

Universidad de Costa Rica

Sede Rodrigo Facio

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de
Licenciatura en Química.

Influencia del flujo autofágico sobre la eficiencia de
transfección celular en diferentes líneas celulares

Carlos Andrés Cervantes Fernandez.

B51856

Tutor: Dr. Alfonso García Piñeres.

Laboratorio de Cultivo Celular - Centro de Investigaciones
en Biología Celular y Molecular

2021

Dedicatoria

A mis padres: Juan Carlos y Susana por apoyarme siempre

Gracias por todo

Agradecimientos

Dr. Alfonso García Peñeres, por permitirme trabajar a su lado, por apoyarme a seguir adelante con esta investigación y por el conocimiento que me transmitió

Dr. Daniel Chacón Arguedas, por apoyarme a seguir adelante con esta investigación y por el conocimiento que me transmitió

Asesores y representantes, por formar parte de este proyecto: Dr. Max Chavarría Vargas, Dr. Juan José Araya Barrantes y Dr. Leslie Pineda Cedeño

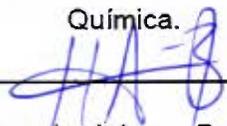
Dra. Mavis Montero Villalobos, por el aporte de las nanopartículas utilizadas en esta investigación

Dr. Rodrigo Mora Rodríguez, PhD. y al Dr. Jorge Arias Arias, MSc. Laboratorio de Quimiosensibilidad Tumoral, Facultad de Microbiología, por sus aportes de reactivos y linajes celulares, utilizados en esta investigación.

Al personal del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular por su colaboración a lo largo de la investigación.

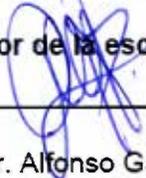
A mis padres y a mi familia que me apoyaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación e Investigación de la escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de licenciatura en Química.



Dr. Juan José Araya Barrantes

Director de la escuela de Química



Dr. Alfonso García Piñeres

Director de Tesis



Dr. Max Chavarría Vargas

Asesor



MSc. Carlos Daniel Chacón Arguedas

Asesor



Dr. Leslie Pineda Cedeño

Representante de la Facultad de Ciencias Básicas



Carlos Andrés Cervantes Fernandez

Sustentante

Índice

Resumen.....	2
Lista de figuras.....	3
Lista de cuadros.....	6
Lista de abreviaturas.....	6
Introducción.....	7
Marco teórico.....	10
Justificación.....	28
Hipótesis.....	29
Objetivos.....	29
Materiales y métodos.....	30
Resultados	36
Discusión.....	45
Conclusiones.....	51
Perspectivas.....	52
Referencias.....	53
Anexos.....	63

Resumen

La capacidad de introducir material genético eficientemente en una célula es de interés en procesos como terapia génica y fabricación de vacunas. Si bien ya existen métodos para lograrlo, es necesario encontrar métodos de transfección más eficientes. Dentro de estos vehículos de transfección se puede destacar la utilidad de nanopartículas de hidroxiapatita (HAp); un mineral cuya fórmula química es: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, y que está presente naturalmente en huesos y dientes.

Las propiedades que posee este material, como su biocompatibilidad, osteoconductividad, afinidad por biomoléculas y toxicidad baja por mencionar algunas, han promovido el estudio y la aplicación de hidroxiapatita como un biomaterial por excelencia en diversos sistemas biológicos. En este trabajo se estudió la utilización de nanopartículas de hidroxiapatita en la transfección de diversos linajes celulares, es decir células HeLa y HEK 293 T, lo anterior con el fin de poder determinar que en presencia de reguladores de la vía autofágica se puede modular la eficiencia de transfección; cuya modulación es dependiente del linaje celular.

Asimismo, se estudió la internalización del complejo HAp-ADN en las líneas celulares HEK 293 T y HeLa, en donde se logró verificar y cuantificar cuantas células positivas internalizan hidroxiapatita por parte del linaje HEK 293T e incluso determinar una tendencia a una posible internalización efectiva por parte de las células HeLa, sin embargo este un aumento no es significativo.

Este estudio permite comprender la captación de este tipo de vehículo genético en los linajes de estudio y la relación que existe entre el proceso de transfección y la modulación autofagia, de la cual existe poca información reportada. Estos resultados podrían permitir obtener procesos más eficientes de transfección y con ello mejoras en áreas de interés como la ya mencionada terapia génica o la nanofarmacología.

Lista de figuras

Figura 1: Proyección esquemática de la estructura cristalográfica de la celda unidad hexagonal de HAp (A) y modelo de losa de la superficie de HAp (B).....	10
Figura 2: Preparación de HAp a partir de fuentes biogénicas.....	13
Figura 3: Rendimiento de transfección con nanopartículas de hidroxiapatita: (HAp) y dopada con europio trivalente (HAp-Eu) en células HEK 293T (A) y HeLa (B), las barras de error representan la desviación estándar y las barras rojas representan la media del tratamiento respectivo.	19
Figura 4: Proceso general de autofagia.....	21
Figura 5: Estructura de los reguladores del flujo autofágico utilizados en este trabajo.....	23
Figura 6: Diagrama de la modulación de la autofagia, regulada por el objetivo mamífero de rapamicina (mTOR); específicamente el complejo mTORC1 mediante la acción de fosfatidilinositol (PtdIns) -3-quinasa (PI3KC3).....	25
Figura 7: Estructura del inhibidor de mTOR; rapamicina (A) e interacción entre rapamicina y mTOR (B).	25
Figura 8: Estructura de rayos X de la interacción entre Wortmanina y el sitio activo de PI3KC3, en (B) las interacciones de hidrógeno están representadas por líneas punteadas rojas	27
Figura 9: Porcentaje de células HeLa transfectadas utilizando fosfato de calcio (A), polietilénimina (PEI, B) o nanopartículas de hidroxiapatita (HAp, C), según el tratamiento: vehículo de transfección; sólo (control), o en presencia del inhibidor (wortmanina, 80 nM) o estímulos del flujo autofágico (rapamicina, 0.75 µM y torin-2, 0.76 µM). El punto rojo representa la media del tratamiento, y las barras de error simbolizan el error estándar obtenido con 3 réplicas. Los símbolos * y # identifican efectos que muestran diferencias significativas, $p < 0.05$	37

Figura 10: Porcentaje de células HeK 293 T transfectadas utilizando fosfato de calcio (A), polietilenimina (B) o nanopartículas de hidroxiapatita (C) según el tratamiento: vehículo de transfección; sólo (control), o en presencia del inhibidor (wortmaninna, 80 nM) o estímulos del flujo autofágico (rapamicina, 0.75 µM y torin-2, 0.76 µM). El punto rojo representa la media del tratamiento y las barras de error simbolizan el error estándar obtenido con 3 réplicas.....40

Figura 11: Internalización del complejo ADN-hidroxiapatita por el linaje celular HeLa. El punto azul representa la media del tratamiento respectivo y las barras de error simbolizan el error estándar obtenido con 4 réplicas. **ADN**=Plásmido, **PI**=Yoduro de propidio, **HAp**=hidroxiapatita y el símbolo a la derecha de cada uno de estas sustancias significa: **(+)** = presencia y **(-)** = ausencia de la condición. Las diferencias se establecieron mediante una ANOVA, según un modelo de mínimos cuadrados pesados con un nivel de significancia de 0,05. Las letras **(A-F)** identifican pares de tratamientos que muestran diferencias significativas entre sí, $p < 0.05$42

Figura 12: Internalización del complejo ADN-hidroxiapatita por el linaje celular HEK 293 T. El punto azul representa la media del tratamiento respectivo y las barras de error simbolizan el error estándar obtenido con 3 réplicas. **ADN**=Plásmido, **PI**=Yoduro de propidio, **HAp**=hidroxiapatita y el símbolo a la derecha de cada uno de estas sustancias significa: **(+)** = presencia y **(-)** = ausencia de la condición. Las diferencias se establecieron mediante una ANOVA, según un modelo de mínimos cuadrados pesados con un nivel de significancia de 0,05. Las letras **(A - N)** simbolizan pares de tratamientos que muestran diferencias significativas entre sí, $p < 0.05$44

Figura 13: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HeLa en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$63

Figura 14: Resultados del análisis post-hoc (prueba Tukey) para la transfección del linaje celular HeLa en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	63
Figura 15: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HeLa en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de PEI.....	64
Figura 16: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HeLa en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de HAp.....	64
Figura 17: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HEK 293 T en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	65
Figura 18: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HEK 293 T en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de PEI.....	65
Figura 19: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HEK 293 T en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de HAp.....	66
Figura 20: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la internalización del complejo ADN-HAp por parte del linaje celular HeLa, mediante un modelo de mínimos cuadrados pesados.....	66
Figura 21: Resultados del análisis post-hoc (prueba Tukey) para la internalización del complejo ADN-HAp por parte del linaje celular HeLa.....	67
Figura 22: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la internalización del complejo ADN-HAp por parte del linaje celular HEK 293 T, mediante un modelo de mínimos cuadrados pesados.....	68

Figura 23: Resultados del análisis post-hoc (prueba Tukey) para la internalización del complejo ADN-HAp por parte del linaje celular HEK 293 T.....69

Lista de cuadros

Cuadro I: Sustancias conocidas que influyen en la autofagia.....23

Cuadro II. Concentraciones de los estímulos e inhibidor del flujo autofágico usados para las transfecciones con los vehículos génicos: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, PEI y HAp.....33

Lista de abreviaturas

HAp	Hidroxiapatita
HAp-Eu	Hidroxiapatita dopada con europio trivalente
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PEI	Polietilenimina
PBS	Phosphate Buffered Saline
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
GFP	Proteína verde fluorescente
PI	Yoduro de propidio

Introducción

Nanotecnología

La nanotecnología es la disciplina encargada de producir y manipular materiales a escala nanométrica, una escala similar al tamaño de algunos virus (~100 nm) o proteínas como la hemoglobina (~10 nm).^{1, 2, 3} Esta área ha tomado auge en los últimos años, debido a las diferentes características físicas (formas y tamaños) y químicas de estos materiales con respecto a los materiales convencionales.⁷

Lo anterior ha generado aplicaciones en diferentes áreas, dentro de las cuales podemos destacar el uso de estos nanomateriales no solo en investigación básica, sino también en el desarrollo e innovación de energías más eficientes y limpias. Incluso se han encontrado aplicaciones en la industria de catálisis^{4, 7} especialmente en fotocatalisis por sus cualidades semiconductoras.⁷ En el área de dispositivos electrónicos, han encontrado aplicación debido a sus características eléctricas y ópticas, por ejemplo se han utilizado en el desarrollo de sensores y pantallas.⁷ En cuanto a la industria mecánica, se han utilizado como revestimientos, lubricantes y adhesivos; debido a sus propiedades de tensión y deformación.⁷ Por otro lado, en el ámbito ambiental, además de la generación de energías más limpias, se han utilizado a estos materiales en la remediación de aguas.⁷

Existen una gran variedad de nanomateriales, por ejemplo, nanopolímeros, nanohilos y nanopartículas de naturaleza metálica o a base de no metales como por ejemplo de carbono (nanotubos).^{4,7} Dentro de estos materiales, nos concentraremos en las nanopartículas, las cuales poseen un tamaño comprendido entre 1 y 100 nm.^{1, 3, 4} La obtención de este tipo de nanomateriales se pueden realizar mediante los siguientes métodos:

1. Las nanopartículas obtenidas por métodos físicos o *top-down* implica un método destructivo, a partir de un material que se subdivide para disminuir su tamaño de partícula y el proceso se repite hasta obtener

nanopartículas a las que se añaden agentes estabilizantes de estas para mantener su forma y tamaño.^{4, 7} Ejemplos de estos métodos son molienda, deposición física en base de vapor, entre otras.⁷

2. Los métodos químicos, conocidos como *bottom-up*, consisten en un enfoque tipo constructivo debido a que las nanopartículas se forman a partir de sustancias más simples.^{7, 8} Este procedimiento consiste en la formación de agregados de moléculas y su estabilización para mantener la morfología de las nanopartículas sintetizadas y por ende sus propiedades.^{4, 7} Ejemplos de estos métodos son la obtención de partículas por reducción química o electroquímica de una sal.^{7, 8} También se utiliza la ablación mediada por láser (métodos físico-químicos) e incluso métodos de síntesis biológicos.^{7, 8}

Otra área que ha generado interés es la aplicación de los nanomateriales en sistemas biológicos, conocida como bio-nanotecnología.^{5, 6, 7, 9} De las aplicaciones que se han reportado para las nanopartículas dentro del área de la bio-nanotecnología se puede destacar el uso de estas como sensores, por ejemplo de diversos analitos biológicos como ácidos nucleicos y proteínas debido a la capacidad de unión de las nanopartículas con estos tipos de biomoléculas.^{6, 74} Asimismo, se han utilizado en la detención de ciertos patógenos, mediante el uso de nanopartículas magnéticas recubiertas con anticuerpos, para detectar antígenos de superficie específicos de estos.^{6, 74} También, han encontrado aplicación en el seguimiento específico de diversos objetivos moleculares, por ejemplo con el uso de los marcadores fluorescentes conocidos en inglés como quantum dots (nanopartículas semiconductoras fluorescentes), se ha podido obtener imágenes celulares satisfactorias.^{1, 74}

Otra aplicación consiste en su uso como vehículos génicos, es decir, como material capaz de transportar ácidos nucleicos hacia el interior de la célula.^{5, 11, 12, 13} Cuando el cargo transportado por las nanopartículas es un

ácido nucleico, y el proceso ese realiza en células eucariotas, es conocido como transfección y es usado para expresar genes en células animales.^{10, 12}

Por otra parte, la transfección ha encontrado aplicación en tratamientos como la terapia génica.⁷⁵ Por ejemplo mediante tratamientos *ex vivo*, en donde se realiza la corrección del defecto genético en células extraídas del propio paciente, una vez el transgen, (gen extraño) es transmitido a las células hijas, estas son devueltas al organismo del paciente.^{75, 76} Esta forma *ex vivo* se aplica en tejidos o células diana como de la piel o el hígado, debido a que pueden renovarse a partir de células progenitoras.⁷⁶ De forma específica se ha utilizado en el tratamiento de la deficiencia de la enzima adenosina desaminasa de hepatocitos para reducir la hipercolesterolemia familiar, entre otras patologías.⁷⁶

Debido al interés que se ha generado en esta área, se ha hecho necesario buscar vehículos más biocompatibles, menos tóxicos o inertes para dicho fin, y que a su vez sean estables en sistemas biológicos.^{10, 11} Uno de los nanomateriales que ha generado interés para dicho fin son las nanopartículas de hidroxiapatita.

Marco teórico

Hidroxiapatita (HAp)

La hidroxiapatita es un mineral compuesto por fósforo, calcio e hidrógeno principalmente, cuya fórmula química es: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.^{10, 14} La hidroxiapatita está presente de forma natural en huesos y dientes, proporcionando la dureza característica a estos tejidos.¹⁴ Sin embargo, la HAp biogénica contiene porcentajes pequeños de otras especies químicas; como carbonato (CO_3^{2-}), cloruro (Cl^-), iones magnesio (Mg^{2+}) y iones sodio (Na^+).^{14, 15} Este mineral pertenece a la familia de las apatitas con una estructura cristalina hexagonal (figura 1) y en la naturaleza puede estar formando parte de rocas sedimentarias e incluso metamórficas.¹⁴ Por lo general posee una relación molar Ca/P de 1,67.¹⁵

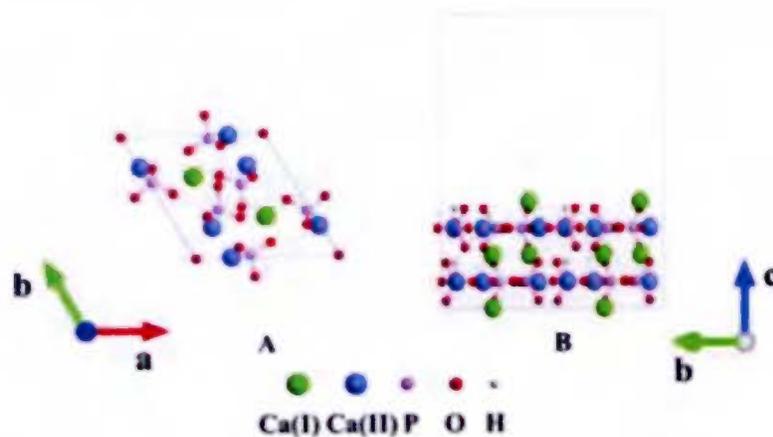


Figura 1: Proyección esquemática de la estructura cristalográfica de la celda unidad hexagonal de HAp (A) y modelo de losa de la superficie de HAp (B). (Fuente: Wang et al., 2018)¹⁶.

