



**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA/
EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA**

MÁSTER EN
BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**“Diseño y validación de un protocolo de compactación de ADN
mediante policationes naturales: evaluación estructural en
diferentes modelos para aplicaciones en terapia génica”**

MASTER`STHESIS

**“Design and Validation of a DNA Compaction Protocol Using
Natural Polycations: Structural Evaluation Across Different
Models for Gene Therapy Applications”**

Realizada por: ÁNGELA MARTÍNEZ RUIZ

Dirigida por: MÓNICA LÓPEZ FANARRAGA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE VALDECILLA-IDIVAL

SANTANDER 2025

Índice

1. Antecedentes	5
1.1 Naturaleza y estructura del ADN	5
1.2 Compactación del ADN en sistemas biológicos.....	7
1.3 Importancia funcional de la compactación.....	8
1.4 Moléculas básicas de compactación: Protamina y Espermina	9
1.5 Reversibilidad de la compactación por policationes naturales.....	12
1.6 Formación de toroides de ADN: implicaciones estructurales y funcionales	12
Objetivos	15
2. Método Experimental	16
2.1 Compactación del ADN del fago λ	16
2.1.1 Materiales y reactivos	16
2.1.2 Preparación del ADN	17
2.1.3 Protocolo de compactación	17
2.1.4 Desarrollo y optimización experimental	18
2.2 Caracterización de los complejos ADN λ -policationes.....	21
2.2.1 Evaluación preliminar mediante microscopía de fluorescencia (ZOE™)	22
2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	22
2.2.3 Microscopía confocal	24
2.2.4 Dispersión de luz dinámica (DLS)	24
2.3 Compactación de otras moléculas de ADN	25
2.3.1 Compactación de ADN plasmídico	25
2.3.2 Compactación de ADN de salmón	27
3. Resultados	29
3.1 Evaluación preliminar de la compactación con protamina en condiciones iniciales	29
3.1.1 Microscopía de fluorescencia (ZOE™)	29
3.1.2 Microscopía confocal	30
3.1.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	31
3.1.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	32
3.2 Optimización del protocolo de compactación y caracterización avanzada	33
3.2.1 Compactación con protamina	33
3.2.1.1 Caracterización inicial y validación del protocolo optimizado	33
3.2.1.2 Repetibilidad y reproducibilidad del protocolo	36
3.2.1.3 Estudio de la relación de cargas (N/P ratio)	37
3.2.2 Compactación del ADN λ con espermina	38
3.2.2.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	39
3.2.2.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	39
3.2.2.3 Estudio de la relación de cargas (N/P ratio)	40
3.3 Compactación de diferentes modelos de ADN	41

3.3.1 ADN plasmídico (pVAXHK70).....	42
3.3.2 ADN genómico de salmón	43
3.3.2.1 Compactación con protamina	43
3.3.2.2 Compactación con espermina	44
3.4 Controles negativos: análisis individual de ADN λ y protamina	45
4. Discusión	47
4.1 Compactación del ADN λ : optimización estructural y formación de toroides	47
4.2 Compactación del ADN plasmídico: aplicabilidad del protocolo a modelos circulares..	48
4.3 Compactación de fragmentos del ADN genómico de salmón: efecto del tamaño y comparación entre agentes	49
4.4 Consideraciones generales y relevancia funcional	49
Conclusiones	50
Referencias	52

Listado de Figuras

Figura 1. Principales formas helicoidales del ADN: comparación entre las conformaciones A, B y Z	6
Figura 2. Esquema del ADN a diferentes niveles de organización.	7
Figura 3. Unión de las moléculas de protamina en el surco principal del ADN, neutralizando el fosfodiéster del ADN.....	11
Figura 4. Remodelación de la cromatina espermática tras la fecundación.	14
Figura 5. Esquema representativo de la preparación inicial con la adición secuencial de ADN λ , tampón Tris-HCl y protamina en tubos Eppendorf.....	20
Figura 6. Incubación en termoagitador para favorecer la formación de complejos compactados	20
Figura 7. Imagen de microscopía de fluorescencia (ZOE™) del ADN λ compactado con protamina en condiciones preliminares (volumen total 50 μ L), teñido con DAPI y visualizado en el canal azul.....	29
Figura 8. Imagen obtenida por microscopía confocal de los complejos del ADN λ compactado con protamina y teñido con DAPI. El gráfico muestra el tamaño (aproximadamente 1 μ m) y la intensidad de fluorescencia de la partícula atravesada por la flecha en la imagen confocal (en el box).....	30
Figura 9. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostrando la distribución heterogénea de tamaños de partículas de ADN λ compactado con protamina	31
Figura 10. Micrografía TEM que evidencia la formación de estructuras toroides.	31
Figura 11. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN λ compactado con protamina (protocolo inicial)	32
Figura 12. Imagen de microscopía de fluorescencia de ADN λ compactado con protamina según el protocolo optimizado	33
Figura 13. Imagen de microscopía confocal de ADN λ compactado con protamina (protocolo optimizado) teñido con DAPI.	34
Figura 14. Micrografía TEM panorámica de la muestra compactada con protamina, mostrando una alta homogeneidad en el tamaño y distribución de las partículas.	34
Figura 15. Imagen TEM representativa de un toroide de ADN λ compactado con protamina. ...	35
Figura 16. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN λ compactado con protamina (protocolo optimizado).....	35
Figura 17. Micrografía TEM panorámica de una de las repeticiones del protocolo optimizado..	36
Figura 18. Imagen TEM representativa de un toroide observado en una repetición del protocolo optimizado, confirmando la persistencia de esta morfología estructurada.	37
Figura 19. Micrografía TEM representativa de la compactación de ADN λ con espermina.	39

Figura 20. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN λ compactado con espermina.	40
Figura 21. Imagen TEM del ADN plasmídico pVAXHK70: vista panorámica y detalle morfológico.	42
Figura 22. Visualización de estructuras toroidales tras la compactación del plásmido.	42
Figura 23. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN plasmídico pVAXHK70 compactado con protamina.	43
Figura 24. Imagen TEM de complejos ADN–protamina formados a partir de ADN genómico de salmón.	44
Figura 25. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN de salmón compactado con protamina.	44
Figura 26. Imagen TEM de complejos ADN–espermina formados a partir de ADN genómico de salmón.	45
Figura 27. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN de salmón compactado con espermina.	45
Figura 28. Micrografía TEM de ADN λ sin compactar (disuelto en tampón Tris-EDTA).	46
Figura 29. Micrografía TEM de protamina disuelta en tampón Imidazol-KCl.	46

Listado de Tablas

Tabla 1. Comparación estructural y funcional entre la protamina y la espermina en la compactación del ADN.	11
Tabla 2. Materiales y reactivos utilizados en el proceso de compactación.	16
Tabla 3. Condiciones experimentales utilizadas en el proceso de compactación del ADN λ con protamina.	21
Tabla 4. Condiciones experimentales empleadas para el estudio de la relación de cargas (N/P) entre protamina y ADN λ , incluyendo las concentraciones utilizadas y las micrografías TEM obtenidas para cada ensayo.	38
Tabla 5. Condiciones experimentales empleadas para evaluar el efecto de la relación de cargas (N/P) en la compactación del ADN λ con espermina. Se muestran las concentraciones utilizadas y micrografías TEM representativas para cada proporción.	41

Listado de Acrónimos

TEM	Transmission Electron Microscopy (Microscopía Electrónica de Transmisión)
DLS	Dynamic Light Scattering (Dispersión de Luz Dinámica)
PI	Polydispersity Index (Índice de Polidispersidad)
N/P	Ratio de cargas negativas del ADN a cargas positivas del polication
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (Tinción fluorescente específica para ADN)
TE	Tris-EDTA (Tampón estabilizador de ADN)
μL / nM / μM	Microlitro / Nanomolar / Micromolar (unidades experimentales comunes)

1. Antecedentes

1.1 Naturaleza y estructura del ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) constituye el material genético fundamental de la mayoría de los organismos vivos, siendo el portador de la información hereditaria y el elemento central en los procesos de replicación, transcripción y traducción que sostienen la vida. Su estructura, función y dinámica han sido objeto de intensas investigaciones a lo largo del siglo XX, culminando en el modelo de doble hélice propuesto por James Watson y Francis Crick en 1953, hito que marcó el inicio de una nueva era en la biología molecular.^{1,2}

Desde una perspectiva química, el ADN es un polímero lineal compuesto por unidades repetidas denominadas nucleótidos. Cada nucleótido consta de un grupo fosfato, una desoxirribosa (una pentosa) y una base nitrogenada, que puede ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T). La secuencia lineal de estas bases codifica la información genética, mientras que la organización tridimensional del ADN confiere estabilidad estructural y especificidad funcional al material genético.¹

La estructura primaria del ADN se refiere a la secuencia de nucleótidos en una sola cadena. Sin embargo, la propiedad más relevante desde el punto de vista biológico es su estructura secundaria: la doble hélice. En este modelo, dos cadenas de ADN se enrollan en torno a un eje en común, en direcciones antiparalelas (una dirección $5' \rightarrow 3'$ y la otra $3' \rightarrow 5'$), unidas por puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarias: adenina con timina (dos enlaces de hidrógeno) y guanina con citosina (tres enlaces de hidrógeno). Esta complementariedad es fundamental para los mecanismos de replicación semiconservativa y reparación del ADN.²

Desde una perspectiva estructural más detallada, la doble hélice del ADN presenta dos tipos de surcos: el surco mayor y el surco menor (también conocidos como fosa mayor y fosa menor). Esta asimetría surge del modo en que las bases nitrogenadas se enlazan con el esqueleto fosfodiéster, generando regiones con diferentes anchuras y profundidades a lo largo de la hélice. El surco mayor proporciona un acceso más amplio a las bases y es el principal sitio de reconocimiento para muchas proteínas reguladoras y factores de transcripción. Por el contrario, el surco menor, más estrecho, desempeña un papel relevante en interacciones no específicas con pequeñas moléculas y agentes de carga positiva, que pueden estabilizar el ADN mediante puentes salinos o enlaces electrostáticos. La existencia de estos surcos diferenciados es clave para entender cómo ciertas moléculas pueden unirse de forma selectiva o preferencial, influyendo en procesos como la regulación génica, la compactación y la organización tridimensional del genoma.³

El descubrimiento de esta arquitectura fue posible gracias a una acumulación de conocimientos previos. Investigaciones clave como las de Friedrich Miescher, quien en 1869 aisló por primera vez una sustancia rica en fósforo a partir de núcleos celulares —a los que denominó “nucleína”—, sentaron las bases para el reconocimiento del ADN como entidad diferenciada. Posteriormente,

a inicios del siglo XX, Phoebus Levene identificó los componentes fundamentales del ADN y propuso el modelo de tetranucleótido, aunque con una estructura repetitiva incorrecta que durante décadas restó importancia al ADN como portador de la herencia.^{1,2}

El paradigma cambió progresivamente gracias a los experimentos de transformación genética llevados a cabo por Oswald Avery y sus colaboradores en la década de 1940, que demostraron que el ADN era la sustancia responsable de transmitir características hereditarias. Este hallazgo fue reforzado por el experimento de Hershey y Chase en 1952, que confirmó que el ADN, y no las proteínas, era el material genético de los bacteriófagos.² Estos avances prepararon el terreno para el modelo de Watson y Crick, quienes, basándose en datos cristalográficos obtenidos por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins, propusieron una estructura de doble hélice capaz de explicar tanto la estabilidad como la replicabilidad del material genético.

Desde el punto de vista estructural, la conformación helicoidal del ADN no es rígida ni uniforme; existen distintas formas conformacionales, entre las cuales la forma B es la más común en condiciones fisiológicas. No obstante, también se han descrito otras variantes como las formas A y Z, cuyas apariciones dependen del contexto iónico, la hidratación del entorno y la secuencia de bases. Estas conformaciones alternativas pueden influir en procesos como la regulación génica y la interacción con proteínas.¹

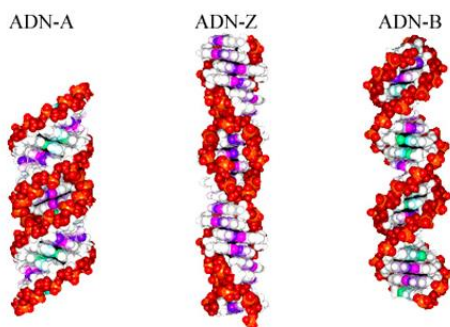


Figura 1. Principales formas helicoidales del ADN: comparación entre las conformaciones A, B y Z.

Ahora bien, a pesar de su estructura altamente organizada, el ADN genómico de los organismos eucariotas alcanza tamaños extraordinarios, del orden de varios metros de longitud si se extendiera linealmente. Esta magnitud contrasta con el limitado espacio disponible en el núcleo celular, lo que plantea un importante desafío físico y funcional. En este contexto donde surge la necesidad biológica de compactar el ADN de forma eficiente, permitiendo su almacenamiento, protección y regulación sin comprometer su accesibilidad. Esta capacidad de empaquetamiento estructurado —en la que intervienen múltiples factores físicos y químicos— constituye un fenómeno clave tanto en los sistemas biológicos naturales como en las aplicaciones biomédicas que buscan manipular y transportar ADN artificialmente.

1.2 Compactación del ADN en sistemas biológicos

En todos los organismos vivos, el ADN representa el soporte físico de la información genética y, sin embargo, debe coexistir en un entorno celular limitado, en términos de espacio y organización. Este hecho impone la necesidad de estrategias altamente especializadas de compactación, que no solo permitan empaquetar grandes cantidades de material genético en volúmenes celulares extremadamente reducidos, sino que también aseguren su accesibilidad y protección. La estructura lineal del ADN de doble hélice, con una extensión total que puede alcanzar varios metros en organismos eucariotas superiores, requiere una organización tridimensional eficaz que garantice tanto la estabilidad estructural como la regulación dinámica de funciones esenciales como la transcripción, la replicación y la reparación.

En células eucariotas, esta organización se logra a través de una arquitectura jerárquica que parte de la asociación del ADN con proteínas denominadas histonas. La unidad mínima de esta estructura es el nucleosoma, un complejo de aproximadamente 147 pares de bases de ADN enrolladas alrededor de un octámero de histonas, compuesto por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4.⁴ Entre los nucleosomas se intercalan segmentos de ADN espaciador, que, junto con la histona H1, favorecen la formación de una fibra de cromatina más condensada. A partir de esta organización primaria, el ADN puede plegarse adicionalmente en estructuras superiores, como la fibra de 30 nm, bucles cromatínicos y dominios topológicos, culminando en la conformación de cromosomas mitóticos durante la división celular. Este complejo grado de empaquetamiento permite no solo reducir el volumen del material genético, sino también modular la actividad génica mediante mecanismos epigenéticos y remodeladores de la cromatina.

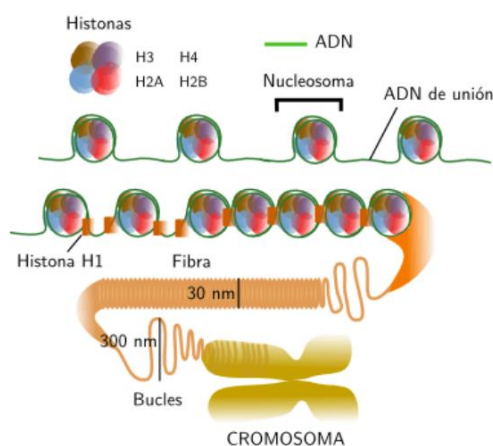


Figura 2. Esquema del ADN a diferentes niveles de organización.

Por el contrario, en organismos procariotas, la compactación del ADN se logra en ausencia de histonas, aunque no exenta de una elevada eficiencia organizativa. El genoma bacteriano, normalmente circular y superenrollado negativamente, se asocia con proteínas de unión inespecífica al ADN, como HU, H-NS y Fis, que inducen curvas, pliegues y bucles funcionales.⁴

Estas proteínas nucleoidales facilitan la formación del nucleoide, una estructura organizada que permite el acceso selectivo a determinadas regiones del genoma en respuesta a estímulos ambientales, contribuyendo también a la segregación del ADN durante la división celular. El superenrollamiento, mantenido por la acción de topoisomerasas, desempeña un papel clave en este modelo de compactación, sustituyendo parcialmente el papel que en eucariotas cumplen las histonas.

Una forma particularmente especializada de compactación del ADN ocurre durante la espermatogénesis en organismos superiores. En este proceso, las células germinales masculinas experimentan una profunda reestructuración del material genético, con el objetivo de reducir el volumen nuclear, proteger el genoma durante su tránsito extracelular y asegurar la entrega eficaz de la información genética al ovocito. Esta reorganización implica una sustitución progresiva de las histonas por proteínas nucleares de transición (TNPs), que posteriormente son reemplazadas por protaminas.⁵ Las protaminas son pequeñas proteínas ricas en residuos de arginina, cuya carga positiva permite una interacción electrostática altamente eficiente con el ADN, dando lugar a un empaquetamiento cristalino o cuasi-cristalino en forma de toroides. Este tipo de empaquetamiento alcanza densidades estructurales superiores a las observadas en cualquier otra célula somática, representando un modelo extremo de compactación genómica natural. Además, se ha demostrado que este tipo de organización protege al ADN frente al daño oxidativo y facilita su descondensación tras la fecundación, al sustituirse nuevamente por histonas en el pronúcleo masculino. La compactación mediada por protaminas no solo tiene implicaciones estructurales, sino también funcionales, ya que se asocia con un silenciamiento transcripcional casi completo, lo cual es fundamental para la maduración final del espermatozoide.

