



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: MICRO Y NANOTRANSPORTADORES
NO VÍRICOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE ADN Y
ARN EN TERAPÉUTICA**

Autora: Aitana Ajona Jover

Fecha: 22/05/19

Tutora: Ana Isabel Torres Suárez

MICRO Y NANOTRANSPORTADORES NO VÍRICOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE DNA Y RNA EN TERAPÉUTICA

1. RESUMEN

Los ácidos nucleicos son muy interesantes para el tratamiento de múltiples y complejas enfermedades. No se pueden administrar directamente ya que son moléculas de elevado peso molecular cargadas negativamente que se quedarían atrapadas o formarían complejos indeseados con estructuras del organismo. Por ello, ha sido necesario desarrollar nuevos sistemas de vectorización que los transporten a las células diana eficaz y específicamente. Los vectores no víricos reemplazan a los víricos puesto que no presentan sus problemas, como una elevada inmunogenicidad o una baja capacidad de carga. Dentro de los vectores no víricos encontramos lipoplejos, poliplexos, nanopartículas inorgánicas y nanosistemas a partir de ADN. Con el fin de mejorarlos, se funcionalizan con compuestos que ayuden al vector a atravesar barreras, a que sean más específicos o a que se pueda controlar externamente el momento de la liberación.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 TIPOS DE ADN Y ARN, SU APLICACIÓN EN TERAPÉUTICA Y PROBLEMAS DE ADMINISTRACIÓN

Los ácidos nucleicos son moléculas que conforman el material genético de los organismos, siendo indispensables para que se almacene y distribuya la información genética. Se encuentran en todas las células procariotas, eucariotas y virus. Son macromoléculas constituidas por polímeros lineales de nucleótidos, siendo éstos la unidad básica de los ácidos nucleicos. Tanto el ADN como el ARN consisten en numerosas repeticiones de, únicamente, cuatro tipos distintos de nucleótidos. Todos los nucleótidos presentan una estructura común: un grupo fosfato unido mediante un enlace fosfodiéster a una pentosa, la cual está unida a una base nitrogenada. El grupo fosfato proporciona cargas negativas, confiriendo características ácidas al ADN y ARN. Las bases nitrogenadas son aromáticas, planas e insolubles en agua, por lo que pueden establecer interacciones hidrófobas entre ellas. Esto estabiliza la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos (1-3).

Se distinguen dos tipos de ácidos nucleicos atendiendo a su composición química y su estructura: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

Por un lado, el ADN almacena la información genética y se caracteriza por tener como bases nitrogenadas dos purinas: adenina y guanina; y dos pirimidinas: timina y citosina. Además, presenta una desoxirribosa como pentosa. En las células eucariotas se encuentra en el núcleo celular, en forma de cromosomas, y en algunos orgánulos, como mitocondrias y cloroplastos. En las procariotas se encuentra localizado en su único cromosoma y en forma de plásmidos. Se caracteriza por: presentar complementariedad de bases mediante uniones del tipo puentes de hidrógeno; tener una secuencia de bases infinita; estar formada por dos cadenas en forma helicoidal, la cual se debe a la distribución de las cargas; tener las bases en el interior de la hélice y los grupos fosfato en el exterior; dar instrucciones a la célula para la elaboración de proteínas específicas para su control; presentar toda la carga de la información genética y hereditaria; autoduplicarse; y ser susceptible de sufrir mutaciones.

Por otro lado, el ARN actúa en el citoplasma e interviene de manera directa en la transmisión de la información desde el ADN hacia los compartimientos celulares. Se caracteriza por tener también como bases nitrogenadas dos tipos de purinas: adenina y guanina; y dos tipos de pirimidinas: citosina y uracilo. En este caso, la pentosa del ARN es una ribosa. En las células eucariotas se encuentra localizado en el núcleo, en el citoplasma, en la matriz mitocondrial y en el estroma de cloroplastos. En las procariotas se localiza en el citosol. Se caracteriza por: ser una sola cadena lineal y simple (excepto la del ARN bicatenario de los reovirus); tener uracilo en vez de timina; formarse a partir de la transcripción; y ser una herramienta esencial para la síntesis de proteínas (1, 3). Hay distintos tipos de ARN: ribosomal (ARNr), mensajero (ARNm), de transferencia (ARNt), micro ARN (miRNA), y ARN pequeño de interferencia (siRNAs). ARNr, ARNm y ARNt codifican para proteínas; mientras que miRNA y siRNA son reguladores (4).

Los ácidos nucleicos han suscitado gran interés en las últimas décadas dadas sus prometedoras utilidades en terapéutica. Se han desarrollado numerosas estrategias terapéuticas con estas moléculas para el tratamiento de enfermedades complejas como el cáncer, las cuales han ido evolucionando y mejorándose. Su uso se basa fundamentalmente en inhibir la expresión de ADN o ARN con el fin de detener la producción de determinadas proteínas anormales relacionadas con una enfermedad sin alterar las normales. Los ácidos nucleicos usados en terapéutica (ANTs) son ácidos nucleicos propiamente dichos o compuestos similares. Existen distintos tipos de ANTs, pero todos comparten el mismo mecanismo de acción: el reconocimiento específico de secuencias endógenas de ácidos nucleicos siguiendo el sistema de emparejamiento de Watson-Crick. ANTs tienen carga negativa, elevado peso molecular, propiedades fisicoquímicas distintas a fármacos pequeños y son inestables en ambientes biológicos. Por esto es necesario introducirlos en vectores adecuados para que lleguen al compartimento intracelular correcto (5, 6). Para modular la expresión génica, se han desarrollado diferentes métodos. Aunque todos se basan en el reconocimiento específico de secuencias de nucleótidos, se diferencian en dónde y cómo alteran la información genética. De acuerdo a Sridharan K et al. (6), la terapéutica con ácidos nucleicos se puede dividir en terapéutica con ADN y terapéutica con ARN.