La hidroxiapatita es un biomaterial con potencial de aplicabilidad debido a sus propiedades de biocompatibilidad (es tolerado por el organismo y así facilita la adherencia de implantes).^{10, 17, 18} Además, este material muestra una alta afinidad por biomoléculas y propiedades adicionales como osteoconducción; (promueve el desarrollo de nuevo material óseo) y baja toxicidad, por mencionar algunas.^{14, 17, 18} Estas propiedades han llevado a su

aplicación en diferentes áreas por ejemplo: ortopedia, odontología con el esmalte dental e incluso en implantes de oído medio.^{14, 17}

Existen diversos ejemplos de aplicaciones de HAp, algunos en temas relacionados con el agua en donde se han utilizado a estas como agentes de tratamiento en la eliminación de ciertos metales pesados como Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} ; esto basado en una reacción de intercambio iónico.¹⁸ También en catálisis se han usado a las nanopartículas, por ejemplo como catalizador económico en la combustión de ciertos compuestos orgánicos como formaldehído, que normalmente se realiza sobre catalizadores de metales preciosos de alto costo como platino y paladio; e incluso se han utilizado como fase estacionaria para purificar y separar ácidos nucleicos, péptidos y proteínas.¹⁸

Se ha reportado que propiedades, como la biocompatibilidad y la toxicidad de este material dependen del tamaño y forma de las nanopartículas.^{17, 18, 19} Por lo cual, controlar estos parámetros es de notorio interés para obtener una formulación adecuada del material para las aplicaciones deseadas.^{17, 18, 19} Por ejemplo se reporta que nanopartículas de hidroxiapatita en forma de aguja (fusiformes) y de placa poseen una mayor toxicidad que en forma esférica, lo anterior en células epiteliales bronquiales humanas (BEAS-2B),^{78, 79} no obstante este efecto es dependiente del tipo de célula ya que en células RAW 264.7 con estas mismas nanopartículas, este efecto es independiente de la forma.⁷⁹

Además, existen reportes de que en presencia de altas concentraciones de las nanopartículas (aproximadamente a 0.5 mg/mL) empieza a tener efectos notorios; causando daños celulares que conducen a la inhibición del crecimiento celular.²⁰

También se ha reportado un aumento de la toxicidad por la presencia de cargas negativas en las nanopartículas,^{10, 21} no obstante, a pesar de tener cargas negativas en su superficie también estas son internalizadas aunque en menor medida que las que poseen cargas positivas.²⁰ En el caso de

hidroxiapatita, este material posee tanto cargas negativas como positivas; por la presencia de fosfatos (PO_4^{3-}) y calcio (Ca^{2+}) en su estructura ^{10, 15} y de igual manera existen reportes de su internalización en diversos linajes celulares.^{10, 80, 81}

Síntesis de HAp

Con el fin de controlar el tamaño y forma de las partículas de hidroxiapatita se han diseñado diferentes métodos de síntesis. Algunos de estos métodos son:

Métodos secos: como lo dice su nombre no implica el uso de solventes y a su vez no requieren controlar la presión.¹⁷ Ejemplo de esto es la síntesis en estado sólido; en la cual sales de calcio son sometidas a un proceso de molienda y luego llevadas a temperaturas de hasta 1000°C , y una vez calcinadas se obtiene una estructura cristalina. ¹⁷ Sin embargo posee la dificultad de formar nanopartículas de gran tamaño y de forma irregular.¹⁷ Este es un método de bajo costo pero debido a la dificultad para controlar el tamaño de partícula, no es adecuado para sintetizar HAp con una aplicación biomédica con un control más preciso.¹⁷

Métodos húmedos: poseen como ventajas poder controlar la morfología y el tamaño de las nanopartículas de manera precisa; sin embargo, presenta la desventaja de que en solución otros iones pueden incorporarse a la estructura cristalina y así ocasionar impurezas.¹⁷ Ejemplos de estos son: precipitación química, hidrolisis, sol-gel, hidrotérmicos, emulsiones y métodos sonoquímicos.¹⁷ En términos generales son métodos que dependen del pH del medio para la formación adecuada de las nanopartículas, y en algunos casos, como en los métodos hidrotérmicos, dependen además de la presión aplicada.¹⁷

Métodos de alta temperatura: son procesos en que los precursores se descomponen ya sea total o parcialmente para dar origen a las nanopartículas.¹⁷ Posee como ventaja la alta pureza del producto, y que es un

método rápido y de bajo costo.¹⁷ Por otro lado su principal desventaja es la gran cantidad de variables que se deben mantener bajo control durante el proceso.¹⁷ Ejemplos de estos métodos son la combustión y la pirólisis.¹⁷

Métodos de síntesis a partir de fuentes biogénicas: en estos procesos las nanopartículas de HAp son obtenidas a partir de fuente de desechos óseos e incluso exoesqueletos de organismos marinos (Figura 2).¹⁷ La ventaja de estos métodos radica en que las nanopartículas obtenidas por este método son más biocompatibles debido a la gran similitud con la apatita ósea humana y que son de menor costo.¹⁷ Como desventaja se puede mencionar que se obtienen nanopartículas de gran tamaño.¹⁷



Figura 2: Preparación de HAp a partir de fuentes biogénicas. (Fuente: Sadat et al., 2013).¹⁷

Métodos de síntesis por electrólisis:

Esta metodología de síntesis fue desarrollada por el grupo de trabajo de la Dra. Mavis Montero en la Universidad de Costa Rica.^{22, 23} El método consiste en la electrólisis de una solución homogénea y saturada de $\text{Ca}^{2+}/\text{EDTA}/\text{PO}_4^{3-}$ mediante el empleo una celda electroquímica simple con electrodos concéntricos rotatorios de platino; con el fin de liberar al calcio quelatado con el EDTA, al degradar a este último y así permitir la unión del calcio con el fosfato.^{22, 23} Los investigadores demostraron que en estas condiciones, la formación de HAp es independiente del tiempo de reacción para la formación de estas nanopartículas,^{22, 23} y que la formación puede ocurrir a un rango de pH de 4-13 y a un rango de densidad de corriente de 50-260 mA cm⁻².²³ Este método es rápido y permite controlar el tamaño de partícula. Además, los rendimientos son altos, e incluso permite la obtención de apatitas dopadas con cationes divalentes como Mg^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} .²³ Cabe

destacar que las nanopartículas usadas en este estudio se sintetizaron mediante un método de electrólisis.^{22, 23}

Transfección mediada por HAp

Existen numerosos reportes sobre la capacidad de la hidroxiapatita para interactuar con biomoléculas como proteínas o ácidos nucleicos.^{22, 24, 25} Esto ha generado muchos trabajos para caracterizar estas interacciones y ha llevado a que la hidroxiapatita sea considerada un vehículo adecuado para estos tipos de biomoléculas y así generar aplicaciones en áreas de interés como terapia génica o nanofarmacología.^{13, 24, 25, 26, 32}

La transfección celular mediante el uso del vehículo génico HAp consiste en aprovechar la interacción entre este y ácidos nucleicos para transportar a estos ácidos nucleicos hacia el interior de células eucariotas.²⁷ Esto con el fin de estudiar expresión génica por mencionar un ejemplo.²⁷ De hecho, uno de los primeros métodos de transfección reportados consiste en la coprecipitación del ADN con fosfato de calcio.¹³ Sin embargo, el precipitado obtenido por este método no es necesariamente cristalino.^{10, 13}

En general, los métodos de transfección se pueden clasificar en tres grupos:

1. Biológicos: en esta categoría se encuentran los vectores virales, uno de los métodos más usados en investigación clínica, incluso se acuñó un término específico para este: transducción.^{10, 27} Este es un método eficiente debido a la capacidad del virus de lograr una interacción muy específica con un tipo de célula y su maquinaria para incorporar el material genético al genoma del hospedero.^{10, 27} Sin embargo posee desventajas, como límites para el tamaño del cargo o ácido nucleico, inmunogenicidad, citotoxicidad, la mutagénesis post-inserción,^{10, 27} además de un posible peligro biológico para el personal de laboratorio que lo utiliza.¹⁰
2. Químicos: estos son de los métodos más utilizados, siendo los primeros en utilizarse para introducir transgenes en células de

mamíferos, además el límite en el tamaño del cargo que se puede introducir es más variable.^{10, 27} Dentro de estos se destaca la coprecipitación alcalina de ADN con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, método comercial en varias presentaciones.^{10, 27} Otros métodos basados en polímeros catiónicos, como Polietilenimina (PEI), tienen la ventaja de ser métodos sencillos de ejecución.^{10, 27} En términos generales, estas moléculas cargadas positivamente forman un complejo con el ácido nucleico, seguidamente este complejo positivo es atraído por la membrana y la atraviesa.²⁷ Sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo exacto por el cual la atraviesa, pero existen reportes que indican que tiene relación con la endocitosis o fagocitosis.²⁷

3. Físicos: dentro de esta categoría se destacan técnicas como la electroporación o la microinyección.²⁷ En la primera se somete a las células a un cambio abrupto de voltaje para permeabilizar temporalmente la bicapa de fosfolípidos de la membrana y así introducir el ADN de interés.^{27, 28} La otra técnica implica la inyección del ácido nucleico de interés directamente en el citoplasma o núcleo.^{16, 27} En términos generales, esta técnica posee como ventaja principal que no requiere del uso de un vector.^{27, 28} Por otra parte, tiene la desventaja de requerir personal de laboratorio altamente capacitado para el uso de estos tipos de instrumentos.^{10, 27}

Como se mencionó, existe una alta afinidad entre el ADN y HAp, la cual ha sido aprovechada para utilizar HAp en la purificación y separación de ADN, tanto de simple hebra sencilla (ss), como de doble hebra (ds).²⁹ Se ha propuesto que la interacción molecular entre HAp y el ADN se debe a un proceso similar a una reacción de intercambio iónico, pero en varias etapas.²⁹ La primera etapa es endotérmica, y es la etapa predominante.^{10, 29} En esta se da una desolvatación y exclusión de iones asociados a las moléculas de ADN y la superficie de HAp, seguida de una etapa exotérmica en la que se da la unión de HAp y el ADN favorecida por interacciones electrostáticas entre el

Ca^{2+} del mineral con las cargas negativas de los grupos fosfato presentes en el ADN.^{10, 29} Por último, el complejo HAp-ADN formado es solvatado e hidratado.^{10, 29}

Además de los factores mencionados previamente, otros parámetros influyen en la interacción entre HAp y el ADN. Dentro de estos factores está el pH, ya que un aumento en este provoca la desprotonación de los grupos fosfato lo que a su vez implica un aumento de las interacciones electrostáticas.^{10, 29} Asimismo la longitud del ADN es importante, ya que entre mayor sea la longitud del fragmento mayores puntos de unión posee.²⁹ Adicionalmente, otro factor relevante es el contenido de guanina y citosina en la secuencia de nucleótidos, ya que esto implica mayor estabilidad de la molécula de ADN de interés y con ello una mayor posibilidad de unión con las nanopartículas.²⁹ Por último, bajas temperaturas favorecen la afinidad de unión del ADN de hebra simple.²⁹

La transfección con hidroxiapatita se puede clasificar como un método de transfección químico, dentro de las metodologías que utilizan fosfato de calcio.^{10, 30} En lugar de realizar una co - precipitación del fosfato de calcio con el ADN, en este caso se mezcla la disolución de ADN con una suspensión de las partículas.⁸⁴ Esto lleva a la adsorción de los ácidos nucleicos sobre la superficie de las partículas.⁸⁴ La diferencia entre ambos métodos por ejemplo radica en la estructura cristalina del fosfato de calcio y la estructura del agregado, entre otros.^{10, 13, 31}

Cabe destacar que la conveniencia del uso de hidroxiapatita como un método de transfección no solo se debe a la interacción de HAp con el ADN, ya que también existen otros parámetros importantes. Dentro de estos está el tamaño de la partícula, el cual es de gran importancia, ya que si los materiales nanoparticulados se encuentran en tamaños comprendidos entre 5 y 300 nm, implica que las células pueden endocitarlos con mayor eficacia, lo cual se relaciona con un mejor rendimiento en la transfección.³²

Asimismo, el tiempo de incubación del ADN con HAp juega un papel importante, ya que entre mayor sea este aumenta la posibilidad de agregación

de estos nanomateriales.^{31, 32} Lo cual afectaría la eficiencia de transfección, al ser difíciles de endocitar por el aumento en el tamaño del material a ser internalizado por los conglomerados formados.³²

Otro factor importante, es el potencial Z, el cual es una medida de las cargas electrostáticas presentes en la superficie de partículas.^{10, 15, 20} Se ha establecido que cargas positivas en la superficie de estos nanomateriales favorece la internalización; al darse un aumento de la actividad endocítica,^{10, 20} lo cual se le puede atribuir a que un potencial Z negativo está relacionado con un aumento en el tamaño de las nanopartículas y por ende en una menor internalización como ya se mencionó.²⁰

Por último, el pH es otro factor relevante, debido a que la hidroxiapatita es estable a diferentes valores de pH, esto dificulta la liberación del cargo o ácido nucleico una vez en el endosoma.^{10, 32} Por lo cual se ha propuesto modificar la estructura de HAp con una incorporación de CO_3^{2-} en la estructura cristalina, esto con el fin de hacer más solubles a las nanopartículas a pH bajos; similar al pH de los endosomas-lisosomas (pH = 5).^{10, 12, 32, 33, 34} Para así mediante una acidificación del endosoma promover la liberación de este ácido nucleico al darse la lisis osmótica del endosoma y con ello una mejor eficiencia de transfección.^{10, 12, 32, 33, 34}

Reportes de HAp como método de transfección

Al existir diversos reportes del uso de HAp como vehículo génico aquí se señalaran algunos ejemplos ilustrativos, con diferentes genes reporteros. Por ejemplo, la transfección de células endoteliales porcinas con nanopartículas modificadas con glucosa, con el fin de poder mejorar la captación celular de estas y además proteger el ADN de interés que se desea introducir; en donde el gen reportero de las células positivas fue la EGFP, es decir características deseadas para estos métodos de transfección.³⁵ Otro ejemplo es la transfección de células de médula ósea de ratones, detectando las células transfectadas mediante el gen *lacZ*, y además de la observación del crecimiento óseo al teñirse de azul, con el fin de comparar a estas con

cerámicas de fosfato de calcio y así determinar con cuál de estos materiales se promueven transfecciones más altas y reproducibles.³⁶

También, destacar el trabajo realizado por el Dr. Daniel Chacón y el Dr. Alfonso García, en el cual se investigó la posibilidad de utilizar nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) como vehículo génico.²² Se probaron nanopartículas de HAp sintetizadas mediante un método de electrólisis a distintos valores de pH: 4.96, 7.53, 9.16, 9.22 y 9.44,²² con el fin de evaluar la eficiencia de transfección con estas nanopartículas. Se obtuvo el mejor rendimiento de transfección con las nanopartículas sintetizadas a pH=9.22: un 20% de células positivas.²² Estas HAp contenían 5,3% de carbonato, un potencial Z de -27,9 mV y un tamaño de partícula promedio de 459 nm.²² Esto se probó en tres linajes celulares: HEK 293T (linaje inmortal derivado de células renales embrionarias humanas), HeLa (linaje inmortal de origen humano derivado de un carcinoma cervical) y Raw 264.7 (linaje de macrófagos murinos).²² En este trabajo se utilizó la proteína verde fluorescente GFP como gen reportero.²²

En este mismo trabajo, los autores lograron determinar que las líneas celulares HEK 293T, que presentan rendimientos aceptables de transfección (figura 3A), también exhibían alteraciones en el flujo autofágico cuando se incubaron con estas nanopartículas; y que el aumento del flujo fue más pronunciado al utilizar nanopartículas de HAp dopadas con europio (HAp-Eu) que con HAp sin dopar.¹⁰ En cuanto a las células HeLa (figura 3B) en general se obtuvieron rendimientos bajos de transfección. Sin embargo, de igual forma que con el linaje celular HEK 293T, se observaron alteraciones en el flujo autofágico, el cual tiende a aumentar al contacto con ambos tipos de nanopartículas.¹⁰

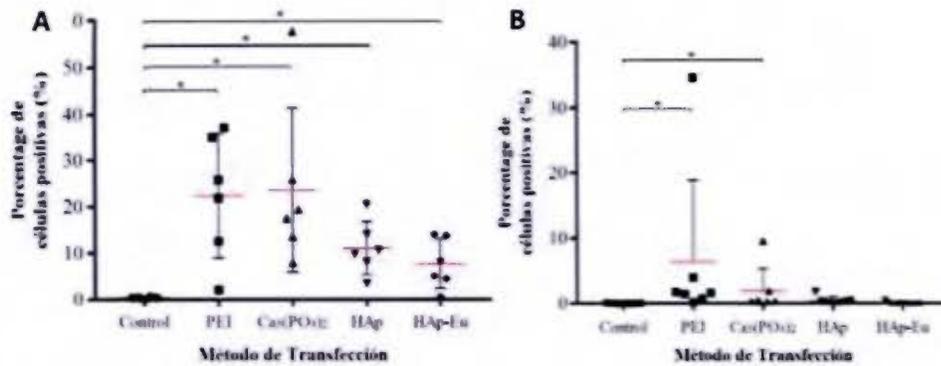


Figura 3: Rendimiento de transfección con nanopartículas de hidroxiapatita: (HAp) y dopada con europio trivalente (HAp-Eu) en células HEK 293T (A) y HeLa (B), las barras de error representan la desviación estándar y las barras rojas representan la media del tratamiento respectivo. (Fuente: Chacón, 2019).¹⁰

