que contenían las nanopartículas en una estufa a 60°C durante 24 horas para eliminar la fracción líquida. Una vez transcurrido el tiempo, se determinó su peso. Con el peso seco de las SiNPs y el peso de los tubos utilizados, se calculó la cantidad de SiNPs que se obtienen en cada reacción de síntesis.

3.4.1.3. Ensayo de adsorción de ADN plasmídico sobre SiNPs

Se mezclaron 50 μ L de SiNPs a una concentración de 3000 μ g/mL con 50 μ L de una solución que contenía los plásmidos 2A-Puro y EGFP a una concentración de 30 ng/ μ L, y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, se centrifugó a una velocidad de 15000 rpm durante 40 minutos y se almacenó el sobrenadante, mientras que el *pellet* obtenido fue resuspendido en 100 μ L de agua ultrapura. La solución se centrifugó nuevamente durante 40 minutos a 15000 rpm y se almacenó el sobrenadante, mientras que el *pellet* obtenido fue resuspendido en 100 μ L de NaCl 500 mM y se incubó durante 10 minutos con agitación. La solución fue centrifugada nuevamente a 15000 rpm durante 40 minutos y se almacenó el sobrenadante. Todas las fracciones almacenadas fueron cuantificadas por espectrofotometría, utilizando el lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan)*, la placa *NanoQuant Plate* y el *software i-control*. Por último, se purificó la fracción obtenida luego de la incubación con NaCl utilizando el *kit* comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, #A9281)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicha fracción fue posteriormente analizada junto con las otras fracciones obtenidas mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V durante una hora.

3.4.2. Ensayos sobre la línea celular NM2C5-GFP

3.4.2.1. Ensayo de citotoxicidad

En una placa de 96 pocillos se sembraron 3×10^4 células en un volumen total de 100 μ L por pocillo, en los bordes de la placa se colocó PBS 1X para evitar la incidencia de la evaporación. La placa de cultivo fue incubada durante 24 horas.

Luego, a partir de un *batch* de SiNPs estériles se realizaron diluciones seriadas al medio, en un rango de concentraciones entre 125 μ g/mL - 4000 μ g/mL. Estas se incubaron en relación 1:1 con medio de cultivo DMEM 2X completo durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se removió el medio de cultivo de la placa y se realizó un lavado con PBS 1X. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de cada solución de SiNPs con medio de cultivo. Además, se realizaron controles sin SiNPs para determinar el 100% de viabilidad, y controles de muerte utilizando Triton X-100 al 0,5%. La placa fue incubada durante 24 horas a 37°C. Luego de transcurrido el tiempo, se removió el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS 1X. A continuación, se adicionaron 100 μ L de medio de cultivo fresco y 30 μ L de una solución de MTT a una concentración de 1,7 g/L, y se incubó durante 3 horas en las mismas condiciones. Seguidamente, se removieron 75 μ L de medio de cada pocillo y se mezcló el líquido remanente con 50 μ L de DMSO. Finalmente, la placa se incubó durante 10 minutos a 37°C y se midió la absorbancia a 540 nm utilizando el lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan)* y el *software i-control*. Se realizaron seis réplicas para cada concentración de SiNPs, así como también para los controles de viabilidad y muerte.

3.4.2.2. Ensayo de transfección utilizando el nanovehículo de sílica

En una placa de 24 pocillos se sembraron 1×10^5 células en un volumen total de 500 μ L por pocillo, y se incubó durante 24 horas. Luego de transcurrido el tiempo, se ensamblaron las soluciones a utilizar, mezclando en relación 1:1 las SiNPs (en un rango de concentraciones entre 125 μ g/mL - 2000 μ g/mL) con una solución que contenía los plásmidos 2A-Puro y EGFP a una concentración de 20 μ g/mL. Se incubó a temperatura ambiente durante una hora, y luego se adicionaron 1200 μ L de medio de cultivo DMEM 2X completo a cada solución. A continuación, se removió el medio de cultivo de la placa y se realizó un lavado con PBS 1X. Seguidamente, se adicionaron 500 μ L de las soluciones de transfección correspondientes, y se incubó durante 72 horas a 37°C. Se realizaron controles sin transfectar y cada condición fue estudiada por duplicado.

Al finalizar la transfección, el medio de cultivo fue removido, se realizó un lavado con PBS 1X y se tripsinizaron las células. Por último, las fracciones obtenidas se centrifugaron y los *pellets* se almacenaron a -20 °C para estudios posteriores.

3.4.2.3. Evaluación de la eficiencia de mutación

3.4.2.3.1. Ensayo de restricción de heteroduplex

A partir de los *pellets* obtenidos en el punto 4.2.2, se realizó una extracción de ADN genómico según lo establecido en la sección 2.3 de los procedimientos generales. Luego, se llevó a cabo una reacción de PCR para amplificar una región del gen GFP utilizando la enzima *Taq DNA Polymerase (NEB, #M0273L)* y siguiendo el ciclado presentado en la Tabla 3 (ver *primers* en Tabla A6 del Anexo). El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 1%. Aquellas reacciones que presentaron una banda cercana a los 500 pb se purificaron utilizando el *kit* comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, #A9281)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Condiciones de reacción de la PCR para amplificar el gen GFP en la línea NM2C5-GFP.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicial	95°C	30 segundos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	35
Annealing	65°C	30 segundos	
Extensión	68°C	25 segundos	
Extensión final	68°C	5 minutos	1

A continuación, para la desnaturalización e hibridación aleatoria de las hebras, se colocaron 100 ng de las muestras de ADN purificadas en un termociclador, siguiendo el programa presentado en la Tabla 4. Al finalizar, se añadió la enzima T7E1 (*NEB*, #M0302S) y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, la enzima fue inactivada añadiendo EDTA 0,25 M. El resultado de la digestión enzimática se visualizó en un gel de acrilamida al 10%.

Tabla 4. Condiciones de incubación para la desnaturalización e hibridación del producto de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Temperatura/Tiempo
1	95°C	5 minutos	-
2	95°C - 85°C	-	- 2°C/s
3	85°C - 25°C	-	- 0,1°C/s

3.4.3. Ensayos sobre la línea celular HEK-293

3.4.3.1. Método *Golden Gate*

3.4.3.1.1. Digestión y desfosforilación de plásmido

Partiendo de una minipreparación de ADN plasmídico, según lo establecido en el punto 3.1.3.1.1, el plásmido 2A-Puro fue incubado con la enzima BbsI (*NEB*, #R3539) durante 30 minutos a 37°C y posteriormente fue inactivada durante 20 minutos a 65°C. La digestión se visualizó en un gel de agarosa al 0,8%, y a partir de este se purificó la banda obtenida utilizando el *kit* comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (*Promega*, #A9281), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido purificado fue desfosforilado utilizando la enzima *FastAP* (*ThermoFisher*, #EF0654) durante 30 minutos a 37°C, la cual fue inactivada durante 5 minutos a 75°C. Finalmente el plásmido digerido y desfosforilado fue purificado utilizando el *kit* mencionado anteriormente.

En instancias posteriores se repitió el ensayo, cambiando el tiempo de incubación con la enzima BbsI por 24 y 4 horas.

3.4.3.1.2. Fosforilación y *annealing* de los oligonucleótidos

El Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay proporcionó tres pares de oligonucleótidos, que permitieron generar tres secuencias guía diferentes (ver Tabla A10 del Anexo). La reacción de fosforilación y *annealing* de dichos oligonucleótidos se realizó utilizando *T4 Ligation Buffer* (*ThermoFisher*, #46300018) junto con la enzima PNK T4 (*ThermoFisher*, #EK0031) en un termociclador, siguiendo el programa presentado en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de incubación para la fosforilación y *annealing* de los oligonucleótidos.

Paso	Temperatura	Tiempo	Temperatura/Tiempo
1	37°C	30 minutos	-
2	95°C	5 minutos	-
3	95°C - 25°C	-	5°C/min

3.4.3.1.3. Ligación de las guías dentro del plásmido

Las tres secuencias guías obtenidas cuentan con extremos simple hebra complementarios a los extremos del plásmido 2A-Puro digerido. La reacción de ligación se llevó a cabo en *10X Ligase Reaction Buffer* (*ThermoFisher*, #B69) utilizando la enzima *T4 DNA Ligase* (*ThermoFisher*, #EL0011) durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, la enzima fue inactivada incubando durante 10 minutos a 65°C. Los plásmidos obtenidos se denominan de aquí en adelante 2A-Puro-G1, 2A-Puro-G2 y 2A-Puro-G3 respectivamente.

3.4.3.1.4. Clonación en *E. coli*

3.4.3.1.4.1. Generación de bacterias quimiocompetentes

El Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay proporcionó bacterias *E. coli* TOP10, a partir de las cuales se preparó un precultivo en medio LB y se lo incubó en un *shaker* de mesada a 200 rpm durante 24 horas a 37°C. A continuación, se diluyó el cultivo en medio LB y se lo incubó a 37°C con agitación. Utilizando el espectrofotómetro *SHIMADZU UVmini 1240* y cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso, se midió la densidad óptica (OD) a 600 nm hasta alcanzar un valor de 0,5.

Luego de alcanzar la OD deseada, el cultivo se centrifugó a 5000 xg durante 10 minutos a 4°C. El *pellet* fue resuspendido en cloruro de calcio 0,1M frío, seguido por otra centrifugación bajo las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió y finalmente las bacterias competentes se resuspendieron en cloruro de calcio 0,1M frío. Las alícuotas fueron almacenadas a -20°C.

3.4.3.1.4.2. Transformación de bacterias quimiocompetentes

Para cada reacción de ligación se añadieron 5 µL de los plásmidos (2A-Puro-G1, 2A-Puro-G2 y 2A-Puro-G3) a 100 µL de bacterias quimiocompetentes en cloruro de calcio. Se incubaron durante 30 minutos en hielo, seguido de una incubación de 45 segundos a 42°C, volviendo al hielo por 2 minutos. Posteriormente se añadió medio LB y se incubó por 45 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias transformadas fueron plaqueadas en medio LB agar con ampicilina a 100 µg/mL y se incubaron

durante 24 horas a 37°C. Se realizaron los controles de viabilidad, formulación y eficiencia correspondientes.

3.4.3.1.4.3. Colony PCR

Se identificaron las colonias a estudiar en cada placa y se tomó una porción de cada una de ellas para disolverlas en agua destilada. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 100°C y posteriormente se centrifugaron a 12000 xg por un minuto. El sobrenadante fue utilizado como molde para realizar una reacción de PCR utilizando la enzima *Taq DNA Polymerase* (NEB, #M0273L) siguiendo el ciclado presentado en la Tabla 6. Se utilizaron tres *primers forward* diferentes (específicos para cada guía) y un único *primer reverse*, que amplificaba un fragmento de la región *gRNA-scaffold* del plásmido (ver Tabla A7 del Anexo). Finalmente, el resultado de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

Tabla 6. Condiciones de reacción de la Colony PCR para verificar la incorporación de inserto al plásmido.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicial	95°C	1 minuto	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	35
Annealing	60°C	30 segundos	
Extensión	68°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

3.4.3.1.4.4. Minipreparación de ADN plasmídico

Se centrifugaron cultivos ON de las colonias seleccionadas a 14000 rpm durante 30 segundos y los *pellets* se resuspendieron en *buffer* P1. Las muestras fueron vortexeadas, se añadió *buffer* P2 y se mezcló por inversión. A continuación, las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente hasta que se volvieron translúcidas. Luego, se agregó *buffer* P3, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se realizó una centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se repitió el paso anterior. El nuevo sobrenadante se transfirió a un tubo limpio al cual se le agregó isopropanol a -20°C en relación sobrenadante (µL):isopropanol (µL) de 1:0,7, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado, se agregó etanol 70% a -20°C y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el etanol fue retirado por evaporación en un termobloque a 60°C y el *pellet* se resuspendió en agua ultrapura.

3.4.3.1.4.5. PCR

Se realizó una reacción de PCR siguiendo el esquema de ciclado y utilizando los mismos *primers* que los empleados en la *Colony PCR* (punto 4.3.1.4.3). Para ello, se utilizó 1 ng del ADN plasmídico extraído en el punto anterior (punto 4.3.1.4.4) como molde de la reacción. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1%.

3.4.3.2. Ensayos de citotoxicidad

3.4.3.2.1. Ensayo con MTT

En una placa de 96 pocillos se sembraron 3×10^4 células en un volumen total de 100 μL por pocillo, y en los bordes se colocó PBS 1X para evitar la incidencia de la evaporación. La placa se incubó durante 24 horas.

Luego de transcurrido el tiempo, a partir de un *batch* de SiNPs estériles se realizaron diluciones seriadas al medio en un rango de concentraciones de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cuales luego se mezclaron en relación 1:1 con medio de cultivo DMEM 2X completo. A continuación, se removió el medio de cultivo de las células y se realizó un lavado con PBS 1X. Posteriormente se adicionaron 100 μL de cada solución de SiNPs con medio de cultivo. Además, se realizaron controles de viabilidad sin SiNPs, y controles de muerte utilizando Triton X-100 al 0,5%. La placa fue incubada durante 24 horas a 37°C, se removió el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS 1X. A continuación, se adicionaron 100 μL de medio de cultivo fresco y 30 μL de una solución de MTT a una concentración de 1,7 g/L, y se incubó durante 3 horas a 37°C. Seguidamente, se removieron 75 μL de medio de cada pocillo y se mezcló el líquido remanente con 50 μL de DMSO. Finalmente, la placa se incubó durante 10 minutos a 37°C y se midió la absorbancia a 540 nm utilizando el lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan)* y el *software i-control*. Se realizaron seis réplicas para cada concentración de SiNPs, así como también para los controles de viabilidad y muerte.

3.4.3.2.2. Ensayo con Cristal Violeta

3.4.3.2.2.1. SiNPs desnudas

En una placa de 96 pocillos se sembraron 3×10^4 células en un volumen total de 100 μL por pocillo, en los bordes se colocó PBS 1X para evitar la incidencia de la evaporación. La placa fue incubada durante 24hs.

Luego de transcurrido el tiempo, a partir de un *batch* de SiNPs estériles se realizaron diluciones seriadas al medio en un rango de concentraciones de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cuales luego se mezclaron con medio de cultivo DMEM 2X completo, en relación 1:1 durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se removió el medio de cultivo de la placa y se realizó un lavado con PBS 1X. Posteriormente se adicionaron 100 μL de cada solución de SiNPs con medio de cultivo. Además, se realizaron controles de viabilidad sin SiNPs y controles de muerte utilizando Triton-X100 al 0,5%. La placa fue incubada durante 24 horas a 37°C, se removió el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS 1X. A continuación, se agregaron a cada pocillo 50 μL de solución de Cristal Violeta y se incubó durante 20 minutos a 37°C. Luego de la incubación se realizaron varios lavados con agua hasta remover el exceso de colorante y se adicionaron 250 μL de ácido acético al 20% por pocillo, homogeneizando suavemente hasta observar una coloración uniforme. Finalmente, se midió la absorbancia a 590 nm utilizando el lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan)* y el *software i-control*. Se realizaron seis réplicas para cada concentración de SiNPs, así como también para los controles de viabilidad y muerte.

3.4.3.2.2. SiNPs con ADN

En una placa de 96 pocillos se sembraron 3×10^4 células en un volumen total de 100 μL por pocillo, en los bordes se colocó PBS 1X para evitar la incidencia de la evaporación. La placa fue incubada durante 24 horas.

Luego de transcurrido el tiempo, a partir de un *batch* de SiNPs estériles se realizaron diluciones seriadas al medio en un rango de concentraciones de 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cuales se incubaron con una solución de plásmido pBAD/His vacío (*Thermo Scientific*, #V43001) (ver Figura A3 del Anexo) a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en relación 1:1 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego, se adicionó medio de cultivo DMEM 2X completo a cada solución en igual proporción. A continuación, se removió el medio de cultivo de la placa y se realizó un lavado con PBS 1X. Posteriormente se adicionaron 100 μL de cada solución de SiNPs. Además, se realizaron controles sin SiNPs y controles de muerte utilizando Triton-X100 al 0,5%. La placa fue incubada en una estufa de cultivo durante 24 horas a 37°C, se removió el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS 1X. A continuación, se agregaron a cada pocillo 50 μL de solución de Cristal Violeta y se incubó durante 20 minutos a 37°C. Luego de la incubación se realizaron varios lavados con agua hasta remover el exceso de colorante y se adicionaron 250 μL de ácido acético al 20% por pocillo, homogeneizando suavemente hasta observar una coloración uniforme. Finalmente, se midió la absorbancia a 590 nm utilizando el lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant* (*Tecan*) y el software *i-control*. Se realizaron seis réplicas para cada concentración de SiNPs, así como también para los controles de viabilidad y muerte.

3.4.3.3. Ensayos de transfección utilizando el nanovehículo de sílica

En una placa de 24 pocillos 1×10^5 células en un volumen total de 500 μL por pocillo, y se incubó durante 24 horas.

Luego de transcurrido el tiempo, se ensamblaron las soluciones a utilizar, mezclando en relación 1:1 las SiNPs (a concentraciones de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con una solución que contenía el plásmido 2A-Puro-G1 a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incubó a temperatura ambiente durante una hora y luego se adicionó medio de cultivo DMEM 2X completo a cada solución en igual proporción. A continuación, se removió el medio de cultivo de la placa y se realizó un lavado con PBS 1X. Seguidamente, se adicionaron 500 μL de las soluciones de transfección correspondientes y se incubó durante 72 horas a 37°C. Se realizó un control sin transfectar y cada condición fue estudiada por duplicado.

Por otra parte, se realizó un control positivo de transfección utilizando lipofectamina. Para ello, se realizaron dos mezclas en paralelo. En un tubo se mezclaron 1000 ng de ADN con 50 μL de DMEM sin suplementar, y en otro 4 μL de *Lipofectamine 2000* (*Invitrogen*, #11668019) con 50 μL de DMEM sin suplementar. Ambos fueron incubados durante 5 minutos y luego se mezcló el contenido de los tubos y se volvió a incubar durante 25 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se removió el medio de cultivo de la placa y se realizó un lavado con PBS 1X. Seguidamente, se adicionó a cada pocillo 450 μL de medio DMEM completo y 50 μL de la solución de transfección y se incubó durante 24 horas a 37°C. Luego de transcurrido el tiempo, se quitó el medio de transfección, se realizó un lavado con PBS 1X. Seguidamente, se adicionó un medio de selección compuesto por DMEM completo con puomicina a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó nuevamente durante 24 horas. Por último, se removió el medio de selección, se realizó un lavado con PBS 1X y las células fueron incubadas durante 24 horas en medio de cultivo DMEM completo para su recuperación.

Al finalizar la transfección de todas las condiciones, se removió el medio de cultivo de los pocillos, se realizó un lavado con PBS y se tripsinizaron las células. Las fracciones obtenidas fueron centrifugadas y se almacenaron los *pellets* a -20 °C para estudios posteriores.

En una segunda instancia de transfección se emplearon SiNPs a concentraciones de 62,5 µg/mL y 125 µg/mL, utilizando el mismo esquema de cultivo, selección y recuperación que para las células transfectadas con lipofectamina.

3.4.3.4. Evaluación de la eficiencia de la mutación

3.4.3.4.1. PCR

A partir de los *pellets* obtenidos en el punto 4.3.3, se realizó una extracción de ADN genómico según lo establecido en la sección 2.3 de los procedimientos generales. Luego, se llevó a cabo una reacción de PCR para amplificar una región del gen CASP8AP2 utilizando la enzima *Taq DNA Polymerase* (NEB, #M0273L) y siguiendo el ciclado presentado en la Tabla 7 (ver *primers* en Tabla A9 del Anexo). El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 1%. Aquellas reacciones que presentaron una banda cercana a los 600 pb se purificaron utilizando el *kit* comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, A9281) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 7. Condiciones de reacción de la PCR para amplificar el gen CASP8AP2 en la línea HEK-293.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicial	95°C	30 segundos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	35
Annealing	59°C	30 segundos	
Extensión	68°C	25 segundos	
Extensión final	68°C	5 minutos	1

3.4.3.4.2. Ensayo de restricción del heteroduplex

Para la desnaturalización e hibridación aleatoria de las hebras, en un termociclador se colocaron 300 ng de las muestras de ADN purificadas en el punto 4.3.3.1.1, siguiendo el programa presentado en la Tabla 8. Al finalizar, se añadió la enzima T7E1 (NEB, #M0302S) y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, la enzima fue inactivada añadiendo EDTA 0,25 M.

Para la primera instancia de transfección, el resultado de la digestión enzimática se visualizó en un gel de acrilamida al 10%, sin embargo, en la segunda instancia se utilizó un gel de agarosa al 3%.

Tabla 8. Condiciones de incubación para la desnaturalización e hibridación del producto de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Temperatura/Tiempo
1	95°C	5 minutos	-
2	95°C - 85°C	-	- 2°C/s
3	85°C - 25°C	-	- 0,1°C/s

3.4.3.4.3. Ensayo de movilidad del heteroduplex

En paralelo al ensayo de restricción del heteroduplex, en un termociclador se colocaron 400 ng de las muestras de ADN purificadas en el punto 4.3.3.1.1, siguiendo el programa presentado en el punto 4.3.3.1.2. El producto rehibridado se visualizó en un gel de acrilamida al 10%.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico para los ensayos de citotoxicidad se realizó utilizando el *software GraphPad Prism 8*. Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de un solo factor y en caso de obtener diferencias significativas ($p < 0,05$) se aplicó la prueba de *Dunnett*.

4. Resultados obtenidos y discusión

4.1. Nanopartículas de oro como posible vehículo de transfección celular: preparación de insumos

Tal como se mencionó en la introducción, las nanopartículas de oro esféricas han sido reportadas como potenciales vehículos para el *delivery* de sistema CRISPR-Cas9. Sin embargo, para lograr un *delivery* efectivo es necesario que estas sean capaces de superar diversas barreras tanto intra como extracelulares. Es por este motivo que varios autores proponen como potencial alternativa, desarrollar estrategias que permitan que los nanovehículos sean capaces de responder a estímulos externos y de esta manera poder controlar la administración espacio temporal del sistema CRISPR-Cas9 (12,17,18).