En primer lugar, dentro de la terapéutica con ADN, encontramos: oligonucleótidos antisentido (ASOs), aptámeros de ADN y terapia génica. (i) Los ASOs son secuencias de cadenas simples y cortas (8-50 pares de bases) que se unen a ARNm endógeno siguiendo los criterios de Watson-Crick. Tras unirse, el complejo se degradará por la ribonucleasa h endógena, o bien se producirá un bloqueo del ARNm debido a un impedimento estérico. (ii) Los aptámeros de ADN son cadenas cortas (56-120 nucleótidos) simples sintéticas de oligonucleótidos similares a ASOs. Se comportan como anticuerpos sintéticos hecho a medida. Pueden unirse a pequeñas secciones de macromoléculas, como proteínas terapéuticas, o pueden encerrar completamente una molécula pequeña, como es el caso de fármacos de pequeño peso molecular. Se presentan como una alternativa real a los anticuerpos monoclonales, utilizándose en vectorización activa, ya que son capaces de dirigir proteínas o pequeñas moléculas terapéuticas a las células diana, uniéndose a ellas mediante reconocimiento estructural. Presentan múltiples ventajas frente a los anticuerpos monoclonales: una producción sencilla y reproducible, pueden ser modificados para incrementar su estabilidad frente a nucleasas, pueden ser desnaturalizados y utilizados repetidamente, no son inmunogénicos, su capacidad de penetración en tejidos y de regeneración, su estabilidad a temperatura ambiente, el abaratamiento de sus costes de producción debido a que se pueden obtener mediante síntesis química, evitando el uso de animales o células, su capacidad de ser administrados

intravenosa y subcutáneamente, y su capacidad para ser marcados (7). (iii) La terapia génica reemplaza genes con funciones anormales o ausentes por una variante del gen que funciona correctamente. El gen que se desea introducir es transportado por vectores. La mayor preocupación de la terapia génica es que se desconoce el riesgo a largo plazo. Tiene gran utilidad en el tratamiento de cáncer y enfermedades de etiología genética (5).

En segundo lugar, dentro de la terapéutica con ARN, encontramos: ARN de interferencia (RNAi) y ARNs pequeños de interferencia (siRNAs), micro ARNs (miRNAs), aptámeros y señuelos de ARN, ribozimas, y ARNs circulares (circRNAs). (i) El RNAi es un potente mecanismo de defensa del genoma frente a la invasión de material genético móvil procedente de virus que generan ARN aberrante o cadenas dobles cortas de ARN (dsARN). ARNi es una herramienta que permite el silenciamiento selectivo de genes. Es un proceso postranscripcional mediante el cual moléculas de ARN complementarias al ARNm inducen la degradación de esa secuencia específica de ARNm, anulando la traducción de éste a proteínas. siRNA son moléculas cortas (21-23 nucleótidos) que pueden ser sintetizadas. A diferencia de los oligonucleótidos de ADN, son transportados en estructura bicatenaria, lo cual es más estable. Terapias con siRNAs tienen un gran potencial en enfermedades causadas por la mutación o expresión incorrecta del material genético ya que siRNA puede ser activado experimentalmente. Los principales problemas con esta terapia son la supresión de genes que no se querían eliminar y el transporte al interior de la célula (8, 9). (ii) miRNAs son cadenas simples de ARN (15-22 nucleótidos) no codificantes que funcionan como reguladores negativos postranscripcionales en la mayor parte de los procesos biológicos. La desregulación de miRNA está relacionada con diversas enfermedades en humanos, por lo que resulta un enfoque atractivo en terapéutica. Su ventaja reside en que es capaz de tener múltiples dianas, a diferencia del enfoque tradicional que solo se centra en una, haciendo que esta técnica sea extremadamente eficiente. En el tratamiento del cáncer se pueden utilizar siguiendo dos enfoques. El primero es directo, introduciéndose oligonucleótidos que bloquean la expresión de genes o inducen un miRNA supresor de tumores que se había perdido a causa de la enfermedad. El segundo es indirecto, y consiste en utilizar fármacos que modulen la expresión de miRNA. (iii) Los aptámeros y señuelos de ARN son moléculas pequeñas de ARN capaces de plegarse en estructuras tridimensionales y unirse a proteínas, inhibiéndolas como si fuesen antagonistas, lo cual permite inhibir proteínas en procesos patológicos concretos. Los aptámeros y señuelos de ARN son capaces de unirse a proteínas virales. La ventaja de los aptámeros de ARN es que son capaces de acceder tanto a dianas intracelulares como extracelulares, a diferencia de otras terapias con ARN (10). (iv) Los ribozimas son moléculas de ARN con actividad catalítica. Tienen una elevada especificidad, un amplio espectro y actúan antes de la traducción, por lo que tanto los ribozimas naturales como los sintéticos pueden ser usados para suprimir específicamente la función de genes. Su capacidad para romper ARNm, con el fin de prevenir la síntesis de proteínas, les confiere aplicaciones en cáncer y virología (11). (v) Los circRNAs son moléculas de ARN endógeno no codificante que tienen los extremos 3' y 5' unidos covalentemente de forma que son moléculas cerradas. Esto les confiere estabilidad ya que son resistentes a la degradación de exonucleasas. Gracias a su estabilidad, circRNAs pueden ser utilizados como señuelos para proteínas y unirse e interactuar con ellas. circRNAs se conocen como “esponjas de miRNA”, ya que son capaces de unirse a él y regular su función. circRNAs pueden utilizarse como dianas terapéuticas, vectores para el tratamiento de cáncer (como el cervical) o como biomarcadores en enfermedades (12, 13).

Cabe destacar que el uso de ácidos nucleicos en terapéutica ha ocasionado grandes quebraderos de cabeza, ya que transportar ADN y ARN al interior celular y nuclear implica superar numerosos retos, puesto que se trata de moléculas de elevado peso molecular cargadas negativamente. Las formas convencionales de transporte de principios activos no permiten llevarlo a cabo, por lo que ha sido necesario desarrollar nuevos vectores que sean capaces de transportar ácidos nucleicos de forma exitosa, superar las barreras fisiológicas, bioquímicas y farmacéuticas y cumplir unos límites de seguridad aceptables. Además, las formas farmacéuticas convencionales no permiten controlar el tiempo que permanece el fármaco en su lugar de acción (aspecto temporal) ni la cantidad de fármaco que llega a su diana terapéutica (aspecto espacial); mientras que las nuevas estrategias y sistemas sí, disminuyendo así el riesgo de que aparezcan efectos adversos indeseados (14, 15). En la vectorización se produce primero la administración del sistema de vectorización, después la distribución y, finalmente, la liberación en la biofase (lugar de acción); mientras que con las formas farmacéuticas convencionales se produce la administración, liberación, absorción y distribución en la biofase y exofase (resto de tejidos) (15).