1.3 Importancia funcional de la compactación

La compactación del ADN es un proceso fundamental en la organización del genoma, con profundas implicaciones funcionales que van más allá de una mera necesidad estructural. En organismos eucariotas, cerca de dos metros de ADN deben ser contenidos en un núcleo de aproximadamente 10 μm de diámetro, lo que implica una organización jerárquica extremadamente eficiente mediante la asociación del ADN con proteínas histonas, formando nucleosomas, que posteriormente se empaquetan en estructuras superiores de cromatina. Sin embargo, la compactación no solo responde a limitaciones espaciales, sino que cumple un papel esencial en la protección de material genético frente a agresiones físicas, químicas y enzimáticas. La organización del ADN en cromatina reduce drásticamente su accesibilidad a nucleasas endógenas y a agentes genotóxicos exógenos, como radicales libres, radiación ultravioleta o compuestos alquilantes, preservando así su integridad estructural y funcional. Esta protección es particularmente crítica durante eventos celulares vulnerables, como la mitosis, la meiosis o el tránsito del ADN en entornos extracelulares, donde el ADN desnudo es altamente susceptible a la degradación.^{6,7}

Además de su función protectora, la compactación del ADN desempeña un papel regulador crucial en la expresión génica. La cromatina no es una estructura estática; por el contrario, su grado de compactación es dinámico y determina la accesibilidad del ADN a los factores de transcripción y a la maquinaria transcripcional. Las regiones menos condensadas, denominadas eucromatina, son transcripcionalmente activas, mientras que las regiones altamente compactadas, como la heterocromatina, tienden a permanecer transcripcionalmente silentes. Este control está mediado por modificaciones postraduccionales de las histonas, como la acetilación, metilación, ubiquitinación y fosforilación, que actúan como señales moleculares para el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina. Estas modificaciones permiten una regulación epigenética precisa y reversible, esencial para procesos como la diferenciación celular, la plasticidad fenotípica, la respuesta al estrés y el mantenimiento de la identidad celular.^{8,9}

En un contexto fisiológico y biomédico más amplio, la compactación del ADN es también indispensable para su transporte eficiente. Un ejemplo paradigmático de esta función, lo constituye la espermatogénesis, ya analizado previamente, que pone de manifiesto como la organización densa del material genético permite su estabilidad estructural en entornos extracelulares y garantiza su entrega funcional durante la fertilización. Este principio ha sido aprovechado en biomedicina para el desarrollo de sistemas de transferencia génica. Tanto los vectores virales como los sistemas no virales (liposomas, nanopartículas, polímeros catiónicos) requieren compactar el ADN exógeno para mejorar su estabilidad en medios extracelulares, protegerlo de nucleasas plasmáticas, facilitar su internalización celular y promover su liberación nuclear eficiente una vez dentro del citoplasma.^{10,11} De este modo, la compactación del ADN no solo representa una estrategia evolutiva para salvaguardar la integridad del genoma, sino también un principio aplicable en el diseño racional de vectores terapéuticos y tecnologías emergentes como la edición génica basada en CRISPR-Cas9, en las que la eficiencia depende críticamente del estado estructural del material genético introducido.

1.4 Moléculas básicas de compactación: Protamina y Espermina

La compactación eficiente del ADN es un proceso esencial para la funcionalidad y estabilidad del genoma, particularmente en contextos celulares en los que se requiere una condensación extrema del material genético. Este proceso depende de la interacción con moléculas policationicas capaces de neutralizar la elevada carga negativa de la doble hélice de ADN, promoviendo su reorganización en estados conformacionales altamente ordenados. Entre estas moléculas destacan la protamina y la espermina, dos agentes de naturaleza y origen distintos, pero con funciones convergentes en la organización supramolecular del ADN. La protamina, como se mencionó anteriormente, es una proteína básica de bajo peso molecular, está presente de forma casi exclusiva en el núcleo de espermatozoides maduros. Su estructura primaria se caracteriza por una elevada proporción de residuos de arginina (hasta un 70%), cuyo grupo guanidinio confiere una carga positiva neta extremadamente alta a pH fisiológico. Esta riqueza en arginina dota a la protamina de una gran afinidad electrostática por los grupos fosfato del

ADN, lo que permite una interacción directa y cooperativa que induce el colapso de la fibra de cromatina en estructuras compactas de tipo toroidal o helicoidal, en las que la neutralización de la carga del ADN es casi completa. Además, la protamina es capaz de inducir un empaquetamiento térmica y químicamente estable, que maximiza la protección del genoma frente a daño oxidativo, hidrólisis y nucleasas extracelulares.¹²

Desde el punto de vista mecanístico, el proceso de compactación inducido por protamina no es meramente electrostático, sino que implica la formación de múltiples contactos específicos entre los residuos de arginina y el surco menor del ADN, así como la estabilización de la estructura compactada mediante interacciones cooperativas y enlaces puente tipo sal (*salt bridges*). El resultado es una estructura en la que la doble hélice se organiza en dominios densamente empaquetados, con una accesibilidad prácticamente nula a enzimas modificadoras de la cromatina, reflejando una estrategia biológica orientada a la inactividad transcripcional absoluta y a la protección estructural a largo plazo.

Por otro lado, la espermina —una poliamina natural de cadena lineal con cuatro grupos amino protonables— representa una estrategia molecular alternativa para inducir compactación del ADN. A diferencia de la protamina, la espermina no posee estructura proteica ni codificación genética, sino que es sintetizada a partir de la vía del metabolismo de la ornitina. Su estructura química, que incluye dos grupos amino primarios y dos secundarios separados por cadenas alifáticas flexibles, le permite adoptar múltiples conformaciones y establecer interacciones dinámicas con el ADN. Estas interacciones se basan en la neutralización parcial de la carga fosfato mediante puentes de iones multivalentes, fenómeno conocido como “*ion-bridging*” o colapso inducido por puentes salinos, el cual provoca la agregación local del ADN en estados de orden superior reversibles y dependientes de la concentración iónica del medio.¹³ A diferencia de la compactación rígida inducida por la protamina, la acción de la espermina permite transiciones reversibles entre estados de condensación y relajación del ADN, regulando el acceso a la maquinaria transcripcional en condiciones fisiológicas. De hecho, se ha observado que diferentes isómeros estructurales de espermina pueden modular el grado y la topología de la compactación, afectando selectivamente la eficiencia de transcripción génica *in vitro*, lo que sugiere un papel regulador adicional más allá de su función estructural.¹²

La comparación funcional entre protamina y espermina revela así dos estrategias divergentes pero complementarias de compactación del ADN. Mientras que la protamina representa un sistema altamente especializado y evolutivamente adaptado para la protección extrema del material genético en células germinales, la espermina actúa como un modulador fisiológico más versátil, con funciones tanto estructurales como reguladoras en múltiples tipos celulares. A nivel molecular, la protamina ejerce una compactación de alta densidad, basada en la sustitución total de las histonas y la exclusión del agua y proteínas accesorias del entorno nuclear. En contraste, la espermina mantiene una compatibilidad funcional con la maquinaria epigenética, facilitando una regulación dinámica de la organización del ADN. Además, en modelos de compactación artificial del ADN con fines terapéuticos, ambas moléculas han sido utilizadas como sistemas

modelo para explorar principios físicos y estructurales de empaquetamiento, siendo la protamina más adecuada para la estabilización a largo plazo de vectores génicos, mientras que la espermina ofrece ventajas en términos de control cinético de liberación y transcripción.¹³

Esta diferencia en el comportamiento estructural entre protamina y espermina también se refleja en las morfologías que adoptan los complejos ADN-policationes. En el caso de la protamina, su elevada densidad de carga y su afinidad específica por el surco menor del ADN inducen un colapso cooperativo de la doble hélice que da lugar a la formación de estructuras toroidales altamente organizadas. Estas configuraciones han sido visualizadas tanto en sistemas biológicos como en modelos in vitro mediante técnicas como la microscopía de fuerza atómica (AFM) y simulaciones moleculares. La *Figura 3* muestra un ejemplo representativo de esta interacción a nivel molecular, así como la formación de estructuras de ADN compactado.

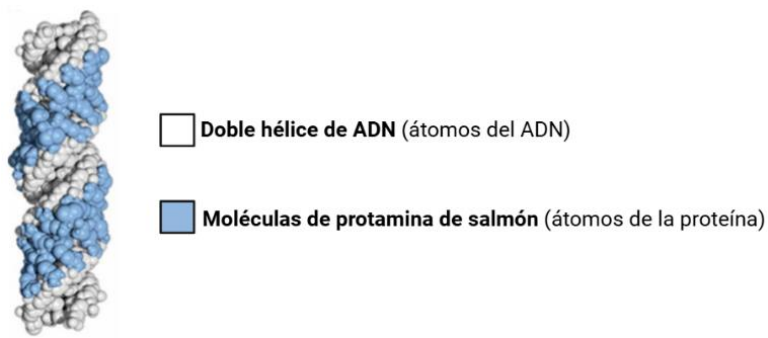


Figura 3. Unión de las moléculas de protamina en el surco principal del ADN, neutralizando el fosfodiéster del ADN.

Para completar la caracterización comparativa de ambos policationes, se presenta a continuación una tabla resumen (*Tabla 1*) en la que se destacan sus principales diferencias en cuanto a naturaleza química, origen, carga neta, y funcionalidad biológica. Esta distinción entre ambos agentes tiene implicaciones directas en su aplicabilidad como herramientas para la compactación artificial del ADN en contextos terapéuticos y experimentales.

Tabla 1. Comparación estructural y funcional entre la protamina y la espermina en la compactación del ADN.

PARÁMETRO CLAVE	PROTAMINA	ESPERMINA
Naturaleza Molecular	Proteína básica	Poliamina
Origen	Codificada genéticamente; expresada durante la espermatogénesis y presente en el núcleo de espermatozoides maduros.	Producto metabólico de la vía de la ornitina
Cargas +/-molécula	~20	4
Función principal	Protección genómica en espermatozoides	Modulación de estructura y expresión

1.5 Reversibilidad de la compactación por policationes naturales

Uno de los atributos más relevantes de la compactación del ADN mediada por policationes naturales como la espermina y, en menor medida, la protamina, es su potencial reversibilidad. A diferencia de otros policationes empleados en la formación de nanopartículas de ADN, las interacciones electrostáticas entre el ADN y espermina y protamina permite su desensamblaje controlado bajo condiciones fisiológicas.

Este carácter reversible se fundamenta en la naturaleza termodinámica de los complejos formados. La fuerza iónica del medio, la presencia de polianiones endógenos, los cambios de pH o la acción de proteínas competidoras pueden desencadenar la liberación del ADN una vez internalizado en el citoplasma o el núcleo celular. Este mecanismo contrasta con los vectores virales, que requieren proteólisis o procesos enzimáticos intracelulares para la liberación del ADN, y con sistemas lipídicos que pueden retener el ADN en compartimentos endosomales.¹²

Hay estudios que han demostrado que, si bien la protamina forma complejos altamente estables con el ADN, estos complejos no son permanentemente irreversibles. En condiciones adecuadas, como las que se encuentran en el entorno intracelular posterior a la fertilización o durante la activación génica, las proteínas empaquetadoras pueden ser desplazadas, facilitando así la descompactación progresiva del ADN. Esta liberación no ocurre de forma espontánea e inmediata, sino que requiere mecanismos activos que modulan las interacciones electrostáticas entre el ADN y el polication. En cambio, otros péptidos de menor tamaño o con menos dominios de anclaje muestran un comportamiento más lábil, con complejos menos estables y más fácilmente dissociables. Esta diferencia en estabilidad permite seleccionar agentes de compactación según el contexto de aplicación, equilibrando la necesidad de proteger el ADN durante su transporte con la necesidad de garantizar su posterior accesibilidad funcional.¹⁴

La reversibilidad de los complejos ADN-policationes constituye una ventaja estratégica en el contexto de la biomedicina y la nanotecnología, ya que permite modular el equilibrio entre protección estructural y accesibilidad funcional. En particular, la espermina ha demostrado ser capaz de formar complejos reversibles en función de su concentración y del entorno iónico, permitiendo una entrega controlada del ADN sin comprometer su integridad.¹²

1.6 Formación de toroides de ADN: implicaciones estructurales y funcionales

Las estructuras toroidales representan una de las formas más compactas y ordenadas que puede adoptar el ADN en presencia de agentes policationicos, y constituyen una manifestación física del empaquetamiento extremo del material genético. Su aparición ha sido ampliamente documentada en contextos fisiológicos, como en la cromatina espermática de organismos superiores, donde la protamina reemplaza a las histonas durante la espermatogénesis, dando lugar a dominios ADN-proteína organizados en toroides de aproximadamente 50–150 nm de diámetro.

Morfológicamente, los toroides consisten en anillos concéntricos de ADN enrollado helicoidalmente alrededor de un eje central, estabilizados por puentes salinos entre los grupos

fosfato del ADN y los residuos cargados positivamente de la protamina —principalmente argininas—. La estructura resultante presenta una simetría radial y una densidad de empaquetamiento muy superior a la de la cromatina somática. Este tipo de organización no es casual: confiere una protección excepcional frente a nucleasas, agentes oxidantes y variaciones del entorno osmótico, factores todos críticos para la conservación del genoma en el espermatozoide.¹⁵

Desde un punto de vista físico-químico, la formación de toroides implica un colapso cooperativo del ADN, que obedece a modelos termodinámicos de tipo “*coil-globule transition*”, en los cuales la energía libre del sistema se minimiza al pasar de un estado extendido a uno compacto. Estos modelos han sido validados tanto experimentalmente como mediante simulaciones computacionales, y son particularmente relevantes en el estudio de la compactación inducida artificialmente para aplicaciones biomédicas.¹⁶

En el ámbito de la nanotecnología del ADN, los toroides han sido adoptados como modelos de referencia para evaluar la eficacia de compactación de distintos agentes, así como su estabilidad coloidal, uniformidad morfológica y capacidad de protección del ADN frente a condiciones agresivas. Su observación *in vitro* mediante microscopía electrónica de transmisión constituye, por tanto, un indicador directo del éxito de los procesos de compactación, y una métrica estructural clave para el desarrollo de sistemas de entrega génica no viral.

Estudios recientes basados en simulaciones de dinámica molecular han revelado que, aunque los toroides muestran un alto grado de organización interna —con un patrón de empaquetamiento localmente hexagonal—, este orden ideal no se mantiene en todo el volumen del condensado. Durante el crecimiento del toroide, ya sea por enrollamiento adicional de la misma molécula o por incorporación de otras estructuras como espirales (*spindles*), pueden generarse defectos topológicos en el empaquetamiento, como el bien conocido defecto de cruce (*crossover defect*) y otros defectos inducidos por la formación de puentes moleculares. Estos defectos interrumpen la simetría hexagonal e introducen regiones de desorden que, no obstante, podrían tener implicancias funcionales en procesos de descompactación del ADN, como los que ocurren tras la fertilización.¹⁷

En este contexto, la *Figura 4* ilustra esquemáticamente el reemplazo progresivo de protaminas por histonas de origen materno tras la fecundación. Este proceso, altamente regulado, se acompaña de una reestructuración profunda de la cromatina espermática y una drástica disminución en los niveles de metilación global del ADN, marcando el inicio de la reprogramación epigenética del genoma paterno.

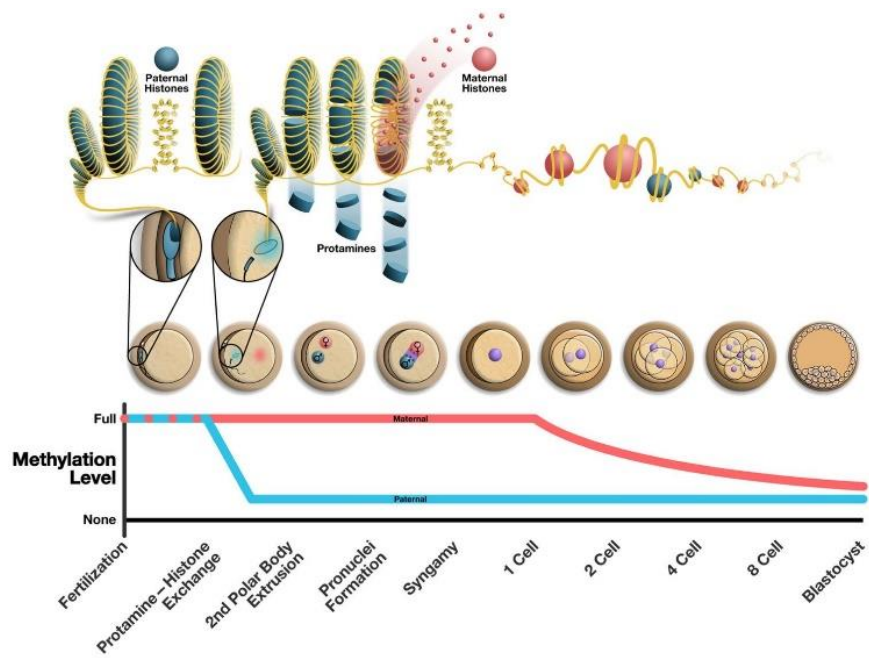


Figura 4. Remodelación de la cromatina espermática tras la fecundación.

Objetivos

El presente Trabajo de Fin de Máster tiene como objetivo general desarrollar una metodología de compactación eficiente y reproducible para moléculas de ADN de doble cadena, orientada a su potencial aplicación en el ámbito de la terapia génica. Esta estrategia busca establecer un sistema versátil capaz de generar complejos estables, funcionales y compactos, que puedan adaptarse a la manipulación de grandes fragmentos de ADN, facilitando su transporte y preservación en entornos extracelulares e intracelulares. La utilización del ADN del bacteriófago lambda (ADN λ) como modelo experimental permitirá definir los parámetros críticos del proceso y sentar las bases para su extrapolación a sistemas más complejos en futuras aplicaciones biomédicas. Este enfoque permite explorar en detalle las condiciones fisicoquímicas necesarias para formar complejos ADN-policationes estables y homogéneos, así como su posterior caracterización estructural mediante distintas técnicas complementarias.