En base a lo mencionado anteriormente, se planteó como idea inicial generar un nanovehículo conformado por un núcleo de oro esférico y recubierto con un polímero termosensible, capaz de encapsular el sistema CRISPR-Cas9 sobre las AuNPs y liberarlos de forma controlada frente a un estímulo externo (Figura 4A). En paralelo, se propuso generar un *knock-out* (KO) del gen GFP en la línea celular NM2C5-GFP (NM2C5-KO-GFP) para posteriormente transfectarla con el nanovehículo, a modo de reparar dicha mutación y evaluar si el sistema es efectivo (Figura 4B).

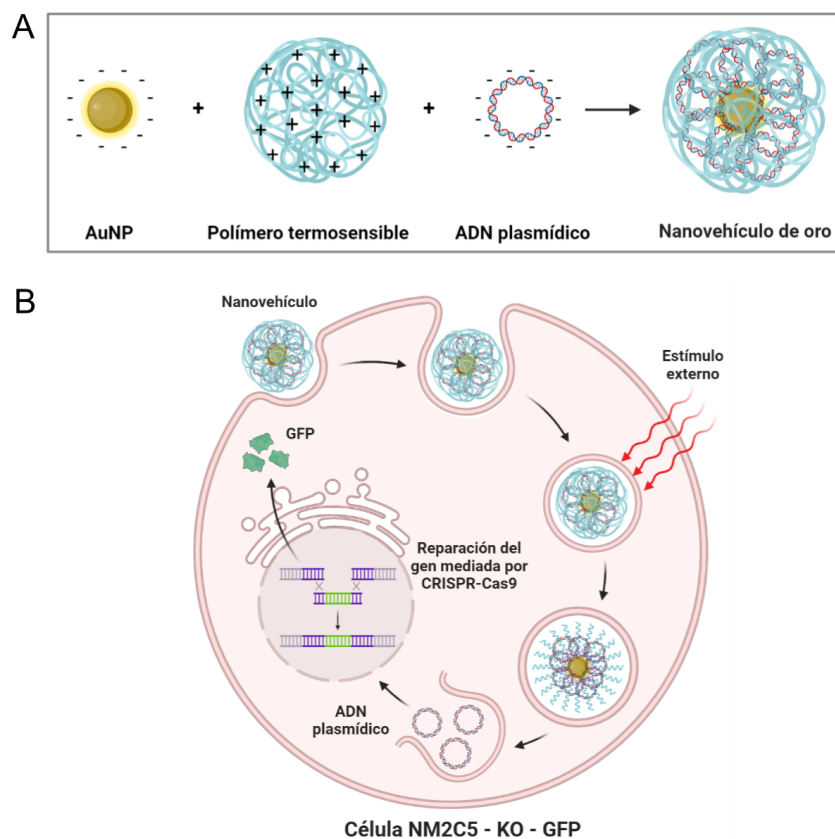


Figura 4. (A) Esquema del nanovehículo. Conformado por un núcleo de oro esférico y recubierto con un polímero termosensible, que encapsula al sistema CRISPR-Cas9 en forma de ADN plasmídico. **(B) Transfección del nanovehículo en una célula NM2C5-KO-GFP.** El nanovehículo ingresa a la célula y libera el ADN plasmídico frente a un estímulo externo. Luego, el sistema CRISPR-Cas9 induce la reparación del gen GFP mediante HDR. Creado en BioRender.com.

4.1.1. Síntesis del nanovehículo de oro

4.1.1.1. Síntesis de AuNPs

Como se mencionó anteriormente, tanto la toxicidad como la biocompatibilidad de las AuNPs están directamente relacionadas con su forma y tamaño. Debido a esto, resulta de vital importancia contar con un método de síntesis robusto, que permita obtener nanopartículas de tamaño y forma homogénea. Para abordar la síntesis, se optó por utilizar el método de síntesis húmeda planteado por Turkevich, que consiste en reducir una sal de oro con una solución de citrato de sodio dentro de un medio acuoso en ebullición y con agitación vigorosa, permitiendo obtener una disolución de nanopartículas de oro esféricas (23,37) (Figura 5).

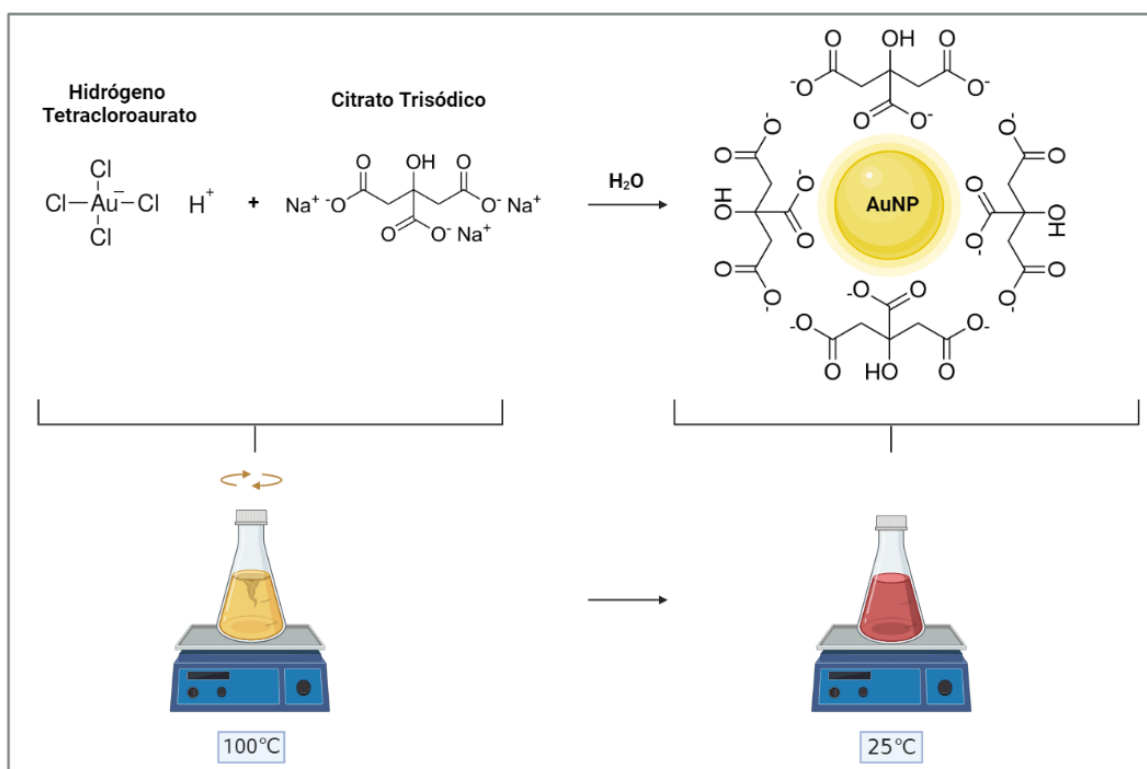


Figura 5. Representación esquemática del método de Turkevich para la síntesis de AuNPs. Siguiendo este método es posible obtener nanopartículas esféricas de aproximadamente 16 nm. Creado en BioRender.com.

Dado que en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT no se contaba con un sistema cerrado, el proceso de síntesis se realizó en un sistema abierto empleando un matraz de vidrio tapado y protegido de la luz. Tras sintetizar cinco *batches* de AuNPs (A - E), se obtuvieron cinco soluciones coloidales de color rojo que fueron caracterizadas por espectroscopía UV-Vis y de acuerdo a su movilidad en un gel de agarosa.

4.1.1.2. Caracterización de AuNPs

4.1.1.2.1. Espectroscopía Ultravioleta - Visible (UV-Vis)

El comportamiento plasmónico de las nanopartículas varía de acuerdo a su forma, tamaño y composición. Según datos bibliográficos, las soluciones de AuNPs esféricas de entre 15 nm - 20 nm presentan un color rojizo y exhiben un SPR dentro del rango entre 520 nm - 524 nm (32,50).

En la Figura 6 se muestran los espectros de absorción obtenidos para todos los *batches* en su día de síntesis y en la Tabla 9 se especifican los valores del SPR. Como se puede observar, existen algunas diferencias en los valores de cada *batch*, que se atribuyen al efecto de la evaporación del medio de síntesis al efectuarse en un sistema abierto. De todos modos, la gran mayoría de los *batches* presentaron un valor de SPR dentro del rango esperado, lo que indica que las AuNPs sintetizadas eran esféricas y poseían un tamaño de entre 15 nm - 20 nm.

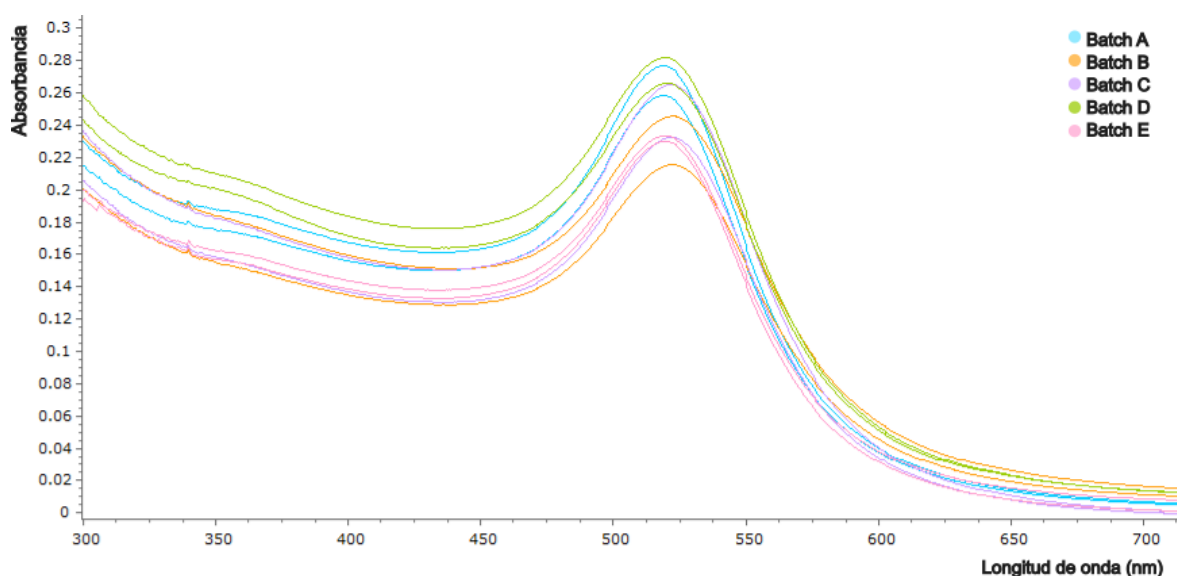


Figura 6. Análisis del comportamiento plasmónico de los *batches* A - E de AuNPs en el día de síntesis. Las AuNPs sintetizadas presentaron un SPR dentro de un rango de 518 - 522 nm.

Tabla 9. Valores de SPR y absorbancia de los *batches* A - E de AuNPs en el día de síntesis.

<i>Batch</i>	Promedio SPR	Desvío estándar SPR	Promedio Absorbancia	Desvío estándar absorbancia
A	518,7 nm	0,14	1,07	0,05
B	522,2 nm	0,42	0,92	0,08
C	521,7 nm	0	0,99	0,09
D	519,8 nm	0,50	1,07	0,04
E	519,5 nm	0,07	0,93	0,01

A su vez, se efectuó un seguimiento individual para cada *batch* durante aproximadamente 15 días. Para ello, se realizó una inspección visual de las muestras y se tomaron medidas de SPR, en intervalos de entre dos y cuatro días (Tablas A1 - A5 del Anexo). Durante este tiempo no se observó un corrimiento notorio del plasmón hacia longitudes de onda mayores, lo que se condice con los colores que presentaban las soluciones al inspeccionarlas visualmente. Según la bibliografía consultada, estas observaciones indican que las AuNPs sintetizadas no se agregan durante el periodo de tiempo estudiado (51). Sin embargo, luego de transcurrida una semana desde el proceso de síntesis, las soluciones presentaban un precipitado visible de las partículas fuera de la suspensión coloidal. Este fenómeno se denomina floculación y normalmente precede a la agregación, aunque a diferencia de esta, puede ser reversible mediante ajustes en el pH de la solución y sonicación leve, entre otros (51).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se considera que se adquirió robustez en la técnica de síntesis de AuNPs siguiendo el método de Turkevich. De todos modos, varios autores recomiendan no basarse únicamente en la espectroscopía UV - Vis como método de caracterización de las nanopartículas (52), por lo que en próximas instancias se podría evaluar el uso de otro método de caracterización adicional como por ejemplo TEM / SEM (*Transmission Electron Microscopy / Scanning Electron Microscopy*).

4.1.1.2.2. Estudio de movilidad de AuNPs por electroforesis en gel de agarosa

Como se mencionó anteriormente, las técnicas de caracterización permiten determinar parámetros como el tamaño, la forma y la carga superficial de las AuNPs, los cuales son aspectos importantes a tener en cuenta previo a realización de ensayos celulares. Una de las técnicas más empleadas para caracterizar la funcionalización de este tipo de nanopartículas es la electroforesis en gel de agarosa, ya que cuando las AuNPs interactúan con las biomoléculas, estas aumentan su tamaño y su movilidad electroforética disminuye en relación con la de las nanopartículas sin funcionalizar (53).

Con el fin de determinar las condiciones de siembra para visualizar las AuNPs de forma óptima en un gel de agarosa, y poder separarlas según su grado de funcionalización en estudios posteriores, se estudió la movilidad y la aparición de bandas visibles en un gel de agarosa luego de centrifugar las AuNPs sintetizadas a diferentes velocidades, y probando diferentes volúmenes de siembra de AuNPs sin centrifugar. Cabe aclarar que, durante el proceso de síntesis por el método de Turkevich, el citrato de sodio funciona como agente reductor y estabilizador, proporcionando a las AuNPs una carga superficial negativa. Además, debido al color rojizo que presenta la solución, no fue necesario utilizar ningún tipo de tinción.

Al estudiar diferentes volúmenes de siembra sin centrifugar no se obtuvieron bandas visibles, lo que demuestra que el paso de centrifugación es necesario para lograr visualizar a las AuNPs en un gel de agarosa.

Por otra parte, en la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto de diferentes velocidades de centrifugación. Como se puede observar, para todas las condiciones se visualiza una única banda de color rojo de igual movilidad electroforética, que comienza a distinguirse con mayor claridad a velocidades de centrifugación más altas (4500 rpm - 5000 rpm). Esto indica que a estas velocidades se logra obtener un *pellet* con mayor concentración de AuNPs sin generar la agregación de las mismas.

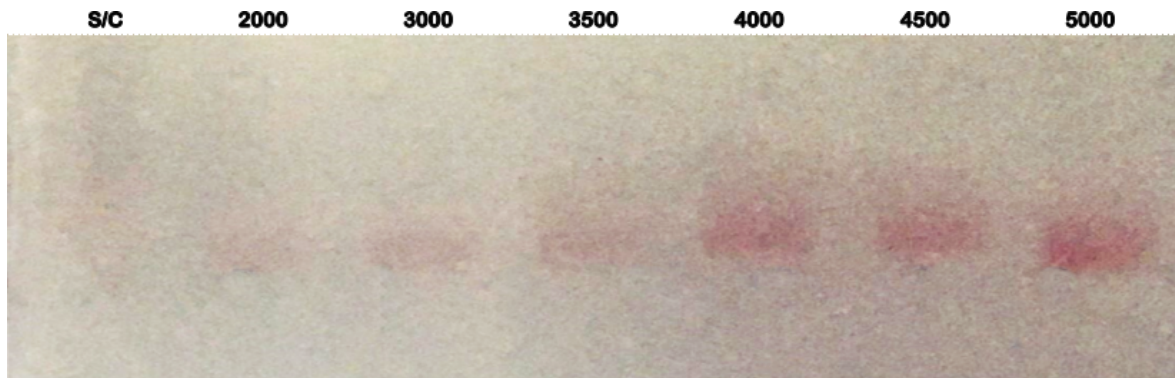


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% para el estudio de AuNPs frente a diferentes velocidades de centrifugación. Las AuNPs se centrifugaron en un rango entre 2000 rpm - 5000 rpm. Se realizó un control sin centrifugar (S/C).

De acuerdo a datos bibliográficos, la velocidad recomendada para centrifugar AuNPs esféricas de 15 nm es de 12000 rpm, mientras que para las de 20 nm se recomienda 10000 rpm (54). Por este motivo, se considera que deberían realizarse más estudios a velocidades superiores para evaluar el comportamiento de las AuNPs en términos de movilidad y agregación.

De acuerdo a los resultados obtenidos luego de la síntesis y la caracterización de las AuNPs, se logró adquirir robustez en la técnica para sintetizar AuNPs esféricas de entre 15 nm - 20 nm, y se determinó que estas se mantienen estables y sin agregarse durante un periodo aproximado de 15 días. A su vez, se determinó que solamente se pueden visualizar en un gel de agarosa luego de someterlas a un paso de centrifugación de al menos 4500 rpm durante 10 minutos.

Como se mencionó anteriormente, una vez sintetizadas y caracterizadas las AuNPs, se iba a ensamblar el nanovehículo adicionando la cubierta polimérica e incorporando el ADN plasmídico. Con el fin de comprobar si el nanovehículo resultaba efectivo, se planteó utilizarlo para reparar una mutación conocida en una línea celular.

Para ello, en primer lugar, se propuso generar un KO en el gen GFP de la línea celular NM2C5-GFP (NM2C5-KO-GFP), empleando el sistema CRISPR-Cas9 en forma de ADN plasmídico y utilizando métodos de transfección tradicionales. A continuación, se estudiaría la población celular generada sin fluorescencia y se seleccionaría una mutación que fuese relativamente fácil de reparar. Luego, en base a la información obtenida, se diseñaría e incorporaría un molde de reparación en el nanovehículo junto con el resto de los componentes del sistema CRISPR-Cas9, para posteriormente transfectar las células NM2C5-KO-GFP. Finalmente, si luego del ensayo se lograba detectar fluorescencia, se lograría determinar que el nanovehículo funcionaba de forma correcta.

4.1.1.3. Generación de la línea celular NM2C5-KO-GFP

4.1.1.3.1. Caracterización de los plásmidos

Para generar el KO del gen GFP se decidió utilizar el sistema CRISPR-Cas9. Para esto, se adquirieron dos plásmidos, uno que codifica para la enzima spCas9 (2A-Puro), y otro que codifica para la secuencia sgARN (EGFP), los cuales fueron caracterizados para verificar su identidad. Para ello, se realizó una minipreparación de ADN plasmídico para ambos plásmidos, seguido de digestiones enzimáticas (utilizando enzimas de restricción diferentes) a modo de obtener un patrón de restricción característico y posteriormente visualizarlo mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Para el plásmido 2A-Puro se seleccionaron las enzimas EcoRI y NcoI. En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos.

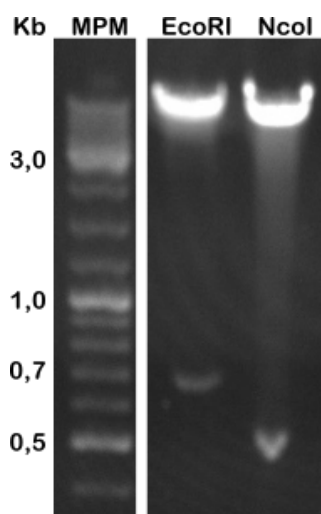


Figura 8. Análisis de la digestión del plásmido 2A-Puro mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%. (MPM) Marcador de peso molecular, (EcoRI) Digestión con EcoRI, (NcoI) Digestión con NcoI.

Según las predicciones del *software NEBCutter*, al digerir el plásmido 2A-Puro con la enzima EcoRI se esperan obtener fragmentos de 8508 pb y 669 pb, mientras que al digerirlo con la enzima NcoI se esperan fragmentos de 8647 pb y 527 pb. Como se puede observar, los resultados obtenidos coinciden con los resultados esperados, por lo que se confirma la identidad del plásmido 2A-Puro.

Por otra parte, para el plásmido EGFP se seleccionó la enzima de restricción HinfI. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos.

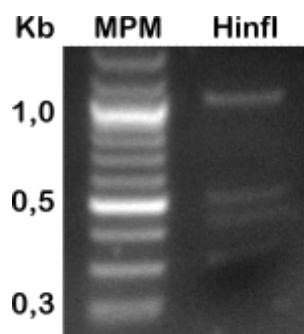


Figura 9. Análisis de la digestión del plásmido EGFP mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%. (MPM) Marcador de peso molecular, (HinfI) Digestión con HinfI.

Según las predicciones del *software NEBCutter*, al digerir el plásmido EGFP con la enzima HinfI se esperan obtener cuatro fragmentos de 1021 pb, 517 pb, 423 pb y 318 pb. Como se puede apreciar, se obtuvo el patrón esperado, confirmando la identidad del plásmido.

4.1.1.3.2. Ensayos de transfección en la línea NM2C5-GFP por métodos tradicionales

NM2C5-GFP es una línea celular desarrollada mediante la transducción del gen GFP en la línea celular NM2C5 proveniente de melanoma humano. Para generar el KO de dicho gen, se utilizó el sistema CRISPR-Cas9 codificado por los plásmidos 2A-Puro y EGFP. Para la transfección del sistema, se utilizaron dos de los métodos tradicionales más empleados (lipofectamina y co-precipitación con fosfato de calcio) y posteriormente se realizó un análisis mediante citometría de flujo.

En la Figura 10 se muestran los histogramas obtenidos para la primera instancia de transfección, y en la Tabla 10 se muestra el efecto de cada reactivo de transfección sobre la viabilidad celular.