2.2 OBJETIVOS DE LA VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS Y TIPOS DE VECTORES

Se puede decir que la vectorización presenta cuatro finalidades (14). La primera es incrementar la absorción de fármacos, facilitando su difusión a través de los epitelios. La segunda es modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y, con ello, su perfil de distribución a ciertos tejidos u órganos con el fin de incrementar su eficacia o disminuir efectos indeseables. La tercera es incrementar la penetración y distribución intracelular necesarias cuando la diana sobre la que va a actuar el fármaco se encuentra en el interior de la célula. La cuarta y última es mejorar las técnicas de imagen y diagnóstico *in vivo*. Estas cuatro finalidades se pueden agrupar dentro de un gran objetivo, que es que el control del lugar de liberación del fármaco. Para que se dé correctamente éste, los elementos del sistema de vectorización (el principio activo y el transportador o vector) han de cumplir con siete requisitos. El primero es ser biocompatibles y biodegradables, es decir, formar productos de degradación no tóxicos y fácilmente eliminables. El segundo es evitar la liberación inmediata del principio activo tras su administración y durante su distribución, pero favorecer la liberación de éste en la diana terapéutica. El tercero es tener un tamaño adecuado para la vía de administración a la que están destinados. Los sistemas de tamaño inferior a 1 micra podrán circular libremente por el torrente circulatorio; mientras que los superiores a 10 micras quedarán retenidos en la primera red capilar que encuentren. El cuarto es tener un tiempo de circulación en el torrente circulatorio lo suficientemente prolongado como para alcanzar la diana. El quinto es presentar una específica o inespecífica capacidad de acumulación en órganos, tejidos o células diana. El sexto es presentar estabilidad durante el almacenamiento, de forma que las propiedades fisicoquímicas del transportador y del principio activo se mantengan inalteradas en las condiciones de almacenamiento preestablecidas. El séptimo y último es tener una producción a gran escala y en condiciones de esterilidad fácil. De esta forma, se dan las ventajas de la vectorización, que son: (i) la liberación del principio activo de forma preferente a nivel del órgano o célula diana, con lo que se consigue acentuar el efecto farmacológico y reducir las reacciones adversas indeseables; (ii) evitar la biodegradación del fármaco durante su distribución, tanto física como química; (iii) posibilitar el acceso a la biofase del principio activo, gracias al correcto diseño de vectores capaces de atravesar las barreras fisiológicas (15).

Además, los vectores pueden ser modificados (14) en su superficie con el fin de conferirles diversas características: (i) incrementar el tiempo de permanencia en sangre del nanosistema, evitando su captura por parte de los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear, por ejemplo con polietilenglicol (PEG) de peso molecular 2.000 a 5.000 Da; (ii) permitir el reconocimiento específico y unión a tejidos o células diana por medio de ligandos específicos como anticuerpos monoclonales, aptámeros, fragmentos Fab, ácido fólico o transferrina; (iii) permitir la liberación del fármaco en función de determinadas características fisiológicas o patológicas como pH y temperatura, asociando al nanosistema componentes sensibles a estas condiciones; (iv) posibilitar la penetración en el interior de la célula por medio de péptidos fusógenos y que el fármaco sea protegido de la degradación lisosomal cuando la diana terapéutica se localiza en el interior de la célula; (v) la posibilidad de obtener nanosistemas multifuncionales conteniendo, por ejemplo, un fármaco y un agente de diagnóstico.

Por otro lado, los vectores se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios (16): según la selectividad del destino y según la forma de alcanzar el destino.

En el primer caso, se distingue la vectorización a nivel de órgano (primer orden), de tejido (segundo orden), de célula (tercer orden) e incluso a nivel de un determinado orgánulo celular (de cuarto orden). A nivel celular, el vector tiene diversas posibilidades de interacción con la célula: interacción membrana-vector, intercambio lipídico, fusión y endocitosis.

En el segundo caso, se distingue vectorización pasiva, vectorización activa y vectorización mediada por un desencadenante externo. La vectorización pasiva es aquella que está relacionada con la capacidad inherente de los fagocitos de reconocer sustancias exógenas (17). Para controlar la vectorización pasiva, se vigila el tamaño del nanotransportador y se funcionaliza con agentes que provean efecto máscara. A la hora de diseñar vectores pasivos, habrá que tener en cuenta el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR), en el cual las nanopartículas se acumulan en los tejidos infectados por tumores; y el sistema reticuloendotelial del hígado y bazo (SRE), el cual es un sistema integrado por células distribuidas por todo el organismo y que está compuesto por macrófagos móviles, macrófagos tisulares fijos y algunas células especializadas de la médula ósea, bazo, hígado y ganglios linfáticos. Tiene como misión principal destruir por fagocitosis partículas extrañas, microorganismos, toxinas, etc. La funcionalización con PEG es una vectorización pasiva que evita la vectorización del fármaco a nivel del SRE (18). Los nanosistemas farmacéuticos en el organismo son reconocidos como partículas extrañas, de forma que son opsonizados y eliminados del torrente circulatorio antes de que puedan cumplir su función. Por ello, una de las propiedades más importantes de todo nanosistema es poseer una elevada semivida plasmática. La opsonización se puede evitar con PEG. Este polímero impide la interacción con ciertos componentes sanguíneos y reduce la unión de proteínas plasmáticas, disminuyendo la fijación de opsoninas y su captura por parte del SRE. El mecanismo por el cual las cadenas de PEG previenen la opsonización es múltiple y no se conoce con certeza, pero se cree que intervienen factores como el aumento de la hidrofilia de la superficie del nanosistema, la disminución de la carga superficial, el aumento de las interacciones repulsivas entre componentes sanguíneos y nanovehículos y que la formación de la capa polimérica sobre la superficie del nanosistema la hace impermeable para macromoléculas como las opsoninas, incluso a bajas concentraciones (14).

La vectorización activa es aquella que requiere que se incorporen identificadores. Esta vectorización se realiza con el fin de atravesar las barreras biológicas específicas que el

nanotransportador debe cruzar para liberar el fármaco en la célula o tejido diana (Fig. 1) (19). Se produce una interacción entre los vectores activos (moléculas ancladas al nanotransportador) y las dianas terapéuticas (receptores situados en la membrana de las células). Gracias a esto, el nanotransportador es internalizado con una mayor eficiencia y especificidad en las células afectadas, aumentando la especificidad del tratamiento y reduciendo los efectos secundarios. Esta vectorización también permite atravesar la barrera hematoencefálica. Los identificadores más destacables son moléculas pequeñas como los azúcares (manosa), vitaminas (ácido fólico), proteínas pequeñas, ácidos nucleicos, oligoproteínas y anticuerpos monoclonales (18).