Los objetivos específicos del trabajo son los siguientes:

- Emplear ADN λ , una molécula lineal de doble cadena con 48502 pares de bases, como sistema modelo para el estudio controlado de la compactación artificial de material genético.
- Evaluar y comparar la capacidad compactante de dos agentes policationicos naturales —protamina y espermina— en términos de eficiencia, estabilidad estructural y homogeneidad de los complejos formados.
- Determinar la relación estequiométrica óptima de cargas (N/P ratio) necesaria para inducir la compactación efectiva del ADN, mediante el ajuste preciso de la concentración de los agentes policationicos.
- Diseñar, optimizar y validar un protocolo experimental robusto y reproducible para la formación de complejos ADN-policationes, adaptable a distintos formatos experimentales.
- Caracterizar las propiedades morfológicas, estructurales y fisicoquímicas de los complejos generados utilizando técnicas complementarias como microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía confocal y dispersión de luz dinámica (DLS).
- Aplicar la metodología desarrollada a otras moléculas representativas de ADN de diferente tamaño y topología —incluyendo un plásmido circular de tamaño intermedio, así como fragmentos de ADN genómico de menor longitud— con el fin de evaluar la versatilidad, eficacia y aplicabilidad transversal del protocolo en distintos contextos moleculares.

2. Método Experimental

A continuación, se describen los materiales y procedimientos empleados en la compactación del ADN λ con policationes, así como las técnicas utilizadas para la caracterización de las muestras obtenidas.

2.1 Compactación del ADN del fago λ

2.1.1 Materiales y reactivos

Para llevar a cabo el proceso de compactación, se han utilizado los materiales y reactivos que se encuentran en la siguiente tabla (*Tabla 2*).

Tabla 2. Materiales y reactivos utilizados en el proceso de compactación

REACTIVO	PROVEEDOR / REF.	DESCRIPCIÓN Y USO
ADN λ	Thermo Fisher Scientific (Cat. SD0011)	ADN genómico de bacteriófago lambda, proporcionado a una concentración de 10 nM. Se utilizó directamente sin diluciones para garantizar la reproducibilidad experimental.
Protamina	Sigma-Aldrich (Cat. No. P3369)	Protamina de sulfato, disuelta en tampón Imidazol-KCl. A partir de esta disolución se prepararon soluciones stock y diluciones ajustadas según la relación de cargas (N/P) requerida para los experimentos de compactación.
Espermina	Sigma-Aldrich (Cat. No. S3256)	Espermina trihidrocloruro, disuelta en tampón Imidazol-KCl. Utilizada como agente policatiónico alternativo a la protamina para inducir la compactación del ADN mediante interacciones electrostáticas.
Buffer Tris-EDTA (TE)	Sigma-Aldrich	Tampón Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) preparado en agua ultrapura, utilizado para mantener estable el pH y proteger el ADN frente a posibles daños causados por iones metálicos presentes en la disolución.
Buffer imidazol-KCl	Sigma-Aldrich	Buffer compuesto por 10 mM imidazol y 150 mM KCl, preparado en agua ultrapura, utilizado para mantener la solubilidad y estabilidad electrostática de la protamina durante la interacción con el ADN.
ADN genómico de salmón	Sigma-Aldrich (Cat. No. 31149)	Fragmento de ADN genómico de salmón, de aproximadamente 154 pb. Utilizado como modelo de ADN de baja longitud. Se preparó una solución stock a 20 μ M por pesada y se diluyó a 10 nM para su uso en compactación con protamina y espermina.
ADN PLASMÍDICO PVAXHK70	Grupo Externo	Plásmido circular de doble cadena de 7342 pb de tamaño. Disuelto en agua ultrapura y utilizado tras dilución a 10 nM. Usado para evaluar la versatilidad del protocolo de compactación en moléculas de topología cerrada.

2.1.2 Preparación del ADN

Como se mencionó anteriormente, el ADN utilizado en los experimentos corresponde al ADN bacteriófago lambda (ADN λ), una molécula lineal de 48.5 kilobases ampliamente caracterizada y empleada como sistema modelo en estudios de compactación. Este ADN se adquirió en solución comercial a una concentración de 10 nM y se utilizó directamente sin dilución para garantizar la reproducibilidad y estabilidad durante el proceso experimental.

Para garantizar su estabilidad estructural y protegerlo frente a posibles procesos de degradación, el ADN fue manejado en condiciones de baja temperatura (4 °C) y mantenido en agua ultrapura.

Dado que el objetivo experimental era estudiar la compactación del ADN en función de la relación carga/carga entre el polianión (ADN) y los agentes policationicos (protamina o espermina), no se ajustaron diferentes concentraciones de ADN, sino que se mantuvo constante a lo largo del protocolo. Las condiciones experimentales se modificaron exclusivamente variando la concentración del agente de compactación, permitiendo así el análisis directo del efecto de diferentes proporciones estequiométricas sobre el empaquetamiento del ADN.

2.1.3 Protocolo de compactación

La compactación del ADN λ en este estudio se llevó a cabo mediante la formación de complejos polielectrolíticos con protamina o espermina, dos agentes de carga positiva capaces de neutralizar la elevada densidad de carga negativa del ADN. Este proceso se basa en interacciones electrostáticas entre los grupos fosfato del esqueleto del ADN y los grupos cargados de los agentes compactantes, lo que permite la reorganización del material genético en estados estructuralmente más condensados. El diseño experimental se centró en controlar de manera precisa la relación carga/carga (N/P ratio) entre el ADN y el agente de compactación, manteniendo constante la concentración de ADN a lo largo de todos los ensayos y modulando exclusivamente la cantidad del polication para evaluar su efecto sobre la formación y estabilidad de los complejos.

Desde un punto de vista estrictamente estequiométrico, se consideró la carga neta asociada a cada molécula de ADN λ y a cada molécula de agente compactante, con el fin de establecer una relación directa entre el número de cargas negativas disponibles en el ADN y el número de cargas positivas aportadas por la protamina o la espermina. El ADN λ es una molécula lineal de doble cadena de 48.5 kilobases, lo que implica la presencia de aproximadamente 48500 pares de bases. Dado que cada nucleótido aporta un grupo fosfato con carga negativa (-1), y que se trata de una molécula bicatenaria, la carga neta total por molécula de ADN λ se aproxima a 97000–100000 cargas negativas.

En contraste, una molécula de protamina contiene aproximadamente 20 residuos de arginina, todos ellos cargados positivamente a pH fisiológico, lo que le confiere una carga neta de +20 por molécula. La espermina, por su parte, es una poliamina de menor tamaño estructural, con cuatro

grupos amino protonables, y por tanto una carga neta de +4 por molécula. A partir de estos valores, se estimó la relación carga/carga (N/P ratio) mediante la siguiente expresión:

$$\frac{N}{P} = \frac{\text{cargas negativas (grupos fosfato del ADN } \lambda)}{\text{cargas positivas (residuos cargados del agente)}} = \frac{100000}{20} = 5000 \text{ (Protamina)}$$

$$\frac{N}{P} = \frac{100000}{4} = 25000 \text{ (Espermina)}$$

Es decir, en condiciones de neutralización estequiométrica completa, se requerirían aproximadamente 5000 moléculas de protamina o 25000 de espermina para neutralizar la carga de una única molécula de ADN λ .

Estas relaciones definen el punto de equivalencia estequiométrica en términos de carga, y constituyen el marco teórico sobre el cual se diseñaron las condiciones experimentales. En lugar de establecer simplemente relaciones molares genéricas, se adoptó un enfoque basado en la proporción precisa entre las cargas positivas y negativas reales presentes en cada especie molecular, lo que permitió un control más riguroso sobre el sistema. De este modo, se definieron distintas relaciones N/P ajustadas sobre la base del número efectivo de cargas, lo que garantiza una aproximación más exacta a los fenómenos fisicoquímicos implicados en la compactación.

2.1.4 Desarrollo y optimización experimental

Una vez establecida la relación de cargas entre los componentes del sistema, basada en la estequiometría entre los grupos fosfato del ADN λ y los grupos amino de los agentes compactantes, se procedió a definir experimentalmente los volúmenes y concentraciones necesarios para llevar a cabo la formación de complejos. El objetivo fue traducir las relaciones teóricas (5000:1 para protamina y 25000:1 para espermina) en condiciones experimentales prácticas, que permitieran generar mezclas reproducibles y cuantificables a escala de laboratorio.

Las primeras pruebas se llevaron a cabo empleando exclusivamente protamina, con el fin de poner a punto el procedimiento experimental: preparación de diluciones, mezcla con ADN, condiciones de incubación y manipulación de las muestras. Como punto de partida se utilizó directamente la disolución comercial de ADN λ , a una concentración de 10 nM, sin realizar diluciones previas. Para respetar la proporción de cargas establecida y evitar modificar la concentración del ADN, se determinó que la concentración de protamina debía ser de 50 μ M, resultado de multiplicar la concentración del ADN (10 nM) por el factor de carga 5000. Con el fin de minimizar errores derivados de la preparación por pesada de nuevas disoluciones concentradas, se empleó una solución de protamina ya disponible en el laboratorio, previamente preparada a 2 mM en tampón Imidazol-KCl. A partir de esta disolución se generó la concentración deseada de 50 μ M aplicando la ecuación de dilución estándar:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Siendo:

$C_1 = 2 \text{ mM}$ (concentración inicial de protamina),

$C_2 = 50 \text{ } \mu\text{M}$ (concentración final deseada),

$V_2 = 1 \text{ mL}$ (volumen final deseado).

Despejando:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{50 \text{ } \mu\text{M} \cdot 1000 \text{ } \mu\text{L}}{2000 \text{ } \mu\text{M}} = 25 \text{ } \mu\text{L}$$

Por tanto, se añadieron 25 μL de la disolución de protamina a 2 mM y se completó con 975 μL de tampón Imidazol-KCl hasta un volumen total de 1 mL, obteniéndose así una solución a 50 μM .

Una vez definidas las concentraciones molares de trabajo, tanto para el ADN λ (10 nM) como para la protamina (50 μM), se procedió a establecer los volúmenes necesarios para llevar a cabo la compactación. Dado que esta fase del trabajo representaba el primer intento experimental de formar complejos ADN–protamina bajo estas condiciones, se diseñaron ensayos paralelos con el objetivo de evaluar la viabilidad del proceso en distintos volúmenes totales de reacción.

Concretamente, se plantearon dos pruebas iniciales con volúmenes finales de 25 μL y 50 μL , respectivamente. Ante la incertidumbre sobre cuál sería la proporción volumétrica más adecuada entre los dos componentes, se optó por una distribución equimolar en términos de volumen, como punto de partida lógico y simétrico. Es decir, para el ensayo de 25 μL totales, se mezclaron 12.5 μL de ADN λ con 12.5 μL de la disolución de protamina a 50 μM , mientras que en el ensayo de 50 μL totales, se utilizaron 25 μL de ADN λ y 25 μL de protamina a 50 μM .

Este enfoque inicial, basado en proporciones iguales, permitió evaluar de manera preliminar la formación de complejos sin introducir sesgos derivados de la manipulación de volúmenes desbalanceados, especialmente en un sistema aún no optimizado.

A partir de las diferentes pruebas de caracterización realizadas posteriormente sobre la muestra generada con un volumen total de 50 μL , se constató la necesidad de introducir ajustes en el procedimiento con el fin de optimizar la calidad de los sistemas compactados. Concretamente, se concluyó que era conveniente incrementar el volumen de la solución de protamina, diluyendo así la muestra y favoreciendo un entorno más adecuado para la formación de complejos estables y reproducibles.

En este nuevo planteamiento experimental se mantuvo constante el volumen de ADN λ a 25 μL , pero se modificó la proporción de los demás componentes. Previamente a la adición del agente de compactación, se incorporaron 15 μL de tampón Tris-HCl (10 mM, pH 7.5), utilizado para estabilizar el ADN y mantener el pH del medio en condiciones óptimas durante el proceso de compactación. Este tampón actúa como regulador ácido-base, evitando desviaciones bruscas del pH que podrían afectar tanto la integridad del ADN como la eficiencia de interacción con la protamina.

Tras la adición del tampón, se incorporaron 160 μL de protamina (a la misma concentración de 50 μM) diluida a la concentración previamente establecida, completando así un volumen final de 200 μL por muestra. Esta estrategia (*Figura 5*) permitió trabajar en un sistema más diluido, lo que se tradujo en condiciones experimentales más estables y en una mejora sustancial en la formación de complejos, tal como se evidenciaría posteriormente en las técnicas de caracterización.

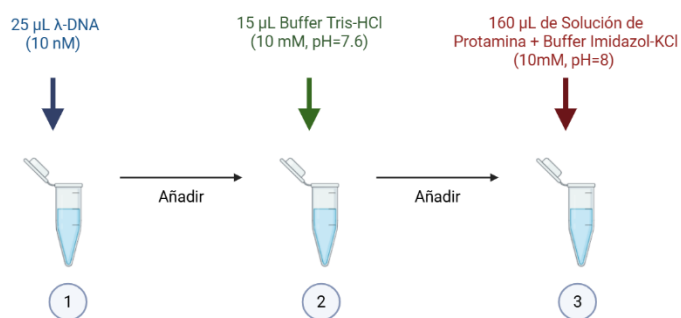


Figura 5. Esquema representativo de la preparación inicial con la adición secuencial de ADN λ , tampón Tris-HCl y protamina en tubos Eppendorf.

Una vez preparadas las mezclas con las cantidades indicadas de ADN λ , tampón Tris-HCl y protamina, las muestras se incubaron en un termoagitador a velocidad constante de 10000 revoluciones por minuto (rpm) y temperatura ambiente controlada de aproximadamente 22.5 °C. La incubación tuvo una duración fija de 30 minutos, condiciones que se mantuvieron tanto para los volúmenes totales de 50 μL como de 200 μL . Este paso (*Figura 6*) es fundamental para favorecer la interacción electrostática entre el ADN y la protamina, promoviendo la formación de complejos compactados homogéneos y estables.

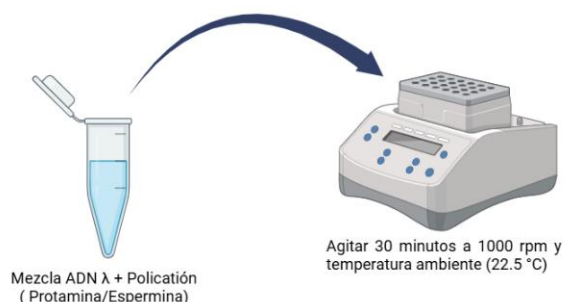


Figura 6. Incubación en termoagitador para favorecer la formación de complejos compactados.

A partir de esta última modificación en el protocolo, que incluía el aumento del volumen total y la incorporación previa de tampón Tris-HCl, se obtuvo una mejora notable en la estabilidad y homogeneidad de las muestras. Esta formulación ajustada se aplicó inicialmente en una única preparación, que mostró un comportamiento significativamente más favorable que las condiciones anteriores.

Con el fin de comprobar la reproducibilidad y robustez del procedimiento, este último protocolo fue replicado en tres ensayos adicionales bajo las mismas condiciones experimentales. En todos los casos se obtuvieron resultados consistentes y comparables con los de la primera preparación, lo que permitió validar el método como una estrategia fiable y efectiva para la compactación del ADN λ . Esta versión optimizada del protocolo fue, por tanto, la que se adoptó como referencia para todas las caracterizaciones posteriores.

Este conjunto de pruebas permitió refinar progresivamente el procedimiento de compactación hasta establecer una metodología reproducible y eficiente. La tabla siguiente (*Tabla 3*) recoge de forma resumida las condiciones experimentales empleadas en las tres configuraciones principales evaluadas durante el desarrollo del protocolo, incluyendo los volúmenes, concentraciones y componentes utilizados en cada caso.

Tabla 3. Condiciones experimentales utilizadas en el proceso de compactación del ADN λ con protamina.

Experimento	CONDICIONES DE λ -DNA EN EL EXPERIMENTO			CONDICIONES DE PROTAMINA EN EL EXPERIMENTO			Volumen Total de Muestra (μ l)
	Concentración Stock	Vol. Stock λ -DNA (μ l)	Vol. Tris-HCl (10 nM) (μ l)	Concentración Stock	Dilución para obtener [50 μ M]	Vol. Stock [50 μ M] (μ l)	
1	10 nM	12.5	-	2 mM	25 μ L Prot. Stock + 975 μ L Imidazol-KCl	12.5	25
2	10 nM	25	-	2 mM	25 μ L Prot. Stock + 975 μ L Imidazol-KCl	25	50
3	10 nM	25	15	2 mM	25 μ L Prot. Stock + 975 μ L Imidazol-KCl	160	200

Aunque el procedimiento descrito y representado en la *Figura 5* hace referencia al caso específico de la protamina, el mismo protocolo fue aplicado sin modificaciones estructurales para la compactación con espermina, variando únicamente la relación de cargas positiva/negativa correspondiente. La puesta a punto del método se realizó inicialmente utilizando protamina como agente modelo, debido a su mayor carga neta, y posteriormente se adaptó de forma directa al uso con espermina para evaluar la versatilidad del protocolo.

2.2 Caracterización de los complejos ADN λ -policationes

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la compactación del ADN λ mediante protamina y espermina, se procedió a la caracterización de los complejos generados con el objetivo de evaluar su morfología, estabilidad y grado de condensación. Para ello, se emplearon distintas técnicas complementarias de análisis, que permitieron abordar la caracterización desde

una perspectiva tanto cualitativa como cuantitativa. Entre ellas se incluyeron métodos de microscopía con distintos niveles de resolución, así como técnicas de análisis físico basadas en la dispersión de la luz. A continuación, se describen las metodologías empleadas para cada una de las técnicas aplicadas al estudio de los sistemas formados.