Además, se determinó que la eficiencia de internalización del cargo de HAp-ADN por parte de las células en estudio es muy variable.¹⁰ Sin embargo, no se determinó cuantas células positivas internalizan hidroxiapatita asociada con ADN, ni cuánto de este complejo se internalizó.¹⁰

Autofagia

El concepto de autofagia como un proceso bioquímico, fue propuesto por primera vez por Christian Duve en 1963 como un mecanismo celular de eliminación de material, mediado por lisosomas.³⁹ Este proceso celular catabólico permite el reciclaje de material de desecho dentro de la célula; desde biomoléculas, como agregados de proteínas (agrefagia) hasta organelas dañadas como mitocondrias (mitofagia), peroxisomas (peroxifagia) e incluso agentes patógenos intracelulares (xenofagia).^{37, 38, 39, 40, 62}

La digestión mediada por lisosomas es de gran importancia para la supervivencia celular.^{37, 38, 39, 40} Debido a que la autofagia basal normal mantiene la homeostasis celular; evitando la acumulación de organelas dañadas y de agregados de biomoléculas, lo cual puede tener un efecto

citotóxico y podría contribuir en la aparición de ciertas patologías como cáncer o enfermedades neurodegenerativas, entre otras.⁶²

Las vías de autofagia están implicadas en procesos como la muerte celular programada y en la respuesta al estrés oxidativo.^{37, 38, 39, 40} Además, esta vía está relacionada con la vía degradativa, una de las rutas de tráfico intracelular que está asociada con la endocitosis (vía por la cual ingresan estos nanomateriales) y exocitosis.^{10, 41}

Cabe destacar, que el termino flujo autofágico hace referencia al nivel de actividad de degradación a través de la ruta de autofagia.⁴² Para medir el nivel de flujo autofágico se pueden utilizar técnicas como Western Blot, también se puede estudiar la autofagia mediante técnicas como microscopía electrónica o microscopía de fluorescencia, al analizar la presencia de autofagosomas, ya sea de manera directa o indirecta.^{10, 42} Por ejemplo se puede utilizar el marcador de autofagia más común; la proteína asociada a microtúbulos cadena ligera 1B 3 (LC3-II), la cual está presente en la membrana del fagóforo.^{10, 42, 43, 45} Esta proteína tiende a ser selectivamente degradada vía autofagia, por lo cual medir el nivel del marcador autofagosomal LC3-II refleja la actividad autofágica presente.^{45, 70}

Existen tres tipos principales de autofagia: macro-autofagia, micro-autofagia y la autofagia mediada por chaperonas (CMA, por las siglas en inglés de chaperone mediated autophagy).³⁹ Todas promueven la degradación del material de desecho, siendo la macro autofagia la más estudiada.³⁹

Debido a que la macro autofagia es la más conocida, por lo general en la literatura se refieren a esta como autofagia.³⁹ La autofagia involucra tres fases: en primera instancia la captura, en la que una porción del citosol en conjunto con las macromoléculas presentes como proteínas, organelas e incluso iones es delimitada por una membrana, formando una vesícula conocida como fagóforo, que después de su elongación se cierra dando lugar a la formación de una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma.^{10, 37, 38, 39} La segunda fase se conoce como la fase de

degradación, e implica la formación de vacuolas especializadas llamadas amfisomas, es decir la unión entre autofagosomas y endosomas que posteriormente se fusionan con los lisosomas, los cuales aportan enzimas hidrolíticas ácidas, para la degradación del contenido de esta nueva vacuola denominada autofagolisosoma.^{10, 37, 38, 39} Por su parte la tercera fase implica que las nuevas moléculas producto de la degradación, como aminoácidos y péptidos, sean transportados hacia el citoplasma proporcionando la energía necesaria y los elementos básicos para la construcción de nuevos componentes celulares.^{10, 37, 38, 39, 70}

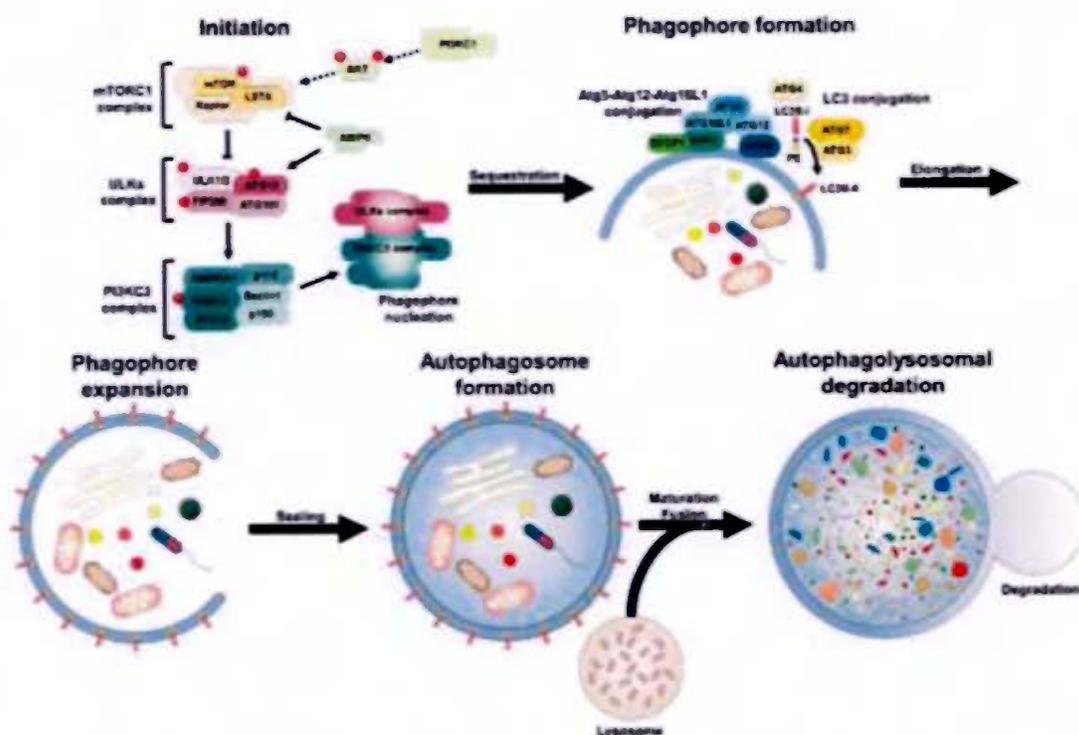


Figura 4: Proceso general de autofagia. (Fuente: Yun et al., 2020).³⁹

El nivel de flujo autofágico es regulado, lo cual puede resultar tanto en una inducción como en una represión del proceso.⁴³ Se ha reportado que el flujo autofágico puede ser acelerado por la presencia de nanomateriales.^{10, 37, 38, 39, 40, 44} Esto podría estar asociado con la toxicidad del material, o con daños que pueden ocasionar en la célula; como por ejemplo a través de provocar estrés oxidativo o inflamación.^{10, 37, 38, 39, 40, 44} Se ha planteado que los nanomateriales pueden influir en la autofagia mediante dos mecanismos; el

primero tiene que ver con el estrés oxidativo como ya se mencionó, que ocasiona oxidación de componentes celulares y por ende la necesidad de eliminar y reciclar el material celular dañado, y el segundo está relacionado con la alteración de la vías de señalización por parte de estos nanomateriales o con la alteración de expresión de ciertos genes (ATG) y/o proteínas que forman parte esencial de esta vía.^{10, 43}

El flujo autofágico también puede aumentar para degradar lo que es extraño a la célula, como bacterias u otros patógenos.⁴³ De hecho, existen reportes de células incubadas con estos nanomateriales, en donde dichos materiales están presentes en los autofagosomas; lo cual indica que esta ruta puede ser utilizada para degradar a estos nanomateriales.^{43, 44}

Asimismo, se reporta que la vía autofágica es la ruta intracelular primaria por la que trafican las nanopartículas con cargas positivas, como dendrímeros, poliplexos y nanopartículas de oro, de sílice e incluso de óxidos de hierro.⁴⁴ Sin embargo no hay evidencia detallada sobre otros tipos de nanopartículas, como hidroxiapatita.^{10, 44} En general se ha establecido que las células reconocen a las nanopartículas mediante las proteínas séricas adsorbidas sobre su superficie o en ausencia de estas; al reconocer intrínsecamente a estos nanomateriales (su disposición química).^{10, 44}

Se debe indicar que la autofagia no solo se ve alterada por la exposición a estos tipos de xenobióticos, sino que también se puede inducir en condiciones de privación de nutrientes, e incluso en condiciones de hipoxia.³⁹

Estímulos e inhibidores del flujo autofágico

Se han identificado diversos fármacos que pueden influenciar el flujo autofágico (cuadro I).^{46, 47, 48, 49} En este contexto, es importante resaltar que el flujo autofágico siempre está activo en la célula, y que estos reguladores modulan su nivel de actividad.^{10, 46, 47, 48, 49}

Cuadro I: Sustancias conocidas que influyen el flujo la autofágico.

(Adaptado de: Rubinsztein et al., Potential therapeutic applications of autophagy, 2007; Traducción personal).⁴⁹

Sustancia	Objetivo	Efecto
Rapamicina	mTOR: proteína quinasa de serina/treonina	Inductor
Torin-2	mTOR: proteína quinasa de serina/treonina	Inductor
Litio, sodio, valproato, carbamazepina	Enzimas que finalmente reducen los niveles de inositol-1,4,5-trifosfato, como la inositol monofosfatasa	Inductor
Tamoxifeno	Beclin A	Inductor
3-metiladenina	Fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III	Inhibidor
Wortmaninna	Fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III	Inhibidor
Bafilomicin A1	ATPasa-vacuolar	Inhibidor
Cloroquina	pH lisosomal	Inhibidor
Hidroxicloroquina	pH lisosomal	Inhibidor

A continuación, se discutirá el mecanismo de acción de la rapamicina, torin-2 y wortmannina (figura 5).

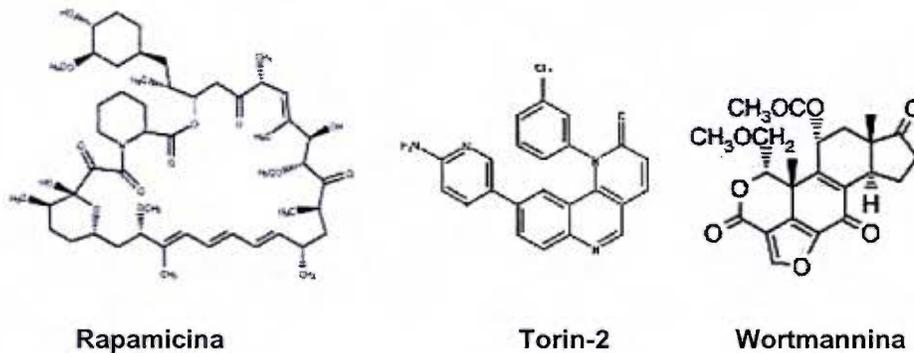


Figura 5: Estructura de los reguladores del flujo autofágico utilizados en este trabajo.

(Adaptado de: Yoo et al., 2016;⁷⁷ Liu et al., 2011;⁵⁵ Yaguchi et al., 2006.⁶¹)

La rapamicina inhibe la actividad de la proteína quinasa de serina/treonina denominada mTOR (siglas en inglés de mammalian Target of Rapamycin), la cual está formada por dos complejos de señalización, es decir mTORC1 y mTORC2, que regulan procesos celulares

relacionados con el crecimiento celular, motilidad celular, síntesis de proteínas, traducción, e inhibe la autofagia.^{50, 51, 52, 53} Los procesos regulados por mTOR tienen una alta demanda energética, y por lo tanto la conexión con autofagia permite mantener la homeostasis celular adecuada.^{50, 51, 52, 53, 63} Al activarse estos procesos se suprime la actividad de mTOR y se observa un aumento del flujo autofágico, para así mantener estable todo el sistema celular.^{50, 51, 52, 53} Caso contrario, en abundancia de nutrientes, se activará mTOR y suprimirá la autofagia.⁵³

Sin embargo, los mecanismos moleculares de la función anti-autofágica de mTOR no se han dilucidado por completo.^{49, 52, 53} Se ha establecido que en mamíferos mTOR está asociado con un ULK1 (Homologo de ATG1 presente en levaduras), ATG13 y FIP200, y que este complejo es necesario para generar una respuesta autofágica.^{49, 52, 53}

De forma más específica, en condiciones ricas en nutrientes, el complejo ULK1-ATG13-FIP200 se une a uno de los complejos de señalización de mTOR, es decir mTORC1, lo anterior a través de la interacción entre ULK1 y raptor, la proteína reguladora asociada a mTORC1.⁵³ El complejo mTORC1 fosforila ULK1 y ATG13 (figuras 4 y 6) para así inhibir la maduración del autofagosoma y la conversión de endosomas en lisosomas.^{39, 49, 53, 63} De esta manera, actúa como un control tanto en las etapas tempranas como tardías de la autofagia.⁶³

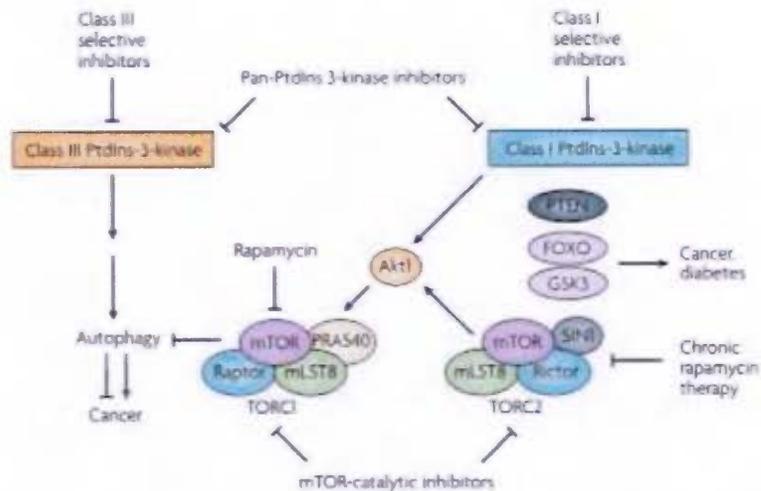


Figura 6: Diagrama de la modulación de la autofagia, regulada por el objetivo mamífero de rapamicina (mTOR); específicamente el complejo mTORC1 mediante la acción de fosfatidilinositol (PtdIns) -3-quinasa (PI3KC3). (Fuente: Rubinsztein et al., 2007).⁴⁹

En cuanto a la interacción de rapamicina con mTOR, se ha establecido que la rapamicina con su receptor FKBP12 se une directamente a mTORC1 (figura 7) e inhibe alostéricamente su actividad quinasa, es decir altera su función imitando así los efectos de privación de nutrientes.^{49, 51, 64} No obstante, es importante mencionar que los sustratos de unión al sitio catalítico de mTORC1 incluyen a la proteína eIF4E1 y a las quinasas ribosomales (S6K), las cuales controlan el inicio y elongación de la traducción.^{82, 83}

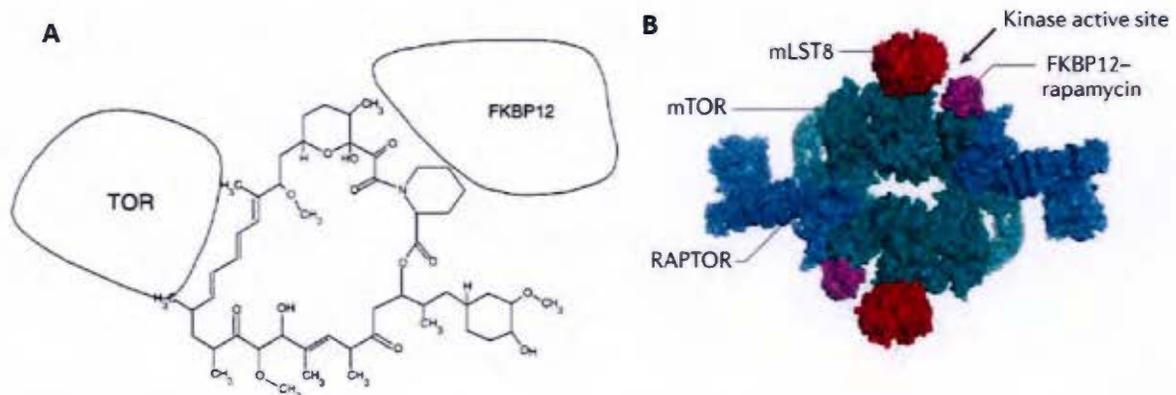


Figura 7: Estructura del inhibidor de mTOR; rapamicina (A) e interacción entre rapamicina y mTOR (B). (Fuente: Hartford et al., 2007; Liu y Sabatini, 2020).^{52, 63}