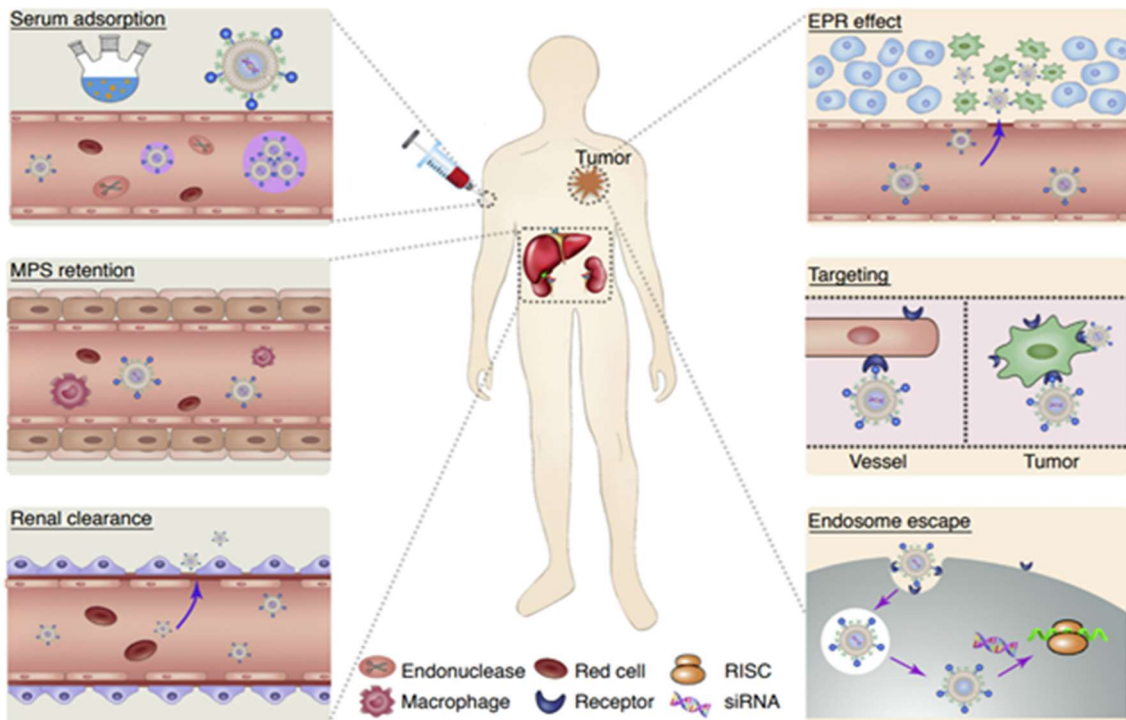


Fig. 1. Barreras biológicas que superan los nanotransportadores. Disponen de una película de PEG y de ligandos específicos de la diana. Normalmente son administrados intravenosamente. Una vez que se encuentran en el torrente sanguíneo, proteínas séricas se adsorben sobre los nanotransportadores formando una corona proteica y confiriendo al vector una nueva identidad biológica. Esto da lugar a la agregación de partículas, la retención SRE y al aclaramiento hepático y renal. Después, se acumula en el tumor por el efecto EPR, los nanotransportadores se internalizan en la célula tumoral y se quedan atrapados dentro de un endosoma. La mayoría de los nanotransportadores son capaces de escaparse e ir al citoplasma y liberar el siRNA. Finalmente, siRNA es incorporado en el material genético de la célula (19).

Finalmente, la vectorización mediada por un desencadenante externo es aquella en la que se someten los vectores a una modificación, como por ejemplo aplicando campos magnéticos, hipertermia o radiaciones. Permite mediante medios externos el seguimiento y control (en el caso de las partículas magnéticas) de la biodistribución del nanotransportador, la liberación del fármaco en un lugar específico del organismo y el diagnóstico de determinadas enfermedades. Los nanotransportadores se modifican introduciendo partículas metálicas magnéticas, puntos cuánticos y moléculas fluorescentes. Generalmente, los nanotransportadores que incluyen partículas metálicas (magnéticas y puntos cuánticos) en su estructura se preparan mediante el recubrimiento de dichas partículas con una capa polimérica. Por otro lado, las moléculas fluorescentes son enlazadas covalentemente al polímero antes de la preparación del nanotransportador. Las grandes ventajas de este tipo de vectorización es que se consiguen vectores inertes y

que las posibilidades de su detección y control permanecen invariantes con el tiempo. Además, las nanopartículas magnéticas sufren un fenómeno conocido como hipertermia magnética, el cual consiste en el calentamiento de dichas partículas cuando son sometidas a campos magnéticos alternantes. Esto se ha usado en el tratamiento del cáncer y también se ha acoplado a partículas termosensibles, creando así un método de liberación con control externo (18).

3. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es hacer una revisión de los vectores no víricos que se han desarrollado para vectorizar ADN y ARN. Se trata por tanto de conocer las características de los ácidos nucleicos y de los materiales de los vectores, de forma que podamos entender por qué se elaboran los vectores de la forma en la que se hacen. Además, otro punto importante de este trabajo es mostrar que estos vectores tienen múltiples aplicaciones en terapéutica y que tiene un futuro muy prometedor.

4. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se ha obtenido el material bibliográfico de las bases de datos PubMed, WOS y Google Académico. A partir de estas, se han obtenido artículos y libros, tanto en inglés como en español, utilizando como palabras clave: “drug delivery”, “non-viral carrier”, “gene therapy and nanomedicine”, “gene therapy and non-viral carrier”, “siRNA and non-viral nanocarrier”, “DNA and non-viral delivery”, “RNA and non-viral delivery”, “DNA nanocarrier” and “RNA nanocarrier”. Además, en la búsqueda se han utilizado filtros de fecha y de “review”. Por otro lado, para realizar la bibliografía se ha utilizado el programa EndNote X8.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 TIPOS DE VECTORES NO VÍRICOS

ADN y ARN son moléculas de gran tamaño cargadas negativamente que sufren un rápido aclaramiento y degradación por acción de nucleasas; inefectividad para atravesar las membranas celulares; y tienen un alto riesgo de desencadenar una respuesta inmunitaria. Por ello, es necesario encerrarlos en vectores elaborados a partir de distintos materiales:

Lípidos catiónicos. Son uno de los más usados. Presentan una estructura común: cabeza hidrofílica y cola hidrofóbica. Normalmente, los grupos hidrofílicos son aminas primarias, secundarias y terciarias, o sales de amonio cuaternarias. Es necesario que las cabezas estén cargadas positivamente para que se dé la unión con los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos. De acuerdo a Al-Dosari MS et al. (20), los lípidos catiónicos y polímeros catiónicos forman complejos condensados con las cargas negativas del ADN a través de interacciones electrostáticas. Los complejos protegen al ADN y facilitan la absorción y el transporte intracelular. Las colas hidrofóbicas suelen ser cadenas alifáticas, colesterol u otro tipo de anillos esteroídicos. La unión de ambas partes normalmente es