2.2.1 Evaluación preliminar mediante microscopía de fluorescencia (ZOE™)

Dado que esta era la primera vez que se realizaban ensayos de compactación con este sistema en el laboratorio, existía incertidumbre respecto a si las condiciones iniciales empleadas generarían estructuras compactadas detectables, o si, por el contrario, las muestras mantendrían el ADN en estado libre o completamente disperso. En este contexto, y sin disponer aún de información sobre la eficiencia del proceso, se optó por realizar una primera evaluación de las muestras mediante tinción fluorescente y visualización en el sistema de imagen ZOE™.

Para ello, se tomaron 3 μL de cada una de las muestras preparadas (complejos ADN-polición), y se añadió 1 μL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). El DAPI es un fluoróforo que se intercala específicamente en las regiones ricas en adenina y timina del ADN bicatenario, permitiendo su detección por fluorescencia. Al excitarse con luz ultravioleta, emite una señal intensa en el canal de fluorescencia azul, lo que permite confirmar la presencia de ADN en la muestra.

Estas muestras teñidas se depositaron sobre portaobjetos y se analizaron utilizando el sistema ZOE™ Fluorescent Cell Imager, observando específicamente la emisión en el canal azul. Aunque este sistema no proporciona información estructural detallada ni permite evaluar la compactación con precisión, resultó útil como primera aproximación para verificar la presencia de ADN tras la mezcla con protamina. Se consideró un criterio básico de validación el hecho de que la fluorescencia se detectara únicamente en el canal azul, sin señales significativas en los canales rojo o verde, lo cual indicaría la ausencia de residuos no específicos o contaminación externa.

Este análisis preliminar sirvió como paso de control para confirmar que las muestras contenían ADN detectable tras el tratamiento, permitiendo así continuar con técnicas de caracterización más específicas y resolutorias.

Cabe destacar que, el protocolo de tinción de muestras fue idéntico para todos los casos, independientemente del tipo de ADN o agente de compactación empleado. Además, aunque inicialmente se prepararon complejos en volúmenes finales de 25 μL y 50 μL , solo se caracterizaron mediante ZOE las muestras de 50 μL , ya que las de menor volumen no ofrecían una señal de fluorescencia visible ni una morfología interpretable en el plano focal. Esta limitación se atribuye probablemente a una menor densidad de complejos sobre el portaobjetos, dificultando la visualización y justificando su exclusión de los análisis posteriores.

2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) es una técnica de caracterización estructural que permite observar directamente la morfología, tamaño y organización de nanoestructuras con una resolución muy superior a la de las técnicas ópticas

convencionales. Su principio se basa en el paso de un haz de electrones a través de una muestra ultrafina, lo que permite formar imágenes a escala nanométrica basadas en las diferencias de densidad electrónica de los componentes.

En el contexto de este trabajo, el TEM se empleó como técnica esencial para analizar la estructura real de los complejos formados entre el ADN λ y los agentes de compactación, así como su estado de agregación o dispersión. A diferencia de otras técnicas complementarias, el TEM ofrece una visualización directa del sistema, lo que lo convierte en una herramienta crítica para confirmar la presencia de estructuras compactadas, su tamaño individual, su distribución y su nivel de organización. Si bien otras metodologías pueden sugerir la formación de agregados o partículas por inferencia (fluorescencia, DLS, etc.), el TEM proporciona evidencia visual inequívoca, lo que le confiere un valor especialmente relevante en estudios de compactación de material genético.

La preparación de las muestras para TEM se realizó siguiendo un protocolo específico optimizado para sistemas basados en ADN. En primer lugar, se empleó una placa de tinción multipocillo como superficie de trabajo, sobre la que se colocó un fragmento de *parafilm* recortado circularmente. Sobre este se dispuso una rejilla metálica (*grid*) recubierta con una película de carbono, que constituye la cara activa para la retención de la muestra y sobre la cual se realiza la observación.

En un tubo Eppendorf aparte se mezclaron 9 μL de etanol absoluto con 1 μL de muestra, y de esa disolución se depositaron 7 μL sobre la superficie de la rejilla. Esta deposición se realizó siempre sobre la cara recubierta con carbono del *grid*, que es la que proporciona soporte adecuado para la observación electrónica y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Dado que el ADN presenta bajo contraste electrónico de forma natural, se aplicó una tinción negativa con acetato de uranilo preparada previamente en el laboratorio, lo que permite aumentar el contraste de las estructuras biológicas sin alterar su morfología. Para ello, se colocaron sobre un nuevo fragmento de *parafilm* una gota (10 μL) de solución de uranilo y a continuación cuatro gotas consecutivas de agua destilada (también de 10 μL cada una) para el enjuague secuencial.

La rejilla fue colocada con la cara de carbono hacia abajo, primero sobre la gota de uranilo durante 1 minuto, y posteriormente trasladada de forma sucesiva sobre cada una de las gotas de agua destilada, también durante 1 minuto por paso, para eliminar el exceso de agente de tinción. Finalizado este proceso, la rejilla se dejó secar otras 24 horas a temperatura ambiente, con la superficie activa hacia arriba, hasta su completa deshidratación. Las muestras así preparadas quedaron listas para su análisis mediante TEM.

Como parte del diseño experimental, se incluyeron controles negativos consistentes en ADN λ sin compactar (disuelto en tampón Tris-EDTA) y protamina sola (disuelta en tampón Imidazol-

KCI), los cuales también fueron analizados mediante TEM para comparar su morfología individual frente a los complejos obtenidos tras la compactación.

2.2.3 Microscopía confocal

La microscopía confocal es una técnica de imagen avanzada que permite obtener imágenes con alta resolución espacial y excelente contraste, gracias a la eliminación del desenfoque procedente de planos fuera del foco. A diferencia de la microscopía de fluorescencia convencional, el sistema confocal utiliza un láser como fuente de excitación y un *pinhole* (pequeña apertura) que bloquea la luz proveniente de otras profundidades del espécimen, generando así imágenes ópticamente seccionadas de una muestra tridimensional.

En el presente estudio, la microscopía confocal se empleó como herramienta complementaria para visualizar la distribución y organización del ADN λ compactado, utilizando la señal fluorescente generada tras la tinción con DAPI. Esta técnica permitió obtener información sobre la presencia, localización y morfología de las estructuras fluorescentes asociadas al ADN en un único plano focal, reduciendo el ruido de fondo y mejorando la calidad de la imagen. Además, ofrece la posibilidad de realizar reconstrucciones tridimensionales mediante apilamiento de secciones ópticas, aunque en este caso el objetivo principal fue la visualización clara de los complejos fluorescentes.

Para la preparación de las muestras, se siguió un protocolo estándar adaptado a muestras teñidas con DAPI. Como se mencionó anteriormente, la tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) permite la detección específica de ADN bicatenario, dado que el fluoróforo se intercala en regiones ricas en adenina y timina y emite fluorescencia intensa en el canal azul tras excitación con luz ultravioleta.

La muestra teñida se depositó sobre un portaobjetos de vidrio estéril, y se fijó añadiendo 3 μ L de medio de montaje, que estabiliza la preparación y previene el secado. A continuación, se colocó cuidadosamente un cubreobjetos sobre la gota, evitando la formación de burbujas de aire y asegurando el contacto uniforme entre la muestra y la superficie del cubreobjetos.

Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio confocal láser, seleccionando el canal de fluorescencia azul correspondiente al espectro de emisión del DAPI. Esta metodología permitió confirmar la presencia de ADN en las muestras compactadas y analizar la distribución espacial de los complejos, aportando una perspectiva complementaria a las técnicas electrónicas y de dispersión óptica empleadas en este trabajo.

2.2.4 Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de partículas en suspensión, especialmente en el rango de tamaño nanométrico. Su principio se basa en la medición de las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada cuando un haz láser

incide sobre una muestra con partículas en movimiento browniano. A partir del análisis de estas fluctuaciones, el sistema permite determinar el tamaño hidrodinámico medio de las partículas y su distribución en el medio dispersante.

En el contexto de este trabajo, la DLS se empleó como técnica complementaria para evaluar la homogeneidad y estabilidad coloidal de los complejos formados entre el ADN λ y los agentes de compactación. Esta técnica permite obtener dos parámetros clave para el análisis del sistema: el Z-Average y el índice de polidispersidad (PI, del inglés *polydispersity index*). El Z-Average representa el tamaño medio hidrodinámico de las partículas en suspensión (en nanómetros), mientras que el PI proporciona información sobre el grado de dispersión de tamaños en la muestra. Un valor de PI próximo a 0.1–0.3 indica una población relativamente monodispersa, mientras que valores más altos (> 0.5) reflejan una mayor heterogeneidad, generalmente asociada a fenómenos de agregación o inestabilidad del sistema.

Para llevar a cabo las mediciones, se preparó cada muestra en una cubeta específica para DLS, añadiendo 1000 μL de agua ultrapura previamente filtrada mediante filtro de 0.22 μm , a lo que se incorporó 1 μL de la muestra compactada. Esta dilución permite reducir el índice de refracción del sistema y minimizar la interferencia por múltiples eventos de dispersión. La cubeta se introdujo en el equipo de análisis, donde se ajustaron los parámetros instrumentales en función de las condiciones fisicoquímicas del disolvente y de la naturaleza del analito.

El software del sistema proporciona como salida principal una gráfica de distribución de tamaño de partículas, junto con una tabla resumen que incluye el valor de Z-Average (en nm) y el PI. Estos datos fueron empleados para evaluar la calidad de las formulaciones y detectar la presencia de agregados, así como para comparar la uniformidad de los distintos complejos ADN-policonaciones generados bajo diferentes condiciones experimentales.

2.3 Compactación de otras moléculas de ADN

Con el fin de evaluar la versatilidad y reproducibilidad del protocolo optimizado de compactación, se decidió extender su aplicación a otras moléculas de ADN con tamaños moleculares distintos al ADN λ . Esta estrategia experimental permitió comprobar si el método era eficaz no solo para ADN de gran tamaño, sino también para moléculas de tamaño intermedio y pequeño. Para ello, se seleccionaron dos nuevos modelos: un plásmido circular de tamaño intermedio (~ 7 kb) y fragmentos de ADN genómico de salmón, de tamaño significativamente menor (154 pb). Ambos fueron sometidos al mismo procedimiento de compactación desarrollado previamente, manteniendo las condiciones experimentales y el análisis mediante las técnicas de caracterización estructural más resolutivas.

2.3.1 Compactación de ADN plasmídico

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad del protocolo de compactación desarrollado con ADN λ a otros tipos de material genético, se utilizó como modelo un plásmido circular doble hebra

denominado pVAXHK70. Este plásmido, de 7342 pares de bases, fue diseñado y sintetizado por un grupo colaborador del Departamento de Nanomedicina, y su secuencia completa no ha sido publicada. No obstante, su estructura y topología son representativas de los plásmidos utilizados habitualmente en estrategias de transferencia génica y vacunación ADN, por lo que constituye un modelo molecular relevante para validar la versatilidad del método.

Dado que se trata de una molécula de doble cadena, el número total de grupos fosfato —y, por tanto, de cargas negativas— asciende a 14684, que se redondearon a 15000 para los cálculos estequiométricos. Al igual que en los experimentos realizados con ADN λ , se utilizó este valor para establecer la relación de cargas entre el ADN y la protamina.

A partir de este valor, se calcularon las relaciones de carga con los policationes empleados en el estudio. En primer lugar, se utilizó protamina, considerando una carga neta de +20 por molécula, lo que define una relación inicial de cargas negativas/positivas según la siguiente expresión:

$$\frac{15000 \text{ cargas negativas del ADN}}{20 \text{ cargas positivas por molécula de protamina}} = 750:1$$

Posteriormente, se procedió a calcular la molaridad de la solución de ADN plasmídico disponible, cuya concentración era de 2.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Aplicando la fórmula:

$$\text{Molaridad (M)} = \frac{\text{Concentración (g/L)}}{\text{Masa Molecular (g/mol)}}$$

$$\text{Molaridad} = \frac{2.6 \text{ g/L}}{4.77 \cdot 10^6 \text{ g/mol}} = 545 \text{ nM}$$

Donde se estima la masa molecular del plásmido en $4.82 \times 10^6 \text{ g/mol}$ (basado en un peso medio de 660 g/mol por par de bases multiplicado por 7342 pb).

Esta concentración tan elevada representa un entorno altamente denso de ADN, lo que podría dificultar la compactación efectiva debido a la proximidad entre cadenas y la posible repulsión estérica. Por ello, se procedió a diluir el plásmido hasta una concentración similar a la utilizada previamente con ADN λ (10 nM), con el objetivo de trabajar bajo condiciones experimentales equivalentes. La nueva concentración seleccionada fue de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, y la molaridad correspondiente se recalculó como:

$$\text{Molaridad (M)} = \frac{50 \cdot 10^3 \text{ g/L}}{4.77 \cdot 10^6 \text{ g/mol}} = 10.5 \text{ nM}$$

Para preparar una solución de trabajo con esta concentración a partir de un stock disponible de protamina a 50 μM , se utilizó la fórmula de dilución:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{7.8 \mu\text{M} \cdot 500 \mu\text{L}}{50 \mu\text{M}} = 78.75 \mu\text{L}$$

Así, se mezclaron 78.75 μL del stock de protamina con 421.25 μL de buffer Imidazol-KCl para obtener un volumen final de 500 μL a una concentración de 7.8 μM , que permitía mantener la relación de cargas deseada frente al ADN plasmídico.

El procedimiento de compactación seguido con el plásmido pVAXHK70 fue análogo al descrito previamente para el ADN λ (apartado 2.1.4), con adaptación específica de las concentraciones para mantener la relación de cargas establecida. Se respetaron los mismos tiempos de incubación, condiciones de mezcla y volumen de reacción.

Del mismo modo, la caracterización de los complejos formados se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión y dispersión de luz dinámica. Asimismo, la preparación de las muestras para ambas técnicas analíticas fue idéntica a la utilizada con el ADN λ , conforme a lo descrito en los apartados 2.2.2 y 2.2.4, respectivamente. Esta homogeneidad metodológica permite una comparación directa entre los distintos modelos de ADN analizados en este estudio.

2.3.2 Compactación de ADN de salmón

Como modelo de ADN de bajo tamaño molecular se utilizó ADN genómico fragmentado de salmón, de longitud media estimada en 154 pares de bases. Al tratarse de una molécula de doble cadena, el número total de grupos fosfato, y por tanto de cargas negativas, es de 308 por molécula.

A partir de este valor, se calcularon las relaciones teóricas de carga frente a los agentes policationicos utilizados. En el caso de la protamina (20 cargas positivas por molécula), la relación inicial es:

$$\frac{308 \text{ cargas negativas del ADN}}{20 \text{ cargas positivas por molécula de protamina}} = 16:1$$

Para la espermina (4 cargas positivas por molécula), la relación estequiométrica es:

$$\frac{308 \text{ cargas negativas del ADN}}{4 \text{ cargas positivas por molécula de espermina}} = 77:1$$

Una vez establecidas las relaciones de carga, se procedió a la preparación de un stock concentrado de ADN de salmón. Se diseñó una solución madre de 20 μM , que serviría como punto de partida para futuras diluciones. Dado que el stock debía prepararse por pesada, se aplicó la fórmula general de la molaridad:

$$\text{Molaridad (M)} = \frac{\text{Masa (g)}}{\text{Volumen (L)} \cdot \text{Peso Molecular (g/mol)}}$$

Despejando la masa:

$$\text{Masa (g)} = \text{Molaridad} \cdot \text{Volumen} \cdot \text{Peso Molecular}$$

Considerando un peso molecular medio de 101640 g/mol para 154 pb (154×660 g/mol), se obtiene una masa de 30 mg. Así, se pesaron 30 mg de ADN de salmón y se añadieron a un tubo Eppendorf con 18 mL de buffer Tris-HCl-EDTA. La mezcla se agitó suavemente hasta su completa disolución, y posteriormente se ajustó el volumen a 20 mL con el mismo buffer.

Para asegurar la comparabilidad con los modelos anteriores, el ADN se diluyó a una concentración de trabajo de 10 nM, mediante una dilución 1:2000 a partir del stock de 20 μM . Esta concentración se mantuvo constante en todos los ensayos de compactación.

A partir de esta concentración de ADN (10 nM) y las relaciones de carga previamente definidas, se calcularon las concentraciones necesarias de protamina y espermina para inducir la compactación. En el caso de la protamina, se trabajó con una concentración final de 0.154 μM , preparada a partir de un stock de 20 μM . Para la espermina, la concentración necesaria fue de 0.77 μM , también diluida desde un stock de 20 μM . En ambos casos, los volúmenes de dilución se ajustaron para preparar soluciones de 1 mL totales, de acuerdo con los requerimientos del protocolo general de compactación.

El procedimiento de compactación aplicado al ADN de salmón siguió exactamente el mismo protocolo descrito previamente para el plásmido pVAXHK70 y el ADN λ (apartado 2.1.4), manteniendo constantes tanto los tiempos de incubación como las condiciones experimentales. Asimismo, la caracterización de los complejos obtenidos se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión y dispersión de luz dinámica. La preparación de las muestras para ambas técnicas analíticas también fue idéntica a la descrita en los apartados 2.2.2 y 2.2.4, respectivamente.

3. Resultados

En este apartado se presentan los resultados obtenidos tras la compactación del ADN bacteriófago lambda (ADN λ) mediante los agentes policationicos protamina y espermina, empleando distintas técnicas de caracterización.

3.1 Evaluación preliminar de la compactación con protamina en condiciones iniciales

Como se describió en el apartado metodológico, esta fue la primera condición experimental ensayada para evaluar la capacidad de compactación del ADN λ mediante protamina. Esta prueba preliminar, realizada con un volumen total de 50 μ L, permitió identificar limitaciones importantes y sirvió como base para el posterior ajuste y optimización del protocolo definitivo.