Al igual que la rapamicina, la torin-2 (figura 5) es un inhibidor de mTOR.^{54, 55, 56} Torin-2 suprime específicamente la activación de la cascada de señalización de PI3KC1 / Akt /mTOR (figura 4); la cual es una vía reguladora clave que controla procesos como el crecimiento celular, el metabolismo, apoptosis, la supervivencia celular y la autofagia.^{39, 54, 55, 56} La activación de esta ruta requiere la fosforilación de Akt, lo cual lleva a la activación de mTORC1 y por ende la represión de autofagia.^{54, 56} Al bloquear la fosforilación de todos los sustratos del complejo mTORC1 de manera eficiente, torin-2 es considerado un inductor de autofagia mucho más fuerte que rapamicina.^{55, 64}

Cabe recalcar que torin-2 es un inhibidor competitivo de mTOR que muestra una alta selectividad por esta enzima.^{49, 54, 63, 64, 65} Este compuesto no solo inhibe el complejo que modula la autofagia mTORC1, sino que también inhibe el complejo mTORC2 para evitar la reactivación de Akt (figura 6).^{49, 54, 63, 64, 65} Lo anterior permite mantener una inducción de la autofagia mayor en comparación con otros inhibidores de mTOR.^{54, 63, 64}

Por último, la wortmannina (figura 5) inhibe la enzima fosfatidil-inositol-3-quinasa de clase III o PI3KC3 por sus siglas en inglés, la cual es necesaria para la regulación de diversos procesos celulares.^{53, 57, 58, 59} Uno de estos procesos es la autofagia.^{53, 57, 58, 59} La wortmannina se une covalentemente a PI3K, y esta unión es irreversible (figura 8).^{53, 57, 60}

La inhibición de la PI3K efectuada por la wortmannina bloquea la producción de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en la superficie luminal del fagóforo.^{39, 53} Este es un proceso necesario para dar inicio a la autofagia, ya que permite la nucleación y expansión del fagóforo.^{39, 53} No obstante, el papel exacto de PI3P en la autofagia no es claro aún.⁴⁹

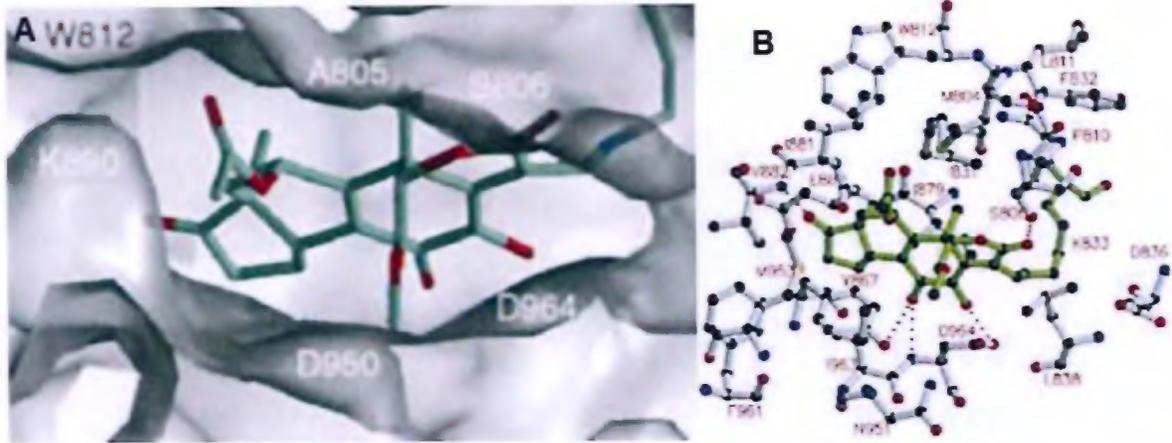


Figura 8: Estructura de rayos X de la interacción entre Wortmanina y el sitio activo de PI3KC3, en **(B)** las interacciones de hidrógeno están representada por líneas punteadas rojas. **(Fuente:** Walker et al., 2000).⁶⁰

Justificación

La introducción de material genético en una célula es de gran interés por su aplicación en investigación, terapia génica y en el desarrollo de vacunas, como por ejemplo las que están basadas en introducir el ARNm que codifica para un antígeno de un virus de interés. No obstante, a pesar de existir diversos métodos para dicho fin, como los vectores virales, cada vez se hace necesario buscar métodos más inocuos, eficaces y, además, poder comprender más afondo el funcionamiento de estos, para así obtener procesos aún más eficientes y mejor control de estas técnicas.

Las nanopartículas hidroxapatita son un vehículo génico viable para suplir dicha necesidad, debido a sus diferentes propiedades de toxicidad baja, de ser un material biocompatible y su capacidad de poder transportar biomoléculas como ácidos nucleicos y proteínas. Debido a lo anterior, ya existen diversos reportes del uso de estos nanomateriales como vehículo de transfección celular, e incluso se reporta que estos nanomateriales poseen efecto sobre el flujo autofágico, el cual es vital para la supervivencia celular.

No obstante, la falta de comprensión sobre el funcionamiento detallado de estos vehículos, es decir, de cómo son internalizados por la célula, de qué modo interactúan con esta y como una vez dentro de qué forma se da la entrega del cargo, ha limitado el uso de estos prometedores vehículos génicos. De hecho esta relación reportada entre estos materiales con el flujo autofágico tampoco ha sido estudiada en detalle.

Por esta razón, es de gran importancia poder comprender estas incógnitas de cómo son internalizados estos tipos de materiales y cómo es entregado el cargo una vez que estos estén dentro y su relación con la autofagia; y así poder utilizar a este prometedor vehículo génico de la mejor forma posible en múltiples aplicaciones relacionadas con estas metodologías, como la ya mencionada terapia génica o en el área de la nanofarmacología de gran interés comercial.

Hipótesis

La alteración del flujo autofágico por medio de la modulación con diferentes reguladores químicos puede influenciar la eficiencia de diferentes métodos de transfección en varios linajes celulares.

Objetivos

General

Determinar la influencia del flujo autofágico sobre la eficiencia de transfección en varios linajes celulares, y utilizando diferentes métodos de transfección.

Específicos

- Comprobar la internalización del complejo ADN-hidroxiapatita en dos linajes celulares.
- Cuantificar la eficiencia de transfección en al menos dos líneas celulares, en presencia de sustancias activadoras o inhibidoras del flujo autofágico.
- Determinar si la relación entre flujo autofágico y eficiencia de transfección depende del vehículo de transfección utilizado.

Materiales y métodos

Citometría de flujo

La eficiencia de transfección se cuantificó con el citómetro de flujo de marca Guava easyCite Mini, con un láser de 488nm y con capacidad de detectar fluorescencia verde (525 nm), amarilla (583 nm) y roja (690 nm).

Para establecer el porcentaje de células positivas se empleó un control negativo, el cual corresponde a células sin el plásmido en el caso de la transfecciones en presencia o ausencia de reguladores del flujo autofágico; con este control se definió la intensidad de fluorescencia que divide las células sin transfectar de las de interés (bajo un marcador establecido). Además, este control se utilizó para elegir a la población celular de interés basado en los resultados obtenidos en el diagrama de dispersión tanto frontal como lateral (dot plot). Por otra parte, cuando se realizaban la cuantificación respectiva; se procuraba adquirir 10 mil eventos por cada condición medida, no obstante en ocasiones se obtuvieron alrededor de 2 mil eventos. Los resultados se expresan como el porcentaje de células que son positivas para el marcador en las condiciones experimentales.

Es importante destacar que para los ensayos de internalización del complejo ADN-HAp, el control negativo corresponde a células con ADN y nanopartículas pero sin marcar.

Células

Los linajes celulares usados son HEK 293 T (ATTCC CRL-3216), un linaje inmortal procedente de células de riñón embrionario humano y las células HeLa (ATTCC CCL-2), un linaje inmortal de origen humano procedente de un carcinoma cervical.^{15, 32}

Materiales para las transfecciones

El plásmido usado en las transfecciones fue el pCMV6-AC-GFP PrecisionShuttle mammalian vector with C-terminal tGFP tag, de la casa comercial Origene. El plásmido codifica para la proteína verde fluorescente bajo control del promotor de citomegalovirus (CMV). En todas las transfecciones se utilizó el ADN 1 µg/uL, independientemente del método usado.

Los controles positivos utilizados son: Kit de transfección por coprecipitación con fosfato de calcio (Sigma Aldrich, Número de Catálogo: CAPHOS) y Polietilenimina (PEI) lineal, peso molecular 25 000 Grado Transfección (Polysciences, Inc: Pensilvania, USA. Número de Catálogo: 23966-1)¹⁰, los cuales se utilizaron según las instrucciones de los fabricantes.

Para el método de transfección con nanopartículas de hidroxiapatita se usó el método establecido en un trabajo previo (ver referencia 10). Estas nanopartículas de hidroxiapatita fueron sintetizadas por el grupo de la Dra. Mavis Montero del Centro de Investigaciones en Electroquímica y Energía Química (CELEQ) de la Universidad de Costa Rica.¹⁰ Las nanopartículas se suspendieron en una solución salina con buffer de fosfato (PBS) 1X a una concentración de 1 mg/mL y antes de utilizarse se agitaron en un baño de ultrasonido entre 10 y 15 min, luego se agitaron en el vortex debido a la sedimentación que se puede generar de la suspensión.¹⁰ La suspensión de trabajo de hidroxiapatita de 100 µg/mL se preparó a partir de una dilución 1/10 de la suspensión inicial de nanopartículas, que estaba a una concentración 1 mg/mL.

Método de cultivo celular

Tanto las células HeLa como Hek 293 T fueron cultivadas en el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y los antibióticos estreptomicina-penicilina al 1%. Este es un medio de alta concentración de glucosa (0,02mol/L), y L-glutamina al 2%.

Los pasajes de las células en botellas de cultivo de 25 cm² se realizaron tres veces por semana, por lo general una dilución de células de 1:3 o 1:10 en un volumen total de 5 mL. Para ambos linajes celulares, las células se separaron del frasco utilizando tripsina (Gibco-Thermo Fischer Scientific, número de catálogo: 25300062, Trypsin-EDTA 0.05%, rojo fenol). En general, en cada pasaje se sembraron entre 1×10^6 y 2×10^6 de células por botella. Para determinar el número de células y con ello la viabilidad, se utilizó una cámara de Neubauer y la tinción con azul tripán, el cual tiñe las células muertas.

Determinación de la eficiencia de transfección en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico

Los linajes celulares HeLa y HEK 293 T se transfectaron utilizando tres vehículos génicos: coprecipitación del ADN con fosfato de calcio, polietilenimina e hidroxapatita, todos bajo condiciones del método estándar como en presencia de inhibidores y estímulos del flujo de autofagia celular. Estos experimentos se realizaron por duplicado al menos en tres días distintos.

Cuadro II. Concentraciones de los estímulos e inhibidor del flujo autofágico usados para las transfecciones con los vehículos génicos: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, PEI y HAp.

Sustancia	Concentración utilizada	Efecto sobre el flujo autofágico
Torin-2	0.76 μM	Estimulo
Rapamicina	0.75 μM	Estimulo
Wortmaninna	80 nM	Inhibidor

Para realizar la transfección, se cambió el medio de cultivo de las células por 5 mL de DMEM suplementado con FBS 10% y penicilina-estreptomicina al 1%, dos horas antes del inicio de la transfección. Pasado este tiempo de incubación, las células se separaron como se describió anteriormente en la sección de método de cultivo celular, se centrifugan y se cambia el medio que tenían por el medio en presencia de los inhibidores o estímulos, el cual es preparado al añadir las sustancias reguladoras del flujo autofágico en este medio en las concentraciones indicadas en el cuadro II y luego se transfirieron a una placa de 24 pocillos.

La concentración de células se determinó mediante un conteo con una cámara de Neubauer y la tinción con azul tripán, y se sembraron $4,5 \times 10^5$ células vivas por pocillo, en un volumen total de 500 μL . Este procedimiento se siguió independientemente del método de transfección utilizado.

En el caso de la transfección control por coprecipitación con $\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$, se preparó la mezcla de transfección, combinando en un eppendorf 1,30 μL de ADN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con 12,25 μL de agua (grado biología molecular) y 1,50 μL de CaCl_2 (2,5 M), este último se añadió lentamente. En un segundo eppendorf se añadió 15 μL del buffer salino de HEPES (HEBS 2X), y este se burbujea con la micropipeta entre 8 y 10 veces. Luego se añade la mezcla anterior lentamente a este tubo que contiene el HEBS y se burbujea de nuevo, se mezcla 2-4 segundos con vórtex y se incubó 20 min a temperatura ambiente previo a su uso. Inmediatamente pasado este periodo de incubación esta

nueva mezcla en su totalidad fue distribuida en los pocillos respectivos; agitándose suavemente.

Con el método de PEI, la mezcla de transfección se preparó combinando 100 μL de medio (DMEM) sin suplementar, con 1,00 μL de ADN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 1,40 μL PEI (1 mg/mL), luego se mezcló 2-4 segundos con vórtex y se incubó 20 min a temperatura ambiente. Inmediatamente pasado este periodo de incubación se añade 98 μL de medio (DMEM) sin suplementar y esta mezcla en su totalidad fue distribuida en los pocillos respectivos.

En el caso de la transfección con hidroxiapatita, se preparó la mezcla de transfección, combinando 1,30 μL de ADN con 1000 μL de la suspensión de nanopartículas de concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se mezcló 2-4 segundos con vórtex y se incubó 20 min a temperatura ambiente previo a su uso. Luego la mezcla en su totalidad fue distribuida en los pocillos respectivos. Para las transfecciones en presencia de los estímulos y el inhibidor del flujo de autofagia, las sustancias reguladoras del flujo autofágico indicadas en el cuadro II, se añadieron a la solución salina con buffer de fosfato (PBS 1x) utilizada para preparar la suspensión de trabajo de nanopartículas de concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicado en la sección de materiales para las transfecciones.

Independientemente del método de transfección utilizado, luego de añadir las mezclas de transfección a los respectivos pocillos, se incubaron las células por 16-18 h a 37°C y a 5 % de CO_2 con atmósfera húmeda. Pasado este tiempo de incubación, independientemente del método de transfección, se cambió el medio de las células por 750 μL de medio DMEM fresco suplementado con FBS 10% y antibióticos, y se continuó con la incubación de las células por 40-48 h a 37°C y a 5 % de CO_2 con atmósfera húmeda.

Finalmente, luego de esta segunda incubación, las células fueron separadas de la placa de cultivo con tripsina y transferidas a los respectivos tubos de citometría, para su posterior análisis en el citómetro de flujo, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Determinación de la internalización del complejo ADN-HAp

Para cuantificar la internalización del complejo ADN-hidroxiapatita, se realizaron al menos 3 veces estos experimentos cada condición se montó por duplicado. Se sembraron las células de los dos linajes de interés ya mencionados, en una placa de 24 pocillos un día previo al proceso de transfección (2×10^5 células por pocillo en un volumen total de 500 μL). La concentración de células se determinó mediante un conteo con una cámara de Neubauer y la tinción con azul de tripán y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5 % de CO_2 con atmósfera húmeda.

Al día siguiente, se incubaron las muestras celulares ya mencionadas, con 1000 μL de la suspensión de hidroxiapatita (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 1 μL de ADN (pCMV6-AC-GFP) a una concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, marcado con 1 μL del agente intercalante yoduro de propidio (PI) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, por 20 minutos a 4°C o en ausencia de uno o más de estos componentes.

Para estos experimentos se utilizaron las siguientes condiciones: células sin ningún tratamiento, células incubadas solamente con PI, células incubadas solamente con nanopartículas, células incubadas solamente con las nanopartículas y PI, pero sin ADN, células incubadas con el ADN marcado pero sin las nanopartículas y por último, células incubadas con el complejo de hidroxiapatita y ADN pero sin marcar con el PI; estas últimas se utilizaron como el control negativo con el que se estableció la intensidad de fluorescencia que divide las células sin marcar de las células marcadas. Las diferentes mezclas de ADN, PI y HAp o en ausencia de uno o más de estos componentes, se trataron en las mismas condiciones que los reactivos de transfección, como se resume anteriormente.

Luego de la incubación de 20 minutos a 4°C las células inmediatamente se incubaron por 4h a 37°C y 5 % de CO_2 con atmósfera húmeda.

Pasado este tiempo de incubación las células fueron colectadas como se describió anteriormente para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

Resultados

1. Efecto de moduladores del flujo autofágico sobre la eficiencia de transfección en el linaje celular HeLa.

En la figura 9, se resumen los resultados obtenidos al transfectar células HeLa con un plásmido que codifica para la Proteína Verde Fluorescente (GFP) utilizando distintos métodos de transfección, en presencia de estimulantes (rapamicina y torin-2), o inhibidores del flujo autofágico (wortmannina).

Al comparar el porcentaje de células transfectadas en las diferentes condiciones, se observó un aumento significativo para las células transfectadas con el método de fosfato de calcio en presencia del estímulo del flujo autofágico torin-2 (3,8%, en comparación con 0,5% para las células control), es decir un incremento de 7,6 veces. De igual manera con este mismo método, se observó una diferencia significativa entre la transfección realizada en presencia de torin-2 (3,8%) comparada con la transfección en presencia de wortmannina (0,2%), inhibidor del flujo autofágico.