Fig. 2. Mecanismo de formación de lipoplejos. (32).

mediante enlaces tipo éter, éster, carbamato o amida. Éstos van a determinar la biodegradabilidad del vector. La eficacia de la transfección de los lípidos catiónicos depende de la estructura de los lípidos (la forma

geométrica, el número de grupos cargados en cada molécula, la naturaleza y los enlaces), el ratio de cargas usado para formar el complejo ADN-lípido, y las propiedades del colípido o “lípido asistente”. Cuando se mezclan con las cargas negativas de los ácidos nucleicos, las cargas positivas de los lípidos forman espontáneamente estructuras extremadamente compactas llamadas lipoplejos (Fig. 2). Las cargas positivas protegen al ADN y ARN de nucleasas intra y extracelulares. Además, estas cargas también interaccionan electrostáticamente con las moléculas de la membrana celular cargadas negativamente, lo cual facilita su paso al interior celular. Los colípidos más habituales son colesterol y dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE). Los lípidos catiónicos son, en mayor o menor medida, tóxicos. Esta toxicidad disminuye con la presencia de DOPE, ya que reduce el ratio de cargas entre el lípido y el ADN/ARN necesario para alcanzar la máxima transfección. Son materiales muy adecuados para preparar vectores ya que fisiológicamente son bien tolerados. Tienen múltiples ventajas frente a otros materiales: (i) buena estabilidad a largo plazo; (ii) su producción es económica; (iii) no requieren solventes; (iv) pueden ser esterilizados (autoclave); (v) tienen una elevada capacidad para proteger al fármaco de la degradación y para modular su liberación (21). Dado que los lípidos catiónicos presentan un aclaramiento rápido, se utiliza PEG para aumentar la semivida de los lipoplejos. Sin embargo, evita las interacciones de éstos con la membrana plasmática, lo cual disminuye la eficacia de la transfección. Existe una gran variedad de lípidos que pueden formar lípidos catiónicos, como 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC) o 1,2-dioleoiloxi-3-trimetilamonio-propano (DOTAP).

Polímeros catiónicos. Se combinan con ADN/ARN y forman unos nanovectores llamados poliplejos (Fig. 3). Son más estables que los lipoplejos. Al administrarlos por vía sistémica, los poliplejos tienden a agregarse y formar complejos de elevado tamaño que se acumulan en tejidos como el pulmonar o el hepático. Por otro lado, inducen en menor medida los niveles de citoquinas que los lipoplejos. Además, para reducir las interacciones inespecíficas, los poliplejos se pueden mejorar añadiendo polímeros inertes como PEG (5000 Da), Pluronic F127®, o dextrano. Uno de los polímeros catiónicos más importantes es el polietilenimina (PEI), ya que presenta una elevada efectividad en la transfección. Ésta y su toxicidad dependen de: (i) su peso molecular (PM); (ii) su configuración; (iii) el ratio de cargas entre el polímero y el ADN/ARN; (iv) el grado de aminas libres. PM medios y bajos son más eficientes y tienen una toxicidad más baja que PM elevados. Hay tanto PEI lineales como ramificados, pero estos últimos presentan mayor toxicidad y menor eficacia en la transfección. Sin embargo, son útiles para formar nanopartículas destinadas a las vías respiratorias. Con el objetivo de mejorar la transfección y reducir la citotoxicidad de los poliplejos de PEI, estos polímeros se pueden encapsular dentro de liposomas neutros o aniónicos, nanopartículas solidas biodegradables, o hidrogeles de base polimérica, modificando así la carga de su superficie.



Fig. 3. Mecanismo de formación de poliplejos (32.)

Además, también se pueden utilizar polipéptidos, tanto de origen natural como sintético. Algunos de ellos son poli-L-lisina (PLL), poliornitina, poliarginina, histonas y protaminas. Tienen una elevada capacidad para condensar los ácidos nucleicos. Recientemente, se han combinado PLL y PEG para dar un conjugado con una composición química definida capaz de mejorar el transporte del material genético a varios órganos. Los péptidos mencionados están cargados positivamente e interaccionan electrostáticamente con los fosfatos de los ácidos nucleicos, formando moléculas

compactas. Protegen su contenido y son capaces de transportarlo hasta la célula diana, pudiendo atravesar la membrana nuclear (22, 23). Por otro lado, también son de gran utilidad en el transporte de genes polímeros como quitosán, derivados amino de dextrano y polímeros catiónicos acrílicos.

La ventaja de utilizar polímeros sintéticos es que pueden estandarizarse con mayor facilidad y han demostrado ser mucho más seguros que los naturales. Para obtener un polímero sin impurezas que afecten a su desempeño biológico, hay que seleccionar el polímero más adecuado, considerando su estructura química, sus propiedades fisicoquímicas y biológicas y la metodología de polimerización que ha de ser empleada. (18)

Materiales inorgánicos. Suelen utilizarse metales como el hierro, el oro o la plata, sales inorgánicas, cerámicas y grafeno.

Los nanomateriales de oro presentan una superficie flexible, lo cual facilita su funcionalización. Esto hace posible que el AND/ARN forme complejos directamente con las nanopartículas de oro (24).

Las sales de iones metálicos, como fosfato cálcico, carbonato cálcico, fosfato de magnesio y carbonato de magnesio dan lugar a complejos con diámetros de 10-100 nm. La superficie de éstos se suele recubrir para facilitar la interacción con ácidos nucleicos o mejorar el transporte hasta la célula diana. Su pequeño tamaño supone numerosas ventajas, como ser capaces de superar gran parte de las barreras fisiológicas y celulares, y producir una alta expresión de genes. Estas sales contienen cationes divalentes que forman complejos iónicos estables con las cargas negativas de los ácidos nucleicos. Son transferidos a las células a través de canales iónicos (22). Además, también pueden ser transportados a través de las membranas celulares mediante receptores específicos de membrana o nucleolina, la cual transporta las nanopartículas directamente al núcleo, eludiendo así la degradación endosomal y lisosomal. Presentan una toxicidad muy baja o nula y son inertes frente al sistema inmunitario.