3.1.1 Microscopía de fluorescencia (ZOE™)

La primera aproximación a la caracterización de la muestra se realizó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el sistema ZOE™, con el objetivo de confirmar la presencia de ADN tras el proceso de compactación. Como se describió en el apartado metodológico, las muestras fueron teñidas con DAPI, un fluorocromo que se une de forma específica a regiones ricas en A-T del ADN bicatenario y emite fluorescencia en el canal azul al ser excitado con luz ultravioleta.

Esta técnica, aunque limitada en resolución, resultó útil para verificar de forma rápida y preliminar si el ADN seguía presente en la muestra tras la formación de complejos con protamina. En el caso de la muestra correspondiente al protocolo de 50 μ L totales, la imagen obtenida mostraba una distribución abundante y homogénea de señales fluorescentes en el canal azul. Esta visualización (*Figura 7*) permitió confirmar la presencia de material genético tras el proceso de compactación.

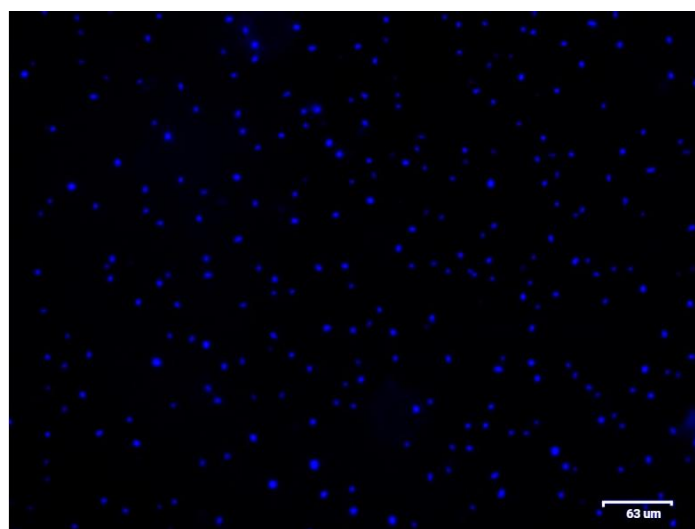


Figura 7. Imagen de microscopía de fluorescencia (ZOE™) del ADN λ compactado con protamina en condiciones preliminares (volumen total 50 μ L), teñido con DAPI y visualizado en el canal azul.

3.1.2 Microscopía confocal

La caracterización mediante microscopía confocal se realizó para complementar la evaluación preliminar de la compactación del ADN λ con protamina en la condición inicial de 50 μL . Aunque esta técnica ofrece mayor resolución y permite observar la distribución espacial del ADN teñido con DAPI, las imágenes obtenidas evidenciaron una muestra con notable presencia de suciedad y falta de uniformidad.

La imagen representativa obtenida mediante microscopía confocal, acompañada de la correspondiente gráfica de tamaño de partícula, se muestra en la *Figura 8*. En esta, se observan estructuras compactadas visibles, identificadas como puntos fluorescentes, cuyo tamaño medio aproximado fue estimado en torno a 1 μm . Sin embargo, también se aprecia una presencia significativa de partículas no específicas y la formación ocasional de estructuras anulares dentro del campo visual.

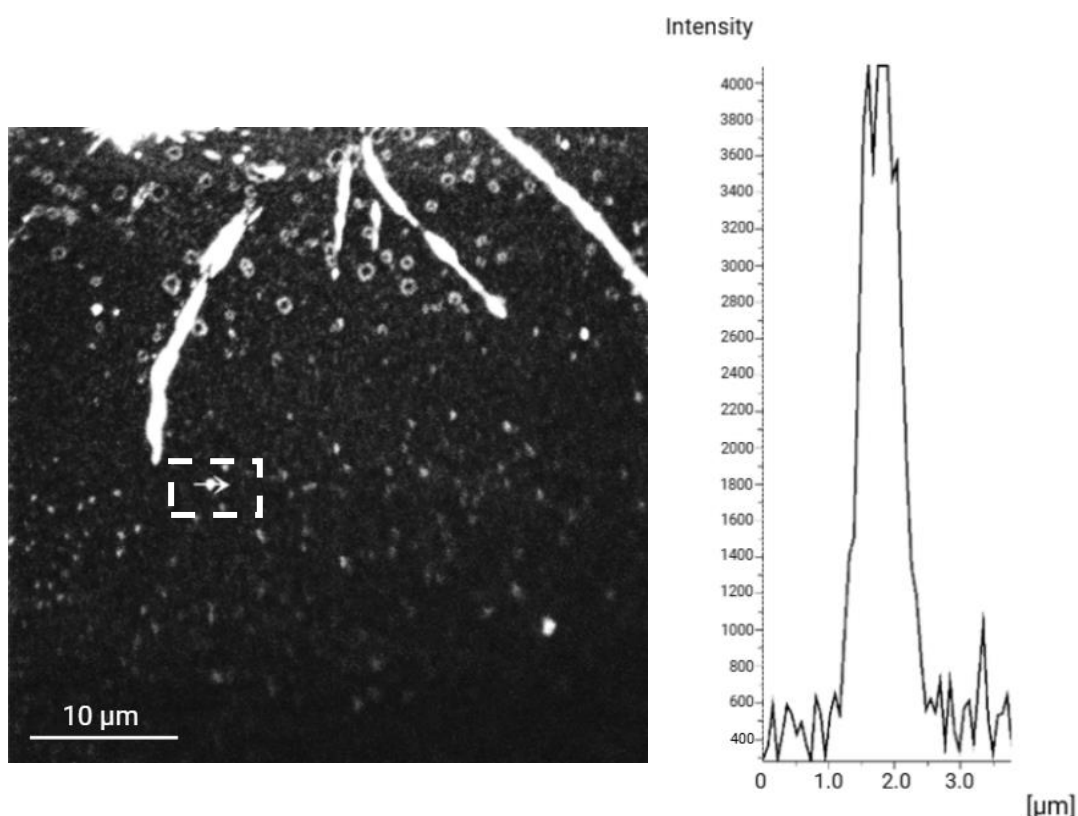


Figura 8. Imagen obtenida por microscopía confocal de los complejos del ADN λ compactado con protamina y teñido con DAPI. El gráfico muestra el tamaño (aproximadamente 1 μm) y la intensidad de fluorescencia de la partícula atravesada por la flecha en la imagen confocal (en el box).

3.1.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Como se mencionó previamente, la microscopía electrónica de transmisión constituye una técnica fundamental para la caracterización estructural de los complejos formados entre el ADN λ y los agentes compactantes. A diferencia de las técnicas ópticas, el TEM permite obtener imágenes con una resolución nanométrica, lo que facilita la observación detallada de la morfología, tamaño y organización de las partículas en la muestra.

Tras la observación de la muestra compactada con protamina, se evidenció una distribución notablemente heterogénea de partículas, con tamaños y formas variadas a lo largo del campo visual. Como se muestra en la *Figura 9*, estas estructuras compactadas presentan un rango amplio de tamaños que abarca desde aproximadamente 30 nm hasta 90 nm, reflejando una compactación irregular y poco uniforme bajo estas condiciones experimentales.

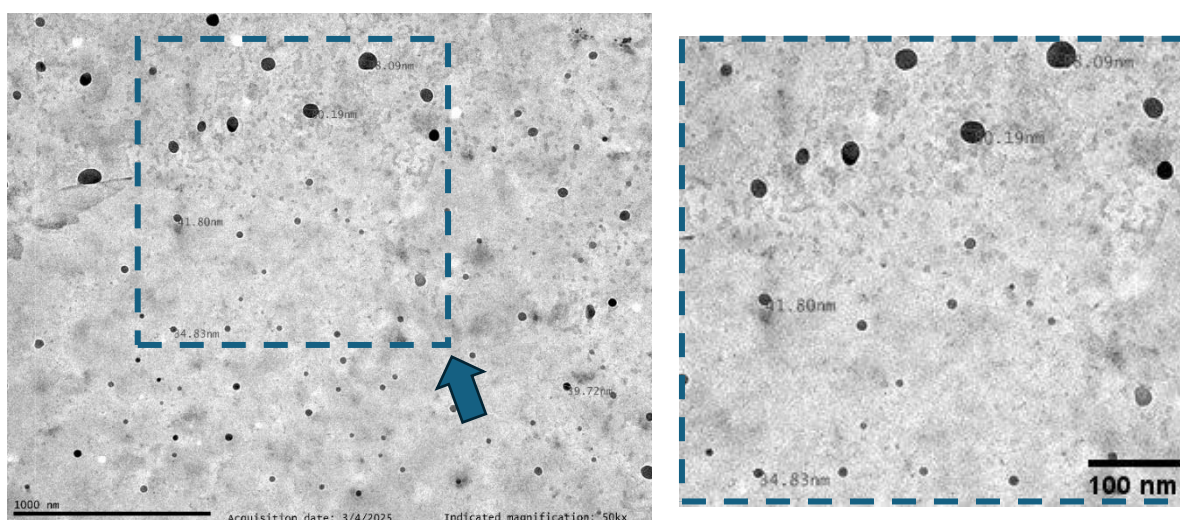


Figura 9. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostrando la distribución heterogénea de tamaños de partículas de ADN λ compactado con protamina.

Uno de los hallazgos más relevantes y destacables en la observación mediante TEM fue la formación recurrente de estructuras anulares, conocidas como toroides (*Figura 10*).

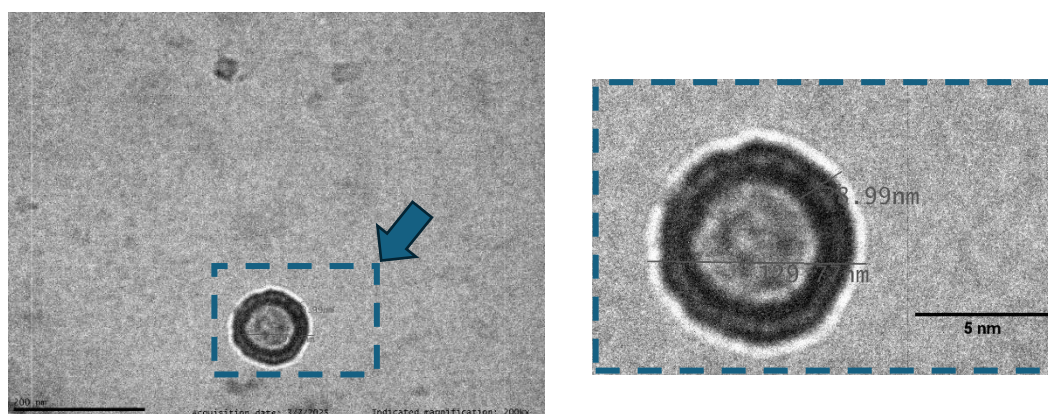


Figura 10. Micrografía TEM que evidencia la formación de estructuras toroides.

Estas estructuras, con un diámetro total cercano a 130 nm y un anillo de aproximadamente 29 nm de grosor.

3.1.4 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Para completar la caracterización de la muestra, se recurrió a la técnica de dispersión de luz dinámica, que permite analizar las propiedades hidrodinámicas de las partículas en suspensión basándose en la medición de fluctuaciones temporales en la intensidad de la luz dispersada causadas por el movimiento browniano.

Esta técnica proporciona dos parámetros fundamentales para la evaluación de la muestra: el tamaño medio de partícula o Z-Average, que representa el diámetro hidrodinámico promedio ponderado por intensidad, y el índice de polidispersidad, un indicador cuantitativo de la distribución de tamaños dentro de la población de partículas.

En este caso, el Z-Average resultó ser de 5534 nm, un valor considerablemente alto que indica la presencia de partículas o agregados de gran tamaño. Este resultado es consistente con la observación microscópica de estructuras heterogéneas y no uniformes. Además, el PI obtenido fue de 1.53, un valor muy elevado que confirma la amplia variabilidad en el tamaño de las partículas y la presencia de múltiples poblaciones en la muestra.

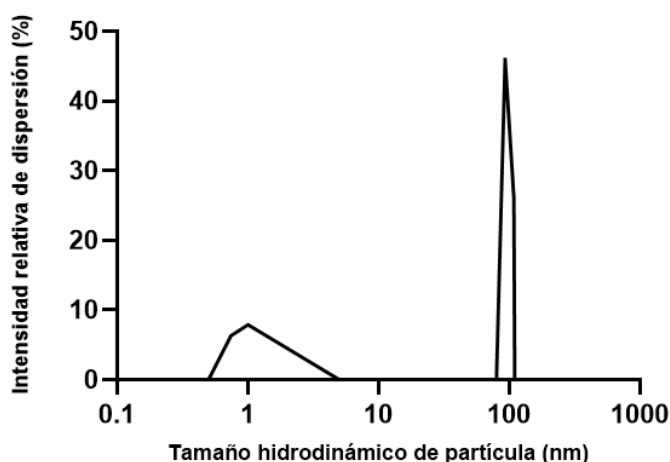


Figura 11. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN λ compactado con protamina (protocolo inicial).

Como se menciona anteriormente, la presencia de dos poblaciones distintas, una de menor tamaño y otra claramente mayor, confirma la coexistencia de partículas pequeñas y agregados o complejos compactados de mayor tamaño en la muestra.

3.2 Optimización del protocolo de compactación y caracterización avanzada

Los resultados preliminares evidenciaron heterogeneidad en tamaño y estructura, lo que motivó la optimización del protocolo. Como se describe en el apartado de metodología, se aumentó el volumen total a 200 μL y se ajustaron las proporciones de reactivos para mejorar la formación de complejos. Esta metodología optimizada permitió una mejora notable en la calidad y uniformidad de las estructuras formadas, cuyos resultados se presentan a continuación.

3.2.1 Compactación con protamina

3.2.1.1 Caracterización inicial y validación del protocolo optimizado

Como parte del proceso de validación del protocolo optimizado, se repitió la caracterización mediante microscopía de fluorescencia (ZOE™) para confirmar la presencia de ADN λ tras la compactación con protamina. Al igual que en la condición preliminar, las muestras fueron teñidas con DAPI y observadas en el canal de fluorescencia azul.

La imagen obtenida mostró una distribución clara de señales fluorescentes puntuales, indicativas de la presencia de ADN compactado. Estas estructuras, visibles exclusivamente en el canal azul, confirmaron que el proceso de compactación mantenía la integridad del material genético y daba lugar a complejos bien definidos.

La imagen representativa se muestra en la *Figura 12*, correspondiente a la muestra caracterizada tras aplicar el protocolo optimizado de 200 μL .

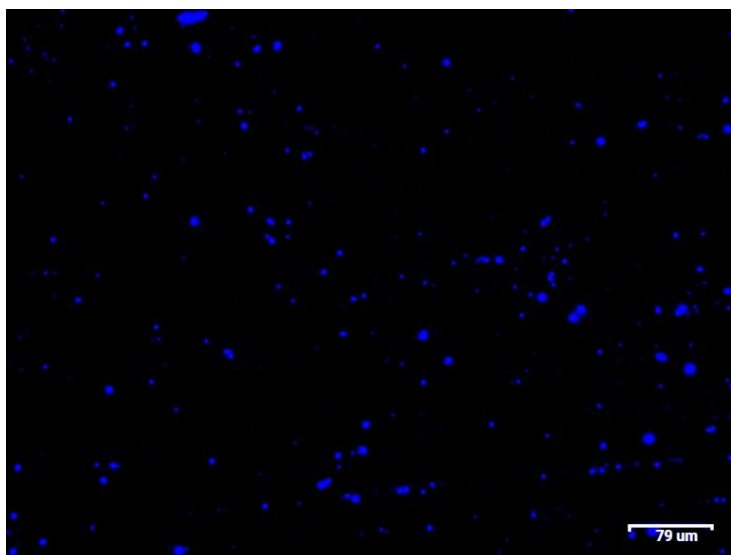


Figura 12. Imagen de microscopía de fluorescencia de ADN λ compactado con protamina según el protocolo optimizado.

La muestra fue también analizada mediante microscopía confocal con el objetivo de observar la distribución espacial tras la aplicación del protocolo optimizado. En comparación con la condición preliminar, la imagen obtenida evidenció una mejora notable en la definición de las estructuras observadas, sin presencia de elementos de fondo inespecíficos ni señales dispersas. La visualización se limitó exclusivamente a entidades compactadas claramente identificables.

En la *Figura 13* se muestran dos de estas estructuras fluorescentes, correspondientes a complejos de ADN compactado, con tamaños medidos de 1.32 μm y 2.43 μm , respectivamente. Estos resultados refuerzan la eficacia del nuevo protocolo en términos de especificidad y organización estructural.

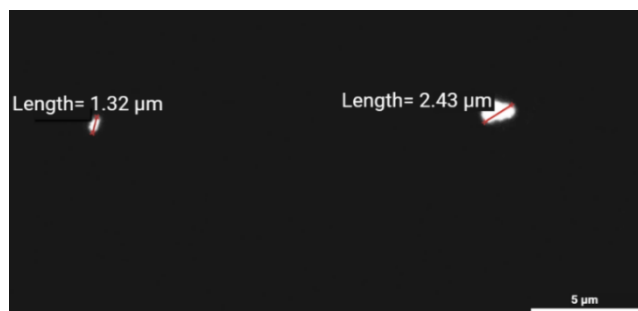


Figura 13. Imagen de microscopía confocal de ADN λ compactado con protamina (protocolo optimizado) teñido con DAPI.

La observación mediante microscopía electrónica de transmisión resultó especialmente relevante para evaluar la calidad estructural de los complejos formados en condiciones optimizadas. A diferencia de lo observado en la muestra correspondiente a la fase preliminar, la muestra analizada tras la aplicación del protocolo optimizado presentó una alta homogeneidad en términos de tamaño y morfología de las partículas. En un amplio campo visual, se observó una gran cantidad de estructuras compactadas con una distribución uniforme y tamaños consistentes, con un diámetro medio aproximado de 100 nm.