En términos generales, se observó una tendencia hacia una mayor eficiencia de transfección en presencia de estímulos del flujo autofágico, al comparar con las células transfectadas en presencia del inhibidor o en ausencia de reguladores del flujo. Esta tendencia se mantiene para los tres métodos de transfección utilizados, especialmente los que utilizan fosfato de calcio. Además, solo con HAp la transfección en presencia de un inhibidor generó una eficiencia mayor en comparación con el control positivo respectivo.

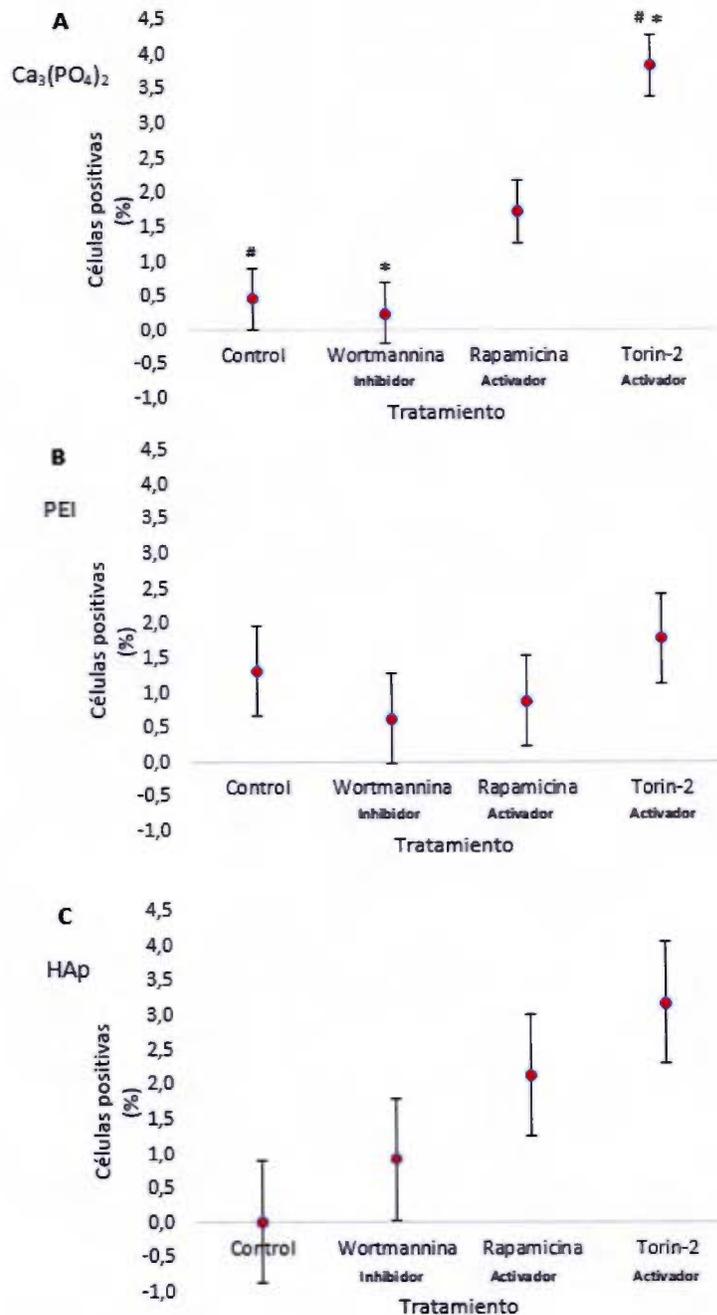


Figura 9: Porcentaje de células HeLa transfectadas utilizando fosfato de calcio (A), polietilenimina (PEI, B) o nanopartículas de hidroxapatita (HAp, C), según el tratamiento: vehículo de transfección; sólo (control), o en presencia del inhibidor (wortmaninna, 80 nM) o estímulos del flujo autofágico (rapamicina, 0.75 μM y torin-2, 0.76 μM). El punto rojo representa la media del tratamiento, y las barras de error simbolizan el error estándar obtenido con 3 réplicas. Los símbolos * y # identifican efectos que muestran diferencias significativas, $p < 0.05$.

En cuanto a las transfecciones realizadas en presencia del inhibidor del flujo autofágico wortmannina, se observan eficiencias de transfección menores en comparación con las transfecciones realizadas en presencia de estímulos del flujo autofágico. En el caso de los métodos de transfección con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y PEI, las eficiencias fueron menores que el método estándar respectivo, es decir sin reguladores del flujo autofágico.

Por otro lado, se compararon los rendimientos entre métodos de transfección para células que recibieron el mismo tratamiento. En el caso del método de hidroxiapatita, se observó un mayor porcentaje de células transfectadas que para el método de PEI cuando se usó torin-2 (3,2% para HAp vs. 1,8% para PEI) o rapamicina (2,1% HAp vs 0,9% para PEI). Asimismo, en presencia del inhibidor wortmannina también se observó una tendencia a una mejor eficiencia de transfección con respecto al método de PEI bajo la misma condición (0,9% HAp vs 0,6% para PEI).

En el caso de la transfección utilizando fosfato de calcio, se obtuvo una mayor eficiencia de transfección en presencia de los activadores del flujo autofágico torin-2 (3,8%) o rapamicina (1,7%) comparado con el método de PEI en las mismas condiciones (1,8% y 0,9%, respectivamente). Esto concuerda con lo observado para HAp; dicho de otra manera los niveles de inducción en estos incrementos en la eficiencia de transfección con el método de coprecipitación de fosfato de calcio son similares al del método de hidroxiapatita. No obstante, al inhibir el flujo autofágico con wortmannina, no se observó este efecto (0,2% para $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ vs. 0,6% para PEI).

Por último, al comparar los efectos en transfecciones utilizando HAp ó $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, se determinó que los resultados obtenidos con ambos vehículos son similares entre sí. Claramente, se observa una tendencia hacia mejores rendimientos de transfección en presencia de estímulos del flujo autofágico.

2. Efecto de moduladores del flujo autofágico sobre la eficiencia de transfección en el linaje celular HEK 293 T.

En la figura 10 se resumen los resultados obtenidos al transfectar células Hek 293 T con un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente utilizando distintos métodos de transfección, en presencia de estimulantes (rapamicina y torin-2), o inhibidores del flujo autofágico (wortmannina).

En este caso no se observaron diferencias significativas al comparar el porcentaje de transfección obtenido con los diferentes tratamientos; de otra manera los reguladores del flujo autofágico parecen que no poseen efecto alguno con este linaje celular en nuestro esquema experimental

No obstante, para los métodos de PEI y HAp se observa una tendencia inversa con respecto al efecto observado para las células HeLa. Al comparar el porcentaje de células transfectadas en las diferentes condiciones (reguladores del flujo), se obtuvo una mayor eficiencia de transfección con el inhibidor wortmannina (1,8 para PEI y 0,7% para HAp) que con torin-2 (PEI: 1,3%, HAp: 0,0 %) o rapamicina (PEI: 1,3%, HAp: 0,3%); dicho de otra forma en términos generales no se observó un incremento en la eficiencia de transfección con los activadores del flujo autofágico y además con el método de PEI se obtuvieron mejores rendimientos para este linaje celular que con las células HeLa.

Por otro lado, se debe destacar que en el caso de la transfección con fosfato de calcio no se observó una tendencia definida. A pesar de lo anterior, con el método de fosfato de calcio es con el que se obtiene las eficiencias de transfección más altas en comparación con los otros dos métodos; (PEI y HAp, este último con los rendimientos de transfección más bajos) e independientemente de si fue en presencia o en ausencia de los reguladores del flujo autofágico.

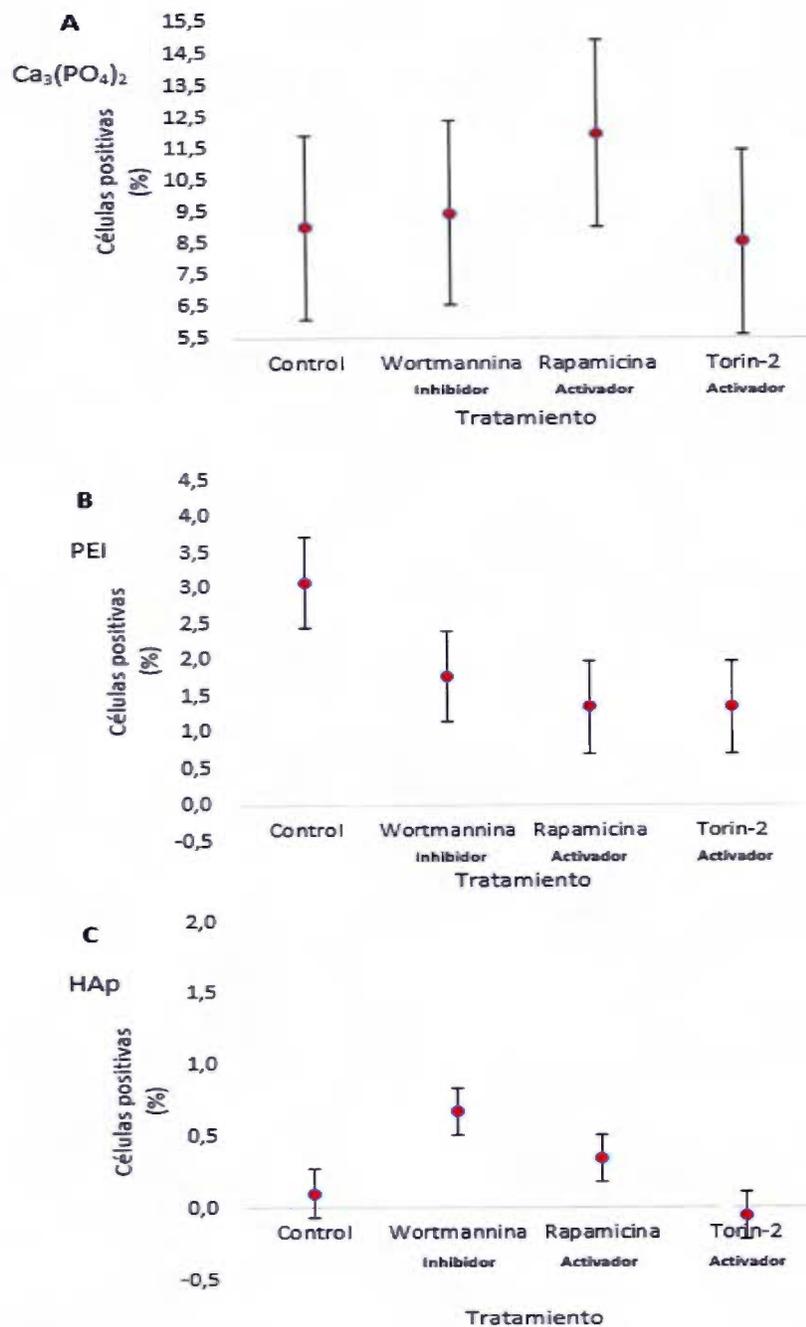
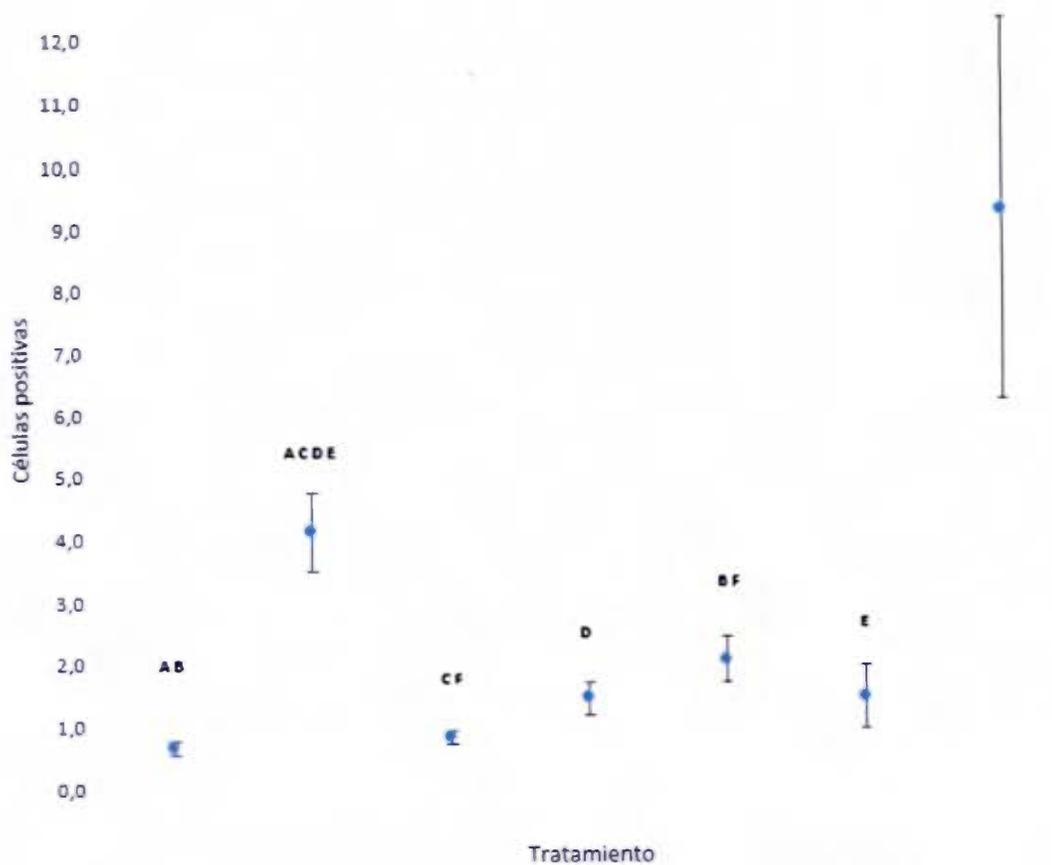


Figura 10: Porcentaje de células HeK 293 T transfectadas utilizando fosfato de calcio (A), polietilenimina (B) o nanopartículas de hidroxapatita (C) según el tratamiento: vehículo de transfección; sólo (control), o en presencia del inhibidor (wortmaninna, 80 nM) o estímulos del flujo autofágico (rapamicina, 0.75 μM y torin-2, 0.76 μM). El punto rojo representa la media del tratamiento y las barras de error simbolizan el error estándar obtenido con 3 réplicas.

3. Internalización del complejo ADN-HAp en células HeLa

Para estudiar si el complejo ADN-HAp logra ingresar en células HeLa, se marcó el ADN con yoduro de propidio. En estos ensayos no se observó un aumento significativo en la cantidad de células positivas para el marcador de interés (figura 11) al comparar con el tratamiento control, es decir células en el que el ADN no se marcó con yoduro de propidio (2,0 %). No obstante, sí se observó un incremento grande en el porcentaje de células positivas que representa un 7,3%, por lo cual sí podría existir una internalización por parte de este linaje celular.

Además destacar que con el tratamiento de PI-ADN-Hap+ se puede notar que el tratamiento con hidroxapatita varía las propiedades ópticas de las células, ya que siempre que un tratamiento posee HAp tiende a generar un aumento en el porcentaje de células positivas para el marcador de interés; por lo cual el control correcto para el experimento es el de ADN+PI-HAp+, es decir el utilizado en estos ensayos para así corregir dicho efecto de HAp sobre la respuesta de interés.



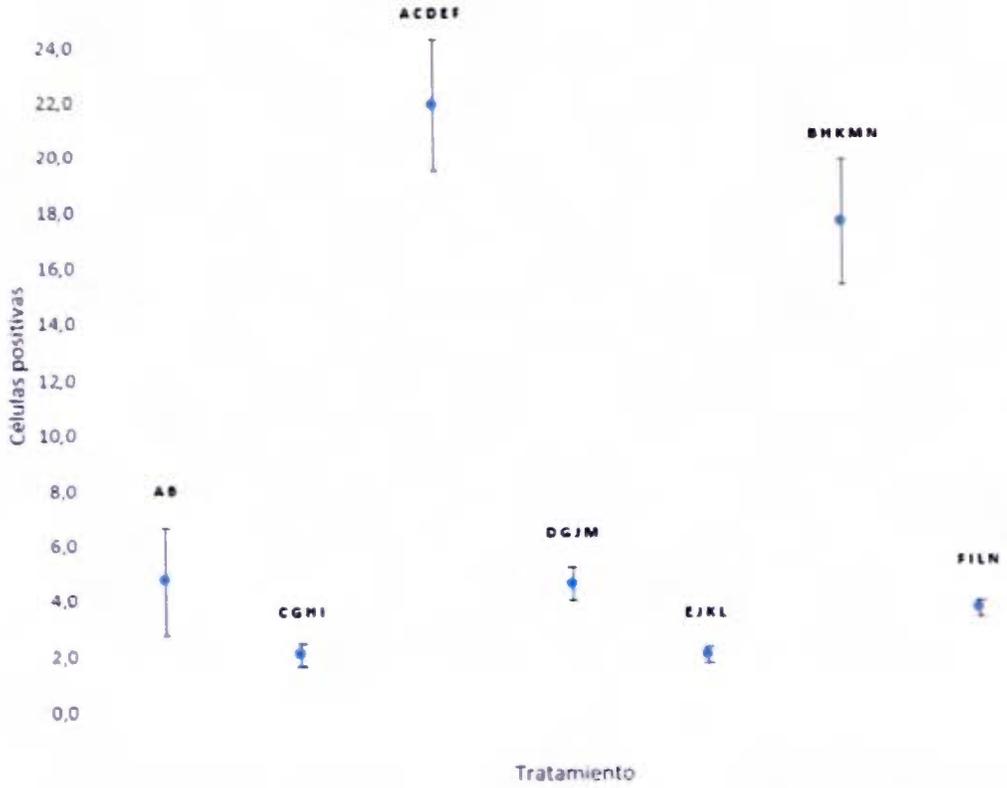
ADN	-	-	-	-	+	+	+
PI	-	-	+	+	-	+	+
HAp	-	+	-	+	+	-	+

Figura 11: Internalización del complejo ADN-hidroxiapatita por el linaje celular HeLa. El punto azul representa la media del tratamiento respectivo y las barras de error simbolizan el error estándar obtenido con 4 réplicas. **ADN**=Plásmido, **PI**=Yoduro de propidio, **HAp**=hidroxiapatita y el símbolo a la derecha de cada uno de estas sustancias significa: **(+)** = presencia y **(-)** = ausencia de la condición. Las diferencias se establecieron mediante una ANOVA, según un modelo de mínimos cuadrados pesados con un nivel de significancia de 0,05. Las letras **(A-F)** identifican pares de tratamientos que muestran diferencias significativas entre sí, $p < 0.05$.