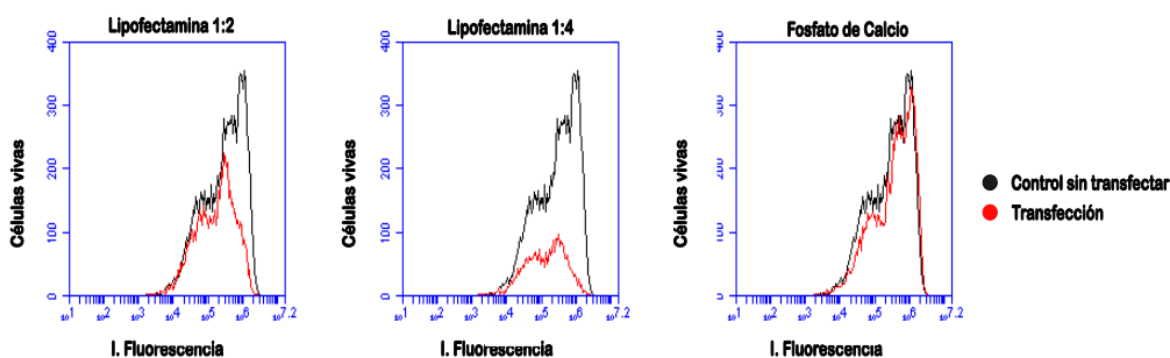


Figura 10. Histogramas de superposición obtenidos luego de la primera instancia de transfección del sistema CRISPR-Cas9 en células NM2C5-GFP utilizando lipofectamina y fosfato de calcio.

Como se puede observar, en el control sin transfectar se detectaron tres picos con distinta intensidad de fluorescencia, que corresponden a tres poblaciones celulares diferentes. Posiblemente esto se deba a la presencia de más de una copia del gen GFP dentro del genoma de las células estudiadas, resultando en una expresión desigual de esta proteína en diferentes poblaciones.

Tabla 10. Porcentajes de viabilidad celular obtenidos luego de la primera instancia de transfección.

Condición	Células muertas (%)	Células vivas (%)
Control sin transfectar	3,3	94,5
Lipofectamina 1:2	32,6	60,4
Lipofectamina 1:4	63,6	32,1
Fosfato de Calcio	5,6	91,2

Cuando las células fueron transfectadas utilizando lipofectamina en relación 1:2 se produjo una disminución en las dos poblaciones con mayor intensidad de fluorescencia, mientras que la población restante se mantuvo relativamente incambiada. Al utilizar la relación 1:4 de lipofectamina se visualizó una disminución significativa de las tres poblaciones. Estos resultados podrían indicar que si efectivamente se generó un KO, este solamente ocurrió en algunas copias del gen.

Otro escenario posible, es donde ocurre el KO en todas las copias del gen, pero no se proporciona el tiempo suficiente para que las proteínas GFP ya sintetizadas se degraden. Sin embargo, se vió que a medida que aumenta la concentración de lipofectamina aumenta la tasa de muerte celular, generando una reducción superior al 30% en la viabilidad al utilizar la relación 1:2, y un elevado descenso en la relación 1:4 (más del 60%). Teniendo esto en consideración, es probable que la reducción en la intensidad de fluorescencia detectada en ambos casos se deba a una disminución en la expresión de la proteína a medida que las células mueren.

Por otra parte, al transfectar con fosfato de calcio no se observaron cambios notorios en la intensidad de fluorescencia ni en la viabilidad con respecto al control sin transfectar.

De acuerdo a estos resultados, se puede inferir que el sistema CRISPR-Cas9 no logra ingresar a las células o no logra actuar sobre el gen *target*. En base a esto, se propuso modificar las condiciones de transfección, removiendo la lipofectamina luego de 6 horas con el fin de disminuir la tasa de muerte celular y ampliar el tiempo de recuperación. Con este cambio se buscó proporcionar el suficiente tiempo para que el sistema CRISPR-Cas9 se ensamble de forma correcta y se dirija hacia el gen *target*, así como también para permitir la degradación de proteínas fluorescentes residuales. Por otra parte, respecto a la transfección con fosfato de calcio, se optó por incubar las células con los complejos durante 48 horas sin proporcionarles tiempo de recuperación, ya que al incubar durante 24 horas no se visualizaron cambios con respecto a los niveles de fluorescencia detectada, ni en cuanto a la viabilidad celular.

En la Figura 11 y en la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos en la segunda instancia de transfección. Como se puede observar, al igual que en la instancia anterior, se detectaron tres poblaciones celulares con diferentes intensidades de fluorescencia en el control sin transfectar.

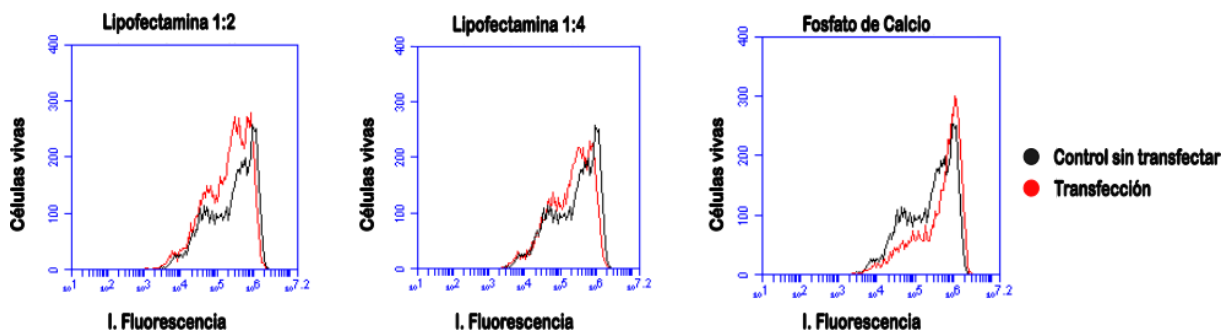


Figura 11. Histogramas de superposición obtenidos luego de la segunda instancia de transfección del sistema CRISPR-Cas9 en células NM2C5-GFP utilizando lipofectamina y fosfato de calcio.

Con respecto a las transfecciones utilizando lipofectamina, en ambas relaciones no se observaron diferencias entre la intensidad de fluorescencia emitida por las células del control y las células transfectadas. En cuanto a la viabilidad, la lipofectamina en relación 1:4 generó una muerte celular superior al 30%. Sin embargo, al utilizar la relación 1:2 se obtuvieron valores similares al control sin transfectar, por lo que, se podría asumir que bajo estas condiciones la lipofectamina no tiene un efecto negativo sobre la viabilidad celular.

Tabla 11. Porcentajes de viabilidad celular obtenidos luego de la segunda instancia de transfección.

Condición	Células muertas (%)	Células vivas (%)
Control sin transfectar	14,9	87,9
Lipofectamina 1:2	12,5	89,7
Lipofectamina 1:4	32,1	71,3
Fosfato de Calcio	45,7	57,9

Por otra parte, en la transfección con fosfato de calcio se observó un desplazamiento hacia las poblaciones celulares más fluorescentes. Según *Guo et al*, esto podría deberse a que algunos reactivos de transfección como el fosfato de calcio pueden producir señales fluorescentes que pueden confundirse con la señal generada por la proteína GFP (55). Además, se observó que la incubación con los complejos durante 48 horas generó un descenso en la viabilidad de alrededor del 50%.

Comparando los resultados obtenidos en ambas instancias de transfección, se demostró que, si bien al incubar las células con lipofectamina durante un periodo de tiempo más reducido es posible disminuir la tasa de muerte celular, en ninguna de las relaciones se logró visualizar una disminución en la intensidad de fluorescencia. Por otra parte, al utilizar fosfato de calcio como reactivo de transfección, se observó que a mayores tiempos de incubación la tasa de muerte celular aumenta sin disminuir la intensidad de fluorescencia. Por lo tanto, se puede establecer que no se logró generar el KO del gen GFP debido a que la línea celular NM2C5-GFP parecería no ser susceptible a los métodos de transfección utilizados, bajo las condiciones estudiadas.

Se ha visto que algunas líneas celulares resultan refractarias frente algunos métodos de transfección (56), por lo que para las células NM2C5-GFP se podrían probar otros métodos alternativos, tales como la electroporación. En cualquier caso, estos resultados no pueden ser comparados con otros estudios similares, ya que no hay numerosos reportes bibliográficos en donde se utilice esta línea para ensayos de transfección celular.

Dado que el abordaje metodológico para la síntesis de AuNPs en esterilidad resultaba muy complejo, y que además se requería incorporar un polímero termosensible, se decidió no avanzar en esta dirección, y cambiar la naturaleza del nanomaterial a utilizar, sustituyendo el núcleo de oro por uno de sílica. Con este cambio se buscó simplificar la estructura del nanovehículo, ya que este permitiría adsorber directamente el ADN plasmídico a su superficie, evitando el uso del polímero.

En base a esta información y a los resultados obtenidos, en donde la línea celular NM2C5-GFP no pudo ser transfectada utilizando dos de los métodos tradicionales más empleados, se decidió reestructurar el ensayo. En lugar de inducir un KO en el gen GFP por métodos tradicionales para luego repararlo utilizando el nanovehículo, se decidió simplificar la estrategia y directamente utilizar el nanovehículo para generar el KO.

Adicionalmente, a pesar de que no se logró generar una mutación en la línea NM2C5-GFP mediante métodos tradicionales, esta no fue descartada para los ensayos posteriores con el nanovehículo a base de sílica, ya que se ha visto que existe una correlación entre la composición química del vehículo de transfección y su capacidad para entregar los ácidos nucleicos (57).

4.2. Nanopartículas de sílica como posible vehículo de transfección celular

Como se mencionó en la introducción, las nanopartículas de sílica presentan varias propiedades interesantes tales como su biocompatibilidad, baja toxicidad, y tamaño ajustable de los poros. Es por este motivo que se presentan como potenciales candidatas para aplicaciones como el *delivery* de ácidos nucleicos (40–42).

En base a esto, se optó por desarrollar un nuevo nanovehículo a base de sílica y luego utilizarlo para transfectar la línea celular NM2C5-GFP, a modo de generar un KO en el gen GFP y de esta manera evaluar si el sistema es efectivo (Figura 12). Adicionalmente, con el fin de poder realizar más ensayos, se propuso cambiar el método de detección de la mutación por técnicas de biología molecular, debido a que el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay no cuenta con un citómetro de flujo propio.

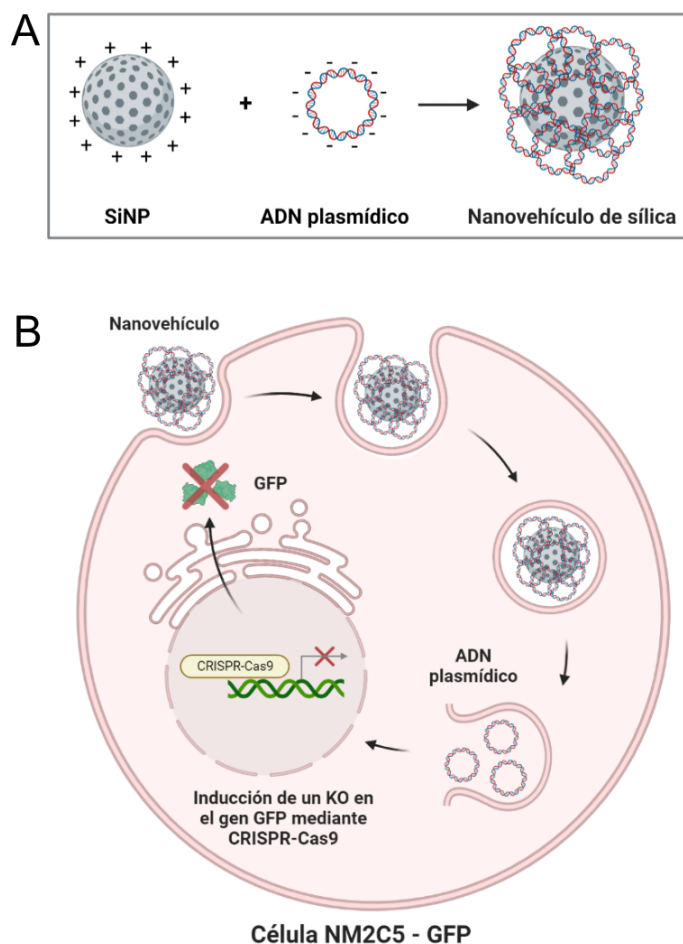


Figura 12. (A) Esquema del nanovehículo. Conformado por un núcleo de sílica mesoporoso y recubierto con ADN plasmídico que codifica para el sistema CRISPR-Cas9. **(B) Transfección del nanovehículo en una célula NM2C5-GFP.** El nanovehículo ingresa a la célula y libera el ADN plasmídico. Luego, el sistema CRISPR-Cas9 induce una mutación en el gen GFP, la cual impide su expresión. Creado en BioRender.com.

4.2.1. Síntesis del nanovehículo de sílica

4.2.1.1. Síntesis y estimación de la concentración de SiNPs

Como fue mencionado anteriormente, existen diversos métodos para la síntesis de nanopartículas de sílica. Sin embargo, en los últimos tiempos el desarrollo de enfoques biomiméticos ha sido el foco de varios investigadores, ya que a diferencia de los métodos tradicionales estos son más rápidos y utilizan condiciones de síntesis más suaves, dado que no involucran el uso de solventes orgánicos, ni requieren de etapas de curado a temperaturas elevadas, entre otros. En ese sentido, se optó por utilizar el método de síntesis biomimética planteado por *Jackson et al.* (Figura 13), que utiliza una proteína globular como molde para mejorar la homogeneidad de las nanopartículas obtenidas. Adicionalmente, este método permite obtener SiNPs con una alta carga superficial positiva (40). Esto resulta de especial interés para su aplicación como base de un nanovehículo para transfectar células, ya que idealmente serían capaces de adsorber el ADN plasmídico (que codifica para el sistema CRISPR-Cas9) en su superficie de forma sencilla.

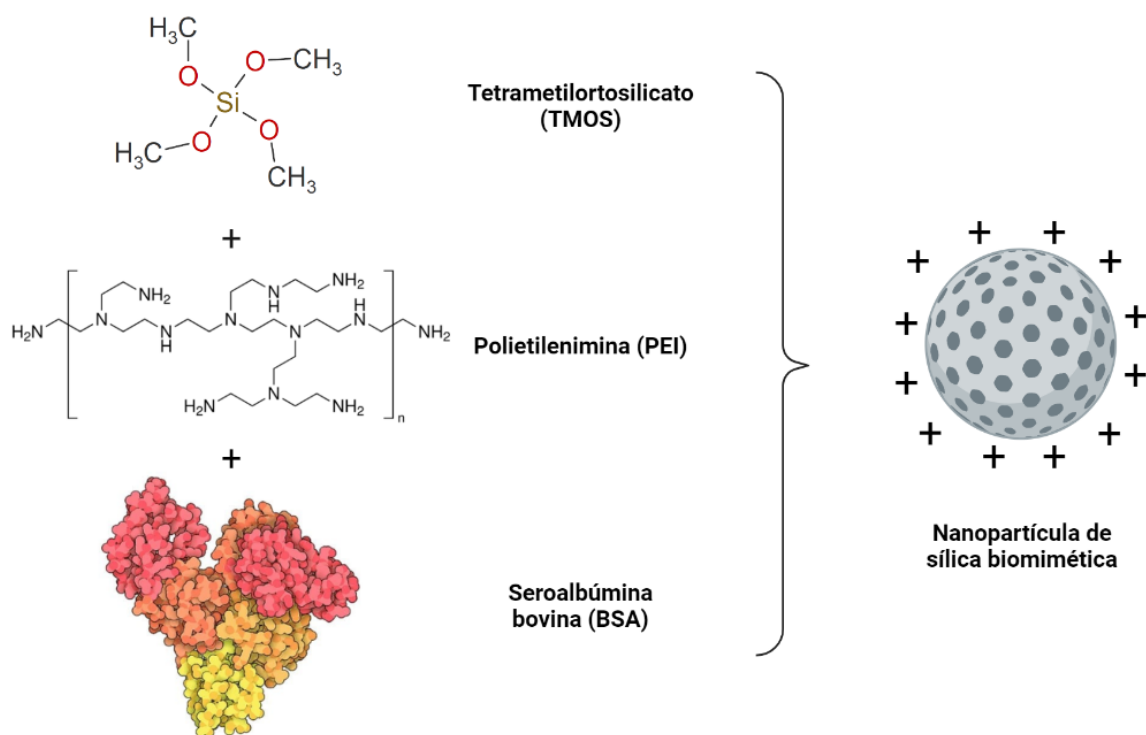


Figura 13. Representación esquemática del método de Jackson *et al.* para la síntesis de SiNPs. Siguiendo este método es posible obtener nanopartículas esféricas mesoporosas de entre 250 nm – 380 nm. Creado en BioRender.com.

El Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay no dispone de un equipo que permita caracterizar este tipo de nanopartículas, ya que a diferencia de las AuNPs, las SiNPs no exhiben un SPR, por lo que no pueden ser caracterizadas mediante espectroscopía UV - Vis. De todos modos, a los efectos de continuar con los objetivos planteados, se considera que tras realizar varias reacciones de síntesis siguiendo el método puesto a punto por *Jackson et al.* se adquirió experiencia en la técnica, lo que permitió obtener *batches* reproducibles. Al mismo tiempo, a partir del peso seco de las SiNPs y los tubos utilizados para su síntesis, se determinó que en cada reacción se obtiene una concentración de 74,3 mg/mL.

4.2.1.2. Ensayo de adsorción de ADN plasmídico sobre SiNPs

Debido a la naturaleza híbrida de las SiNPs, los grupos aminos del PEI que quedan expuestos en su superficie le confieren una carga positiva (40). Esto permite que las moléculas de ADN se adsorban de forma sencilla, y a su vez se puedan desplazar aplicando una solución salina.

Con el fin de estudiar las interacciones que ocurren entre el ADN plasmídico y las SiNPs, en una primera instancia se incubaron SiNPs en rangos de concentraciones entre 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ junto con 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN plasmídico. Sin embargo, al cuantificar las fracciones obtenidas, se observó que los valores se encontraban cercanos al límite de detección del equipo. A su vez, se detectó que una fuente de error en este experimento son las numerosas diluciones seriadas de las SiNPs. Esto se debe a que este tipo de nanopartículas se agregan y decantan rápidamente, lo que contribuye a tomar fracciones poco representativas de la solución. Debido a esto, se ajustaron los parámetros para aumentar la concentración de los reactivos y disminuir los volúmenes de trabajo. Para las SiNPs se utilizó una única concentración de 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para el ADN plasmídico se utilizaron 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Como se mencionó, en la segunda instancia se les ofreció a las SiNPs 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de la mezcla de plásmidos 2A-Puro y EGFP (fracción denominada aplicado). Luego de la incubación, se realizó una centrifugación para separar aquellos plásmidos que no se adsorbieron a las nanopartículas (fracción denominada sobrenadante). Posteriormente se realizó un lavado con agua ultrapura para quitar el ADN que quedó atrapado entre las SiNPs cuando estas decantan, pero que no se encuentra unido a ellas mediante interacciones electrostáticas (fracción denominada lavado). Por último, se realizó un paso de elución utilizando NaCl 500 mM con el fin de desplazar las moléculas de ADN unidas a las SiNPs de forma iónica (fracción denominada eluido). En la Figura 14 se muestra un esquema de ensayo realizado.

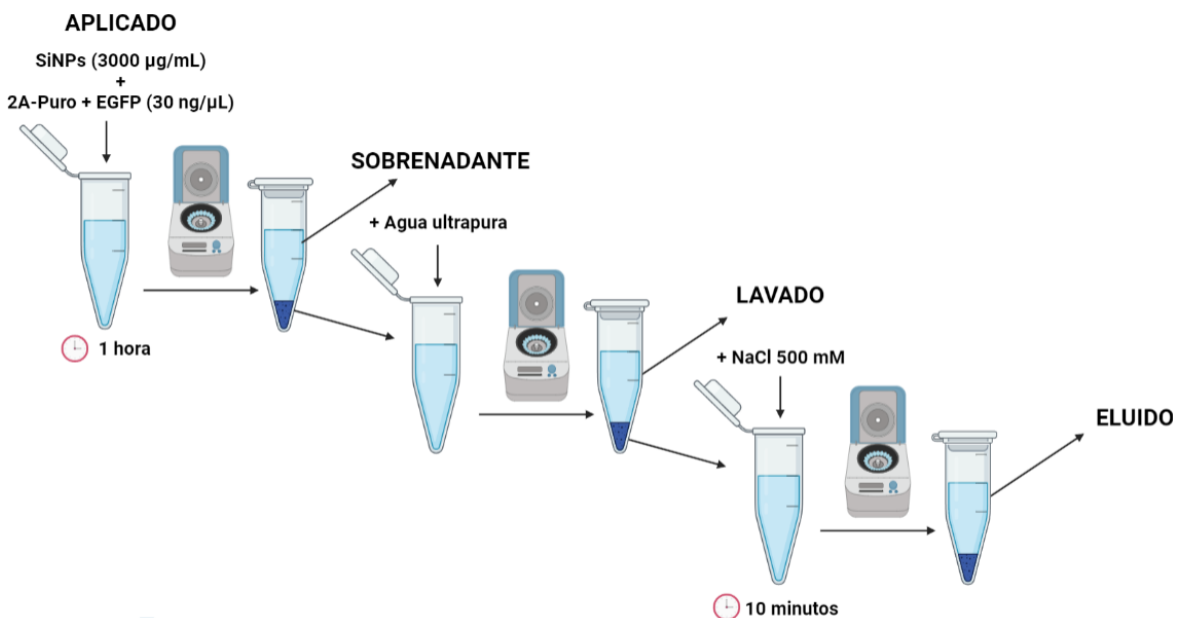


Figura 14. Esquema del ensayo de adsorción de ADN plasmídico sobre SiNPs.

Para determinar la cantidad de ADN plasmídico presente en todas las fracciones obtenidas, estas fueron cuantificadas y posteriormente se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. En la Tabla 12 y en la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 12. Valores de concentración obtenidos en cada etapa del ensayo de adsorción de ADN sobre las SiNPs.