Una de las observaciones más destacadas fue, otra vez, la alta presencia de estructuras anulares o toroides distribuidas de forma recurrente a lo largo de toda la muestra. En la *Figura 14* se muestra una micrografía panorámica donde se aprecia la homogeneidad en tamaño y la abundancia de complejos compactados.

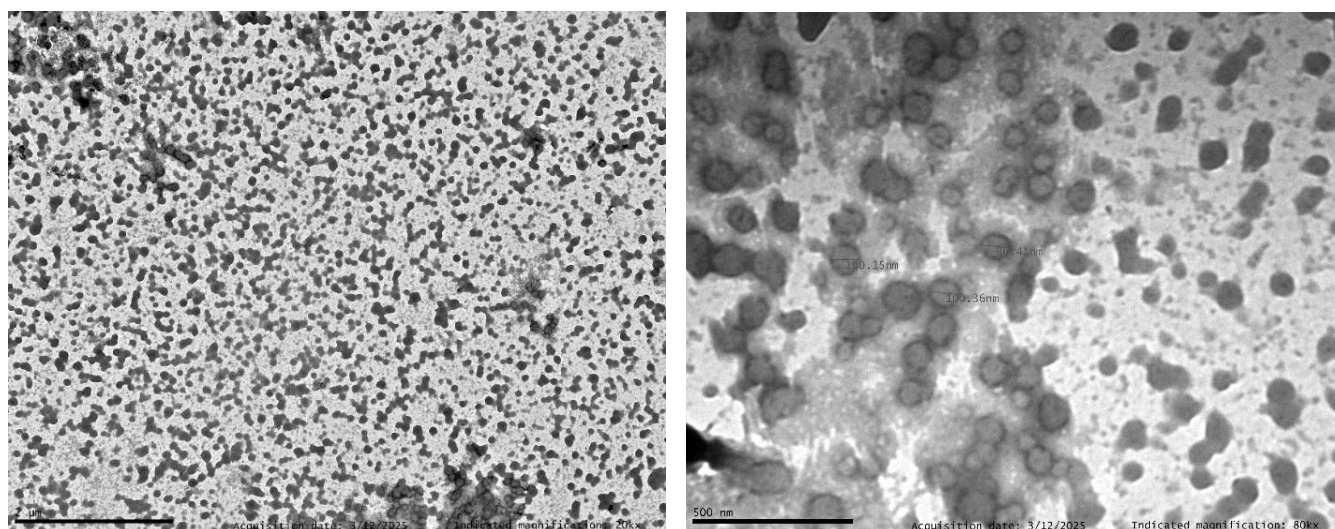


Figura 14. Micrografía TEM panorámica de la muestra compactada con protamina, mostrando una alta homogeneidad en el tamaño y distribución de las partículas.

Por su parte, la *Figura 15* recoge un toroide representativo, cuyo diámetro externo es de aproximadamente 111 nm, mientras que el grosor del anillo se estima en 20 nm, dimensiones coherentes con los valores descritos en la literatura para estructuras de ADN altamente empaquetadas.

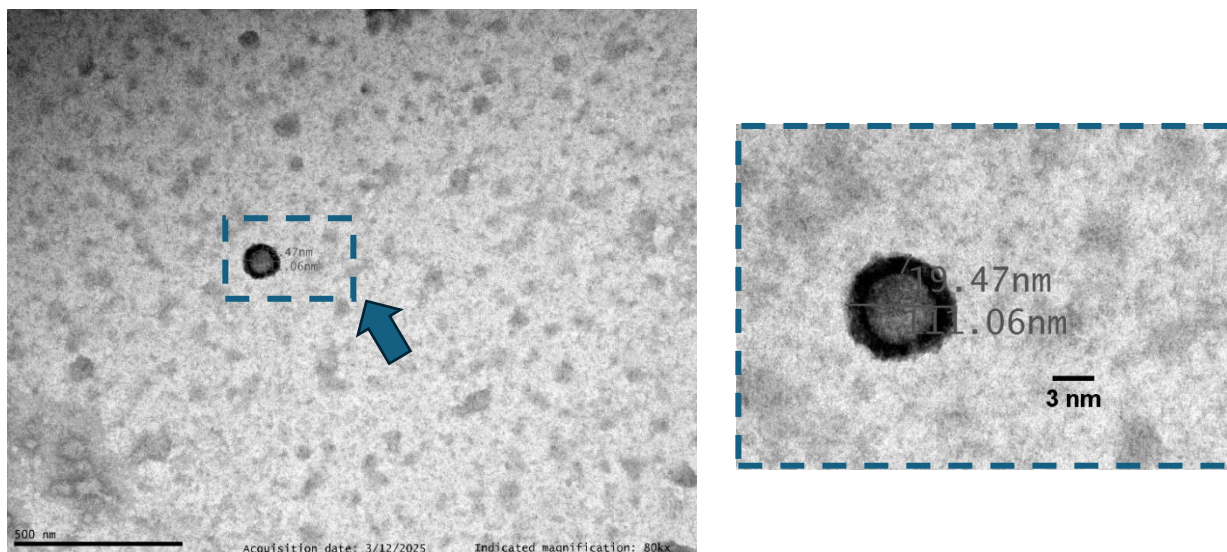


Figura 15. Imagen TEM representativa de un toroide de ADN λ compactado con protamina.

La técnica DLS se empleó nuevamente como herramienta final de caracterización para cuantificar el tamaño hidrodinámico y la homogeneidad de las partículas formadas tras la compactación optimizada del ADN λ con protamina. A diferencia del análisis realizado en la condición preliminar, en este caso la muestra ya presentaba, según todas las técnicas previas —especialmente la microscopía electrónica—, una morfología notablemente más uniforme, por lo que se esperaba una mejora clara en los parámetros obtenidos mediante DLS.

La muestra fue analizada en cinco mediciones independientes, y los valores aquí reportados corresponden a la media de esas cinco repeticiones. El Z-Average obtenido fue de 650 nm, una reducción significativa respecto al valor extremo observado en la primera prueba de compactación (5534 nm). Por otro lado, el PI fue de 0.5, un valor considerablemente inferior al de la condición preliminar (1.53), este valor indica una distribución de tamaños mucho más concentrada y con menor presencia de agregados.

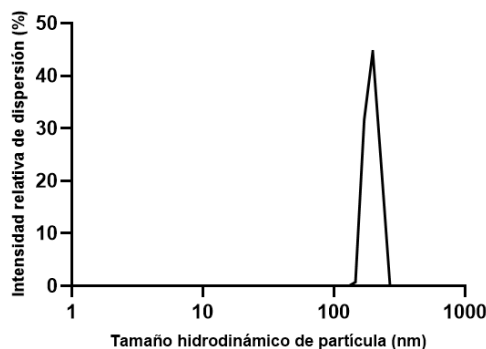


Figura 16. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN λ compactado con protamina (protocolo optimizado).

Además, la gráfica de intensidad obtenida durante el análisis mostró una única población dominante, en contraste con la doble población detectada en el experimento previo.

3.2.1.2 Repetibilidad y reproducibilidad del protocolo

Tal como se ha detallado en el apartado anterior, la aplicación del protocolo optimizado permitió una mejora sustancial en la compactación del ADN λ , generando nanopartículas homogéneas y estructuralmente definidas. No obstante, la validación de un procedimiento experimental no puede sustentarse únicamente en un resultado puntual, por muy prometedor que sea, sino que requiere su repetición en condiciones idénticas para garantizar su fiabilidad y reproducibilidad.

Con este objetivo, el protocolo optimizado fue repetido en tres ocasiones adicionales, manteniendo constantes todas las condiciones experimentales —incluyendo volúmenes, concentraciones y proporciones de reactivos— empleadas en la muestra de referencia. Para la caracterización de estas repeticiones se seleccionaron únicamente las técnicas de microscopía electrónica de transmisión y dispersión de luz dinámica, al tratarse de los métodos que proporcionan la información más robusta y representativa sobre la morfología, el tamaño hidrodinámico y la distribución de las partículas formadas.

Como se puede observar en las Figuras 17 y 18, correspondientes a dos de las repeticiones realizadas, las micrografías TEM muestran resultados altamente consistentes con los obtenidos en la muestra inicial. En la *Figura 17*, se aprecia un campo amplio con una distribución uniforme de estructuras compactadas de ADN λ . En la *Figura 18*, se muestra un toroide representativo detectado en una de las repeticiones, con dimensiones comparables a las observadas previamente.

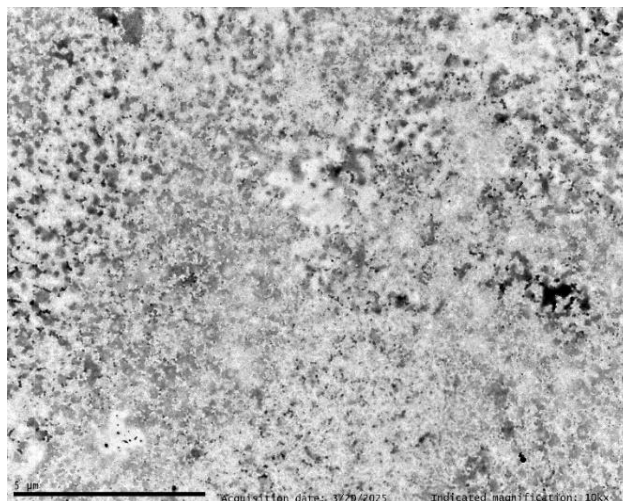


Figura 17. Micrografía TEM panorámica de una de las repeticiones del protocolo optimizado.

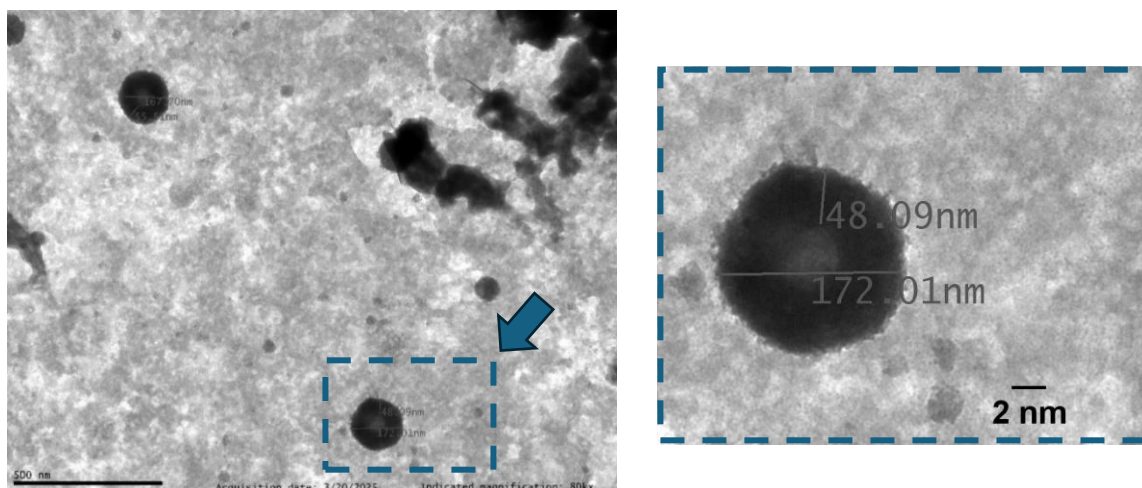


Figura 18. Imagen TEM representativa de un toroide observado en una repetición del protocolo optimizado, confirmando la persistencia de esta morfología estructurada.

En cuanto al análisis por DLS, los valores obtenidos en las repeticiones fueron muy similares a los de la muestra de referencia, con Z-Average y PI prácticamente constantes en todas las mediciones.

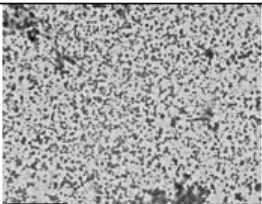
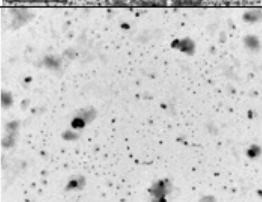
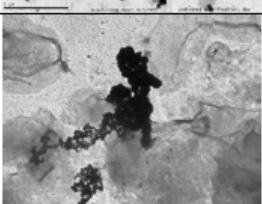
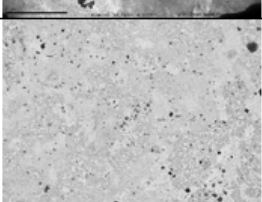
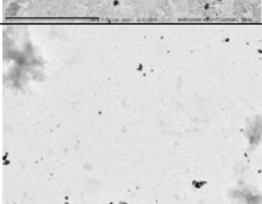
3.2.1.3 Estudio de la relación de cargas (N/P ratio)

Una vez validado el protocolo óptimo de compactación del ADN λ con protamina, diseñado en base a una relación de cargas 5000:1, se planteó la necesidad de evaluar cómo pequeñas variaciones en dicha proporción afectarían al proceso. Dado que el método utilizado estaba formulado para lograr una neutralización de cargas lo más precisa posible, surgió la duda de si ese equilibrio era estrictamente necesario o si existía cierto margen operativo por encima o por debajo del valor teórico.

Para abordar esta cuestión, se diseñó un pequeño estudio experimental manteniendo constante la concentración de ADN λ (10 nM) y variando ligeramente la concentración de protamina, lo que implicó modificar también la relación N/P. El objetivo era observar si, bajo estas nuevas condiciones, seguía produciéndose la compactación o si esta dependía de forma crítica del equilibrio de cargas exacto.

Las condiciones ensayadas y los resultados observados se resumen en la siguiente tabla (*Tabla 4*), que recoge las imágenes TEM representativas obtenidas para cada proporción.

Tabla 4. Condiciones experimentales empleadas para el estudio de la relación de cargas (N/P) entre protamina y ADN λ , incluyendo las concentraciones utilizadas y las micrográficas TEM obtenidas para cada ensayo.

Muestra	Concentración λ -DNA (nM)	Tamaño de λ -DNA (pares de bases)	Concentración de Protamina (μ M)	Ratio de Cargas (Protamina: DNA)	Resultados DLS (Tamaño Promedio de Partículas, nm)	Índice de Polidispersidad (PI)	Resultados TEM
1	10	48502	50	(5000:1)	650.6	0.6	
2	10	48502	40	(4000:1)	386	0.32	
3	10	48502	45	(4500:1)	561	0.56	
4	10	48502	55	(5500:1)	796	0.54	
5	10	48502	60	(6000:1)	-	-	

Las imágenes TEM indican que esta condición es la única que genera partículas compactadas con morfología definida y distribución homogénea. Al incrementar o disminuir ligeramente la relación de cargas, se observa una pérdida significativa en la calidad de la compactación: en las imágenes TEM correspondientes, las estructuras aparecen dispersas, de morfología irregular o incluso inexistentes. En el caso concreto de la condición 6000:1, ni siquiera fue posible obtener una lectura correcta mediante DLS.

3.2.2 Compactación del ADN λ con espermina

Una vez establecido y validado el protocolo de compactación del ADN λ con protamina, se procedió a evaluar la aplicabilidad de este utilizando otro polication natural: la espermina. El objetivo era comprobar si, manteniendo el enfoque experimental ya optimizado, podían obtenerse resultados comparables en cuanto a eficiencia de compactación y homogeneidad

estructural. De este modo, se extendió el estudio a una segunda molécula con características fisicoquímicas distintas, con el fin de valorar su capacidad para inducir una compactación efectiva del ADN en condiciones similares.

3.2.2.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La muestra compactada con espermina fue analizada mediante microscopía electrónica de transmisión con el objetivo de evaluar la morfología y uniformidad de las estructuras formadas bajo las condiciones experimentales definidas para esta poliamina. Como se observa en la *Figura 19*, se detectó una alta densidad de partículas compactadas distribuidas de forma regular en el campo visual. Las estructuras presentaban una morfología bien definida, con un tamaño medio en torno a 200 nm, y una dispersión muy reducida.

En comparación con los complejos formados con protamina, se apreció una mayor uniformidad en la geometría de las partículas y una disposición más clara de las entidades compactadas.

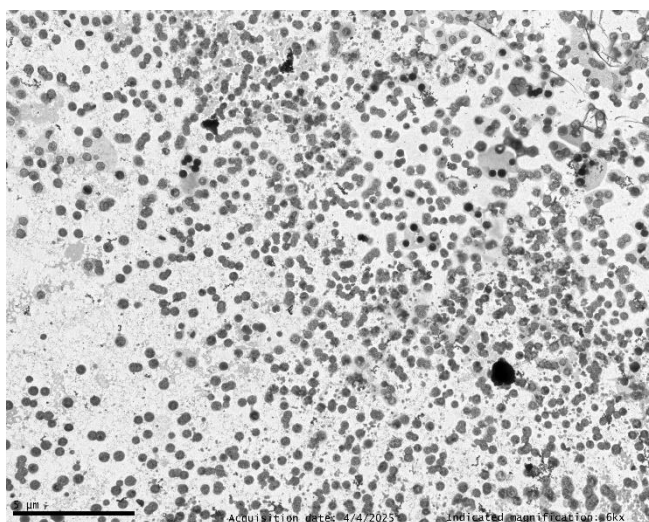


Figura 19. Micrografía TEM representativa de la compactación de ADN λ con espermina.

3.2.2.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La caracterización de las muestras compactadas con espermina se completó mediante análisis de dispersión de luz dinámica (*Figura 20*), con el objetivo de cuantificar el tamaño hidrodinámico medio de las partículas formadas y evaluar la homogeneidad del sistema. Esta técnica aporta información esencial para validar la eficiencia de compactación y la estabilidad coloidal de los complejos formados entre el ADN λ y la espermina.

El análisis arrojó un tamaño medio de partícula de 227 nm, lo que indica la formación de estructuras de tamaño nanométrico bien definido. Este valor es coherente con las observaciones realizadas por TEM.