4. Internalización del complejo ADN-HAp en células HEK 293T

Al analizar la internalización del complejo ADN-HAp marcado con PI por parte de las células HEK 293 T, (figura 12), se logró observar un aumento estadísticamente significativo al comparar las células que fueron incubadas con este complejo marcado contra las células control. Por lo cual, en efecto se pudo establecer que existe una internalización de este complejo por parte de este linaje celular, el cual causa un 3,6 % en la proporción de células marcadas, comparado con 1,9% del control, a pesar de no ser un aumento grande dicha internalización. En otras palabras, esto representa un aumento en el porcentaje de células positivas de 1,7%.

Por otro lado, HAp no parece afectar las propiedades ópticas en gran medida como con el linaje celular HeLa. No obstante, se usó de igual forma el control correcto (ADN+PI-HAp+) para estos ensayos. En cuanto a los tratamientos control que tenían PI y dieron un aumento en el porcentaje de células positivas para el marcador de interés, posiblemente es debido al gran número de células no viables bajo estas condiciones, ya que a pesar de que en el tratamiento de ADN+PI+HAp-, el PI marque al ADN pudo haber quedado exceso de este marcando a las células muertas presentes.



ADN	-	-	-	-	+	+	+
PI	-	-	+	+	-	+	+
HAp	-	+	-	+	+	-	+

Figura 12: Internalización del complejo ADN-hidroxiapatita por el linaje celular HEK 293 T. El punto azul representa la media del tratamiento respectivo y las barras de error simbolizan el error estándar obtenido con 3 réplicas. **ADN**=Plásmido, **PI**=Yoduro de propidio, **HAp**=hidroxiapatita y el símbolo a la derecha de cada uno de estas sustancias significa: **(+)** = presencia y **(-)** = ausencia de la condición. Las diferencias se establecieron mediante una ANOVA, según un modelo de mínimos cuadrados pesados con un nivel de significancia de 0,05. Las letras **(A - N)** simbolizan pares de tratamientos que muestran diferencias significativas entre sí, $p < 0.05$.

Discusión

1. Efecto de la transfección del linaje celular HeLa y HEK 293 T en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico.

Al realizar los experimentos de alteración del flujo autofágico (figura 9) en el linaje celular HeLa, se puede observar una relación entre la activación de este flujo y una mejor eficiencia de transfección. Por otro lado, se observó una disminución al usar inhibidores de este flujo. En el caso del linaje celular HEK 293 T no se observa un efecto significativo para las sustancias que se analizaron (figura 10).

Nuestros resultados con el linaje celular HeLa (figura 9), concuerdan con un reporte de Zhong *et al*,⁶⁶ en el que se transfectaron fibroblastos de ratón (NIH 3T3) utilizando nanopartículas de polyplex y un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP). En presencia del estímulo del flujo autofágico rapamicina, los autores observaron un aumento de la eficiencia de transfección de 17% en comparación con el tratamiento control, y en presencia del inhibidor 3-metiladenina, la expresión del transgén disminuyó un 80%.⁶⁶ Los autores plantean que este efecto podría estar relacionado con el estrés oxidativo que provoca este tipo de vehículos génicos (nanopartículas cargadas), ya que al activar la autofagia se podría mejorar la supervivencia celular y con ello los rendimientos de transfección.⁶⁶ Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor y el estímulo no generaron un cambio significativo en el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular.⁶⁶

Como es sabido, este tipo de vehículos génicos debe de atravesar varias barreras intracelulares antes de poder entregar el cargo.^{10, 66} Zhong *et al*, mencionan que algunas de las nanopartículas (polyplex) se localizan en la región perinuclear dentro de los autofagosomas.^{66, 67} Por lo cual, proponen que el escape de estas vesículas podría explicar el aumento observado en la eficiencia de transfección al estimularse la vía autofágica.⁶⁶

La disposición perinuclear en autofagosomas concuerda también con las observaciones obtenidas para hidroxapatita en el trabajo desarrollado en nuestro equipo.¹⁰ Según nuestras observaciones, las nanopartículas se pueden detectar en la región perinuclear dentro de lisosomas, lo cual sugiere que las nanopartículas de HAp en efecto siguen la ruta degradativa de tráfico intracelular, ruta relacionada con la vía autofágica, como ya se ha señalado, y por ende están presentes en compartimientos como los endosomas y autofagosomas.¹⁰

En cuanto al efecto observado sobre el linaje celular HEK 293 T, cuando se utilizaron moduladores del flujo autofágico, no se observó un efecto sobre la eficiencia de transfección. Esta diferencia con los resultados obtenidos en el linaje celular HeLa podría deberse a que en células HEK 293 T, los vehículos génicos pueden ser degradados antes de la entrega del cargo al compartimiento nuclear.¹⁰ Estos materiales son degradados por las enzimas tipo hidrolasas y el pH ácido que se encuentran en los lisosomas antes de un posible escape, ya sea de los autofagosomas,^{10, 66} o de algún otro compartimiento relacionado con esta vía; como los endosomas.^{10, 68, 69}

Existen reportes en los que se estableció que la concentración y la duración de la incubación con el estímulo o inhibidor influye directamente sobre el efecto que va a tener este regulador en específico sobre la autofagia.⁷⁰ Por ejemplo, se reporta que si la concentración del estímulo rapamicina es alta (30 μ M), este estímulo puede inhibir el flujo en lugar de la activación que se observa a concentraciones bajas (0,5 μ M).^{70, 71} Resultados similares se han reportado para los inhibidores 3-metiladenina y wortmaninna, los cuales conducen a un incremento del flujo autofágico si se administran por periodos prolongados.⁷⁰ Estos resultados sugieren que no se debe asumir el mismo efecto sobre un nuevo linaje celular, al utilizar concentraciones similares de los estímulos o inhibidores del flujo autofágico.

No obstante, es necesario destacar que en nuestro trabajo previo se determinó que había diferencias en el flujo autofágico basal de estos linajes celulares.¹⁰

Con las células HEK 293 T se determinó que el flujo autofágico basal era bajo y por el contrario en el linaje celular HeLa se observó un flujo autofágico basal alto, el cual en presencia de nanopartículas tiende a aumentar en mayor medida en comparación con las células HEK 293 T.¹⁰ Sin embargo, con el linaje celular HEK 293 T a diferencia de las células HeLa, tanto al tratar inducir o no el flujo autofágico los niveles medidos de este fueron similares, por lo cual se determinó que el flujo autofágico en HEK 293 T no varía en presencia de este tipo de inductores.¹⁰

Estas observaciones sugieren que la ausencia de un efecto de moduladores del flujo autofágico sobre la transfección en el linaje celular HEK 293 T, podría deberse a que este flujo ya está estimulado y por ende un estímulo adicional o inhibición sobre este no tenga efecto medible; es decir estos resultados permiten complementar nuestras observaciones previas sobre dichas diferencias.

Además, estas observaciones son consistentes con que en ambos estudios con este linaje (HEK 293T) se obtienen las eficiencias de transfecciones mayores en condiciones estándar.¹⁰ Por lo tanto, se verifica que en el linaje celular HEK 293 T al tener un flujo autofágico estimulado; exhibe una eficiencia de transfección mayor independientemente de la presencia de moduladores del flujo e incluso si son inhibidores de este flujo. El efecto observado es similar al que se determinó con las células HeLa en las que el flujo autofágico fue estimulado.

Basado en los resultados obtenidos para ambos linajes en las mismas condiciones experimentales, se puede concluir que el efecto de estimular o inhibir la autofagia sobre la eficiencia de transfección, es dependiente del linaje celular en estas condiciones experimentales específicas. En el caso del linaje celular HeLa se observó que una inducción del flujo autofágico causa un

incremento de la eficiencia de transfección, verificando así nuestra hipótesis. No obstante, la proporción de células transfectadas sigue siendo menor al 10 %. Lo anterior debido a que el incremento significativo obtenido con este linaje al estimular con Torin-2 bajo el método de fosfato de calcio en comparación con el control, representa un aumento leve de 3,3%.

En cuanto a la influencia del vehículo génico sobre la eficiencia de transfección en presencia de moduladores de autofagia, en el linaje celular HeLa se observaron diferencias más claras al estimular la vía autofágica (figura 9). En estas condiciones, se observó una mayor eficiencia con los vehículos génicos $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y las nanopartículas de hidroxiapatita que con el método de PEI.

Una posible explicación para esta observación consiste en que al estimular la autofagia se promueve en mayor medida la degradación del vehículo génico PEI en comparación con los otros vehículos génicos, generando una disminución en la entrega del cargo de interés y por ende una eficiencia de transfección menor. Lo anterior concuerda con que ha reportado para este polímero catiónico, que tiende a ser degradado al estimularse la autofagia por el efecto citotóxico que posee, que lleva por un lado a un daño celular necrótico y por otro a una muerte celular apoptótica.^{70, 72, 73}

Además, la tendencia obtenida bajo condiciones estándar (sin la presencia de reguladores del flujo autofágico) para el linaje celular HeLa de igual manera coincide con los resultados obtenidos previamente por nuestro equipo en las mismas condiciones.¹⁰ En otras palabras, los mejores rendimientos fueron obtenidos con el vehículo génico PEI, seguido por fosfato de calcio y los rendimientos más bajos fueron obtenidos con hidroxiapatita.¹⁰

Respecto a los resultados obtenidos con el linaje celular HEK 293 T, se puede notar que independientemente de si se estimula o se inhibe el flujo autofágico, la eficiencia de transfección muestra una variación muy pequeña, independientemente del tratamiento o del vehículo de transfección (figura 10).

2. Internalización del complejo ADN-HAp en células HeLa y HEK 293T

En nuestro trabajo previo, se utilizaron nanopartículas dopadas con europio para mostrar que la internalización del cargo de HAp-ADN por parte de las células en estudio, cabe destacar que dicha internalización era heterogénea.¹⁰ En otras palabras, algunas células capturan más de este complejo que otras.¹⁰ Mientras que para algunas células se observan grandes cúmulos de partículas, en otras hay nanopartículas de tamaño inferior y con una distribución más extendida en el citoplasma.¹⁰

Aunque en los resultados previos se logró mostrar que hay una internalización de las partículas y que esta es heterogénea, no se determinó cuántas células HeLa internalizan hidroxapatita. Por esta razón, nuestro trabajo complementa estas observaciones.

Según nuestros resultados, para el linaje celular HeLa (figura 11), se logra observar una tendencia hacia un aumento de la proporción de células marcadas, el cual representa un 7,3% con respecto al control. Sin embargo, se debe destacar que esta diferencia no es significativa. Esta gran proporción del complejo internalizado; lo cual concuerda con los resultados obtenidos en ensayos de microscopia en nuestro trabajo previo como ya se describió,¹⁰ nos sugiere que los bajos rendimientos de transfección obtenidos con este vehículo génico (HAp) no se debe a un defecto o deficiencia en la internalización, sino más bien en procesos posteriores implicados; como podría ser la degradación de este vehículo y por ende provocando una disminución en la entrega del cargo de interés.¹⁰

En cuanto al linaje celular HEK 293 T, se logró establecer que en efecto hay una internalización de las nanopartículas marcadas por parte de las células; ya que al comparar las células de interés, es decir las marcadas (Células + ADN + HAp + PI) contra las células control (Células + ADN + HAp), se logró observar un aumento de 1,7 % en el porcentaje de células marcadas

(figura 12) e incluso este aumento es significativo a un nivel de confianza del 95 %. Además, al igual que para el linaje celular HeLa (figura 11 y 9 C, respectivamente) con HEK 293T se determina más internalización del complejo HAp-ADN que células transfectadas (figura 12 y 10 C, respectivamente), pero dicha diferencia no es tan marcada como en el caso de las células HeLa. Por lo cual estos resultados sugieren que la baja internalización provoque menor posibilidad de entrega del cargo de interés y por ende una menor eficiencia en la transfección o que en efecto una internalización eficiente no implica una transfección adecuada y se deba de igual manera que en las células HeLa, a un proceso posterior como degradación del vehículo antes de poder escapar de algún compartimento relacionado con la vía autofágica como ya se describió, sea los autofagosomas o los endosomas y así poder entregar el cargo de interés.^{10, 66, 68, 69}

Conclusiones

1. La autofagia puede ser modulada para mejorar la eficiencia de entrega de cargos y con ello obtener mejores rendimientos en el proceso de transfección, aunque este efecto es dependiente del linaje celular.
2. La eficiencia de transfección para el linaje celular HeLa aumenta con el uso de estímulos del flujo autofágico y disminuye con el uso de inhibidores, y para el linaje celular HEK 293 T no se observó algún efecto significativo.
3. Los rendimientos de transfección son dependientes del tipo de regulador de la vía autofágica. En el linaje celular HeLa al usar torin-2 se obtienen mejores rendimientos de transfección (efecto significativo), independientemente del vehículo génico utilizado, en comparación con estímulos de primera generación como rapamicina cuyo efecto no es significativo.
4. Se logró determinar cuántas células internalizan el complejo ADN- HAp por parte del linaje HEK 293 T. No obstante, para el linaje celular HeLa no se observó un incremento significativo en el marcaje.
5. Nuestros resultados sobre la vía de autofagia y su relación con la eficiencia de transfección, nos permiten comprender mejor esta dependencia y así generar protocolos más eficientes; lo cual se podría reflejar en una mayor aplicabilidad en áreas de interés, como terapia génica y la nanofarmacología.

Perspectivas

1. Optimizar las condiciones para realizar la transfección en presencia de reguladores de la autofagia: su concentración y el tiempo de incubación.
2. Adicionalmente, analizar el efecto de reguladores de la autofagia independientes de la proteína quinasa de mTOR sobre la eficiencia de la transfección.
3. Estudiar el efecto de activar o inhibir la autofagia sobre el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) para comprobar si posee alguna relación con la eficiencia de transfección observada en los linajes celulares en estudio.

Referencias

1. Gao, J.; Xu, B. Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today* **2009**, *4*, 37–51.
2. Mann; S. Life as a Nanoscale Phenomenon. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5306-5320.
3. Goesmann, H.; Fedelmann, C. Nanoparticulate Functional Materials. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 1362-1395.
4. Horikoshi, S.; Serpone, N. Introduction to Nanoparticles. In *Microwaves in Nanoparticle Synthesis*; Horikoshi, S., Serpone, N., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2013; pp 1–24
5. Mailländer, V.; Landfester, K. Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2379– 2400.
6. Salata, O. V. Applications of nanoparticules in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology* **2004**, *6*, 1–6.
7. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry.* **2019**, *12*(7), 908-931.
8. Abdullaeva, Z. *Synthesis of Nanoparticles and Nanomaterials*. 1st ed.; Springer International Publishing: Cham, 2017
9. Khalaf, A. K.; Al, S. Y. Role and implications of nanodiagnostics in the changing trends of clinical diagnosis. *Saudi. J. Biol. Sci.* **2014**, *21*(2), 109-107.
10. Chacón, A. C. C. Transfección mediante vehículos génicos basados en hidroxiapatita: eficacia y efectos sobre el tráfico intracelular. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica, 2019.
11. Hillaireau, H.; Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2873–96.