Las cerámicas son capaces de transportar ácidos nucleicos en sus poros y liberarlos de forma controlada (25). Su estructura puede ser modificada con la inclusión de grupos catiónicos que permiten el anclaje a los fosfatos de los ácidos nucleicos. Son capaces de evadir al sistema inmune y de atravesar determinadas barreras como la hematoencefálica o la pared del tracto gastrointestinal. Tienen un tamaño de partícula menor a 50 nm, una elevada superficie específica y una naturaleza porosa que no muestra cambios con el pH ni presenta hinchamiento. Los materiales cerámicos más comunes son SiO₂, TiO₂, ZrO₂ e hidróxidos dobles laminares (HDL) (26).

El grafeno es un alótropo del carbono. Es un nanomaterial muy interesante para vectorizar material genético gracias a sus características ópticas, térmicas y eléctricas. El óxido de carbono presenta una elevada eficacia en el transporte de grandes cargas de material genético, al igual que una buena liberación controlada. También es capaz de proteger a los ácidos nucleicos de posibles escisiones (24).

A partir de los materiales citados anteriormente, se pueden ensamblar distintos tipos de micro y nanotransportadores, como por ejemplo complejos poliméricos, complejos lipídicos, nanopartículas lipídicas sólidas catiónicas (SLNs), nanocápsulas lipídicas (NLC) (21), nanopartículas poliméricas, micelas (PEG con PLL) (27), liposomas catiónicos (28), nanotubos de carbono (29), dendrímeros, nanopartículas de sílice mesoporosas y microburbujas (30) (Fig. 4).

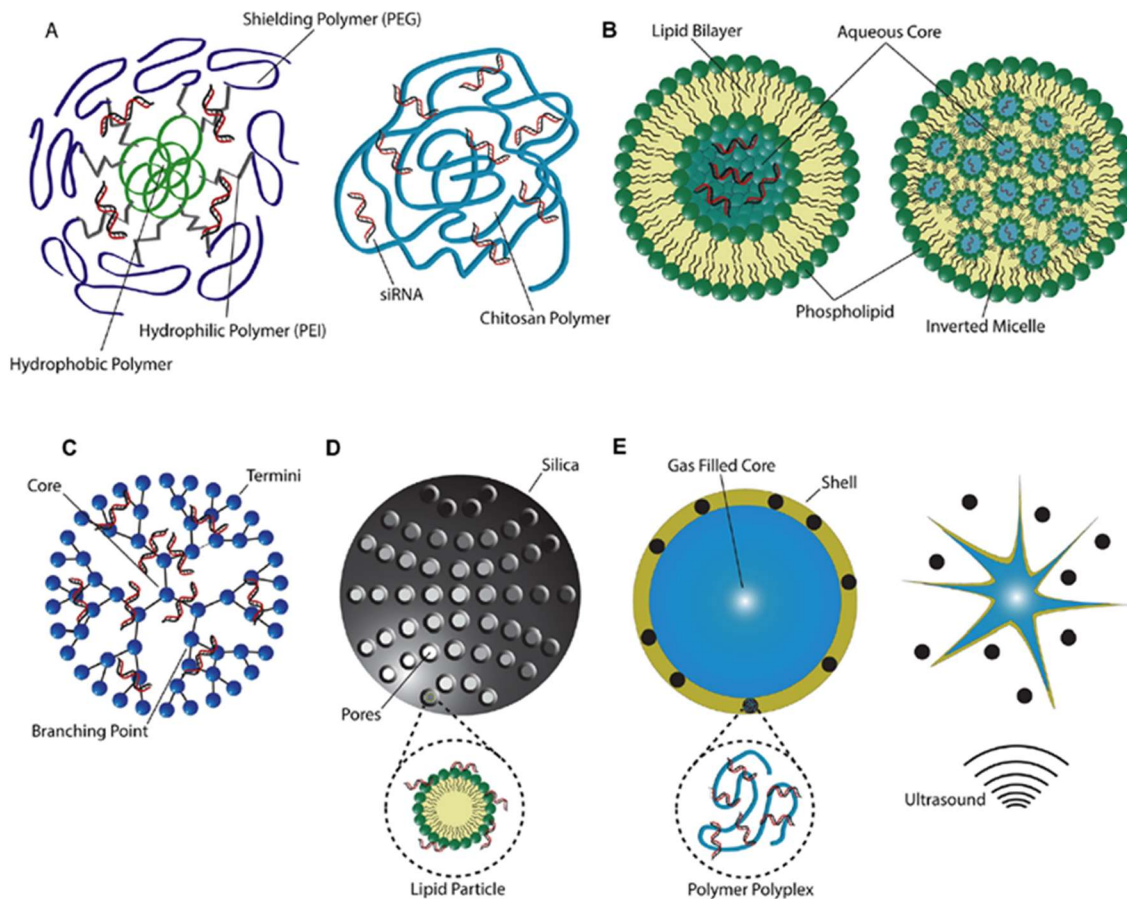


Fig. 4. Ejemplos de sistemas de liberación de fármacos. A) Nanopartículas poliméricas, la de la izquierda con polímeros tribloque y la de la derecha con chitosán. B) Nanopartículas lipídicas, siendo un liposoma la de la izquierda y una nanopartícula lipídica con micelas inversas la de la derecha. C) Dendrímtero. D) Nanopartícula de sílice mesoporosa. E) Microburbuja, cuya superficie/coraza puede ser de distintos materiales. Cuando se les aplica ultrasonido se rompen y los poliplejos de la coraza entrarán en las células (30).

5.2 ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICACIA DE LOS VECTORES NO VÍRICOS

A pesar de introducir el material genético en nanotransportadores, la mayoría se quedan atrapados en el hígado, bazo y riñones (por el SER) y, en el caso de los tumores sólidos, solo un 0,7% llegan a su lugar de destino. Con el fin de solucionar esto, se han diseñado formulas inteligentes capaces de percibir determinados estímulos y provocar cambios que faciliten la vectorización, como hincharse, agregarse, degradarse, reajustar su superficie e invertir sus cargas (19, 31). Estas modificaciones están basadas en:

- Estímulos fisiológicos:
 - Cambios en el pH. El pH en los tumores es más ácido ya que se producen fermentaciones metabólicas y se acumula ácido láctico debido a una disminución en la perfusión. Se cree que esta disminución del pH favorece la metástasis. Este fenómeno ha llevado a desarrollar nanotransportadores que no solo son capaces de resistir los múltiples cambios de pH que sufren desde que son administrados hasta que llegan a la célula diana, sino que también aprovechan este aumento en la acidez para protonarse y cambiar su solubilidad, interacción electrostática o degradar enlaces inestables en medio ácido. Para ello, los vectores se pueden funcionalizar, por ejemplo, con ácido

2,3-dimetilmaleámico (DMMA), que es un compuesto muy sensible a cambios del pH (Fig. 5, B).