Condición	Concentración (ng/μL)
Aplicado	30
Sobrenadante	4
Lavado	0,75
Eluido	1,1

Como se puede observar, para la fracción correspondiente al sobrenadante, se cuantificaron 4 ng/μL de plásmidos. Esto podría denotar que la superficie de las SiNPs se encuentran en condiciones de saturación, ya que en el medio de reacción se detectó un remanente de los plásmidos ofrecidos, por lo que bajo esas condiciones las nanopartículas estarían en su máxima capacidad de carga y no podrían adsorber más moléculas de ADN.

Con respecto a la fracción obtenida para el lavado, la baja cuantificación de ADN indica que solo una pequeña cantidad del mismo queda retenido entre las SiNPs sin adsorberse a ellas. Por su parte, la baja cuantificación en el eluido indica que luego de una incubación de 10 minutos con NaCl 500 mM no se logra desplazar la unión entre los plásmidos y las SiNPs.

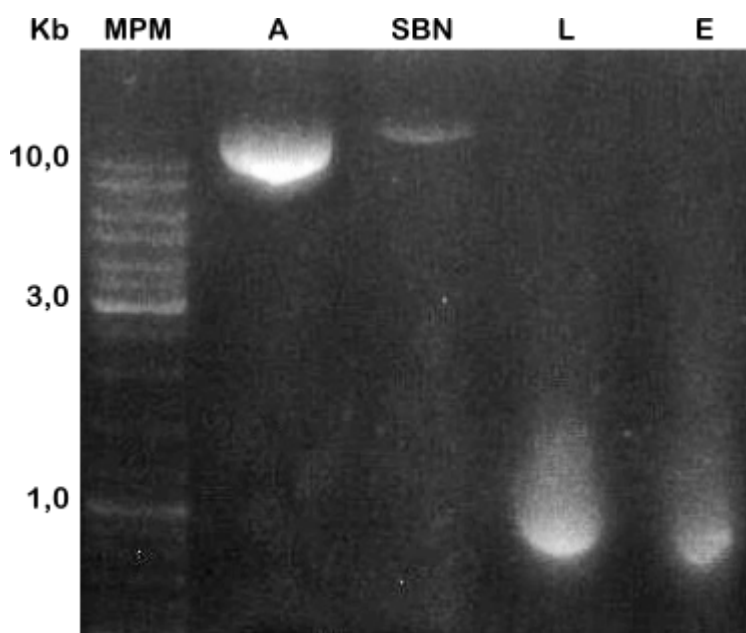


Figura 15. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de las fracciones obtenidas en cada etapa del ensayo de adsorción de ADN sobre las SiNPs. (MPM) Marcador de peso molecular, (A) Aplicado, (SBN) Sobrenadante, (L) Lavado, (E) Eluido.

Luego de analizar la fracción correspondiente al lavado mediante electroforesis en gel de agarosa, no se detectó una banda como la que se visualiza en el carril correspondiente al aplicado, pero se puede observar un patrón de bandas en un rango de pesos moleculares entre 1000 pb - 500 pb. Esto podría indicar que los plásmidos recuperados luego de esta etapa se encuentran degradados, posiblemente debido a una contaminación con DNAsas, ya que el procedimiento se realizó en mesada bajo

condiciones no estériles. Para la fracción correspondiente al eluido también se detecta el mismo patrón de bandas que para el lavado, sin embargo, estas son más pequeñas y tenues, lo que se atribuye a la pérdida de ADN luego del paso de purificación y a la pérdida de volumen a la hora del sembrado de la muestra.

Al finalizar el ensayo, entre las fracciones correspondientes al sobrenadante, lavado y eluido no se logró obtener la cantidad inicial de ADN ofrecido a las SiNPs. Estos resultados demuestran que las interacciones electrostáticas que ocurren entre las SiNPs y el ADN plasmídico son muy fuertes. A pesar de esto, podrían estudiarse condiciones de elución más fuertes, como concentraciones de sal más elevadas, inducir cambios de pH en el medio, o someter a la muestra a temperaturas elevadas.

4.2.2. Ensayos sobre la línea celular NM2C5-GFP

4.2.2.1. Ensayo de citotoxicidad

Una de las características que se busca al desarrollar nuevas estrategias para la transfección de líneas celulares es que el método genere baja toxicidad celular (58). En base a esto se decidió estudiar un rango amplio de concentraciones de SiNPs, a modo de establecer un rango seguro de trabajo, en el cual estas no generen un efecto citotóxico sobre la línea celular NM2C5-GFP.

Una de las estrategias más empleadas para estudiar la citotoxicidad de un compuesto sobre una línea celular consiste en realizar un ensayo con MTT. Este se basa en la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir sales de tetrazolio como el MTT (bromuro de 2-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazolio), produciendo cristales violetas de un compuesto insoluble denominado formazán. Este posteriormente es disuelto en un solvente orgánico y a partir de mediciones de absorbancia relativas a un control, permite determinar el porcentaje de células viables después de tratarlas con concentraciones variables del reactivo en estudio (59).

De momento, no se disponen datos bibliográficos acerca de la citotoxicidad de las SiNPs sobre la línea celular NM2C5-GFP. Por este motivo, para determinar el rango de concentraciones de SiNPs a estudiar con MTT, se utilizó como referencia un estudio que emplea nanopartículas de sílica híbridas en la línea celular MIA PaCa-2 (60). Si bien dicho estudio utiliza un rango de concentraciones entre 62,5 µg/mL - 1000 µg/mL, en este ensayo se optó por quitar la concentración más baja e incluir algunos valores más altos para ampliar el rango de análisis hasta 4000 µg/mL.

Al finalizar el ensayo se graficó la viabilidad celular en función de las concentraciones de SiNPs utilizadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. A partir del análisis estadístico realizado, no se detectaron disminuciones significativas en la viabilidad celular. Esto indica que en el rango estudiado, las SiNPs no parecerían ser tóxicas en la línea celular NM2C5-GFP. En base a estos resultados, se eligió como rango de trabajo para ensayos posteriores concentraciones de SiNPs de entre 125 µg/mL - 2000 µg/mL.

4.2.2.2.1. Evaluación de la eficiencia de la mutación

Luego de realizar la transfección con SiNPs en la línea NM2C5-GFP, se realizó una extracción del ADN genómico de las células a estudiar y se amplificó un fragmento del gen GFP mediante una reacción de PCR. Utilizando el *software Primer-BLAST* se determinó que el amplicón esperado tenía un tamaño de 546 pb.

El resultado de la PCR del ADN genómico se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa (ver Figura 18). Como se puede observar, para todas las condiciones de transfección se logró amplificar un fragmento con el tamaño esperado. Además, en algunos carriles se visualiza una banda más tenue de un tamaño aproximado de 1000 pb, que se atribuye a amplificaciones inespecíficas.

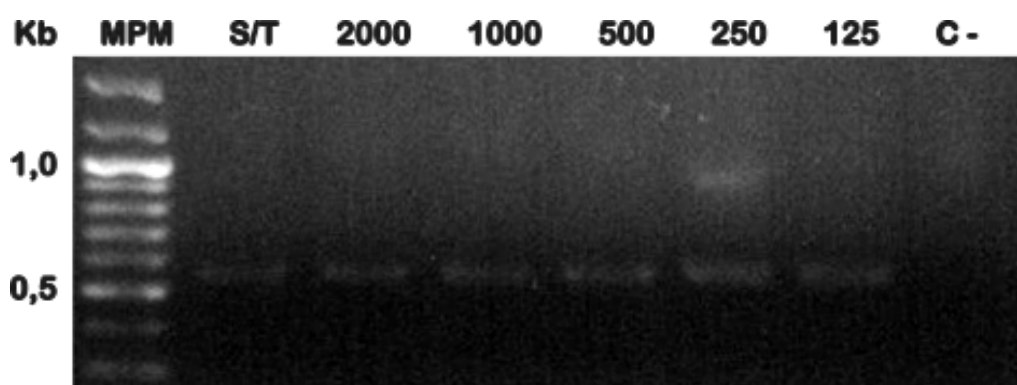


Figura 18. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen GFP por PCR. (MPM) Marcador de peso molecular, (S/T) Células sin transfectar, (2000 - 125) Células transfectadas utilizando SiNPs en concentraciones entre 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, (C -) Control negativo de PCR.

A partir del producto de PCR de la secuencia mutada, los amplicones pueden desnaturalizarse y rehibridarse para obtener un heteroduplex, es decir, obtener dos hebras unidas que portan secuencias diferentes (ya sea un amplicón *wildtype* y un amplicón mutante, o dos amplicones que portan mutaciones diferentes). Debido a estas, se generan bucles en los heteroduplex, denominados *mismatches*. El ensayo de restricción del heteroduplex es una técnica que se utiliza para detectar las mutaciones inducidas. Este se basa en el uso de endonucleasas capaces de reconocer y escindir los *mismatches* en fragmentos más pequeños, que luego pueden ser analizados mediante electroforesis (61).

En la Figura 19 se muestra un esquema del funcionamiento de este ensayo.

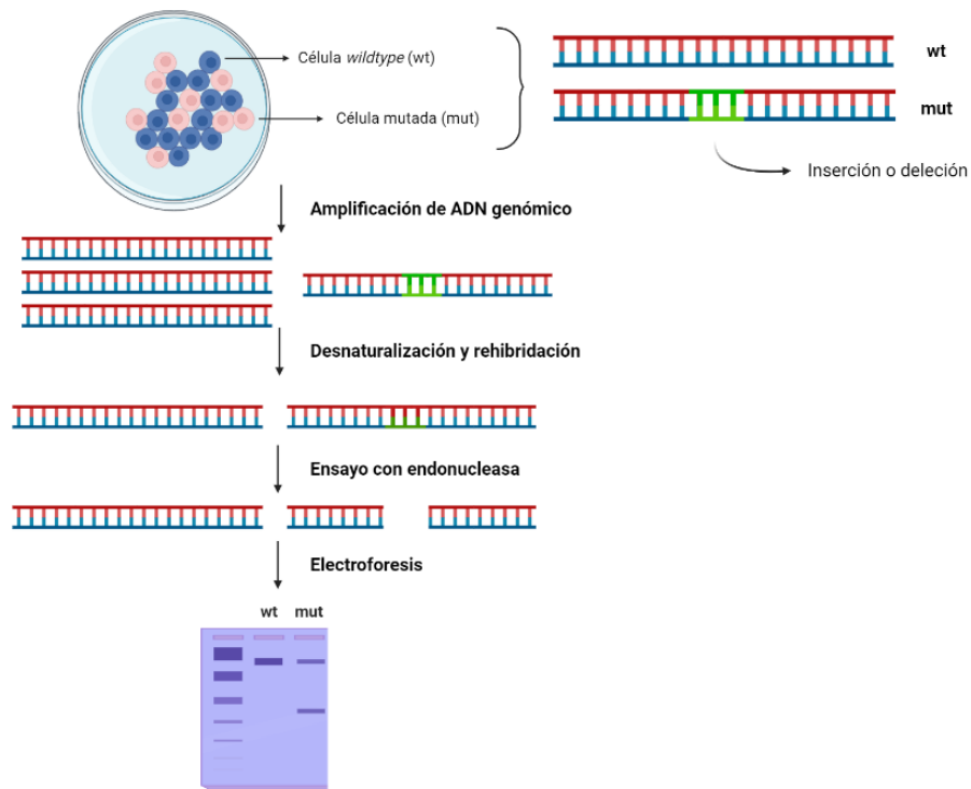


Figura 19. Representación esquemática del ensayo de restricción del heteroduplex. Creado en BioRender.com.

Posteriormente, para evaluar la eficiencia de la transfección se realizó un ensayo de restricción de heteroduplex con la endonucleasa I T7 (T7E1) utilizando todas las muestras. Los fragmentos obtenidos luego de la digestión se resolvieron mediante una electroforesis en gel de acrilamida. En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos.

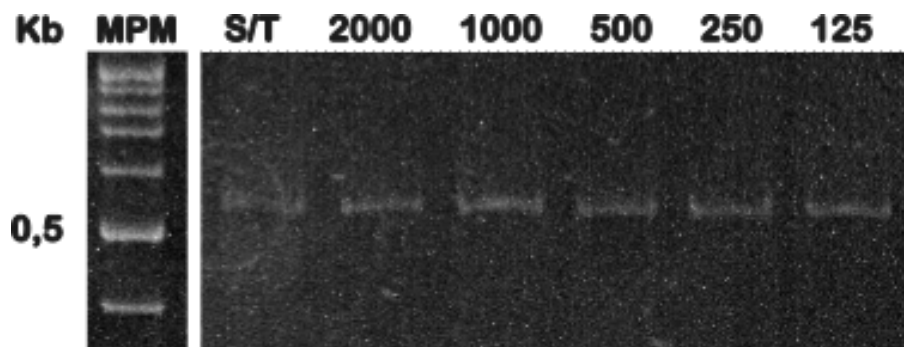


Figura 20. Análisis del ensayo de restricción del heteroduplex en el gen GFP con T7E1 en gel de acrilamida 10%. (MPM) Marcador de peso molecular, (S/T) Células sin transfectar, (2000 - 125) Células transfectadas utilizando SiNPs en concentraciones de entre 2000 µg/mL - 125 µg/mL respectivamente.

Como se observa, para todas las muestras analizadas se visualiza una única banda, indicando que la enzima T7E1 no detectó heteroduplex presentes en el medio de reacción. Con estos resultados se podría inferir que el sistema CRISPR-Cas9 no fue capaz de inducir una mutación, ya sea porque la

transfección no fue exitosa, o porque los plásmidos no lograron expresarse de forma correcta dentro de las células y alcanzar su *target*.

En base a los resultados obtenidos, en donde la línea celular NM2C5-GFP no pudo ser transfectada utilizando dos de los métodos tradicionales más empleados, ni un método novedoso basado en SiNPs, se decidió reestructurar nuevamente el ensayo. Para ello se optó por utilizar la línea celular HEK-293, y se eligió un nuevo gen *target*, ya que esta línea no expresa GFP.

4.2.3. Ensayos sobre la línea celular HEK-293

Según datos bibliográficos, HEK-293 es una de las líneas celulares más utilizadas para investigación debido a que es relativamente sencilla de cultivar, y presenta una alta velocidad de crecimiento, así como también susceptibilidad y eficiencia frente a la transfección utilizando una gran variedad de métodos (62,63). Con respecto a la modificación genética a inducir, se planteó realizar un KO del gen de la proteína 2 asociada a la caspasa 8 (CASP8AP2), ya que varios investigadores reportaron que un descenso en el ARNm de este gen se asocia a una mayor expresión de proteínas recombinantes, sin afectar significativamente el crecimiento y la viabilidad celular (64,65).

Para llevar a cabo este nuevo enfoque se utilizó el nanovehículo a base de sílica planteado anteriormente, pero esta vez conteniendo un solo plásmido que codificaba para la enzima Cas9 y el sgARN. En la Figura 21 se esquematiza la estrategia propuesta.

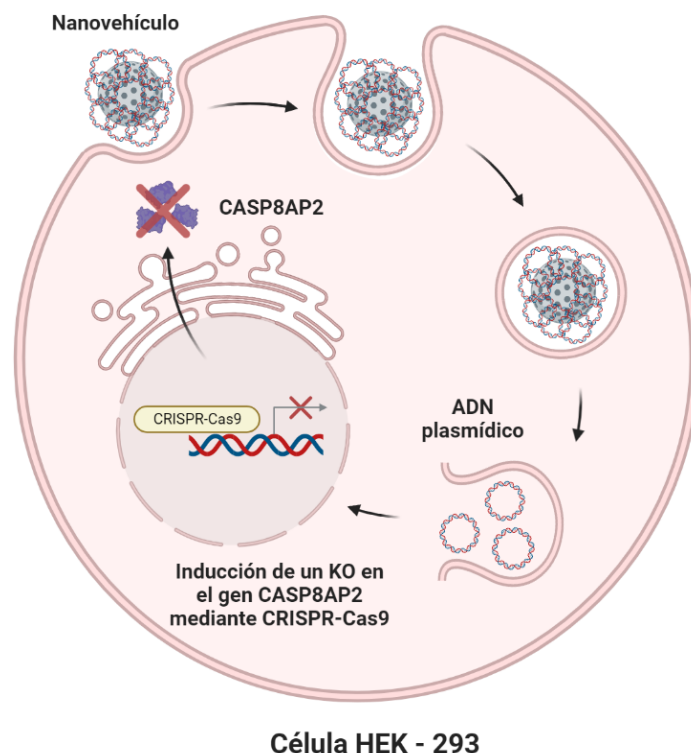


Figura 21. Transfección del nanovehículo en una célula HEK-293. El nanovehículo a base de sílica ingresa a la célula y libera el ADN plasmídico. Luego, el sistema CRISPR-Cas9 induce una mutación en el gen CASP8AP2, la cual impide su expresión. Creado en BioRender.com.

4.2.3.1. Método *Golden Gate*

Para poder generar un KO en el gen CASP8AP2 de la línea HEK-293, era necesario contar con una secuencia sgARN que dirija al sistema CRISPR-Cas9 hacia dicho gen. Para ello, se decidió clonar la secuencia guía en cuestión dentro del plásmido 2A-Puro, que a su vez codifica para la enzima spCas9. Para este fin, el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay proporcionó tres pares de oligonucleótidos que tras una reacción de *annealing* permitían obtener tres secuencias guías diferentes (ver Tabla A10 del Anexo).

Con el objetivo de insertar las tres secuencias guía para el sistema CRISPR-Cas9 dentro del plásmido 2A-Puro se utilizó el método de clonación *Golden Gate*. Este se basa en el uso de endonucleasas del tipo IIS que se caracterizan por inducir un corte en un sitio fuera de su secuencia de reconocimiento, lo que permite clonar sin la necesidad de añadir ninguna secuencia adicional. Además, este método permite digerir el plásmido y ligar un inserto dentro de él en una misma reacción (66).

En primer lugar, para clonar las guías dentro del plásmido, este fue incubado con la enzima de restricción BbsI durante 30 minutos. El sitio de restricción de esta enzima en el plásmido 2A-Puro se muestra en la Figura 22.



Figura 22. Sitio de restricción de la enzima BbsI en el plásmido 2A-Puro. Creado en SnapGene.

Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para detectar la digestión mediante la visualización de una banda de aproximadamente 9000 pb (ver Figura 23). A continuación, se purificó el plásmido digerido a partir de dicho gel.

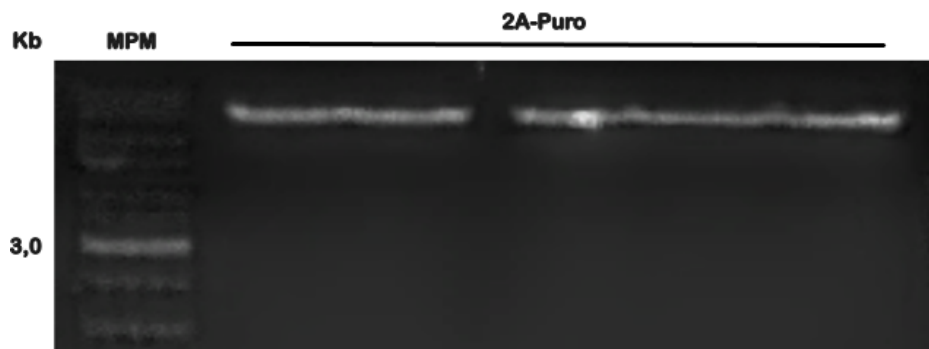


Figura 23. Análisis de la digestión enzimática del plásmido 2A-Puro durante 30 minutos en electroforesis en gel de agarosa 0,8%. (MPM) Marcador de peso molecular, (2A-Puro) Plásmido 2A-Puro digerido con la enzima BbsI.

En paralelo, se realizó el ensamblaje de las secuencias que codifican los ARN guía, que luego fueron ligadas al plásmido previamente digerido y purificado. En la Figura 24 se muestran los oligonucleótidos utilizados para generar las guías, y la inserción de las mismas dentro del plásmido 2A-Puro.

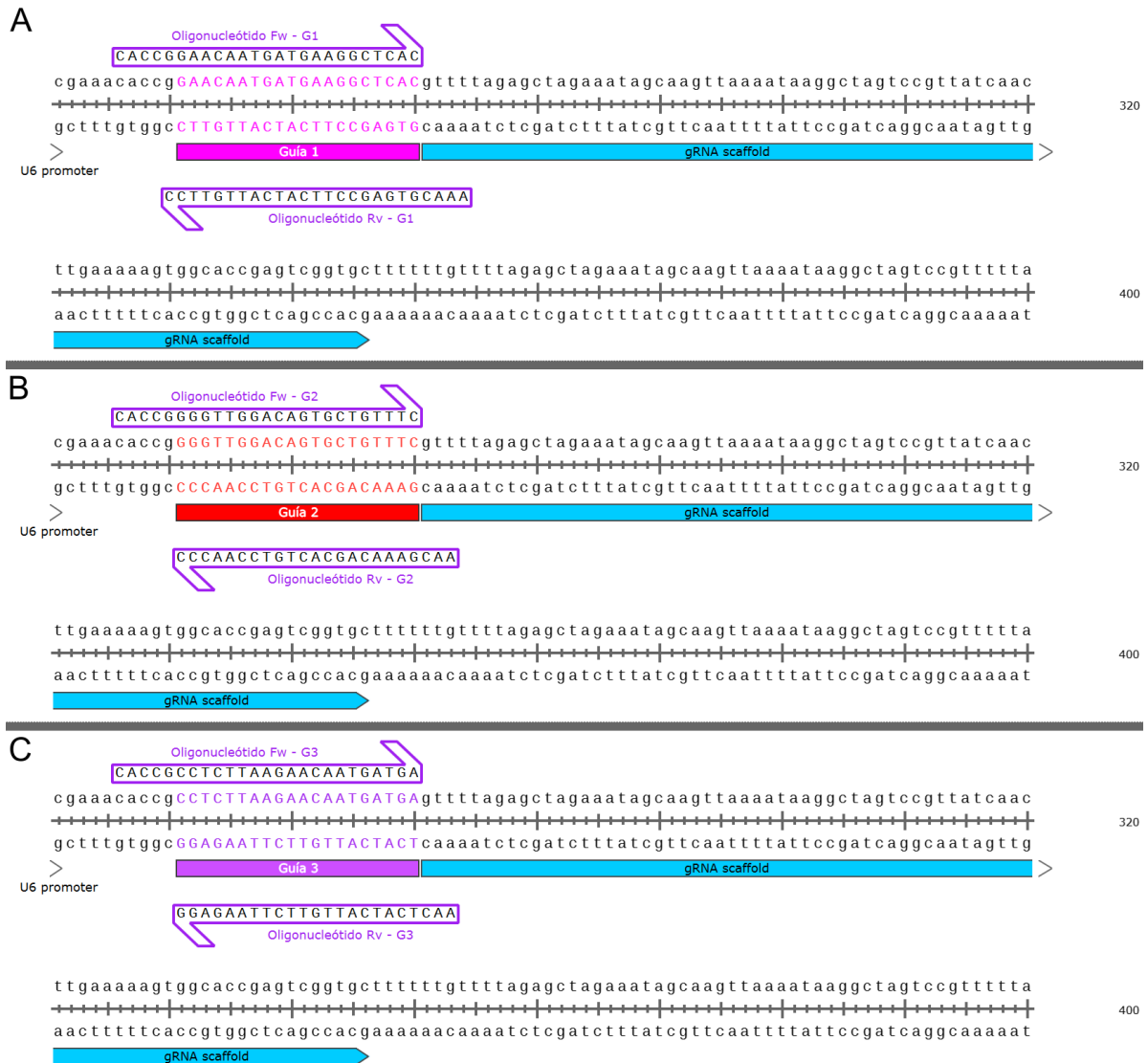


Figura 24. Oligonucleótidos utilizados para la generación de las guías e inserción de las mismas dentro del plásmido 2A-Puro. (A) Guía 1, (B) Guía 2, (C) Guía 3. Creado en SnapGene.