12. Chowdhury, E. H.; Akaike, T. A bio-recognition device developed onto nanocrystals of carbonate apatite for cell-targeted gene delivery. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 90, 414–421.
13. Pedraza, E. C.; Bassett, C. D.; McKee, D. M.; Nelea, V.; Gbureck U.; Barralet, E. J. The importance of particle size and DNA condensation salt for calcium phosphate nanoparticle transfection. *Biomaterials* **2008**, 29, 3384–3392.
14. García, G. M. V.; Reyes, G. J. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **2006**, 9(2), 90-95.
15. Rivera-Muñoz, E. M. Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. In *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*; Fazel, R., Ed.; InTech, 2011
16. Wang, X.; Zhang, L.; Liu, Z.; Zeng, Q.; Jiang, G.; Yang, M. Probing the surface structure of hydroxyapatite through its interaction with hydroxyl: a first-principles study. *RSC Adv.* **2018**, 8, 3716-3722.
17. Sadat, S. M.; Khorasani, M.T.; Dinpanah, K. E.; Jamshidi, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.* **2013**, 9(8), 7591–7621.
18. Hui, J.; Wang, X. Hydroxyapatite nanocrystals: colloidal chemistry, assembly and their biological applications. *Inorg. Chem. Front.* **2014**, 1, 215-225.
19. Shi, Z.; Huang, X.; Cai, Y.; Tang, R.; Yang, D. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. *Acta Biomater.* **2009**, 5, 338–345.
20. Chen, L.; Mccrate, J. M.; Lee, J. C. M.; Li, H. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. *Nanotechnology* **2011**, 22(10), 1-10.

21. Clift, M. J. D.; Rothen, R. B.; Brown, D. M.; Duffin, R.; Donaldson, K.; Proudfoot, L.; Guy, K.; Stone, V. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, 232(3), 418–427.
22. Chacón, A. C. C. Caracterización de una colección de nanopartículas de Hidroxiapatita con diferentes propiedades estructurales como vehículos de transfección y marcadores de procesos endocíticos en diferentes linajes celulares. Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica, 2015.
23. Montalbert, S.; Echeverría, R.; Montero, M. L. Electrolytic one-pot synthesis of Group II nanohydroxyapatites. *J. Mater. Sci.* **2013**, 48(15), 5253–5260.
24. Cummings, L. J. Hydroxyapatite chromatography: purification strategies for recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **2014**, 541, 67–83.
25. Shanta, R. B.; Santosh, A.; Remant, B. K. C.; Narayan, B.; Pyong, H. H.; Ho, K. Y.; Hak, Y. K. Carbon nanotube-hydroxyapatite nanocomposite for DNA complexation. *Mater. Sci. Eng. C.* **2008**, 28(1), 64–69.
26. Itokazu, M.; Yang, W.; Aoki, T.; Ohara, A.; Kato, N. Synthesis of antibiotic-loaded interporous hydroxyapatite blocks by vacuum method and in vitro drug release testing. *Biomaterials* **1998**, 19(7-9), 817–819.
27. Kim T. K.; Eberwine J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem.* **2010**, 397, 3173–3178.
28. Zheng, Y.; Nguyen, J.; Wei, Y.; Sun, Y. Recent advances in microfluidic techniques for single-cell biophysical characterization. *Lab Chip* **2013**, 13, 2464–2483.
29. Chen, W.Y.; Lin, M. S.; Lin, P. H.; Tasi, P. S.; Chang, Y.; Yamamoto, S. Studies of the interaction mechanism between single strand and double-strand DNA with hydroxyapatite by microcalorimetry and isotherm measurements. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, 295, 274–283.

30. Olton, D.; Li, J.; Wilson, M. E.; Rogers, T.; Close, J.; Huang, L.; Kumta, P. N.; Sfeir, C. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials* **2007**, 28(6), 1267–1279.
31. Jordan, M.; Schallhorn A.; Wurm, F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24(4), 596–601.
32. Chowdhury E. H. pH-sensitive nano-crystals of carbonate apatite for smart and cell-specific transgene delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* **2007**, 4(3), 193–196.
33. Chowdhury, E. H.; Akaike, T. High performance DNA nano-carriers of carbonate apatite: multiple factors in regulation of particle synthesis and transfection efficiency. *Int. J. Nanomedicine* **2007**, 2(1), 101–106.
34. Chowdhury, E. H.; Maruyama, A.; Kano, A.; Nagaoka, M.; Kotaka, M.; Hirose, S.; Kunou, M.; Akaike, T. pH-sensing nano-crystals of carbonate apatite: effects on intracellular delivery and release of DNA for efficient expression into mammalian cells. *Gene* **2006**, 376(1), 87–94.
35. Komuro, H.; Sasano, T.; Horiuchi, N.; Yamashita, K.; Nagai, A. The effect of glucose modification of hydroxyapatite nanoparticles on gene delivery. *J Biomed. Mater. Res. Part A.* **2018**, 107(1), 61–66.
36. Frayssinet, P.; Rouquet, N.; Mathon, D. Bone cell transfection in tissue culture using hydroxyapatite microparticles. *J. Biomed. Mater. Res.* **2006**, 78(2), 225-228.
37. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* **2007**, 21, 2861–2873.
38. Kaur, J.; Debnath, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, 16, 461–472.

39. Yun, H. R.; Jo, Y. H.; Kim, J.; Shin, Y.; Kim, S.S.; Choi, T. G. Roles of Autophagy in Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1-27.
40. Vicencio, J. M.; Galluzzi, L.; Tajeddine, N. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path—a mini-review. *Gerontology* **2008**, *54*, 92-9.
41. Duncan, R.; Richardson, S. C. W. Endocytosis and Intracellular Trafficking as Gateways for Nanomedicine Delivery: Opportunities and Challenges. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2380–2402.
42. Loos, B.; du Toit, A.; Hofmeyr, J.-H. S. Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. *Autophagy* **2014**, *10*(11), 2087–2096.
43. Stern, T. S.; Adisheshaiah, P. P.; Crist, M. R. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9* (20), 1-15.
44. Gustafson, H. H.; Casper, H. D.; Grainger, W. D.; Ghandehari, H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* **2015**, *10*(4), 487–510.
45. Tanida, S.; Ueno, T.; Kominami, K. LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *445*, 77-88.
46. Zullo, F.; Jurcic, S. K.; Lee, S. Mammalian Target of Rapamycin Inhibition and Mycobacterial Survival Are Uncoupled in Murine Macrophages. *BMC Biochem.* **2014**, *15*(4), 1-10.
47. Datan, M.; Shirazian, A.; Benjamin, S.; Matassov, D.; Tinari, A.; Malorni, W.; Lockshin, A.R.; Sastre, G. A.; Zakeri, Z. mTOR/p70S6K signaling distinguishes routine, maintenance-level autophagy from autophagic cell death during influenza A infection. *Virology.* **2014**, *453*, 175-190.

48. Yang, Y.; Hu, L.; Zheng, H.; Mao, C.; Hu, W.; Xiong, K.; Wang, F.; Liu, C. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, *34*(5), 625–635.
49. Rubinsztein, C. D.; Gestwicki, E. J.; Murphy, O. L.; Klionsky, J. D. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*(4), 304–312.
50. Tanemura, M.; Ohmura, Y.; Deguchi, T.; Machida, T.; Tsukamoto, R.; Wada, H.; Kobayashi, S.; Marubashi, S.; Eguchi, H.; Ito, T.; Nagano, H.; Mori, M.; Doki, Y. Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Transplant.* **2012**, *12*, 102–114.
51. Kim, D. H.; Sarbassov, D. D.; Ali, S. M.; King, J. E.; Latek, R. R.; Erdjument, B. H.; Tempst, P.; Sabatini, M. D. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* **2002**, *110*, 163–75.
52. Hartford, C. M.; Ratain, M. J. Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *82*, 381–388.
53. You, T. W.; Hui, L. T.; Guanghou, S.; Chantal, B.; Qing, H.; Markus, R. W.; Choon, N. O.; Patrice, C.; Han, M. S. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*(14), 10850–10861.
54. Simioni, C.; Cani, A.; Martelli, M. A.; Zauli, G.; Tabellini, G.; McCubrey, J.; Capitani, S.; Neri, M. L. Activity of the novel mTOR inhibitor Torin-2 in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential to prevent Akt reactivation. *Oncotarget.* **2014**, *5*(20), 10034–10047.
55. Liu, Q.; Wang, J.; Kang, A. S.; Thoreen, C. C.; Hur, W.; Ahmed, T.; Sabatini, M. D.; Gray, S. N. Discovery of 9-(6-Aminopyridin-3-yl)-1-(3-

(trifluoromethyl)phenyl)benzo[h][1,6] naphthyridin-2(1H)-one (Torin2) as a Potent, Selective, and Orally Available Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor for Treatment of Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54(5), 1473–1480.

56. Wang, C.; Wang, X.; Su, Z.; Fei, H.; Liu, X.; Pan, Q. The novel mTOR inhibitor Torin-2 induces autophagy and downregulates the expression of UHRF1 to suppress hepatocarcinoma cell growth. *Oncology Reports* **2015**, 34(4), 1708–1716.

57. Blommaart, E. F.; Krause, U.; Schellens, J. P.; Vreeling, S. H.; Meijer, A. J. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 240–246.

58. Xinlei, Y.; Yun, C. L.; Han, M. S. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy* **2015**, 11(10), 1711–1728.

59. Hou, H.; Zhang, Y.; Huang, Y.; Yi, Q.; Lv, L.; Zhang, T.; Chen, D.; Hao, Q.; Shi, Q. (2012) Inhibitors of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Promote Mitotic Cell Death in HeLa Cells. *PLOS ONE* **2012**, 7(4), 1-11.

60. Walker, H. E.; Pacold, E. M.; Perisic, O.; Stephens, L.; Hawkins, T. P.; Wymann, P. M.; Williams, L. R. Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. *Molecular Cell* **2000**, 6(4), 909–919.

61. Yaguchi, S.; Fukui, Y.; Koshimizu, I.; Yoshimi, H.; Matsuno, T.; Gouda, H.; Hirono, S.; Yamasaki, K.; Yamori, T. Antitumor Activity of ZSTK474, a New Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor. *Journal of the National Cancer Institute* **2006**, 98(8), 545–556.

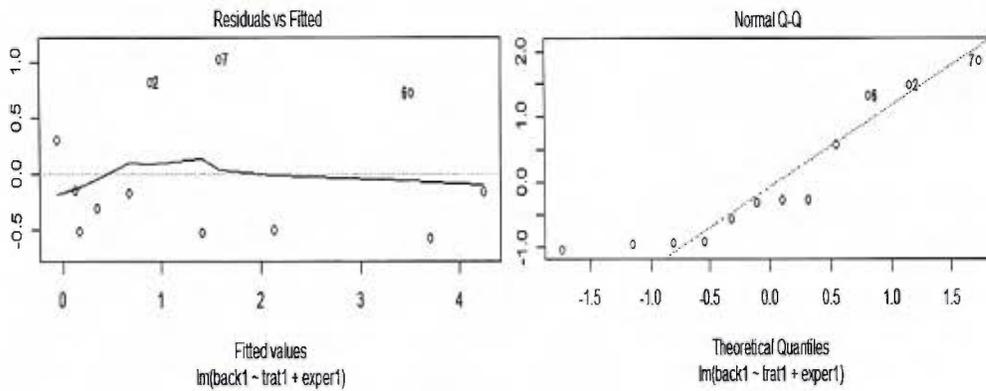
62. Mishra, P.; Dauphinee, N. A.; Ward, C.; Sarkar, S.; Gunawardena, A. H. L. A. N.; Manjithaya, R. Discovery of pan autophagy inhibitors through a high-throughput screen highlights macroautophagy as an evolutionarily conserved process across 3 eukaryotic kingdoms. *Autophagy* **2017**, 13(9), 1556–1572.

63. Liu, Y. G.; Sabatini, M. D. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, 21(4), 183-203.
64. Kim, C. Y.; Guan, L. K. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Invest.* **2015**, 125(1), 25–32.
65. Ballou, M. L.; Lin, Z. R. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J. Chem. Biol.* **2008**, 1, 27–36.
66. Zhong, X.; Panus, D.; Ji, W.; Wang, C. Modulating Polyplex-Mediated Gene Transfection by Small-Molecule Regulators of Autophagy. *Mol. Pharm.* **2015**, 2(3), 932-940.
67. Roberts, R.; Al-Jamal, T. W.; Whelband, M.; Thomas, P.; Jefferson, M.; van den Bossche, J.; Powell, P. P.; Kostarelos, K.; Wileman, T. Autophagy and Formation of Tubulovesicular Autophagosomes Provide a Barrier Against Nonviral Gene Delivery. *Autophagy* **2013**, 9(5), 667–682.
68. Khalil, I. A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58(1), 32–45.
69. Sahay, G.; Alakhova, D. Y.; Kabanov, A. V. Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release* **2010**, 145(3), 182–195.
70. Peynshaert, K.; Manshian, B. B.; Joris, F.; Braeckmans, K.; De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Soenen, S. J. Exploiting Intrinsic Nanoparticle Toxicity: The Pros and Cons of Nanoparticle-Induced Autophagy in Biomedical Research. *Chemical Reviews* **2014**, 114(15), 7581–7609.
71. Zhou, C.; Zhong, W.; Zhou, J.; Sheng, F.; Fang, Z.; Wei, Y.; Chen, Y.; Deng, X.; Xia, B.; Lin, J. Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. *Autophagy* **2012**, 8(8), 1215–1226.

72. Guo-dong, W.; Yu-zhen, T.; Hai-jie, W.; Pei, Z. Autophagy promotes degradation of polyethyleneimine–alginate nanoparticles in endothelial progenitor cells. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 6661–6675.
73. Parhamifar, L.; Larsen, A. K.; Hunter, A. C.; Andresen, T. L.; Moghimi, S. M. Polycation cytotoxicity: a delicate matter for nucleic acid therapy—focus on polyethylenimine. *Soft Matter*, **2010**, *6*(17), 4001-4009.
74. Wang, E. C.; Wang, A. Z. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integr. Biol.* **2014**, *6*(1), 9–26.
75. Gonçalves, G. A. R.; Paiva, R. de M. A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein* **2017**, *15*(3), 369–375.
76. Rozalén, J.; Ceña, V.; Jordán, J. Terapia génica. Vectores de expresión. *Offarm* **2003**, *22*(8), 102-108
77. Yoo, J. Y., Kim, H., Park, R. S.; Yoon, J. Y. An overview of rapamycin: from discovery to future perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2016**, *44*(4-5), 537–553.
78. Truong, P. N.; Whittaker, R. M.; Mak, W. C.; Davis, P. T. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2014**, *12*(1), 129–142.
79. Zhao, X.; Ng, S.; Heng, B. C.; Guo, J.; Ma, L.; Tan, T. T. Y.; Ng, K. W.; Loo, S. C. J. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. *Archives of Toxicology* **2012**, *87*(6), 1037–1052.
80. Bauer, I. W.; Li, S.-P.; Han, Y.-C.; Yuan, L.; Yin, M.-Z. Internalization of hydroxyapatite nanoparticles in liver cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2007**, *19*(3), 1091–1095.
81. Yan-zhong, Z.; Yan-yan, H.; Jun, Z.; Shai-hong, Z.; Zhi-you, L.; Ke-chao, Z. Characteristics of functionalized nano-hydroxyapatite and internalization by human epithelial cell. *Nanoscale Research Letters* **2011**, *6*(1), 1-8.

82. Yang, H.; Rudge, G. D.; Koos, D. J.; Vaidialingam, B.; Yang, J. H.; Pavletich, P. N. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* **2013**, 497(7448), 217–223.
83. Romero, A. L.; Guerra S. G. La cinasa de residuos de serina y treonina blanco de la rapamicina (TORC1) es esencial en el metabolismo celular de los eucariontes. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* **2018**, 37(1), 4-13.
84. Fernandez, F. E. Caracterización de la interacción con el ADN y de las propiedades proinflamatorias de nanopartículas de hidroxiapatitas modificadas. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica, 2020.