El índice de polidispersidad obtenido fue de 0.17, un valor bajo que refleja una distribución de tamaños estrecha y una alta homogeneidad en la muestra. En términos fisicoquímicos, este nivel

de dispersión indica que la compactación inducida por la espermina da lugar a un sistema estable, con baja presencia de agregados o subpoblaciones heterogéneas.

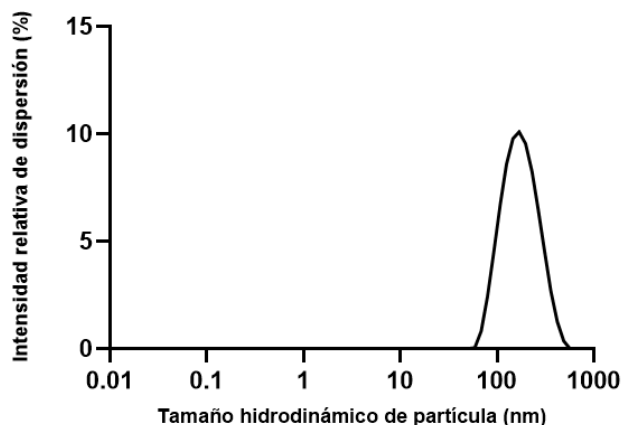


Figura 20. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN λ compactado con espermina.

Estos resultados refuerzan la capacidad de la espermina para compactar el ADN λ de forma ordenada y reproducible, formando nanopartículas con propiedades estructurales bien definidas.

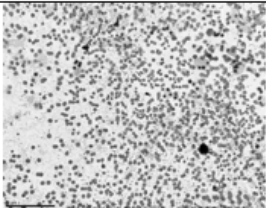
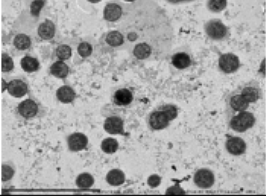
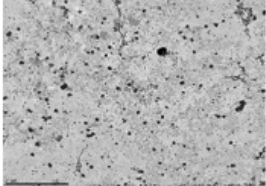
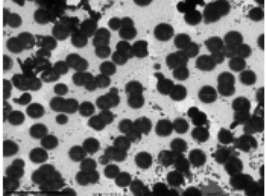
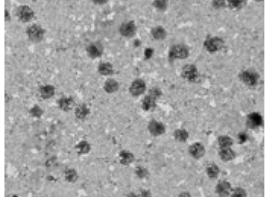
3.2.2.3 Estudio de la relación de cargas (N/P ratio)

Tras confirmar que la espermina era capaz de compactar de forma eficiente el ADN λ utilizando la relación de cargas teórica de (25000:1), se decidió realizar un estudio de sensibilidad experimental para evaluar el comportamiento del sistema ante pequeñas variaciones en dicha proporción. Al igual que en el caso de la protamina, el objetivo era determinar si la eficiencia de compactación se mantenía en un rango cercano al valor óptimo o si, por el contrario, el sistema era estrictamente dependiente de la neutralización precisa de cargas.

Para ello, se mantuvo constante la concentración de ADN λ (10 nM) y se realizaron ligeros ajustes en la concentración de espermina, generando así relaciones N/P ligeramente inferiores y superiores a la teórica. Las condiciones empleadas se recogen en la tabla siguiente, junto con las imágenes TEM representativas obtenidas para cada caso.

De forma especialmente relevante, se observó que las relaciones 24000:1 y 25500:1 generaban estructuras compactadas con morfologías altamente definidas y homogéneas, muy similares a las obtenidas con la relación teórica de 25000:1. Aunque los análisis por DLS ofrecieron buenos resultados en todas las condiciones ensayadas, fue la microscopía electrónica la que permitió discriminar las diferencias más sutiles a nivel estructural.

Tabla 5. Condiciones experimentales empleadas para evaluar el efecto de la relación de cargas (N/P) en la compactación del ADN λ con espermina. Se muestran las concentraciones utilizadas y micrografías TEM representativas para cada proporción.

Muestra	Concentración λ -DNA (nM)	Tamaño de λ -DNA (pares de bases)	Concentración de Espermina (μ M)	Ratio de Cargas (Espermina: DNA)	Resultados DLS (Tamaño Promedio de Partículas, nm)	Índice de Polidispersidad (PI)	Resultados TEM
1	10	48502	250	(25000:1)	227.4	0.17	
2	10	48502	240	(24000:1)	351	0.36	
3	10	48502	245	(24500:1)	407	0.32	
4	10	48502	255	(25500:1)	688	0.58	
5	10	48502	260	(26000:1)	353	0.4	

En el caso de la relación 26000:1, correspondiente al extremo superior del rango evaluado, las imágenes TEM revelaron una pérdida progresiva en la definición de las nanopartículas compactadas. Las estructuras comenzaron a observarse de forma más difusa y menos nítida.

3.3 Compactación de diferentes modelos de ADN

Con el objetivo de evaluar la versatilidad del protocolo de compactación desarrollado, se aplicó la misma estrategia experimental a otros dos tipos de ADN distintos al ADN λ : un plásmido circular de tamaño intermedio (pVAXHK70) y fragmentos de ADN genómico de salmón de baja longitud. A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir de la caracterización de los complejos formados mediante microscopía electrónica de transmisión y dispersión de luz dinámica.

3.3.1 ADN plasmídico (pVAXHK70)

Como primer paso en la caracterización, se realizó el análisis por microscopía electrónica de transmisión. En la *Figura 21* se muestran dos imágenes representativas: una vista panorámica donde se aprecia una distribución abundante de estructuras compactadas en la muestra, y una imagen ampliada enfocada en la visualización del tamaño y la morfología individual de los complejos. Estas estructuras presentan un tamaño medio en torno a 200 nm y exhiben una morfología densa y simétrica, indicativa de un empaquetamiento eficiente con protamina.

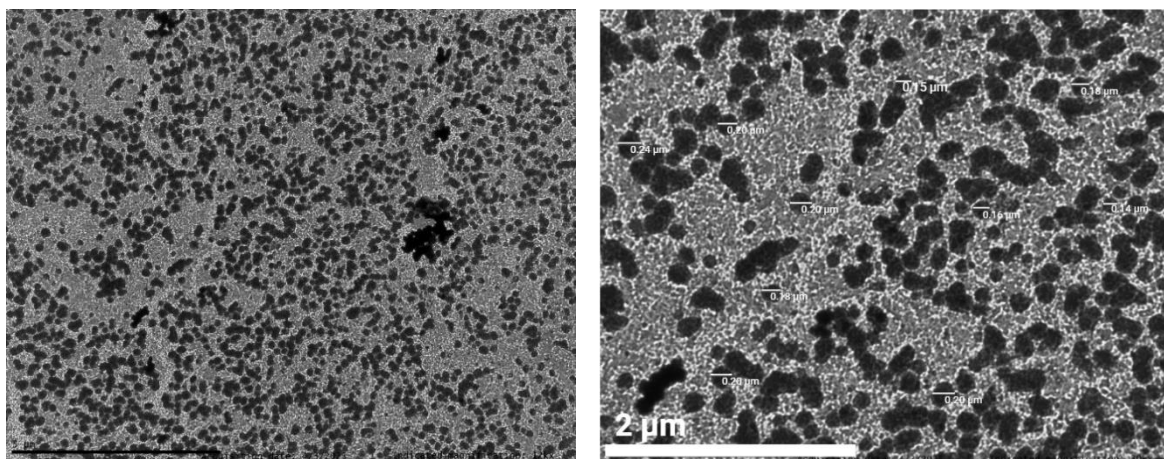


Figura 21. Imagen TEM del ADN plasmídico pVAXHK70: vista panorámica y detalle morfológico.

De forma destacable, en varias zonas de la muestra se identificaron estructuras toroidales bien definidas (*Figura 22*), también con diámetros próximos a los 200 nm.

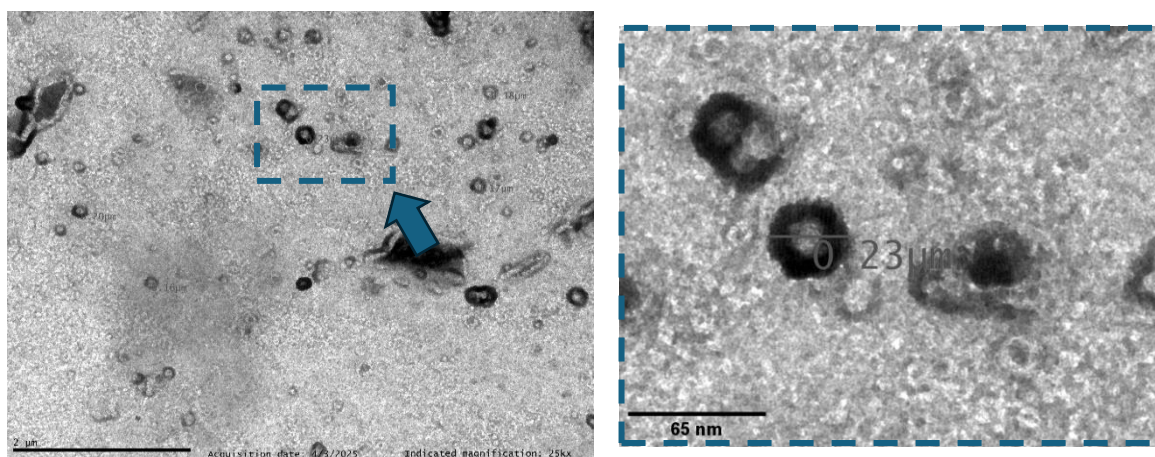


Figura 22. Visualización de estructuras toroidales tras la compactación del plásmido.

Para completar la caracterización de la muestra compactada, se llevó a cabo un análisis por DLS (*Figura 23*). En esta medición, se obtuvo un valor de Z-Average de aproximadamente 1000 nm, indicando la formación de estructuras de gran tamaño, propias de complejos supramoleculares densamente empaquetados. Este dato es coherente con los resultados observados por TEM, donde se evidenció una alta densidad estructural y agrupaciones de geometría definida.

El índice de polidispersidad fue de 0.49, un valor aceptable en el contexto de sistemas basados en polielectrolitos y complejos ADN-policationes, donde es habitual encontrar una cierta variabilidad estructural. Destaca la presencia de un único pico bien definido en la distribución por intensidad (*Figura 23*) que hace referencia a una única población dominante, sin indicios de agregación no específica ni subestructuras disociadas.

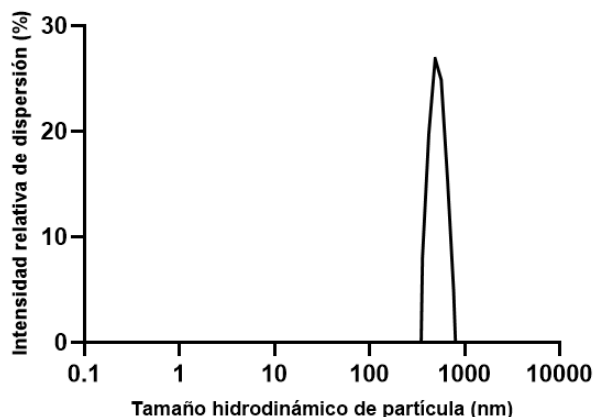


Figura 23. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN plasmídico pVAXHK70 compactado con protamina.

Aunque el tamaño hidrodinámico es superior al de formulaciones más compactas, se encuentra dentro del rango esperable para sistemas biológicos basados en compactación electrostática.

3.3.2 ADN genómico de salmón

La compactación del ADN genómico fragmentado de salmón se evaluó utilizando los dos agentes policationicos estudiados: protamina y espermina. Se analizaron las muestras resultantes mediante microscopía electrónica de transmisión y dispersión de luz dinámica, con el fin de valorar la eficiencia de compactación y las propiedades físico-químicas de los complejos formados.

3.3.2.1 Compactación con protamina

La compactación del ADN genómico fragmentado de salmón se inició, como en los casos anteriores, empleando protamina como agente policationico. En la imagen TEM obtenida (*Figura 24*), se observan estructuras condensadas con morfología redondeada y tamaño bien definido, con diámetros aproximados de 0.34 μm y 0.20 μm .

No obstante, se aprecia una cierta variabilidad en las dimensiones de los complejos formados, con partículas ligeramente dispares entre sí. Esta heterogeneidad puede deberse a la reducida longitud del fragmento de ADN de salmón (~154 pb).

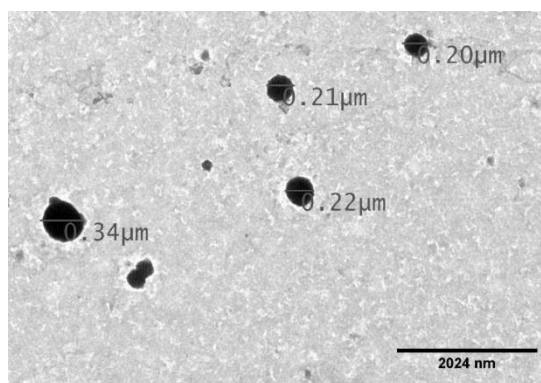


Figura 24. Imagen TEM de complejos ADN-protamina formados a partir de ADN genómico de salmón.

El análisis mediante DLS arrojó un valor de Z-Average de 287 nm, significativamente inferior al obtenido en otros modelos como el ADN plasmídico, y coherente con el tamaño reducido del ADN genómico de salmón. El PI fue de 0.35, valor que indica una dispersión moderada pero aceptable en sistemas basados en polielectrolitos.

La gráfica de distribución por intensidad (*Figura 25*) muestra un pico único, estrecho y simétrico, centrado en torno a los 287 nm, sin presencia de picos secundarios.

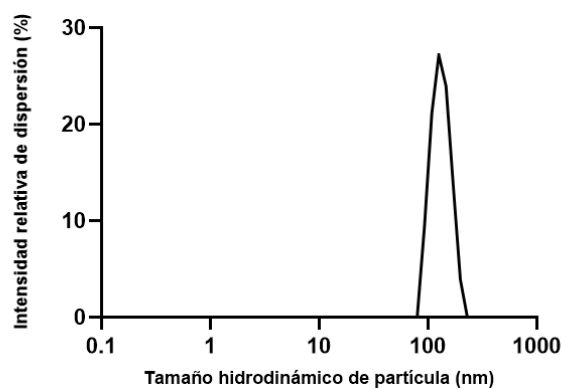


Figura 25. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN de salmón compactado con protamina.

3.3.2.2 Compactación con espermina

La caracterización morfológica inicial se llevó a cabo mediante TEM. A diferencia de lo observado con la protamina, las estructuras generadas tras la compactación con espermina presentaron tamaños significativamente menores, comprendidos entre 0.10 y 0.15 μm (*Figura 26*). Además del tamaño reducido, las partículas mostraban mayor uniformidad y simetría entre sí.

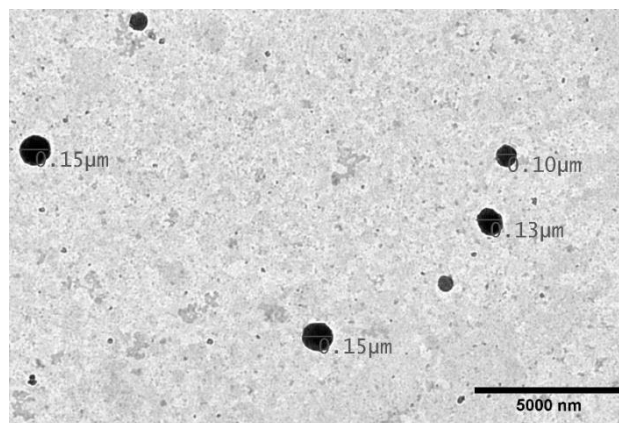


Figura 26. Imagen TEM de complejos ADN-espermina formados a partir de ADN genómico de salmón.

El análisis por DLS arrojó un Z-Average de 460 nm y un índice de polidispersidad de 0.50, valores algo más elevados que los obtenidos en la compactación con protamina. Sin embargo, la gráfica de intensidad (*Figura 27*) muestra un único pico claramente definido y de distribución más ancha, lo que indica una población principal única con una cierta dispersión de tamaños, pero sin presencia de agregados o subpoblaciones. La amplitud del pico, en lugar de indicar agregación, puede estar reflejando una distribución continua de partículas bien formadas.

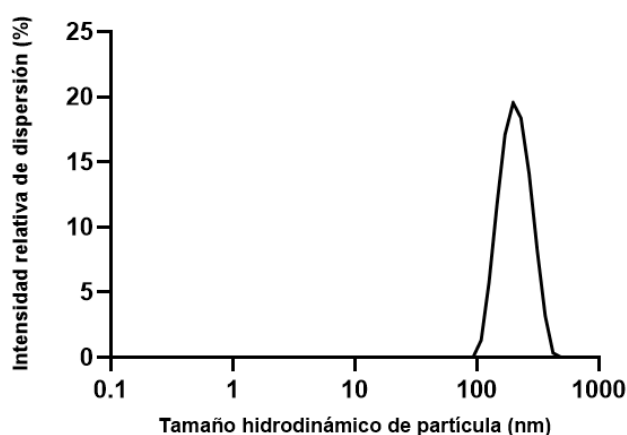


Figura 27. Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS para el ADN de salmón compactado con espermina.

3.4 Controles negativos: análisis individual de ADN λ y protamina

Con el objetivo de confirmar que las estructuras observadas en las muestras compactadas eran consecuencia directa de la interacción entre el ADN λ y el agente policationico, se realizaron controles negativos en los que se analizaron por TEM los componentes de forma individual.

En la muestra que contenía únicamente ADN λ sin compactar, disuelto en tampón Tris-EDTA, se observó una estructura de gran tamaño ($\approx 5.28 \mu\text{m}$ de diámetro) y morfología circular, correspondiente a la molécula de ADN en su forma plasmídica nativa (*Figura 28*). Esta estructura aparecía dispersa, sin señales de reorganización estructural ni condensación, confirmando que el ADN por sí solo no forma complejos compactados bajo estas condiciones.