- Presencia de enzimas. Se ha observado que el inicio, la progresión, la invasión y la metástasis de un tumor están normalmente asociados con un aumento en la expresión de determinadas enzimas, distinguiéndose dos tipos: aquellos que se secretan en la matriz extracelular y aquellos que se expresan en el interior de la célula. Dado que las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) siempre se sobreexpresan en tejidos tumorales con potencial a derivar en metástasis, estos enzimas son una señal frecuente a la que van dirigidos los nanotransportadores.
- Reacciones redox. Se ha observado que la desregulación del metabolismo y de los neutralizadores de ROS desencadena la acumulación deletérea de ROS en células tumorales, las cuales se adaptan al estrés oxidativo mediante una regulación positiva de glutatión (GSH). Un ejemplo de funcionalización es la adición de grupos tioacetal en un dendrímero, ya que son muy sensibles a ROS y provocan una disociación del vector-ácido nucleico eficaz y específica. Además, las células tumorales tienen una cantidad cuatro veces mayor de GSH que las células sanas, por lo que también se pueden diseñar nanotransportadores que respondan a GSH (Fig. 5, A). Este es el caso de enlaces disulfuro o diselenio.
- Metabolitos. La proliferación de tumores desencadena la desregulación de determinados metabolitos como oxígeno, glucosa, ATP y ácidos nucleicos, por lo que también se pueden utilizar para controlar la liberación del material genético contenido en los nanotransportadores. De esta forma, se han introducido en los vectores fracciones atraídas por la hipoxia, concentraciones elevadas de ATP (Fig. 5, C) o determinados genes como fragmentos de ADN, ARNm y miRNAs.

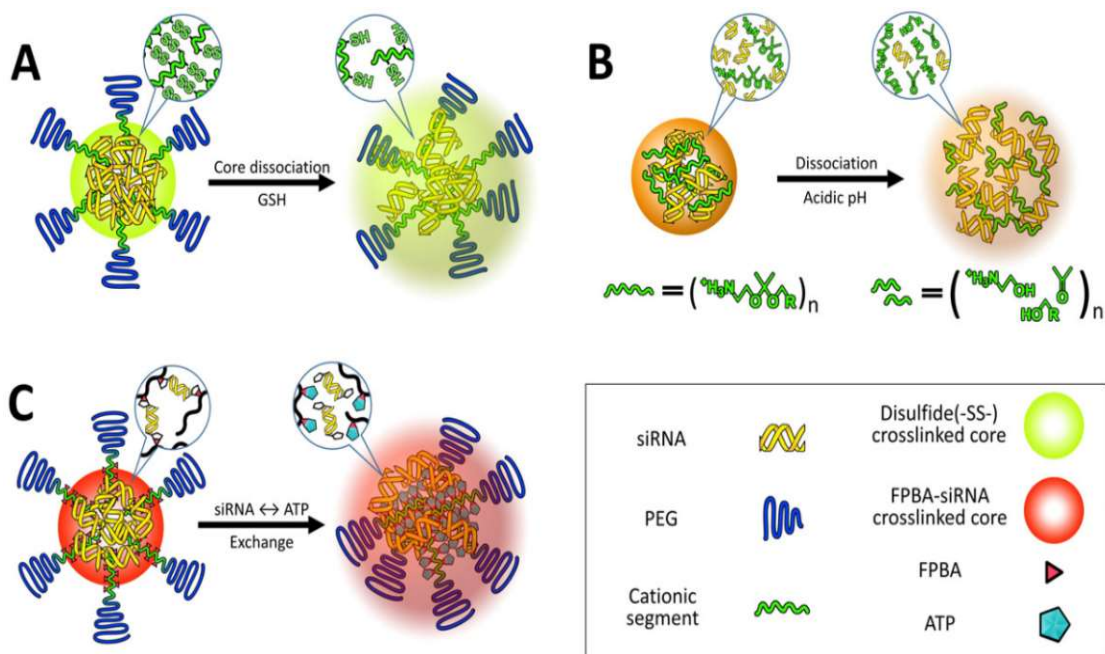


Fig. 5. Vectores no víricos para la liberación selectiva de siRNA. A) Estructura con enlaces tiol en el núcleo que reaccionan ante la presencia de ROS. B) Estructura con compuestos que aceleran la disociación ante pH ácidos. C) Estructuras con compuestos que consiguen una disociación selectiva ante la presencia de ATP (31).

- Estímulos externos:
 - Luz. Es una herramienta de gran interés ya que es capaz de modular el transporte y la entrega del material genético con un gran control de forma no invasiva. Tanto la luz ultravioleta (UV) como la visible (Vis) tienen la suficiente energía como para iniciar reacciones fotoquímicas. Sin embargo, presenta una baja capacidad de penetración en tejidos blandos y producen daño tisular. Por otro lado, aunque la luz del infrarrojo cercano (NIR) sí que es capaz de penetrar en los tejidos y produce daños mínimos en los tejidos, tiene una energía demasiado baja como para iniciar reacciones fotoquímicas. Mediante nanopartículas de conversión ascendentes (UCNPs) se consigue convertir la NIR absorbida en luz UV o Vis. UCNPs se han conseguido introducir en vectores con el fin de controlarlos y monitorizarlos en tiempo real.
 - Temperatura. NIR puede ser adsorbido por agentes fotoabsorbentes, como nanoestructuras de oro, nanomateriales de carbono y nanopartículas orgánicas para generar calor, lo cual conlleva la ablación térmica de células cancerosas. También se han desarrollado polímeros termosensibles (TSPs).
 - Campos magnéticos. Tienen una penetración tisular excelente y también es una herramienta no invasiva. Permiten llevar a cabo el transporte y monitorización de nanotransportadores. Un ejemplo es ensamblar siRNAs en el núcleo de óxido de hierro, el cual actúa como agente de imagen en una resonancia magnética para la monitorización del tratamiento. Al mismo tiempo, la manipulación de nanopartículas magnéticas, normalmente de óxido de hierro (IONs), se utiliza para controlar externamente el transporte de una determinada droga (ácido nucleico) hasta el lugar deseado.
 - Ultrasonido. Es una herramienta no invasiva que permite controlar la liberación de la droga espacial y temporalmente. Provoca ligeros daños en tejidos sanos. Los nanotransportadores y los tejidos pueden absorber la energía de una pequeña fracción del ultrasonido y convertirla en calor, generando la liberación del contenido del vector.