A continuación, partiendo de un cultivo de *E. coli* TOP10, se obtuvieron bacterias quimiocompetentes las cuales se transformaron con las construcciones realizadas (2A-Puro-G1, 2A-Puro-G2 y 2A-Puro-G3). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25.

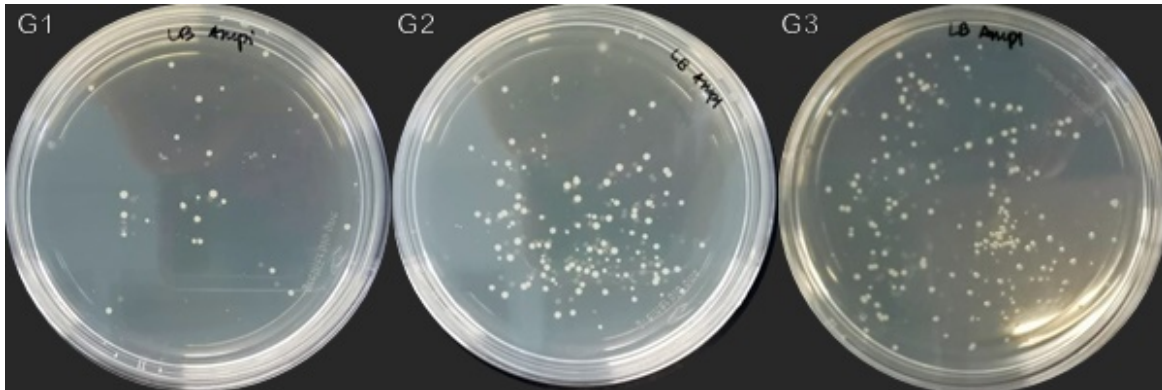


Figura 25. Cultivos de *E. coli* TOP10 transformados con los plásmidos 2A-Puro-G1, 2A-Puro-G2 y 2A-Puro-G3 (G1, G2 y G3 respectivamente) en placas de LB agar con ampicilina.

A su vez, se realizaron distintos tipos de controles para validar los resultados. En primer lugar, se realizaron dos controles de viabilidad, uno de ellos con bacterias quimiocompetentes sin transformar en medio sin antibiótico para confirmar que las células eran viables, mientras que para el otro se sometió a estas al proceso de transformación sin plásmido, y se las cultivó en medio sin antibiótico para verificar que las células resistieran el procedimiento.

Por otra parte, se realizó un control con bacterias sin transformar en medio con ampicilina para corroborar que el medio fue bien formulado y que el cultivo no fuera resistente a ese antibiótico. Por último, se realizó un control de eficiencia donde las células quimiocompetentes se transformaron con un plásmido pBAD/His vacío en medio con antibiótico.

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos para cada control. Como se puede observar, a excepción del control sin transformar en medio con antibiótico (Figura 26A), todos los controles realizados exhibieron los patrones de crecimiento esperados. De todos modos, dado que en dicho control se observaron muy pocas colonias en relación al resto de las placas, se siguió adelante.

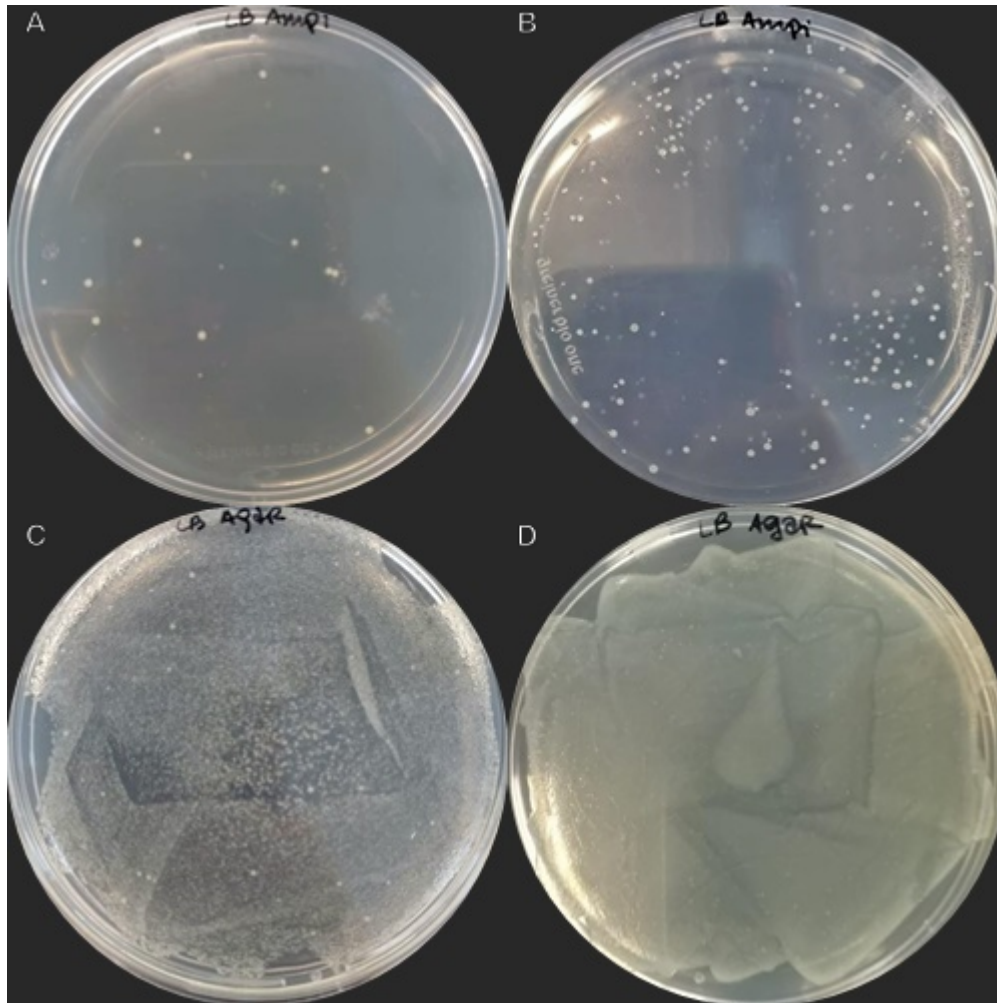


Figura 26. Resultados de los controles realizados para la transformación de *E. coli* TOP10. (A) Células sin transformar en medio LB con ampicilina, (B) Células transformadas con pBAD/His en medio LB con ampicilina, (C) Células sin transformar en medio LB, (D) Células transformadas sin plásmido en medio LB.

A partir de las bacterias transformadas, se seleccionaron tres colonias por guía y se realizó una *colony* PCR. Para ello se utilizó un par de *primers* diseñados para amplificar una porción del plásmido y las guías correspondientes, con el fin de detectar aquellas colonias que incorporaron el plásmido con el inserto de forma exitosa. El resultado se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa, esperando observar una banda de aproximadamente 400 pb para cada colonia seleccionada. Tras revelar el gel obtenido, no se detectó ninguna banda. Esto podría deberse a una inhibición de la reacción de PCR, ocasionada por la naturaleza de la muestra utilizada. Por este motivo, se optó por estriar las bacterias transformadas y tomar siete colonias para cada guía, a partir de las cuales se realizó una minipreparación de ADN plasmídico, y posteriormente una PCR para confirmar la inserción de las guías en el plásmido. Tras realizar una nueva electroforesis en gel de agarosa para visualizar los resultados de la PCR mencionada anteriormente, tampoco se lograron detectar bandas que indicaran la presencia del inserto en ninguna de las colonias estudiadas.

Si bien se realizaron controles de la reacción de PCR sin ADN y utilizando el plásmido vacío (sin el inserto), no se disponía de un control positivo (plásmido con el inserto) que confirmara que la amplificación se dio de forma correcta. Debido a esto, se decidió repetir la PCR tomando nuevas colonias para cada guía, e incluyendo además un nuevo control utilizando un par de *primers* que amplificaban un fragmento del gen de resistencia a la ampicilina, presente en el plásmido 2A-Puro. El

propósito de este nuevo control fue comprobar que los reactivos de la PCR funcionaban de forma correcta, y que por lo tanto, la falta de bandas en los geles de electroforesis efectivamente estaba dada porque ninguna de las colonias estudiadas había incorporado el inserto. Utilizando el *software Primer-BLAST* se determinó que el amplicón esperado tenía un tamaño de 812 pb. En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos tras realizar la PCR de control con los *primers* de resistencia a la ampicilina.

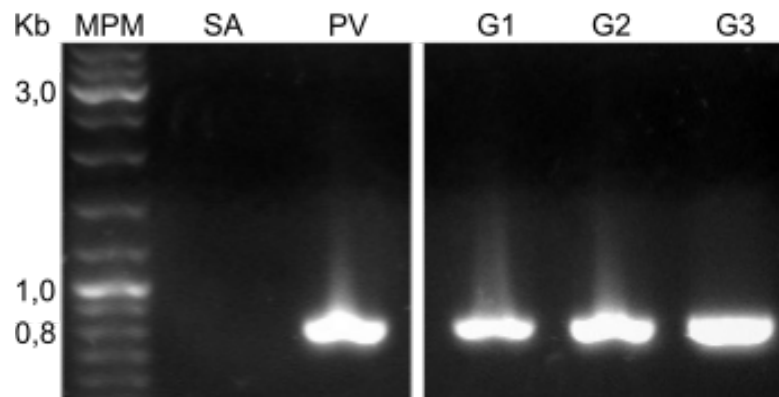


Figura 27. Resultados de la PCR del control de amplificación en electroforesis en gel de agarosa 1%. (MPM) Marcador de peso molecular, (SA) Control sin ADN, (PV) Control con el plásmido 2A-Puro vacío, (G1) Colonia transformada con el plásmido 2A-Puro-G1, (G2) Colonia transformada con el plásmido 2A-Puro-G2, (G3) Colonia transformada con el plásmido 2A-Puro-G3.

Como se puede observar, en todas las condiciones hubo una amplificación de aproximadamente 800 pb, menos en el control sin ADN, lo que indica que la reacción se estaba dando en forma correcta. Con respecto a las colonias analizadas, no se detectó la presencia de bandas que indicaran la presencia del inserto en las colonias estudiadas. De acuerdo con los resultados obtenidos, y dado que las colonias transformadas fueron capaces de crecer en medio de cultivo con ampicilina, se confirmó que las bacterias incorporaron el plásmido de forma correcta pero que este se encontraba vacío.

En base a esto, se decidió repetir el proceso de ensamblaje del plásmido, aumentando el tiempo de la incubación con la enzima BbsI a 24 horas, para asegurar que una mayor cantidad de plásmido sea digerido. En la Figura 28 se muestra el gel obtenido tras la digestión.

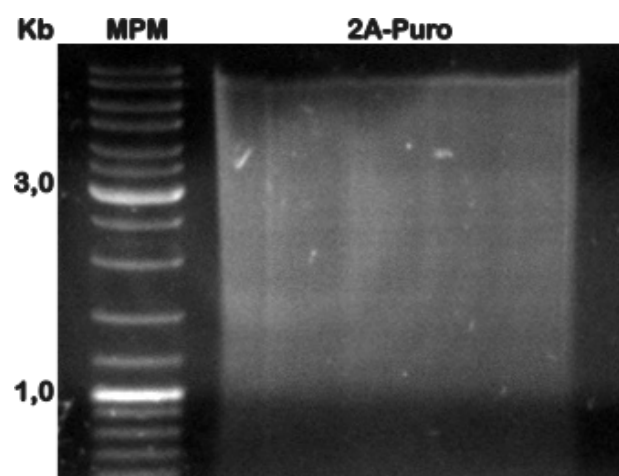


Figura 28. Análisis de la digestión enzimática del plásmido 2A-Puro durante 24 horas en electroforesis en gel de agarosa 0,8%. (MPM) Marcador de peso molecular, (2A-Puro) Plásmido 2A-Puro digerido con la enzima BbsI.

Al incubar durante 24 horas con la enzima se observó un patrón borroso sin la presencia de bandas definidas, lo que indica que el plásmido se degradó. Por este motivo, se resolvió repetir el proceso de digestión cambiando el tiempo de la incubación con la enzima BbsI a 4 horas, para asegurar que una buena proporción de plásmido sea digerido sin degradarse completamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 29.

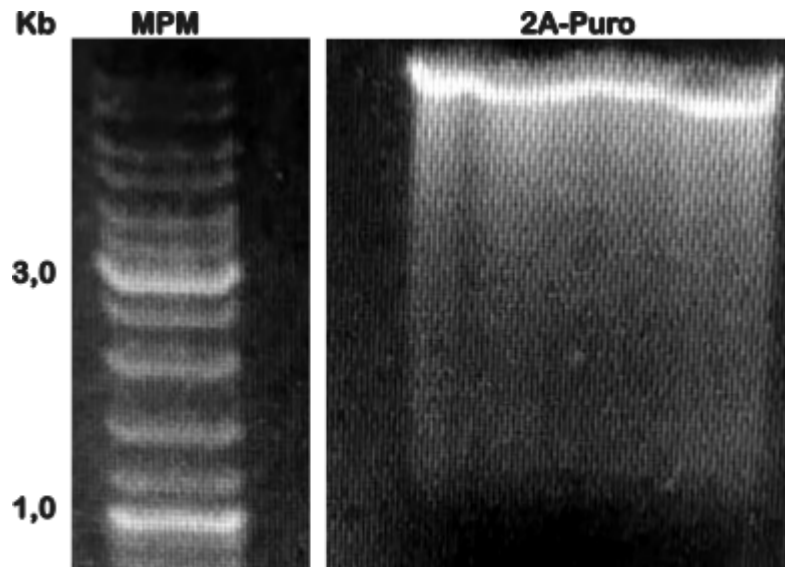


Figura 29. Análisis de la digestión enzimática del plásmido 2A-Puro durante 4 horas en electroforesis en gel de agarosa 0,8%. (MPM) Marcador de peso molecular, (2A-Puro) Plásmido 2A-Puro digerido con la enzima BbsI.

Luego de la incubación por 4 horas se visualizó una banda irregular seguida de un patrón borroso, indicando la presencia del plásmido tanto digerido como degradado. A pesar de esto se siguió adelante, purificando la banda obtenida a partir del gel y ensamblando las secuencias que codificaban los ARN guía. Adicionalmente, para la reacción de ligación se incorporaron dos controles, uno de ellos con todos los componentes excepto la ligasa, y el otro con todos los componentes excepto el inserto. A continuación, partiendo de un cultivo de *E. coli* TOP10, se obtuvieron bacterias quimiocompetentes las cuales fueron transformadas con las construcciones realizadas y los controles de ligación. En estos últimos no se esperaba ver crecimiento, ya que el plásmido en ausencia de la ligasa y/o del inserto no debería ser capaz de recircularizarse y, por lo tanto, expresar la resistencia al antibiótico.

Luego de la transformación, ambos controles de ligación exhibieron una gran cantidad de colonias (ver Figura 30), por lo que se asume que después de la purificación a partir del gel se obtuvo mayoritariamente el plásmido sin digerir. Debido a esto, las guías no pudieron insertarse en él y las bacterias se transformaron con el plásmido 2A-Puro vacío.

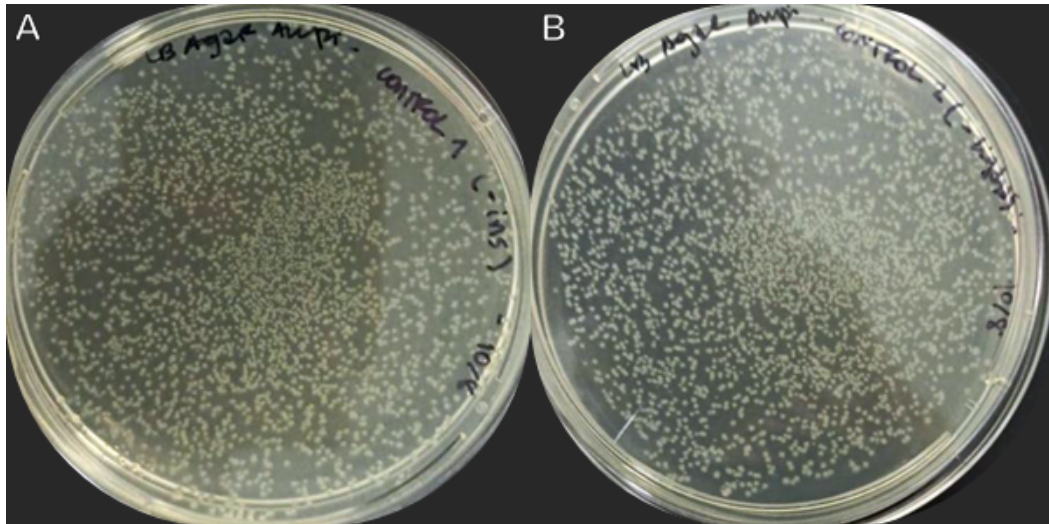


Figura 30. Resultados de los controles realizados para la reacción de ligación. (A) Reacción de ligación sin inserto transformadas en *E. coli* TOP10 y plaqueadas en LB agar con ampicilina. (B) Reacción de ligación sin ligasa transformadas en *E. coli* TOP10 y plaqueadas en LB agar con ampicilina.

Tras realizar tres intentos no se logró insertar las guías dentro del plásmido, ya que incubaciones cortas con la enzima BbsI no eran suficientes para generar el corte deseado en el plásmido, e incubaciones de más de 4 horas generaban la degradación del mismo. En base a esto y por cuestiones de tiempo, se resolvió utilizar un plásmido ya ensamblado provisto por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay. Adicionalmente, para simplificar los experimentos posteriores se decidió trabajar únicamente con la guía 1, ya que de acuerdo con el *software* CRISPOR es la que presenta mayor eficiencia.

4.2.3.2. Ensayos de citotoxicidad

4.2.3.2.1. Ensayo con MTT

Al igual que con la línea celular NM2C5-GFP, se realizó un ensayo de citotoxicidad utilizando MTT, a modo de determinar el rango de concentraciones en las cuales las SiNPs no resultan tóxicas para las células HEK-293.

En una primera instancia se estudió el efecto que generaban las nanopartículas en un rango de concentraciones entre 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego de la incubación con las SiNPs, al inspeccionar visualmente la placa utilizada, se observó la presencia de un precipitado blanco en el fondo de los pocillos donde se aplicaron las concentraciones más altas (ver Figura 31).

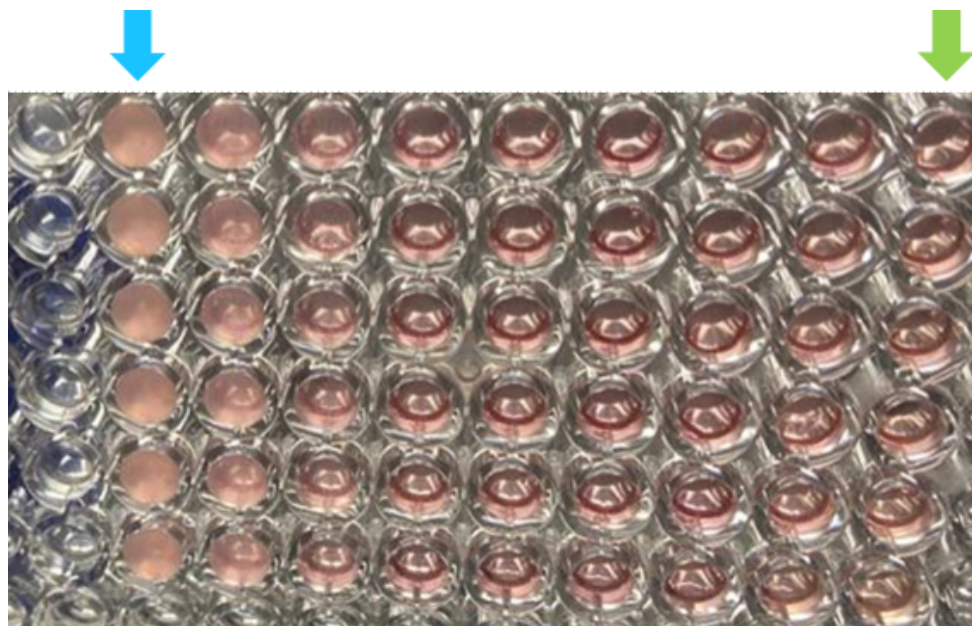


Figura 31. Placa de 96 pocillos utilizada para el ensayo de citotoxicidad de SiNPs en la línea celular HEK-293 con MTT. La flecha celeste indica la condición de mayor concentración de SiNPs (16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) donde se visualiza un precipitado blanco en el fondo de los pocillos. La flecha verde señala el control de viabilidad que se utiliza como referencia.