Anexos



Analysis of variance Table

Response: back1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat1	3	24.2022	8.0674	13.5195	0.004449 **
exper1	2	1.1377	0.5688	0.9532	0.437021
Residuals	6	3.5804	0.5967		

 signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 13: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HeLa en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

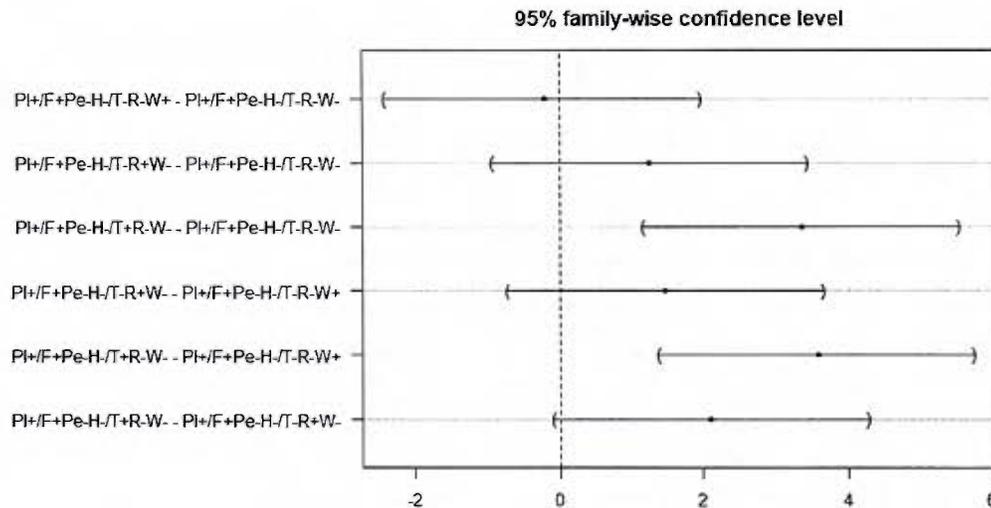
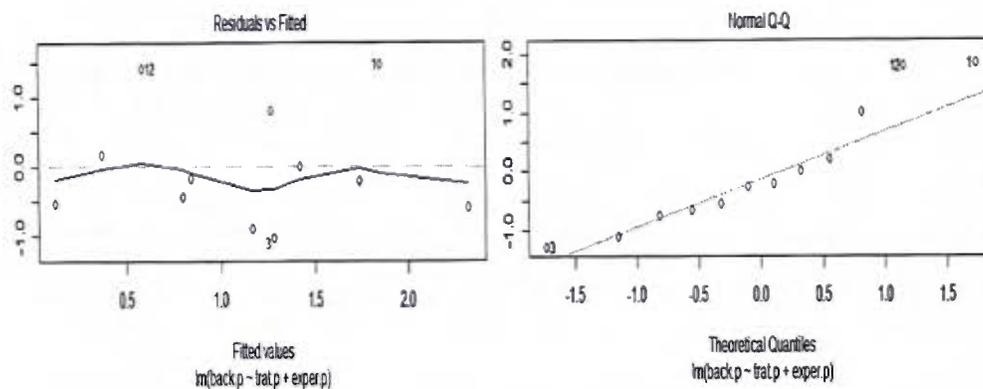


Figura 14: Resultados del análisis post-hoc (prueba Tukey) para la transfección del linaje celular HeLa en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

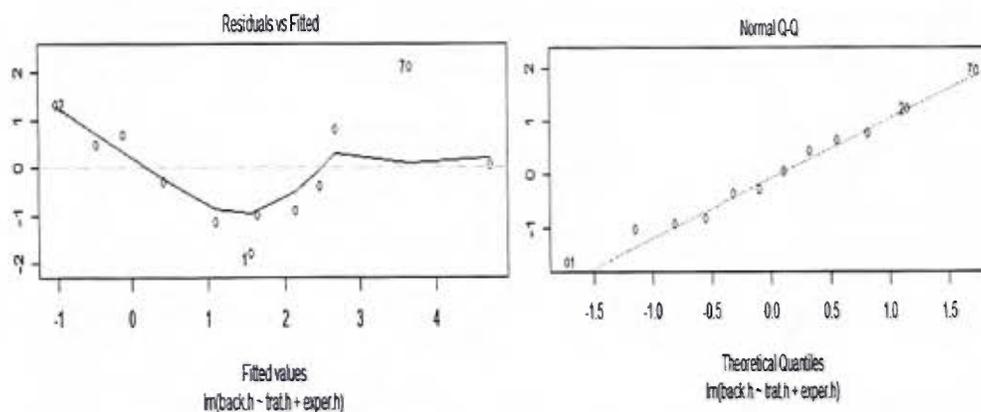


Analysis of variance Table

Response: back.p

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat.p	3	2.3090	0.76966	0.6065	0.6347
exper.p	2	2.2327	1.11636	0.8797	0.4624
Residuals	6	7.6143	1.26905		

Figura 15: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HeLa en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de PEI.

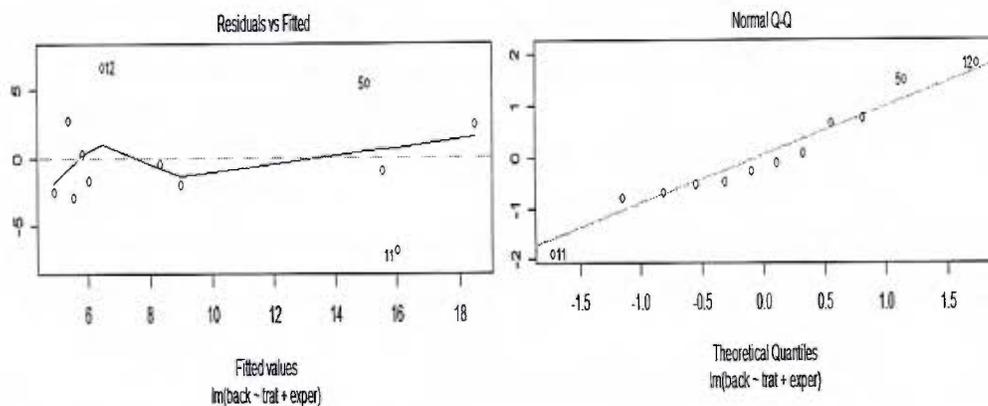


Analysis of variance Table

Response: back.h

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat.h	3	17.187	5.7291	2.4737	0.159
exper.h	2	14.761	7.3806	3.1868	0.114
Residuals	6	13.896	2.3160		

Figura 16: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HeLa en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de HAp.



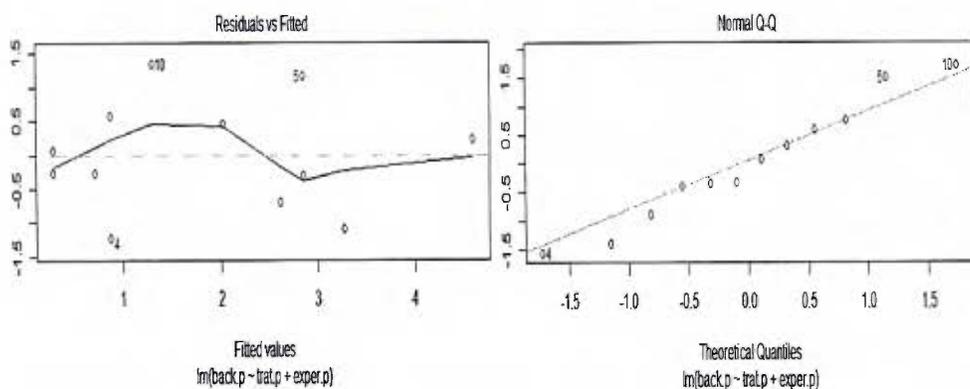
Analysis of variance Table

Response: back

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat	3	21.113	7.038	0.2749	0.84172
exper	2	259.191	129.595	5.0621	0.05152 .
Residuals	6	153.606	25.601		

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 17: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HEK 293 T en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.



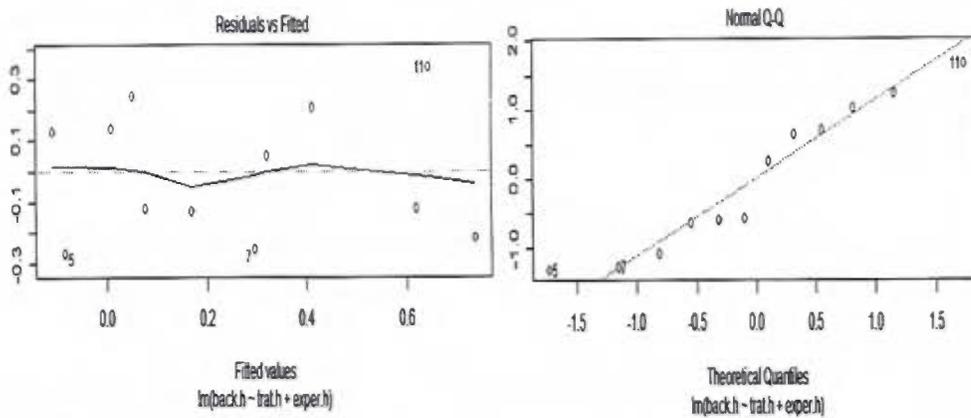
Analysis of variance Table

Response: back.p

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat.p	3	6.1167	2.0389	1.7027	0.26492
exper.p	2	14.4886	7.2443	6.0497	0.03643 *
Residuals	6	7.1848	1.1975		

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 18: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HEK 293 T en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de PEI.



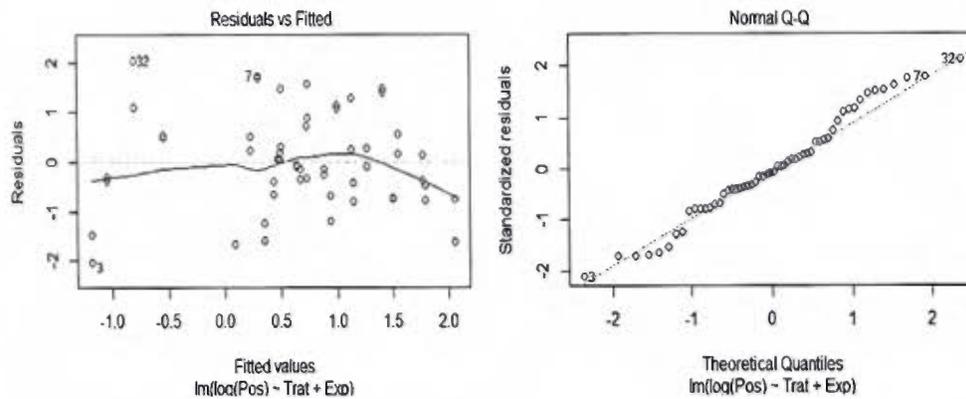
Analysis of variance Table

Response: back.h

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat.h	3	0.90089	0.300297	3.7236	0.08009
exper.h	2	0.03065	0.015325	0.1900	0.83173
Residuals	6	0.48388	0.080647		

 signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 19: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la transfección del linaje celular HEK 293 T en presencia de estímulos e inhibidores del flujo autofágico bajo el método de HAp.



Analysis of variance Table

Response: Pos

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Trat	6	15212.0	2535.34	28.307	6.871e-14 ***
Exp	3	4010.7	1336.90	14.927	6.391e-07 ***
Residuals	46	4120.0	89.57		

 signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 20: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la internalización del complejo ADN-HAP por parte del linaje celular HeLa, mediante un modelo de mínimos cuadrados pesados.

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

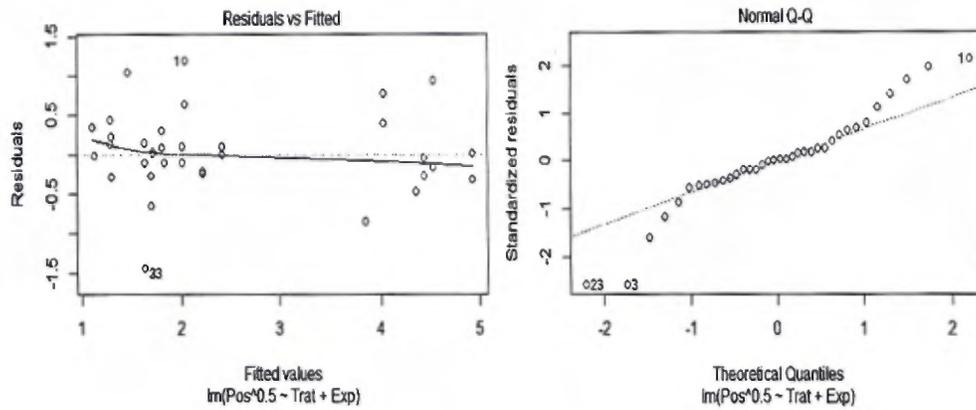
Fit: aov(formula = Pos ~ Trat + Exp, data = base, weights = peso)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
ADN-PI-H+ - ADN-PI-H- == 0	3.44687	0.63429	5.434	< 0.001	***
ADN-PI+H- - ADN-PI-H- == 0	0.15124	0.13892	1.089	0.89981	
ADN-PI+H+ - ADN-PI-H- == 0	0.76486	0.32428	2.359	0.18614	
ADN+PI-H+ - ADN-PI-H- == 0	1.38902	0.36419	3.814	0.00469	**
ADN+PI+H- - ADN-PI-H- == 0	0.78588	0.51689	1.520	0.66408	
ADN+PI+H+ - ADN-PI-H- == 0	8.59090	3.04680	2.820	0.06806	.
ADN-PI+H- - ADN-PI-H+ == 0	-3.29562	0.63041	-5.228	< 0.001	***
ADN-PI+H+ - ADN-PI-H+ == 0	-2.68200	0.68118	-3.937	0.00333	**
ADN+PI-H+ - ADN-PI-H+ == 0	-2.05785	0.72434	-2.841	0.06461	.
ADN+PI+H- - ADN-PI-H+ == 0	-2.66098	0.80561	-3.303	0.01994	*
ADN+PI+H+ - ADN-PI-H+ == 0	5.14404	3.10731	1.655	0.57365	
ADN-PI+H+ - ADN-PI+H- == 0	0.61362	0.29660	2.069	0.31691	
ADN+PI-H+ - ADN-PI+H- == 0	1.23778	0.38358	3.227	0.02414	*
ADN+PI+H- - ADN-PI+H- == 0	0.63464	0.50577	1.255	0.82393	
ADN+PI+H+ - ADN-PI+H- == 0	8.43966	3.04470	2.772	0.07572	.
ADN+PI-H+ - ADN-PI+H+ == 0	0.62416	0.46950	1.329	0.78288	
ADN+PI+H- - ADN-PI+H+ == 0	0.02102	0.58567	0.036	1.00000	
ADN+PI+H+ - ADN-PI+H+ == 0	7.82604	3.05169	2.564	0.12117	
ADN+PI+H- - ADN+PI-H+ == 0	-0.60314	0.62715	-0.962	0.94173	
ADN+PI+H+ - ADN+PI-H+ == 0	7.20188	3.06678	2.348	0.18943	
ADN+PI+H+ - ADN+PI+H- == 0	7.80502	3.08609	2.529	0.13034	

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
 (Adjusted p values reported -- single-step method)

Figura 21: Resultados del análisis post-hoc (prueba Tukey) para la internalización del complejo ADN-HAp por parte del linaje celular HeLa.



Analysis of Variance Table

Response: Pos

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Trat	6	120.56	20.0937	22.3080	2.754e-09 ***
Exp	2	4.68	2.3400	2.5978	0.09293 .
Residuals	27	24.32	0.9007		

 Signif. codes: .0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 22: Resultados del análisis de supuestos y del ANOVA para la internalización del complejo ADN-HAp por parte del linaje celular HEK 293 T, mediante un modelo de mínimos cuadrados pesados.

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = Pos ~ Trat + Exp, data = base, weights = peso)

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
ADN-PI-H+ - ADN-PI-H- == 0	-2.6380	1.9947	-1.322	0.79611	
ADN-PI+H- - ADN-PI-H- == 0	17.1200	3.0805	5.558	< 0.001	***
ADN-PI+H+ - ADN-PI-H- == 0	-0.1360	2.0429	-0.067	1.00000	
ADN+PI-H+ - ADN-PI-H- == 0	-2.7320	1.9733	-1.384	0.76084	
ADN+PI+H- - ADN-PI-H- == 0	12.8360	2.9613	4.335	0.00219	**
ADN+PI+H+ - ADN-PI-H- == 0	-1.0781	1.9744	-0.546	0.99684	
ADN-PI+H- - ADN-PI-H+ == 0	19.7580	2.4174	8.173	< 0.001	***
ADN-PI+H+ - ADN-PI-H+ == 0	2.5020	0.7265	3.444	0.02017	*
ADN+PI-H+ - ADN-PI-H+ == 0	-0.0940	0.4981	-0.189	0.99999	
ADN+PI+H- - ADN-PI-H+ == 0	15.4740	2.2635	6.836	< 0.001	***
ADN+PI+H+ - ADN-PI-H+ == 0	1.5599	0.5023	3.106	0.04433	*
ADN-PI+H+ - ADN-PI+H- == 0	-17.2560	2.4573	-7.022	< 0.001	***
ADN+PI-H+ - ADN-PI+H- == 0	-19.8520	2.3998	-8.273	< 0.001	***
ADN+PI+H- - ADN-PI+H- == 0	-4.2840	3.2610	-1.314	0.80058	
ADN+PI+H+ - ADN-PI+H- == 0	-18.1981	2.4006	-7.581	< 0.001	***
ADN+PI-H+ - ADN-PI+H+ == 0	-2.5960	0.6654	-3.901	0.00652	**
ADN+PI+H- - ADN-PI+H+ == 0	12.9720	2.3061	5.625	< 0.001	***
ADN+PI+H+ - ADN-PI+H+ == 0	-0.9421	0.6686	-1.409	0.74670	
ADN+PI+H- - ADN+PI-H+ == 0	15.5680	2.2447	6.936	< 0.001	***
ADN+PI+H+ - ADN+PI-H+ == 0	1.6539	0.4091	4.043	0.00460	**
ADN+PI+H+ - ADN+PI+H- == 0	-13.9141	2.2456	-6.196	< 0.001	***

 signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
 (Adjusted p values reported -- single-step method)

Figura 23: Resultados del análisis post-hoc (prueba Tukey) para la internalización del complejo ADN-HAP por parte del linaje celular HEK 293 T.