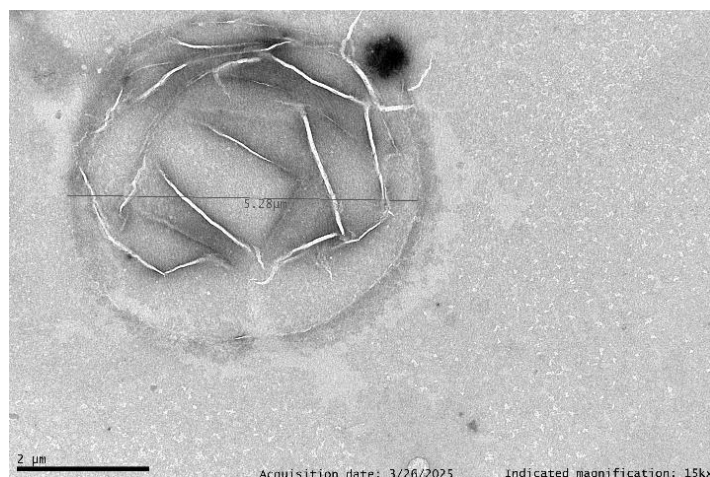


Figura 28. Micrografía TEM de ADN λ sin compactar (disuelto en tampón Tris-EDTA).

Por su parte, en la muestra de protamina disuelta en tampón Imidazol-KCl, la imagen TEM (*Figura 29*) reveló una distribución densa y homogénea de contraste oscuro, sin estructuras discernibles o delimitadas. El aspecto observado se correspondía con una acumulación amorfa del polication en la superficie del *grid*, posiblemente por secado o saturación local del agente, lo que imposibilita la identificación de partículas definidas. Este resultado demuestra que la protamina, en ausencia de ADN, no adopta ninguna estructura organizada observable mediante TEM.

En conjunto, estos controles negativos refuerzan la conclusión de que las nanopartículas y estructuras definidas observadas en las muestras compactadas son producto directo de la interacción específica entre el ADN λ y los policationes, y no derivan de ninguno de los componentes individuales.

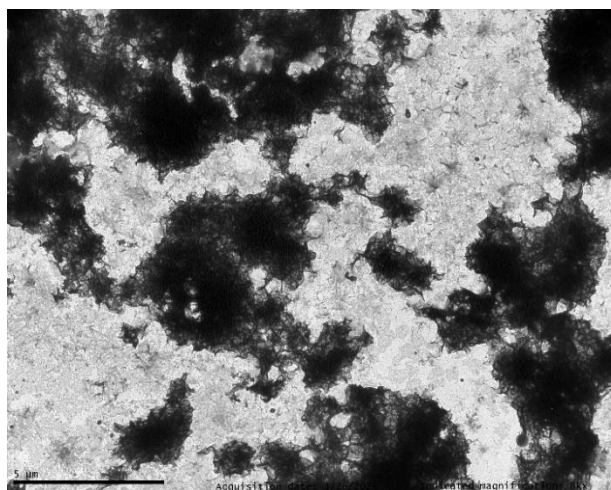


Figura 29. Micrografía TEM de protamina disuelta en tampón Imidazol-KCl.

4. Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo principal el desarrollo y validación de un protocolo de compactación de ADN basado en el uso de policationes naturales —protamina y espermina—, con especial interés en su aplicabilidad a sistemas de transferencia génica. La capacidad de compactar eficientemente grandes moléculas de ADN mediante interacciones electrostáticas resulta crítica para su encapsulación, protección y transporte en entornos fisiológicos, especialmente considerando las limitaciones asociadas a otros métodos de vehiculización como los vectores virales o lipídicos. En este contexto, se evaluaron distintas condiciones de compactación y se aplicaron a tres modelos de ADN con longitudes y estructuras significativamente diferentes: ADN λ (48502 pb), plásmido pVAXHK70 (7342 pb) y fragmentos de ADN genómico de salmón (~154 pb).

4.1 Compactación del ADN λ : optimización estructural y formación de toroides

El ADN λ fue seleccionado como sistema modelo para el desarrollo inicial del protocolo de compactación debido a su longitud considerable (48502 pb), su estructura lineal de doble cadena y su alta pureza comercial. Estas características lo convierten en una molécula representativa para evaluar como prueba de concepto.

La primera aproximación experimental se llevó a cabo empleando protamina como agente policationico y utilizando una relación de cargas negativa/positiva (N/P) elevada en un volumen total reducido (25–50 μ L). Bajo estas condiciones, los resultados obtenidos fueron subóptimos: el análisis por DLS reveló un Z-Average superior a 5000 nm y un índice de polidispersidad elevado, indicativo de una población altamente heterogénea y de la presencia de agregados de gran tamaño. De forma paralela, las imágenes obtenidas por TEM mostraron estructuras irregulares y desorganizadas, con escasa presencia de morfologías definidas como los toroides esperados. Estos hallazgos sugerían una interacción no controlada entre la protamina y el ADN, posiblemente por una rápida neutralización de cargas en un entorno de baja dilución, que favorecía la agregación coloidal.

Para mejorar este proceso, se diseñó una optimización experimental basada en el ajuste de la concentración del ADN y la protamina, manteniendo la misma relación N/P, pero incrementando significativamente el volumen total del sistema a 200 μ L. Esta dilución permitió trabajar en condiciones menos concentradas, facilitando una interacción más progresiva entre ambas moléculas. Bajo este nuevo protocolo, se obtuvieron resultados considerablemente más consistentes: el DLS arrojó valores de Z-Average reducidos (entre 600–650 nm) y un índice de polidispersidad inferior, reflejando una suspensión más homogénea y estable. Asimismo, el análisis morfológico mediante TEM mostró una alta densidad de partículas esféricas bien distribuidas, con diámetros promedio de aproximadamente 100 nm. De forma especialmente relevante, se observaron estructuras toroidales definidas y repetitivas, lo cual sugiere un empaquetamiento altamente ordenado del ADN, en línea con lo que ocurre en sistemas

fisiológicos como la cromatina espermática, donde las protaminas median la condensación del material genético.

Una vez establecido el protocolo óptimo de compactación con protamina, se procedió a evaluar su aplicabilidad a otro polímero natural de interés biomédico: la espermina. Este polímero endógeno, con cuatro cargas positivas frente a las veinte de la protamina, presenta un perfil electrostático menos intenso y una mayor flexibilidad estructural. Al aplicar exactamente las mismas condiciones experimentales optimizadas, la compactación con espermina generó partículas de menor tamaño y distribución más estrecha. El DLS registró un Z-Average de 227 nm y un índice de polidispersidad de 0.17, lo que refleja una alta homogeneidad poblacional. En las imágenes TEM se observaron complejos de tamaño regular (~200 nm), densamente distribuidos, con morfología esférica uniforme y sin presencia de agregados.

Aunque no se identificaron estructuras toroidales en este caso, la morfología observada fue consistente con un empaquetamiento eficiente y controlado. Este comportamiento podría atribuirse a la menor densidad de carga de la espermina, que favorecería una interacción más gradual y menos disruptiva con la doble hélice del ADN, permitiendo una reorganización progresiva sin colapso estructural. Este tipo de empaquetamiento puede resultar particularmente ventajoso en entornos fisiológicos donde se requiere mantener la estabilidad coloidal del sistema y preservar la reversibilidad del complejo. En conjunto, los resultados posicionan a la espermina como un agente de compactación eficaz para ADN lineal, especialmente útil en contextos donde se prioriza la homogeneidad de tamaño, la ausencia de agregación y la posibilidad de liberar el ADN de forma controlada.

4.2 Compactación del ADN plasmídico: aplicabilidad del protocolo a modelos circulares

La aplicación del protocolo de compactación al plásmido pVAXHK70 tuvo como objetivo valorar su versatilidad frente a moléculas de ADN de menor tamaño y topología circular. Aunque en este caso solo se empleó protamina como agente policationico, los resultados obtenidos confirmaron que el método es igualmente eficaz en la generación de estructuras compactadas bien definidas. La caracterización morfológica mediante TEM mostró estructuras compactadas bien definidas, con diámetros en torno a 200 nm, así como la presencia clara de toroides, morfológicamente comparables a los observados en el ADN λ . La detección de estas estructuras en una molécula de ADN circular resulta especialmente significativa, dado que su configuración cerrada introduce restricciones topológicas que dificultan la reorganización ordenada del polímero. Los resultados sugieren que, bajo condiciones adecuadas de relación de cargas y concentración, la protamina permite superar estas barreras conformacionales y promover un empaquetamiento controlado y eficiente.

Desde el punto de vista hidrodinámico, el análisis por dispersión de luz dinámica reveló un tamaño medio de 1000 nm (Z-Average) y un índice de polidispersidad de 0.49. Aunque el valor del Z-Average es superior al observado en el ADN λ , la curva de intensidad mostró un único pico

bien definido, lo que indica la formación de una población dominante de complejos sin agregación secundaria. Esta combinación de morfología organizada y comportamiento coloidal relativamente homogéneo confirma la capacidad del protocolo para adaptarse a sistemas circulares de ADN, consolidando su versatilidad como plataforma de compactación aplicable a diferentes tipos de vectores génicos.

4.3 Compactación de fragmentos del ADN genómico de salmón: efecto del tamaño y comparación entre agentes

El ADN de salmón representa un modelo de ADN corto y lineal, de apenas 154 pb, utilizado en este trabajo para comprobar si el protocolo es efectivo incluso en moléculas pequeñas, con baja carga negativa total. A diferencia de los modelos anteriores, en este caso se emplearon ambos agentes policatiónicos: protamina y espermina.

La compactación con protamina generó estructuras visibles por TEM con morfología redondeada, aunque con mayor dispersión en el tamaño (entre 200 y 340 nm), y sin organización toroidal. Esta variabilidad puede deberse a que, en moléculas de longitud muy reducida, la interacción con policationes cargados como la protamina tiende a formar empaquetamientos menos controlados y más dependientes de la relación local de cargas. En DLS, se obtuvo un Z-Average de 287 nm con un PI de 0.35, lo cual refleja una población moderadamente homogénea de partículas.

En cambio, la compactación con espermina dio lugar a estructuras más pequeñas (100–150 nm) y morfológicamente más uniformes, tal y como se observó en TEM. Esta diferencia puede explicarse por el menor número de cargas positivas de la espermina, lo que favorece una compactación más progresiva y controlada. Aunque el valor de Z-Average fue algo superior (460 nm) y el PI alcanzó un valor de 0.50, la curva de DLS mostraba un único pico bien definido, sin agregación secundaria. Esto sugiere que, a pesar de la mayor dispersión numérica, la compactación con espermina es más estable desde el punto de vista coloidal. En conjunto, estos datos apuntan a que la espermina permite una mejor compactación en ADN de pequeño tamaño, al generar estructuras más pequeñas y consistentes morfológicamente.

4.4 Consideraciones generales y relevancia funcional

A lo largo del trabajo se ha evidenciado que la relación de cargas negativa/positiva (N/P) es un factor crítico en el proceso de compactación, influenciando de manera directa tanto la eficiencia del empaquetamiento como la morfología de los complejos formados. Los resultados muestran que la longitud, conformación y topología del ADN condicionan la aparición de estructuras ordenadas: en el caso del ADN λ , se observaron toroides bien definidos y con alta frecuencia; en el ADN plasmídico, también se identificaron toroides, aunque en menor proporción, lo que sugiere que, si bien la topología circular introduce restricciones estructurales, éstas pueden ser superadas mediante un balance adecuado de cargas y condiciones fisicoquímicas. Por su parte, en el ADN genómico de salmón, se obtuvieron partículas de tamaño reducido, pero con mayor dispersión morfológica, especialmente al emplear protamina.

La comparación entre protamina y espermina reveló diferencias funcionales relevantes. La protamina, con una mayor carga neta y densidad básica, generó empaquetamientos más compactos, pero también mostró una mayor variabilidad en el tamaño de las partículas. En cambio, la espermina, al poseer una carga inferior y una conformación más flexible, favoreció la formación de complejos más homogéneos en términos de tamaño y distribución, especialmente en modelos de ADN de menor longitud como el de salmón. Este comportamiento puede estar relacionado con la dinámica de interacción menos agresiva de la espermina, permitiendo una compactación más progresiva y estructurada.

Estos hallazgos están en concordancia con estudios previos sobre el empaquetamiento del ADN espermático, donde ambas policationes participan en distintas fases de la condensación nuclear, así como con observaciones estructurales en sistemas fisiológicos, en los que se reconoce la capacidad de la espermina para facilitar una compactación más reversible. Precisamente, la reversibilidad del sistema, especialmente en el caso de la espermina, constituye una ventaja significativa frente a otros métodos de vehiculización genética como vectores virales o lipídicos, ya que permite la liberación controlada del material genético en respuesta a estímulos celulares o ambientales.

En conjunto, el hecho de haber validado un mismo protocolo experimental con tres tipos de ADN —lineal, circular y genómico fragmentado— demuestra la versatilidad del método y su capacidad para adaptarse a diferentes contextos estructurales. Esta flexibilidad, unida a la posibilidad de modular el empaquetamiento mediante ajustes en la relación de cargas o en el agente policationico empleado, posiciona a este sistema como una herramienta prometedora para aplicaciones en terapia génica y nanomedicina.

Conclusiones

El presente Trabajo de Fin de Máster ha desarrollado y validado un protocolo eficaz y reproducible para la compactación de ADN de doble cadena mediante policationes naturales, con especial énfasis en su aplicación potencial en contextos biomédicos como la terapia génica. Utilizando el ADN λ como modelo de referencia, se logró establecer una relación óptima de cargas entre el ADN y los agentes compactantes, que permitió la formación de nanoestructuras organizadas y morfológicamente estables, visualizadas mediante técnicas de alta resolución como TEM y DLS.

Posteriormente, el protocolo fue aplicado exitosamente a otras moléculas de ADN con diferentes tamaños y topologías —incluyendo un plásmido circular y fragmentos de ADN genómico de salmón—, lo que permitió demostrar su versatilidad y adaptabilidad. La comparación entre protamina y espermina evidenció diferencias clave en la eficiencia de compactación, morfología de los complejos y homogeneidad estructural, siendo la espermina especialmente relevante por su capacidad para generar estructuras más uniformes y reversibles.

En conjunto, los resultados obtenidos no solo validan el protocolo propuesto como herramienta experimental robusta, sino que también sientan las bases para su futura aplicación en el diseño racional de vectores no virales para transferencia génica. La capacidad de modular la compactación del ADN en función del agente policationico y del tipo de ADN ofrece una plataforma flexible y adaptable a distintas necesidades terapéuticas, lo que refuerza la relevancia de este estudio en el campo emergente de la nanomedicina.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a Mónica López Fanarraga, directora de este Trabajo de Fin de Máster, por su constante apoyo, su orientación científica y su compromiso durante todas las etapas del proyecto. Su experiencia y confianza han sido claves para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco también al grupo de Nanomedicina, por haberme acogido desde el primer día con cercanía y por brindarme un ambiente en el que siempre me he sentido acompañada y cómoda. A lo largo de todo el proyecto, he contado con su apoyo, su disposición para ayudar y su espíritu colaborativo, lo que ha hecho que esta experiencia haya sido no solo formativa, sino también muy enriquecedora a nivel personal. Muy especialmente, quiero dar las gracias a los técnicos de laboratorio Débora, Pedro y Claudia, por su ayuda constante, su paciencia y su implicación diaria, así como a Andrés, que se encontraba realizando su doctorado durante mis primeros meses en el grupo y cuya ayuda también agradezco sinceramente.

Por último, gracias a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han estado presentes en este proceso, por su apoyo constante, su ánimo y su confianza. Sin su presencia, este camino habría sido muy diferente.

Referencias

- [1] Becerra, A. (2016). *Antecedentes de la función y la estructura del ADN: Identificación del ADN como material genético*. Dialnet. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6072411>
- [2] Deulofeu, M. T. (s.f.). *Historia del ADN*. Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.
- [3] Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2014). *Molecular Biology of the Gene* (7th ed.). Pearson Education.
- [4] Razin, S.V., Zhegalova I.V., & Kantidze, O.L. (2022). *Domain Model of Eukaryotic Genome Organization: From DNA Loops Fixed on the Nuclear Matrix to TADs*. Biochemistry (Mosc).
- [5] Mendieta, V., & Olenka, S. (2019). *La importancia de las protaminas en el proceso de compactación nuclear espermática*. Universidad Científica del Sur.
- [6] Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251–260.
- [7] Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*. 2007;128(4):787–800.
- [8] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.
- [9] Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. 2016;17(8):487–500.
- [10] Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(7):581–593.
- [11] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*. 2014;15(8):541–555
- [12] Rousseau, F., Fraser, W. M., Chen, H., & Lavelle, C. (2022). *Multiple modes of DNA compaction by protamine: Interplay of electrostatics and protein self-assembly*. Biophysical Journal, 121(2), 312–325. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.12.005>
- [13] Masuda, K., Terui, Y., Nishimura, K., & Kashiwagi, K. (2022). *Effects of structural isomers of spermine on the higher-order structure of DNA and gene expression*. Biochemistry and Biophysics Reports, 29, 101219. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101219>
- [14] Brewer, L. R., Corzett, M., & Balhorn, R. (1999). Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science*, 286(5437), 120–123. <https://doi.org/10.1126/science.286.5437.120>
- [15] Hud, N. V., & Vilfan, I. D. (2005). Toroidal DNA condensates: Unraveling the fine structure and the role of nucleation in determining size. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34, 295–318.
- [16] de Gennes, P. G. (1975). Collapse of a polymer-chain in poor solvents. *Journal de Physique Lettres*, 36(2), 55–57.
- [17] Dey, A., & Reddy, G. (2017). Packing defects propagated during the growth of toroidal condensates by semiflexible polymer chains. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(42), 9861–9870. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b07600>