A su vez, al inspeccionar los pocillos individuales bajo el microscopio se encontraron precipitados oscuros en las concentraciones 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ver Figura 32). De acuerdo con varios autores, esto se debe a que las SiNPs tienden a agregarse y aglomerarse con mayor facilidad cuando se encuentran a altas concentraciones. Además, a medida que aumenta el tamaño de dichas nanopartículas su internalización por parte de las células se ve afectada de forma negativa (67). En las concentraciones de 8000 $\mu\text{g}/\text{m}$ - 16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es tanta la cantidad de precipitado que no deja ver la monocapa e inferir sobre el estado de las células. A partir de las concentraciones 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se comienzan a ver células por debajo de los precipitados, pero se encuentran visiblemente dañadas (ligeramente redondeadas y despegadas de la superficie). Entre 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se detectan precipitados de SiNPs, y la morfología celular parecería no verse alterada con relación al control de viabilidad.

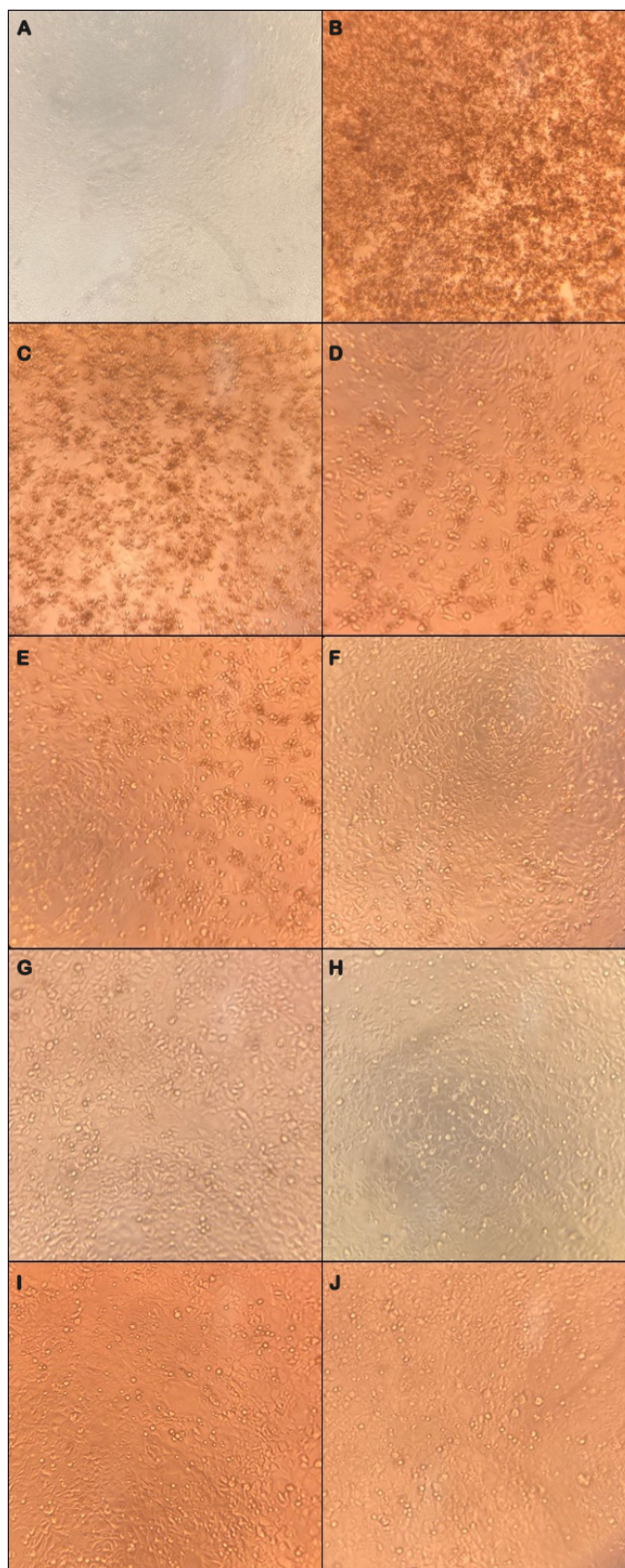


Figura 32. Visualización mediante microscopio óptico 10x de cada condición del ensayo de citotoxicidad de SiNPs en la línea celular HEK-293 con MTT. (A) Control de muerte celular con Tritón X-100, (B) Incubación con SiNPs a 16000 µg/mL, (C) Incubación con SiNPs a 8000 µg/mL, (D) Incubación con SiNPs a 4000 µg/mL, (E) Incubación con SiNPs a 2000 µg/mL, (F) Incubación con SiNPs a 1000 µg/mL, (G) Incubación con SiNPs a 500 µg/mL, (H) Incubación con SiNPs a 250 µg/mL, (I) Incubación con SiNPs a 125 µg/mL, (J) Control de viabilidad.

Los datos obtenidos a partir del ensayo de citotoxicidad se analizaron utilizando el *software GraphPad Prism 8* y los resultados se muestran en la Figura 33.

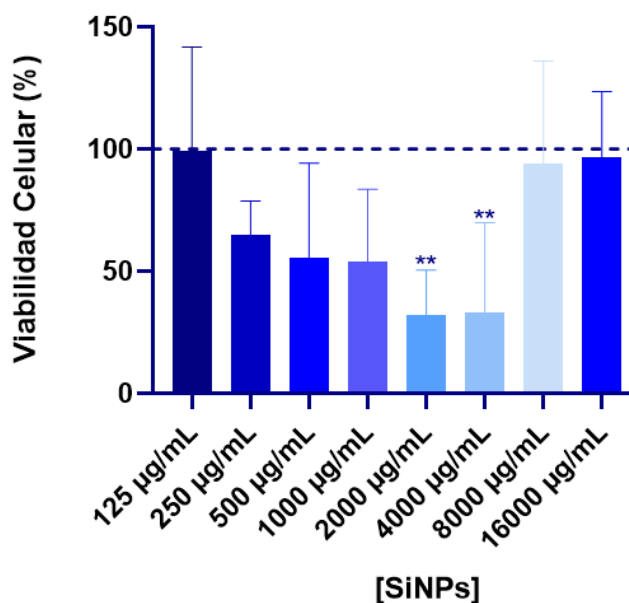


Figura 33. Análisis del efecto citotóxico que presentan las SiNPs sobre la línea celular HEK-293 utilizando MTT. Los datos obtenidos fueron normalizados en base a un control de células sin tratar y un control de células tratadas con Tritón X-100. La significancia de los valores se calculó con respecto a las células sin tratar (** $p < 0,01$).

Como se observa, a partir de 1000 µg/mL la viabilidad celular tiende a descender hasta valores inferiores al 50%, sin embargo, a partir de 4000 µg/mL esta parecería volver a aumentar. Este fenómeno fue reportado por varios autores, en particular *Laaksonen et al.* determinaron que las SiNPs son capaces de reducir el MTT de forma directa, generando la misma señal que producen las células metabólicamente activas (68). A su vez, *Fisichella et al.* establecieron que las SiNPs interfieren con el tráfico intracelular de las vesículas que transportan el formazán, generando un aumento en la exocitosis de este compuesto (59). En ambos casos, el resultado final es una subestimación del efecto citotóxico que generan las SiNPs sobre las células (59,68). Por lo tanto, se puede inferir que la disminución aparente en el efecto citotóxico que se observa a mayores concentraciones de nanopartículas se debe a la interferencia de estas con el MTT y no a un aumento real de la viabilidad celular.

Varios autores establecen que al realizar ensayos de citotoxicidad el método a utilizar debe elegirse con precaución, teniendo en cuenta el mecanismo de acción del compuesto. Además, en caso de ser posible, recomiendan utilizar más de un ensayo, a modo de aumentar la fiabilidad de los resultados obtenidos (69). Por este motivo se decidió utilizar el ensayo de tinción con Cristal Violeta como método alternativo.

4.2.3.2.2. Ensayos con Cristal Violeta

El ensayo de tinción con Cristal Violeta se basa en que las células adherentes se desprenden de las placas de cultivo durante su muerte, lo que permite que al teñirlas con este colorante se pueda cuantificar indirectamente la muerte celular en base a la cantidad de células que permanecen adheridas a la placa (70). Dado que este ensayo no depende de la actividad metabólica de las células, lo esperable es que las SiNPs no generen interferencia con el método, evitando así la subestimación del efecto citotóxico.

4.2.3.2.2.1. SiNPs desnudas

En primera instancia se estudió el efecto que generaban las SiNPs en un rango de concentraciones entre 125 µg/mL - 16000 µg/mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 34.

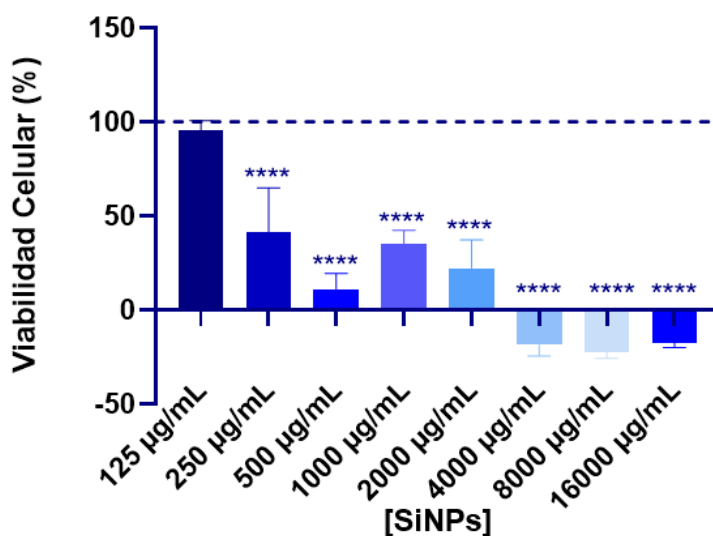


Figura 34. Análisis del efecto citotóxico que presentan las SiNPs sobre la línea celular HEK-293 utilizando Cristal Violeta. El valor de IC_{50} calculado es de 253,8 µg/mL. Los datos obtenidos fueron normalizados en base a un control de células sin tratar y un control de células tratadas con Tritón X-100. La significancia de los valores se calculó con respecto a las células sin tratar (****p < 0,0001).

Como se observa en la Figura 34, a partir de 250 µg/mL la viabilidad decrece a valores cercanos al 50% y se mantiene en este margen hasta concentraciones de SiNPs de 2000 µg/mL. A partir de este punto la viabilidad celular desciende nuevamente a valores cercanos al 0%. Por otra parte, comparando estos resultados con los obtenidos luego de realizar el ensayo de MTT, se respalda la hipótesis de que altas concentraciones de SiNPs generan interferencia con éste, y por lo tanto, no debería utilizarse como único método para el estudio de citotoxicidad de estos compuestos.

4.2.3.2.2.2. SiNPs con ADN

En varios estudios se ha reportado que el tamaño de las nanopartículas de sílica influye directamente en la citotoxicidad de las mismas, siendo las más pequeñas las más tóxicas (71). Ahora bien, hasta el momento no está del todo claro hasta qué punto la química superficial de las nanopartículas influye sobre sus propiedades citotóxicas, por lo que no se debería suponer que el efecto de las nanopartículas recubiertas y sin recubrir es el mismo. Por este motivo, se repitió el ensayo de citotoxicidad con Cristal Violeta utilizando las SiNPs cargadas con un plásmido pBAD/His vacío y ampliando el rango de estudio, adicionando dos concentraciones de SiNPs menores. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 35.

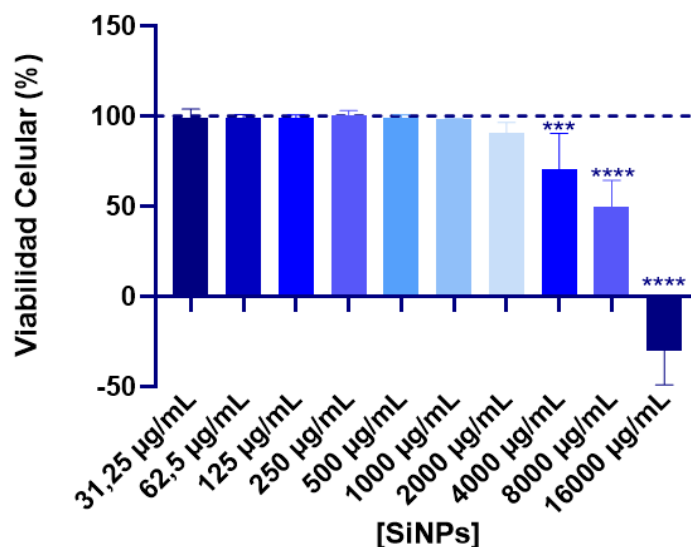


Figura 35. Análisis del efecto citotóxico que presentan las SiNPs - pBAD/His sobre la línea celular HEK-293 utilizando Cristal Violeta. El valor de IC_{50} calculado es de 5583 $\mu\text{g/mL}$. Los datos obtenidos fueron normalizados en base a un control de células sin tratar y un control de células tratadas con Tritón X-100. La significancia de los valores se calculó con respecto a las células sin tratar (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$).

En esta instancia se observó que la viabilidad celular comenzaba a descender al utilizar SiNPs a concentraciones mayores de 2000 $\mu\text{g/mL}$. Teniendo en cuenta estos resultados y considerando los ensayos posteriores donde se utilizarán las SiNPs como agente de transfección, se puede inferir que el rango de trabajo se encuentra entre 31,25 $\mu\text{g/mL}$ - 2000 $\mu\text{g/mL}$, ya que a estas concentraciones las SiNPs no parecerían presentar un efecto citotóxico sobre las células.

Tras comparar ambos gráficos, se evidencia que las SiNPs recubiertas de ADN plasmídico resultan menos citotóxicas que las SiNPs desnudas. Esta diferencia posiblemente se deba a la exposición de los residuos catiónicos provenientes del PEI. Como se mencionó anteriormente, la síntesis de SiNPs utilizando PEI como partícula aminada es una interesante estrategia para obtener un nanovehículo capaz de adsorber y transportar moléculas de ácidos nucleicos. Sin embargo, varios investigadores han reportado que los policationes pueden resultar citotóxicos (47,72). En particular, se ha visto que el PEI aumenta la expresión génica de proteínas que desencadenan procesos de estrés oxidativo e inflamación, conduciendo a la apoptosis (73). Si bien el grado de toxicidad que presenta el PEI depende de su peso molecular y el grado de ramificación, se ha visto que incluso aquellos de bajo peso molecular influyen de forma negativa en la viabilidad celular (74). Por lo tanto, el efecto citotóxico evidenciado en las SiNPs desnudas se atribuye a la interacción directa entre los residuos del PEI y las proteínas involucradas en las vías celulares apoptóticas.

4.2.3.3. Ensayos de transfección utilizando el nanovehículo de sílica

Tras determinar el rango de concentraciones en las cuales las SiNPs no resultan tóxicas sobre las células HEK-293, se prosiguió con los ensayos de transfección para intentar generar el KO sobre el gen CASP8AP2 utilizando SiNPs a concentraciones de 500 µg/mL y 1000 µg/mL. Adicionalmente, como se sabe que la línea HEK-293 es sensible a la lipofectamina como agente transfectante, se decidió utilizar este reactivo como control positivo de la transfección.

Al igual que en los ensayos de transfección donde se buscaba generar el KO de gen GFP en las células NM2C5-GFP, el mecanismo de reparación celular que se verá inducido es la reparación por NHEJ, generando así pequeñas inserciones o deleciones en la región del gen de interés.

En la Figura 36 se muestra la secuencia del gen CASP8AP2 a la cual se encuentra dirigido el sgARN codificado en el plásmido 2A-Puro-G1.

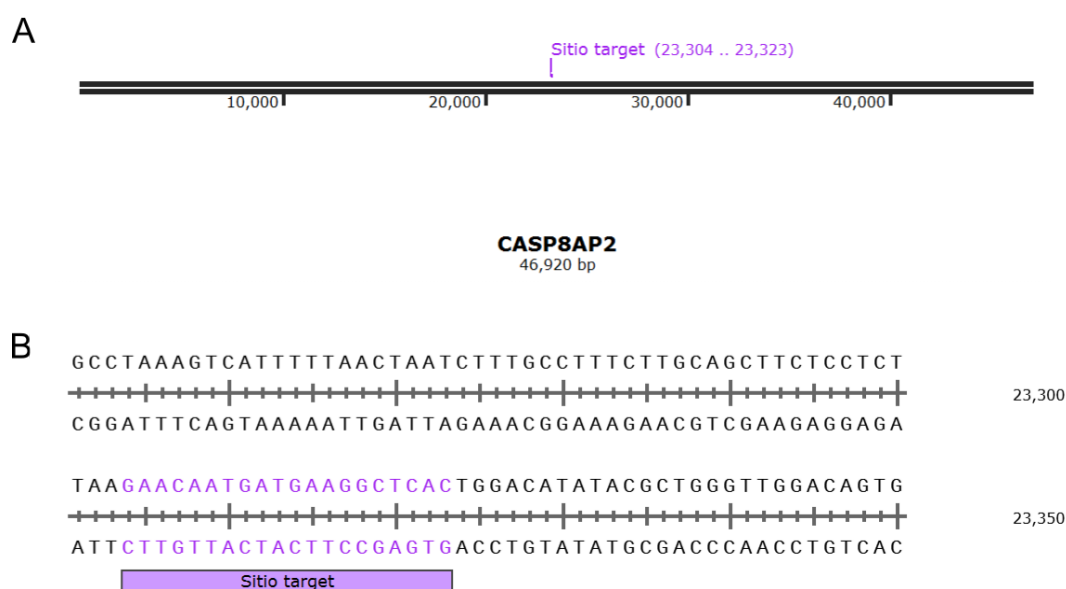


Figura 36. Sitio *target* al cual se encuentra dirigido el sgARN codificado en el plásmido 2A-Puro-G1. (A) Región del gen, (B) Secuencia del gen. Creado en SnapGene.

4.2.3.3.1. Evaluación de la eficiencia de la mutación

4.2.3.3.1.1. PCR

Luego de realizar los ensayos de transfección con SiNPs a concentraciones de 500 µg/mL y 1000 µg/mL sobre la línea HEK-293, se realizó una extracción del ADN genómico de las células a estudiar y se amplificó una sección del gen CASP8AP2 mediante una reacción de PCR. El resultado se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa (ver Figura 37).

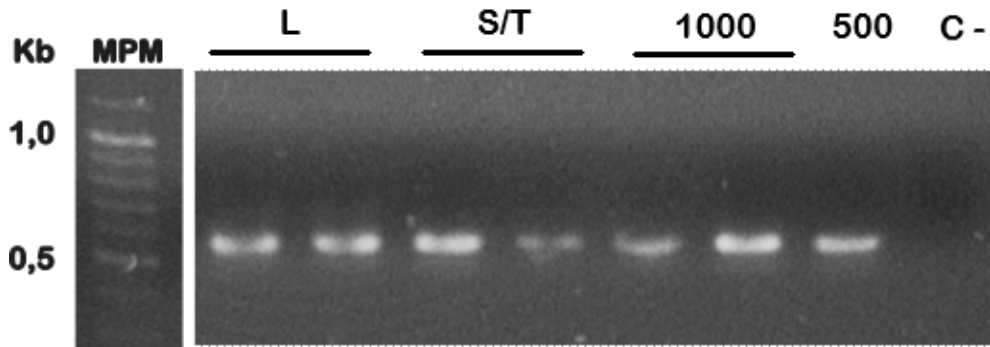


Figura 37. Análisis por electroforesis en gel de agarosa 1% de la amplificación del gen CASP8AP2 por PCR. (MPM) Marcador de peso molecular, (L) Células transfectadas con lipofectamina, (S/T) Control sin transfectar, (1000 - 500) Células transfectadas utilizando SiNPs en concentraciones de 1000 µg/mL y 500 µg/mL respectivamente, (C -) Control negativo de PCR.

Utilizando el *software Primer-BLAST* se determinó que el amplicón esperado tenía un tamaño cercano a los 600 pb. Como se observa en la Figura 37, para todas las condiciones de transfección se logró amplificar un fragmento con el tamaño esperado, por lo que se prosiguió a evaluar la eficiencia de la mutación.

4.2.3.3.1.2. Ensayos de restricción y movilidad del heteroduplex

Para evaluar la eficiencia de la transfección se realizaron dos ensayos en paralelo. En primer lugar se efectuó un ensayo de restricción del heteroduplex con la endonucleasa T7E1 utilizando todas las muestras. Los fragmentos obtenidos luego de la digestión se resolvieron mediante una electroforesis en gel de acrilamida. En la Figura 38 se muestran los resultados obtenidos.

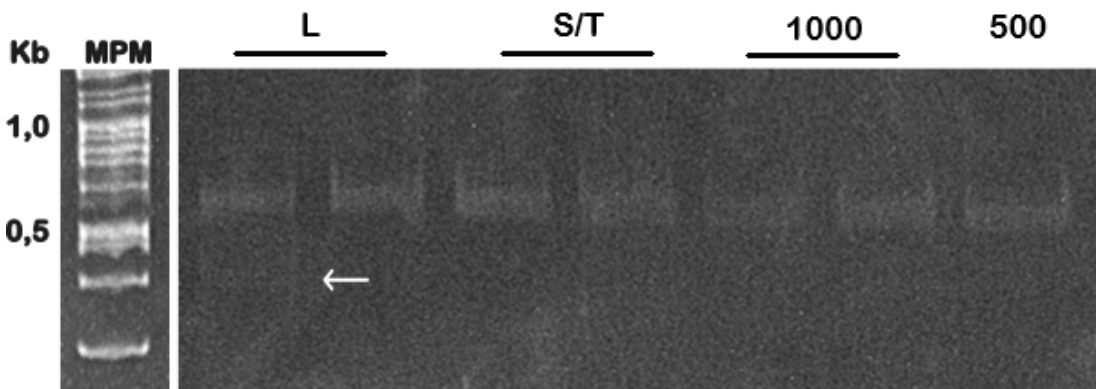


Figura 38. Análisis del ensayo de restricción del heteroduplex en el gen CASP8AP2 con T7E1 en gel de acrilamida 10%. (MPM) Marcador de peso molecular, (L) Células transfectadas con lipofectamina, (S/T) Control sin transfectar, (1000 - 500) Células transfectadas utilizando SiNPs en concentraciones de 1000 µg/mL y 500 µg/mL respectivamente. La flecha de color blanco indica una segunda banda resultante de la digestión con la enzima T7E1.

Como se puede observar, en el carril correspondiente a las células transfectadas con lipofectamina se detecta una segunda banda (señalada con una flecha blanca), lo que indica la presencia de heteroduplex en el medio de reacción. Con respecto a las muestras transfectadas con SiNPs únicamente se observa una banda, por lo que parecería no haberse generado un heteroduplex. Esto indicaría en principio, que al utilizar las SiNPs bajo estas condiciones no se genera la mutación deseada.

Por otra parte, se realizó otro ensayo en paralelo, denominado ensayo de movilidad del heteroduplex. Al igual que el ensayo de restricción, este se basa en la formación de un heteroduplex que se genera cuando dos amplicones que presentan secuencias diferentes se desnaturalizan y rehibridan. El desapareamiento en algunas de las bases del heteroduplex genera cambios en la conformación de la molécula y retarda su movilidad electrofóretica, por lo que es posible detectar la presencia de mutaciones mediante una electroforesis en gel de acrilamida (61). En la Figura 39 se muestra un esquema del funcionamiento de este ensayo.

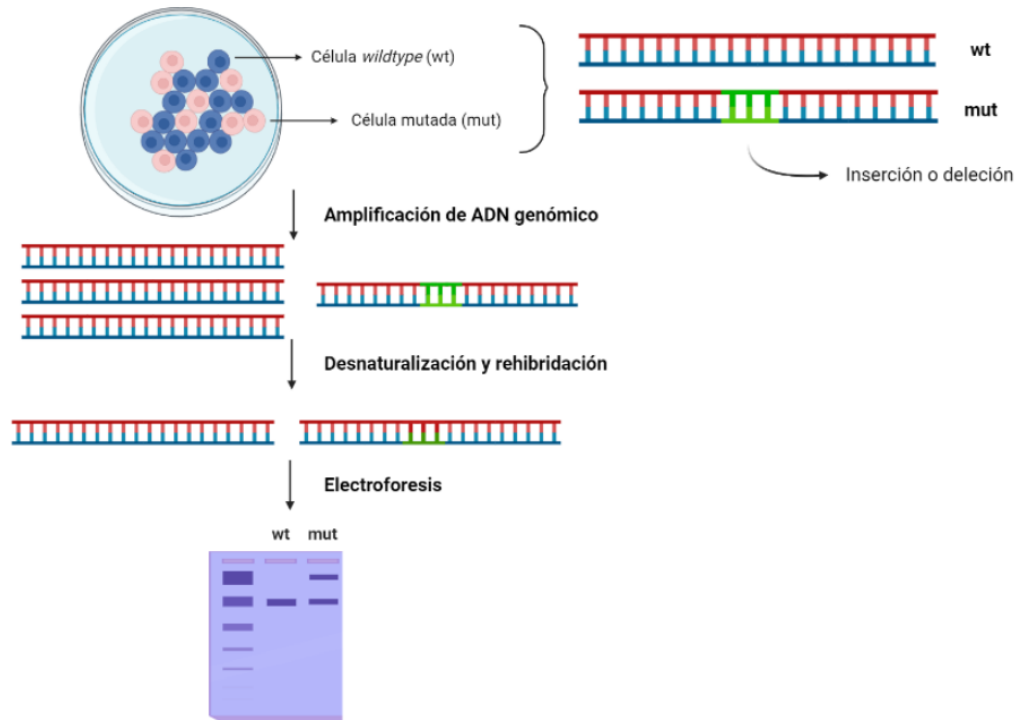


Figura 39. Representación esquemática del ensayo de movilidad del heteroduplex. Creado en BioRender.com

Los resultados obtenidos tras realizar el ensayo de movilidad de heteroduplex se muestran en la Figura 40.

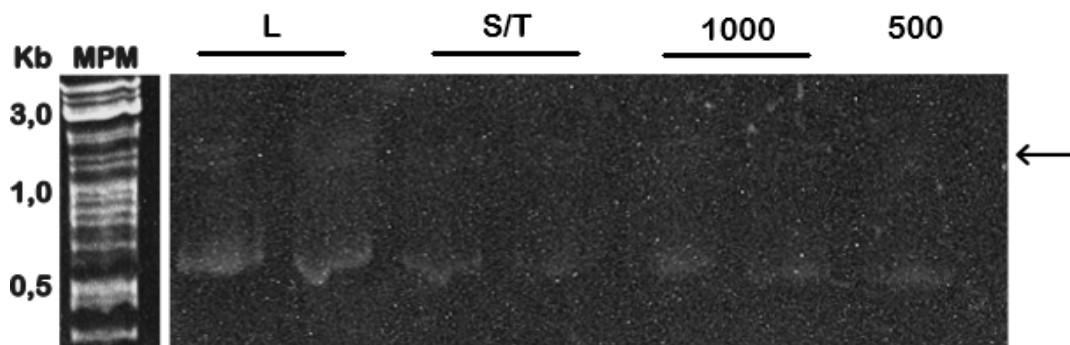


Figura 40. Análisis del ensayo de movilidad del heteroduplex en el gen CASP8AP2 en gel de acrilamida 10%. (MPM) Marcador de peso molecular, (L) Células transfectadas con lipofectamina, (S/T) Control sin transfectar, (1000 - 500) Células transfectadas utilizando SiNPs en concentraciones de 1000 µg/mL y 500 µg/mL respectivamente. La flecha de color negro indica la altura donde se visualizan bandas adicionales debido a la presencia de heteroduplex.

Al igual que en el ensayo anterior, se obtuvo nuevamente una única banda para las transfecciones empleando SiNPs. Por otra parte, en los carriles correspondientes a la lipofectamina parecería haber dos bandas, infiriendo que bajo esas condiciones de transfección se logró generar el KO en el *target*, pero en baja proporción en relación a la población celular estudiada.

De todos modos, tanto para el ensayo de restricción como para el de movilidad del heteroduplex, las bandas obtenidas para todas las condiciones son muy tenues. Por este motivo, no es posible determinar con certeza si efectivamente se logró generar la mutación deseada.

Una posible hipótesis que explicaría estos resultados es que hay una baja tasa de captación por parte de las células. Según datos bibliográficos, existen numerosos factores que inciden en la eficiencia y las vías de internalización celular de las nanopartículas. Uno de ellos es el tamaño, ya que se ha visto que NPs de diferentes diámetros hidrodinámicos tienen diferentes tasas de internalización. Además, luego del proceso de síntesis es posible que el tamaño de las nanopartículas aumente debido a efectos de aglomeración y agregación (75). *Lu et al.* estudiaron el efecto de la captación de soluciones monodispersas de SiNPs mesoporosas de entre 30 nm - 280 nm en células de cáncer cervical humano (HeLa) y observaron que el tamaño óptimo para la absorción celular es de 50 nm (76). *Jiang et al.* llegaron a la misma conclusión al estudiar la internalización de AuNPs que oscilaban entre 14 nm - 100 nm en células de adenocarcinoma humano (SK-BR-3) (77). Otro factor a tener en cuenta es el índice de polidispersidad, ya que al aumentar la diversidad de tamaños, aumentan las probabilidades de que las nanopartículas se agreguen y se generen partículas irregulares de mayor tamaño (75).

Adicionalmente, se debe considerar también la concentración de las nanopartículas ofrecidas. Varios estudios han demostrado que para las SiNPs mesoporosas a concentraciones de alrededor de 50 µg/mL se logran captaciones eficientes sin causar efectos citotóxicos (78). Dado que en este ensayo se utilizó una concentración de SiNPs elevada en relación con otros ensayos consultados en bibliografía, y que según *Jackson et al.* las nanopartículas obtenidas mediante el proceso de síntesis son polidispersas en un rango de tamaños que oscila entre 250 nm - 380 nm (40), es posible inferir que quizás las SiNPs se agregaron durante el proceso de transfección, generando partículas de mayor tamaño que no pudieron ser internalizadas por las células.

En base a lo anteriormente mencionado, se planteó una segunda instancia de transfección utilizando SiNPs a concentraciones de 62,5 µg/mL y 125 µg/mL. Además, al igual que para la transfección con lipofectamina, se incorporaron pasos de selección con puromicina y recuperación en medio DMEM completo. En la Figura 41 se muestran los resultados obtenidos luego de amplificar un fragmento del gen CASP8AP2 a partir de una extracción de ADN genómico de las células transfectadas.

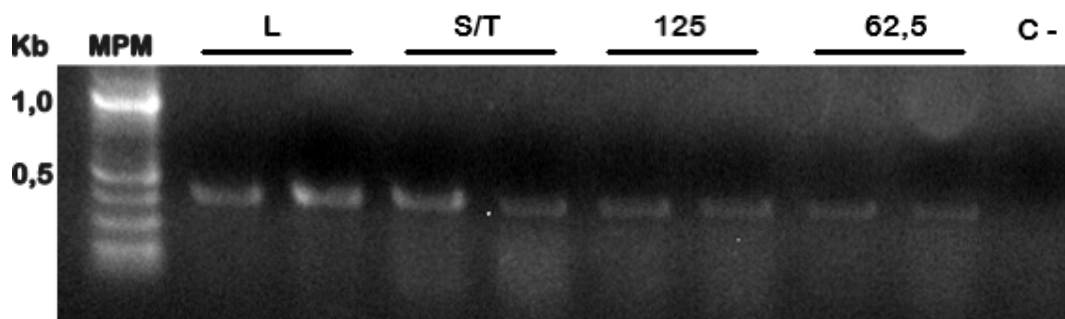


Figura 41. Análisis por electroforesis en gel de agarosa 1% de la amplificación del gen CASP8AP2 por PCR. (MPM) Marcador de peso molecular, (L) Células transfectadas con lipofectamina, (S/T) Control sin transfectar, (125 - 62,5) Células transfectadas utilizando SiNPs en concentraciones de 125 µg/mL y 62,5 µg/mL respectivamente, (C -) Control negativo de PCR.

Dado que para todas las condiciones de transfección se logró amplificar un fragmento de alrededor de 600 pb, se llevó adelante el ensayo de restricción del heteroduplex para evaluar la eficiencia de la mutación. Los resultados del ensayo con la endonucleasa T7E1 se muestran en la Figura 42.

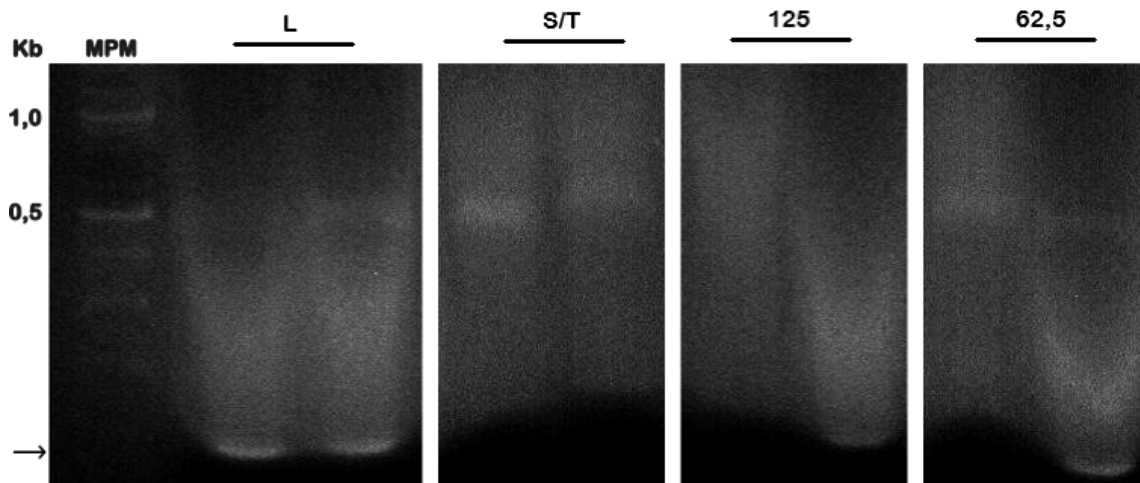


Figura 42. Análisis del ensayo de restricción del heteroduplex en el gen CASP8AP2 con T7E1 en gel de agarosa 3%. (MPM) Marcador de peso molecular, (L) Células transfectadas con lipofectamina, (S/T) Control sin transfectar, (125 - 62,5) Células transfectadas utilizando SiNPs en concentraciones de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. La flecha de color negro indica la altura donde se visualizan bandas adicionales resultantes de la digestión con la enzima T7E1.

Como se puede observar, en el carril correspondiente a las células transfectadas con lipofectamina se obtuvieron nuevamente dos bandas, confirmando que al utilizar este reactivo de transfección bajo estas condiciones es posible generar mutaciones en el gen CASP8AP2. A su vez, para ambas condiciones de transfección con SiNPs, también se lograron visualizar dos bandas para una de las réplicas, indicando que la mutación ocurrió de forma exitosa.

Estos resultados indicarían que a menores concentraciones de SiNPs se logran mayores tasas de captación celular. Además, se vió que los pasos de selección por antibiótico y posterior recuperación juegan un rol importante en la identificación y conservación de la población celular transfectada hasta su análisis. En principio, esto indica que las SiNPs podrían ser utilizadas como base de un nanovehículo para la transfección de líneas celulares, de todos modos, se deberían estudiar factores adicionales para comprobarlo. En primer lugar, sería recomendable incorporar más réplicas para cada condición estudiada, así como también evaluar la mutación inducida mediante un método más sensible, como por ejemplo la secuenciación. Adicionalmente, se debería estudiar con mayor profundidad el efecto de la concentración de las SiNPs sobre la captación celular.

5. Conclusiones

Según el objetivo general planteado en este trabajo, se logró evaluar el uso de un nanovehículo a base de sílica como método de transfección de líneas celulares de mamíferos, utilizando el sistema CRISPR-Cas9 como técnica de edición genética. A partir de los resultados obtenidos, se demostró que este tipo de nanopartículas son herramientas prometedoras como métodos de *delivery* de ácidos nucleicos.

En base a los objetivos específicos establecidos, se obtuvo conocimiento y experiencia en la síntesis de nanopartículas de dos materiales diferentes. Con respecto a las AuNPs, tras realizar un análisis mediante espectroscopía UV - Vis de los *batches* sintetizados, se comprobó el método de síntesis era reproducible, y que las nanopartículas obtenidas eran esféricas y presentaban un tamaño de entre 15 nm - 20 nm. En cuanto a las SiNPs, no se pudo comprobar que los distintos *batches* obtenidos fueron homogéneos, debido a la falta de equipamiento adecuado para caracterizarlos. Adicionalmente, se logró funcionalizar las SiNPs sintetizadas con ADN plasmídico.

Asimismo, se demostró que la química superficial de las nanopartículas incide sobre su efecto citotóxico, ya que para línea celular HEK-293 se vio que las SiNPs desnudas resultan más tóxicas que aquellas recubiertas de ADN plasmídico. Para estas últimas, se estableció un rango de trabajo seguro entre 31,25 $\mu\text{g/mL}$ - 2000 $\mu\text{g/mL}$. Para la línea celular NM2C5-GFP no se pudo establecer un rango seguro, ya que más adelante se demostró que los resultados obtenidos a partir ensayo de citotoxicidad utilizando MTT no son confiables, debido al efecto de interferencia que generan las altas concentraciones de SiNPs. Además, tampoco se estudió el efecto citotóxico que generaban las SiNPs recubiertas de ADN plasmídico.

Finalmente, mientras que la línea celular NM2C5-GFP no pudo ser transfectada por ninguno de los métodos estudiados, si se logró inducir una mutación en el gen CASP8AP2 de la línea celular HEK-293 mediante el sistema CRISPR-Cas9. Dicha mutación se generó utilizando tanto un método tradicional basado en lípidos catiónicos como un método novedoso utilizando un nanovehículo a base de sílica en concentraciones de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ y 125 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, no fue posible comparar la eficiencia entre ambos mecanismos de transfección, debido a que el método elegido para detectarlo es semicuantitativo.

6. Perspectivas a futuro

Si bien los resultados obtenidos son alentadores, se considera que estudios posteriores deberían abordar otros factores involucrados en el proceso de transfección, como las condiciones de preparación e incubación del nanovehículo con las células. Además, se podría evaluar tanto el uso de otras estrategias de síntesis que permitan obtener SiNPs monodispersas y de menor tamaño, como la incorporación de un polímero que permita proteger el ADN de la degradación. Por otra parte, las SiNPs podrían ser funcionalizadas con biomoléculas que se unan específicamente a receptores presentes en las membranas celulares, de forma tal de mejorar la biocompatibilidad y la internalización celular. Este último aspecto podría evaluarse empleando técnicas de microscopía de fluorescencia.

Adicionalmente, se considera que podría ser enriquecedor seguir estudiando diferentes estrategias de transfección utilizando nanopartículas sobre la línea NM2C5-GFP, ya que una transfección exitosa supondría un avance en las técnicas de modificación genética de aquellas líneas celulares difíciles de transfectar.

Por último, sería interesante continuar con el estudio de un nanovehículo a base de AuNPs como potencial método de transfección, ya que debido a las características intrínsecas de este nanomaterial es posible realizar un seguimiento del estado de agregación de nanovehículo durante su síntesis y ensamblaje.

7. Referencias bibliográficas

1. Li Z. In Vitro Micro-Tissue and - Organ Models for Toxicity Testing. *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier; 2011. p. 551–563.
2. Línea celular de cultivo. Instituto Nacional del Cáncer. [Internet] <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/linea-celular-de-cultivo>
3. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*. 2012;2(1):1–5.
4. Swiech K, Picanço-Castro V, Covas DT. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expression and Purification*. 2012;84(1):147–153.
5. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002;13(2):117–123.
6. Dumont J, Ewart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(6):1110–1122.
7. Fus-Kujawa A, Prus P, Bajdak-Rusinek K, Teper P, Gawron K, Kowalczyk A, Sieron AL. An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:701031.
8. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*. 2021;9:e11165.
9. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;397(8):3173–3178.
10. Castro FO, Portelles Y. Transfección de ADN a células de mamíferos. *Biotecnología Aplicada*. 1997;14(3):149–161.
11. Wang P, Zhang L, Zheng W, Cong L, Guo Z, Xie Y, Wang L, Tang R, Feng Q, Hamada Y, et al. Thermo-triggered Release of CRISPR-Cas9 System by Lipid-Encapsulated Gold Nanoparticles for Tumor Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2018;57(6):1491–1496.
12. Aghamiri S, Talaei S, Ghavidel AA, Zandsalimi F, Masoumi S, Hafshejani NH, Jajarmi V. Nanoparticles-mediated CRISPR/Cas9 delivery: Recent advances in cancer treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;56:101533.
13. CRISPR Transfection – DNA, mRNA & Protein. ThermoFischer Scientific. [Internet] <https://www.thermofisher.com/uy/en/home/life-science/genome-editing/geneart-crispr/crispr-transfection.html>
14. Chávez-Jacobo V. El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológica*. 2018;21(2):116–123.
15. Lagunas Rangel F. Sistema CRISPR/Cas. *Revista Ciencia*. 2019;70(4).
16. Shahbazi R, Sghia-Hughes G, Reid JL, Kubek S, Haworth KG, Humbert O, Kiem H-P, Adair JE. Targeted homology-directed repair in blood stem and progenitor cells with CRISPR nanoformulations. *Nature Materials*. 2019;18(10):1124–1132.
17. Zhang X-H, Tee LY, Wang X-G, Huang Q-S, Yang S-H. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2015;4:e264.
18. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020;578(7794):229–236.

19. Nanomaterials. National Institute of Environmental Health Sciences. [Internet] <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-nano/>
20. European Commission. Directorate-General for Health and Consumers. Scientific basis for the definition of the term “nanomaterial.” European Commission; 2010.
21. Alagarasi A. Chapter - Introduction to nanomaterials. *Nanomaterials*. 2009.
22. Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*. 2022;20(1):262
23. Kalimuthu K, Cha BS, Kim S, Park KS. Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Microchemical Journal*. 2020;152:104296.
24. Nanomateriales. Phi4tech. [Internet] <https://www.phi4tech.com/es/nanomateriales>
25. Indoria S, Singh V, Hsieh M-F. Recent advances in theranostic polymeric nanoparticles for cancer treatment: A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;582:119314.
26. Kumar Selvaraj V, Kumar Gudipudi D. Fundamentals to clinical application of nanoparticles in cancer immunotherapy and radiotherapy. *ecancermedicalsecience*. 2020
27. Nikezić AVV, Bondžić AM, Vasić VM. Drug delivery systems based on nanoparticles and related nanostructures. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;151:105412.
28. Oprică L, Bălăşoiu M. Nanoparticles: An overview about their classifications, synthesis, properties, characterization and applications. *Journal of Experimental and Molecular Biology*. 2020;20(4):43–60.
29. Daniel M-C, Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*. 2004;104(1):293–346.
30. Hu X, Zhang Y, Ding T, Liu J, Zhao H. Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:990.
31. Bai X, Wang Y, Song Z, Feng Y, Chen Y, Zhang D, Feng L. The Basic Properties of Gold Nanoparticles and their Applications in Tumor Diagnosis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2480.
32. Gold Nanoparticles: Properties and Applications. Merck (Sigma-Aldrich). [Internet] <https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/biosensors-and-imaging/gold-nanoparticles>
33. Azzazy HME, Mansour MMH, Samir TM, Franco R. Gold nanoparticles in the clinical laboratory: principles of preparation and applications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2012.
34. Yeh Y-C, Creran B, Rotello VM. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*. 2012;4(6):1871–1880.
35. Kang MS, Lee SY, Kim KS, Han D-W. State of the Art Biocompatible Gold Nanoparticles for Cancer Theragnosis. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):701.
36. Karakocak BB, Liang J, Biswas P, Ravi N. Hyaluronate coating enhances the delivery and biocompatibility of gold nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2018;186:243–251.
37. Fuente JM, Grazu V. *Nanobiotechnology: inorganic nanoparticles vs organic nanoparticles*. Amsterdam ; Boston: Elsevier; 2012.
38. Ferreira D, Fontinha D, Martins C, Pires D, Fernandes AR, Baptista PV. Gold Nanoparticles for Vectorization of Nucleic Acids for Cancer Therapeutics. *Molecules*. 2020;25(15):3489.

39. Mohammadi P, Abbasinia M, Assari MJ, Oliaei M. The Toxicology of Silica Nanoparticles: A Review. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2018;100(3):285–316.
40. Jackson E, Ferrari M, Cuestas-Ayllon C, Fernández-Pacheco R, Perez-Carvajal J, de la Fuente JM, Grazú V, Betancor L. Protein-Templated Biomimetic Silica Nanoparticles. *Langmuir*. 2015;31(12):3687–3695.
41. Narayan R, Nayak U, Raichur A, Garg S. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):118.
42. Yu M, Niu Y, Zhang J, Zhang H, Yang Y, Taran E, Jambhrunkar S, Gu W, Thorn P, Yu C. Size-dependent gene delivery of amine-modified silica nanoparticles. *Nano Research*. 2016;9(2):291–305.
43. Levy D, Zayat M, editors. *The Sol-Gel handbook: synthesis, characterization, and applications*. Weinheim: Wiley-VCH; 2015.
44. Bogush GH, Zukoski CF. Studies of the kinetics of the precipitation of uniform silica particles through the hydrolysis and condensation of silicon alkoxides. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1991;142(1):1–18
45. Kang K-K, Oh H-S, Kim D-Y, Shim G, Lee C-S. Synthesis of silica nanoparticles using biomimetic mineralization with polyallylamine hydrochloride. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017;507:145–153.
46. Jin R-H, Yao D-D, Levi RT. Biomimetic Synthesis of Shaped and Chiral Silica Entities Templated by Organic Objective Materials. *Chemistry - A European Journal*. 2014;20(24):7196–7214.
47. Liu Y, Lou C, Yang H, Shi M, Miyoshi H. Silica Nanoparticles as Promising Drug/Gene Delivery Carriers and Fluorescent Nano-Probes: Recent Advances. *Current Cancer Drug Targets*. 2011;11(2):156–163.
48. Kneuer C, Sameti M, Bakowsky U, Schiestel T, Schirra H, Schmidt H, Lehr C-M. A Nonviral DNA Delivery System Based on Surface Modified Silica-Nanoparticles Can Efficiently Transfect Cells in Vitro. *Bioconjugate Chemistry*. 2000;11(6):926–932.
49. Bharali DJ, Klejbor I, Stachowiak EK, Dutta P, Roy I, Kaur N, Bergey EJ, Prasad PN, Stachowiak MK. Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for *in vivo* gene delivery and expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(32):11539–11544.
50. Huang X, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*. 2010;1(1):13–28.
51. Why do gold nanoparticles aggregate? NanoHybrids - Advanced Imaging Solutions. [Internet] <https://nanohybrids.net/pages/understanding-gold-nanoparticle-aggregation>
52. 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;2013:1–10.
53. Luque Alled JM. Caracterización de nanopartículas de plata y evaluación de especies de Ag (I) derivadas de la formación de proteínas corona mediante técnicas electroforéticas y ablación láser-ICP-MS. 2015.
54. Gold Nanoparticles Properties - Centrifuge Speeds. Nanopartz. [Internet] <https://www.nanopartz.com/gold-nanoparticles-properties-centrifuge-speeds.asp>
55. Guo B, Pearce AG, Traulsen KEA, Rintala AC, Lee H. Fluorescence Produced by Transfection Reagents Can Be Confused with Green Fluorescent Proteins in Mammalian Cells. *BioTechniques*. 2001;31(2):314–321

56. DePalma A. Transfection Protocols for Difficult Cells. FUTURE LAB - Biocompare. 2018. [Internet] <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/354002-Optimizing-Transfection-of-Nontraditional-Cell-Lines/>
57. Utku Konca Y, Kirshenbaum K, Zuckermann RN. Nanometer-scale siRNA carriers incorporating peptidomimetic oligomers: physical characterization and biological activity. *International Journal of Nanomedicine*. 2014 May;2271.
58. Iglesias Artola JM, Villamonte G, Gonzales Molfino M. Transfección de ADN a células de animales como herramientas utilizadas en biotecnología animal. *The Biologist*. 2015;13(1).
59. Fisichella M, Dabboue H, Bhattacharyya S, Saboungi M-L, Salvétat J-P, Hevor T, Guerin M. Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. *Toxicology in Vitro*. 2009;23(4):697–703.
60. Arroyo E, Torres Herrero B, de la Fuente JM, Ocaña M, Becerro AI. Highly uniform Y3Al2Ga3O12-based nanophosphors for persistent luminescence bioimaging in the visible and NIR regions. *Inorganic Chemistry Frontiers*. 2022;9(11):2454–2461.
61. Zischewski J, Fischer R, Bortesi L. Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology Advances*. 2017;35(1):95–104
62. Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:796991.
63. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005;51(3):187–200.
64. Chen S, Evans HG, Evans DR. FLASH Knockdown Sensitizes Cells To Fas-Mediated Apoptosis via Down-Regulation of the Anti-Apoptotic Proteins, MCL-1 and Cflip Short Tsilibary EC, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e32971.
65. Abaandou L, Sharma AK, Shiloach J. Knockout of the caspase 8-associated protein 2 gene improves recombinant protein expression in HEK293 cells through up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene. *Biotechnology and Bioengineering*. 2021;118(1):186–198.
66. Gearing M. Plasmids 101: Golden Gate Cloning. *Addgene Blog*. 2015. [Internet] <https://blog.addgene.org/plasmids-101-golden-gate-cloning>
67. Forozaandeh P, Aziz AA. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. 2018;13(1):339.
68. Laaksonen T, Santos H, Vihola H, Salonen J, Riikonen J, Heikkilä T, Peltonen L, Kumar N, Murzin DYu, Lehto V-P, et al. Failure of MTT as a Toxicity Testing Agent for Mesoporous Silicon Microparticles. *Chemical Research in Toxicology*. 2007;20(12):1913–1918.
69. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: Larramendy ML, Soloneski S, editors. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTech; 2018.
70. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016;2016(4):pdb.prot087379.
71. Kim I-Y, Joachim E, Choi H, Kim K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015;11(6):1407–1416.
72. Slita A, Egorova A, Casals E, Kiselev A, Rosenholm JM. Characterization of modified mesoporous silica nanoparticles as vectors for siRNA delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;13(6):592–599.
73. Grandinetti G, Ingle NP, Reineke TM. Interaction of Poly(ethylenimine)–DNA Polyplexes with Mitochondria: Implications for a Mechanism of Cytotoxicity. *Molecular Pharmaceutics*. 2011;8(5):1709–1719.

74. Hom C, Lu J, Tamanoi F. Silica nanoparticles as a delivery system for nucleic acid-based reagents. *Journal of Materials Chemistry*. 2009;19(35):6308.
75. Augustine R, Hasan A, Primavera R, Wilson RJ, Thakor AS, Kevadiya BD. Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. *Materials Today Communications*. 2020;25:101692.
76. Lu F, Wu S-H, Hung Y, Mou C-Y. Size Effect on Cell Uptake in Well-Suspended, Uniform Mesoporous Silica Nanoparticles. *Small*. 2009;5(12):1408–1413.
77. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*. 2008;3(3):145–150.
78. Napierska D, Thomassen LC, Lison D, Martens JA, Hoet PH. The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010;7(1):39.

8. Anexo

8.1. Seguimiento de los *batches* A - E de AuNPs a lo largo del tiempo

Tabla A1. Valores de SPR y absorbancia del *batch* A a lo largo del tiempo.

Día	Promedio SPR	Desvío estándar SPR	Promedio Absorbancia	Desvío estándar absorbancia
1	518,7 nm	0,14	1,07	0,05
2	518,9 nm	0,14	1,09	0,01
4	518,7 nm	0,14	1,13	0,07
8	519 nm	0	1,03	0,08
11	519,7 nm	0	1,12	0,02
15	521 nm	0,14	0,99	0,10

Tabla A2. Valores de SPR y absorbancia del *batch* B a lo largo del tiempo.

Día	Promedio SPR	Desvío estándar SPR	Promedio Absorbancia	Desvío estándar absorbancia
1	522,2 nm	0,42	0,92	0,084
2	522,2 nm	0,14	0,86	0,016
4	522,6 nm	0,07	1,10	0,20
8	523,2 nm	0,14	0,86	0,01
11	524,1 nm	0,21	0,86	0,05
15	522,5 nm	0,21	0,89	0,01

Tabla A3. Valores de SPR y absorbancia del *batch* C a lo largo del tiempo.

Día	Promedio SPR	Desvío estándar SPR	Promedio Absorbancia	Desvío estándar absorbancia
1	521,7 nm	0	0,99	0,10
2	522,1 nm	0	0,96	0,04
4	523,3 nm	0,21	0,94	0,02
8	522,4 nm	0,57	1,19	0,23
11	521,5 nm	0	0,90	0,02
15	522,7 nm	0,71	0,91	0,05

Tabla A4. Valores de SPR y absorbancia del *batch* D a lo largo del tiempo.

Día	Promedio SPR	Desvío estándar SPR	Promedio Absorbancia	Desvío estándar absorbancia
1	519,8 nm	0,50	1,09	0,05
2	520,4 nm	0,85	1,06	0,09
4	520 nm	0,14	1,06	0,10
8	520,6 nm	0,21	0,98	0,03
11	520,3 nm	0,50	0,91	0,01
15	519,6 nm	0,42	1,05	0,07

Tabla A5. Valores de SPR y absorbancia del *batch* E a lo largo del tiempo.

Día	Promedio SPR	Desvío estándar SPR	Promedio Absorbancia	Desvío estándar absorbancia
1	519,5 nm	0,07	0,93	0,01
2	519,8 nm	0,42	0,96	0
4	520,3 nm	0,21	0,88	0,02
8	520,1 nm	0,55	0,94	0,02
11	519,9 nm	0,14	0,91	0,01
15	519,9 nm	0,1	0,92	0,03

8.2. Mapas de los plásmidos utilizados

Created with SnapGene®

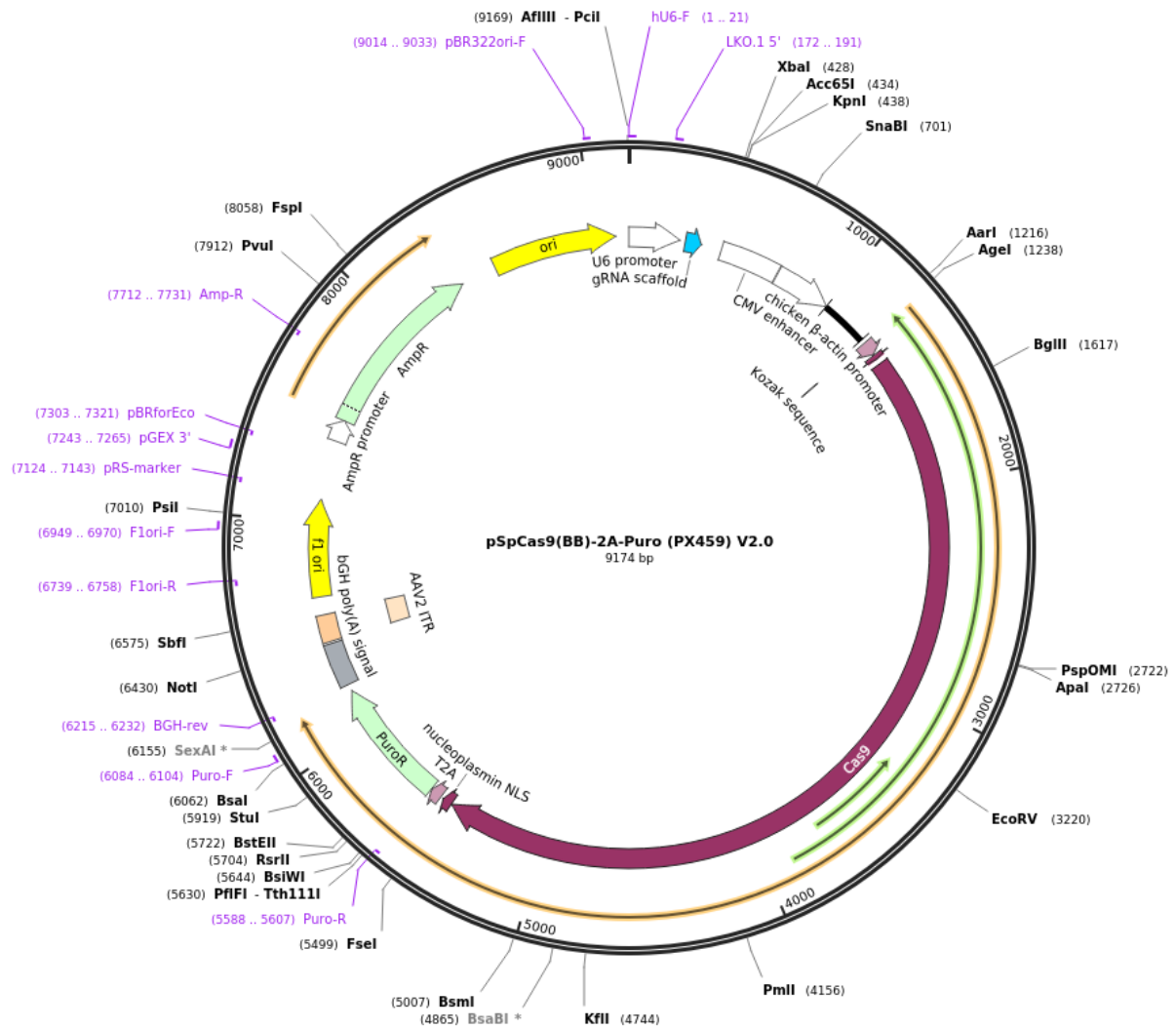


Figura A1. Mapa del plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0. Secuencia extraída de www.addgene.org/62988.

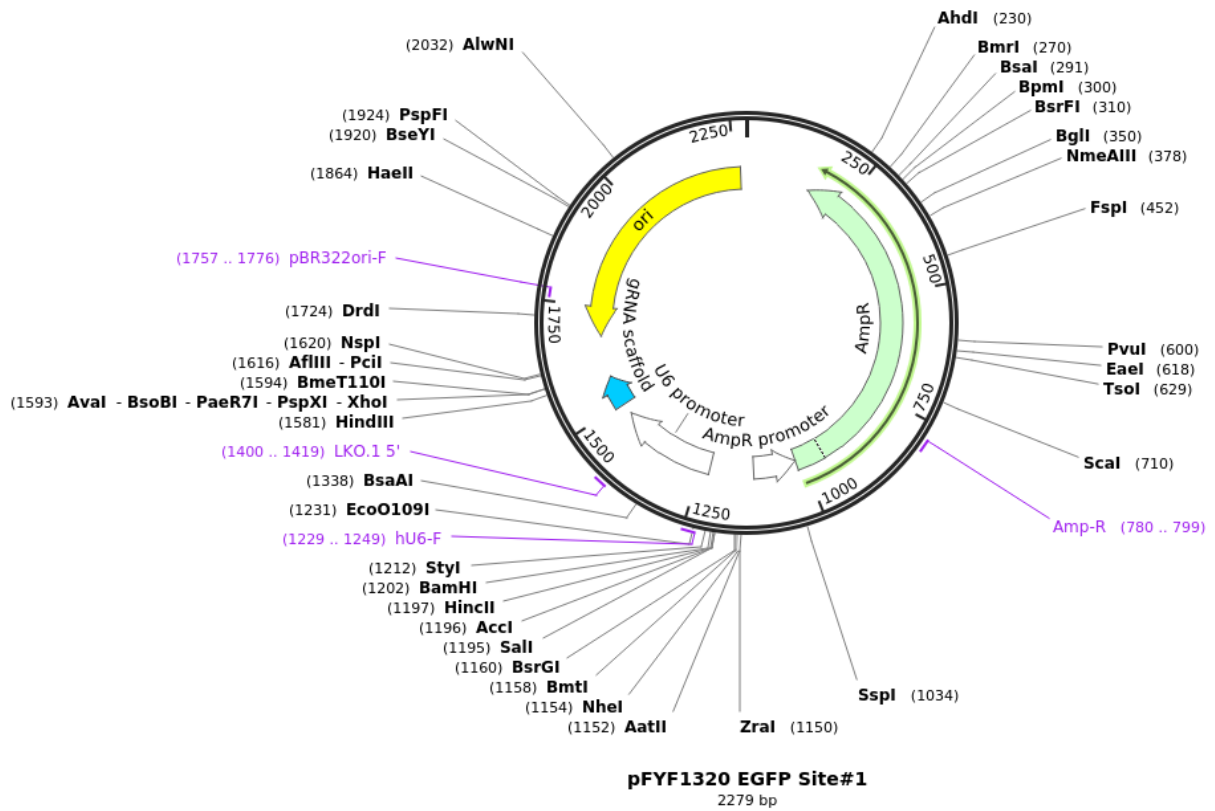


Figura A2. Mapa del plásmido pFYF1320 EGFP Site#1. Secuencia extraída de <http://www.addgene.org/47511>.

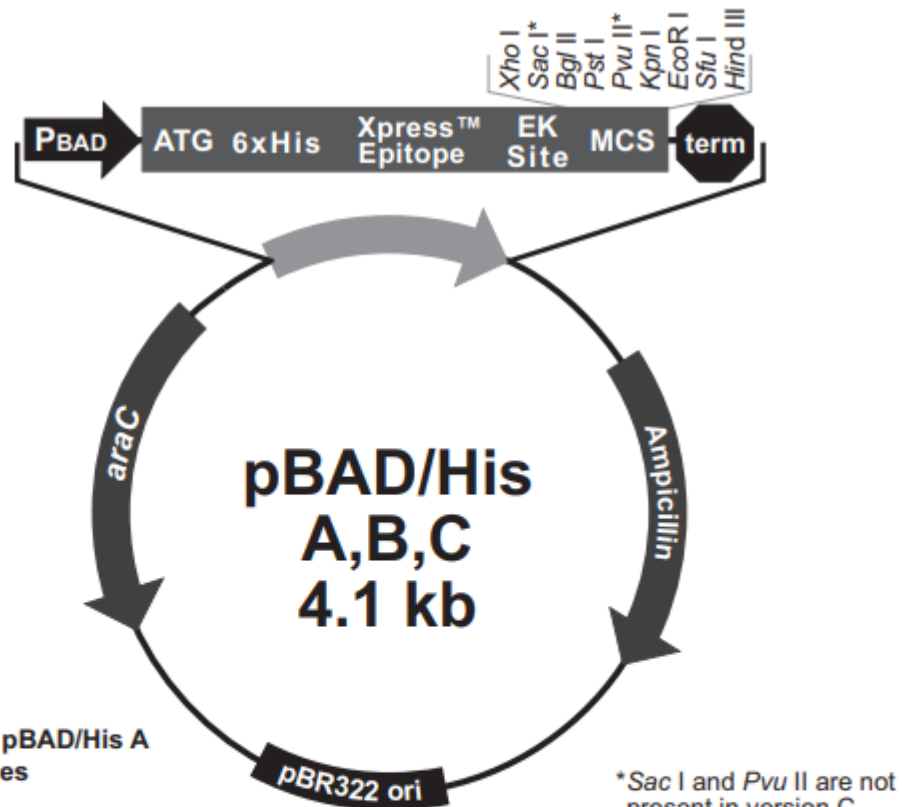


Figura A3. Mapa del plásmido pBAD/His. Secuencia extraída de <http://www.thermofisher.com>

8.3. Secuencias de los *primers* utilizados

Tabla A6. Secuencias de los *primers forward* y *reverse* diseñados para amplificar el gen GFP en la línea celular NM2C5-GFP.

Secuencia <i>Forward</i>	Secuencia <i>Reverse</i>
ACGTAAACGGCCACAAGTTC	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCTG

Tabla A7. Secuencias de los *primers forward* y *reverse* diseñados para verificar la inserción de las guías en el plásmido 2A-Puro.

Nombre del <i>primer</i>	Secuencia <i>Forward</i>	Secuencia <i>Reverse</i>
Guía 1	CGGAACAATGATGAAGGCTCAC	ATAGGGGGCGTACTTGCCAT
Guía 2	GGGTTGGACAGTGCTGTTTC	
Guía 3	CCGCCTCTTAAGAACAATGATGA	

Tabla A8. Secuencias de los *primers forward* y *reverse* diseñados para amplificar el gen de resistencia a la ampicilina en el plásmido 2A-Puro.

Secuencia <i>Forward</i>	Secuencia <i>Reverse</i>
ACAGAAAAGCATCTTACGGATGG	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC

Tabla A9. Secuencias de los *primers forward* y *reverse* diseñados para amplificar el gen CASP8AP2 en la línea celular HEK-293.

Secuencia <i>Forward</i>	Secuencia <i>Reverse</i>
TCCTGGTCCTTTAGTGTAGGAATG	CACCAGCACTAGTTGCACTT

8.4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados

Tabla A10. Secuencias de los oligonucleótidos *forward* y *reverse* diseñados para generar las guías para el sistema CRISPR-Cas9.

Nombre de la guía	Secuencia <i>Forward</i>	Secuencia <i>Reverse</i>
Guía 1	CACCGGAACAATGATGAAGGCTCAC	CCTTGTTACTACTTCCGAGTGCAAA
Guía 2	CACCGGGGTTGGACAGTGCTGTTTC	CCCCAACCTGTCACGACAAAGCAAA
Guía 3	CACCGCCTCTTAAGAACAATGATGA	CGGAGAATTCTTGTTACTACTCAA