5.3 APLICACIONES

En cuanto a su aplicación terapéutica, la nanotecnología tiene gran importancia en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades, como el cáncer, enfermedades y disfunciones cerebrales y enfermedades infecciosas.

- Cáncer. Principalmente se busca incrementar la eficacia y disminuir la toxicidad del tratamiento, controlando la biodistribución e incrementando la penetración intracelular. Para ello se pueden utilizar, por ejemplo, lipoplejos y poliplexos. Un ejemplo de lipoplejos son aquellos preparados a partir de lípidos catiónicos (DC-colesterol/DOPE) y que actúan como transportadores de siRNA en células cancerosas. Para evitar que los componentes de la sangre con carga negativa formen complejos con los lipoplejos, se les añade PEG. Además, éste contribuye en la acumulación de la sustancia activa en las células malignas, en la disminución de la excreción por parte de los riñones y en la mejora de la circulación de los lipoplejos en el torrente sanguíneo. Los lipoplejos de PEG con siRNA se utilizan en el tratamiento de cáncer de ovario para silenciar el gen de las proteínas kinesin husillo (KSPs). Esto se traduce en un elevado silenciamiento de genes en células cancerosas y en una significativa disminución en el crecimiento del tumor.

También es interesante que en estudios *in vivo* en ratones no han producido una respuesta inmunitaria innata (32).

Por otro lado, un ejemplo del uso de poliplejos son aquellos que se obtienen de DOPE y PEI y se utilizan en el transporte combinado de P-gp siRNA y doxorubicina para el tratamiento de cáncer de pecho. Otro ejemplo de la aplicación de poliplejos es la utilización poliplejos sensibles a redox en el transporte y liberación de doxorubicina y kinasa I siRNA (32). Además, PLL puede conjugarse con anticuerpos de células específicas, como hepatocitos cancerosos o linfocitos T cancerosos (33). En (Tabla 1 y tabla 2) se muestran más ejemplos de posibles vectores y aplicaciones.

Tabla 1. Tratamientos de cáncer con terapias combinadas de ácido nucleicos y principios activos en vectores no víricos (32).

Tipo de vector	Fármaco/gen	Tipo de estudio	Diana
Lipoplejo	5-fluorouracilo	In vivo	Cáncer colorrectal
Poliplejo	Doxorrubicina	In vivo	Cáncer hepático
Lipoplejo	Doxorrubicina	In vitro	Cáncer multirresistente
Poliplejo	5-fluorouracilo	In vivo	Cáncer de próstata
Lipoplejo	5-fluorouracilo/cisplatino	In vitro	Cáncer de ovario
Poliplejo	Doxorrubicina	In vivo	Cáncer de mama
Lipoplejo	Paclitaxel	In vivo	Carcinoma nasofaríngeo
Poliplejo	AT2-R	Intracraneal	Cáncer de pulmón
Poliplejo	VEGF	Intravenoso	Cáncer pancreático
Poliplejo	KRAS	Intravenoso	Cáncer pancreático
Poliplejo	AT2-R	Intracraneal	Cáncer de pulmón

Tabla 2. Estrategias para el transporte de siRNA con vectores no convencionales (19).

Vector	Diana de siRNA	Tipo de célula	Ligandos
Vectorización pasiva			
Nanopartículas de oro	NGF	Cáncer pancreático	
Dendrímeros	MYC	Cáncer hepático	
Complejos con polímeros catiónicos	SDC1	Cáncer hepático	
Microestructuras ARN	GFP	HeLa	
Polímeros	EGFP	HeLa	
Polímeros NIR	BRAF	Cáncer de tiroides	
Vectorización activa			
Nanopartículas pRNA	MED1	Cáncer de mama	Aptámero HER2
Polímeros sensibles a pH	PHB1	Cáncer de próstata	ACUPA
Polimetformina	BCL2	Cáncer de pulmón	Anisamida
Poliuretano	GFP	Osteoblasto	Péptido periostin
LDH	Survivin	Célula KB	Ácido fólico
Vectorización activable			
Polímero anfifílico	Survivin	Cáncer de próstata	Proteasa
Copolímeros	Proteína "Twist"	Leucemia	Aptámero
Nanotubos de ADN	CDK4	Célula A549	pH ácido

- Enfermedades y disfunciones cerebrales. Incluyen numerosas enfermedades como accidentes cerebrovasculares, adicciones o Alzheimer. La presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) restringe en gran medida el paso de fármacos, pero gracias a que se pueden modificar las características de las nanopartículas se han conseguido grandes avances. Por ejemplo, se ha desarrollado un nanotransportador constituido por nanorods de oro que es capaz de atravesar la BHE y liberar DARPP-32 siRNA en neuronas dopaminérgicas para tratar la drogadicción (34). Por otro lado, en el Alzheimer se ha demostrado que al inhibir a la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK) se promueve la regeneración de los axones y que suprimir ROCK II disminuye la formación del péptido β -amiloide, lo cual sugiere que ROCK es una diana para el tratamiento del Alzheimer. En el cerebro, ARNm ROCK II se encuentra altamente expresado y se silencia mediante siRNA. Por ello, se han sintetizado políplejos PEG-PEI/siRNA ROCK II (35).
- Enfermedades infecciosas. Están ocasionadas por patógenos como bacterias, virus u hongos. Suponen un grave problema de salud ya que: están apareciendo resistencias a los antibióticos, están apareciendo nuevas enfermedades y están resurgiendo enfermedades que se crían erradicadas. Por ello, se ha invertido en desarrollar nuevos fármacos que refuercen el sistema inmunitario y se han desarrollado las vacunas de ADN. Un ejemplo es la vacuna que contiene el plásmido de ADN que codifica para el antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*, el cual está vectorizado en nanopartículas de quitosán trimetil catiónico (TMC). Otro ejemplo es el de la vacuna de ADN para la Hepatitis B, vectorizada por nanopartículas de HDL de SiO₂ (arcillas sintéticas) (34).

5.4 ADN COMO VECTOR PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

A pesar de los grandes avances que se han conseguido con los nanotransportadores fabricado con polímeros, lípidos y materiales inorgánicos, todavía no se ha alcanzado la eficacia, la biocompatibilidad, la eficiencia en el transporte, la absorción ni la liberación adecuadas para modelos *in vivo*. Por ello, se han desarrollado nanosistemas a partir de ADN que tienen aplicaciones versátiles, como el tratamiento o diagnóstico del cáncer. Los vectores a partir de ADN se elaboran mediante la hibridación de ADN programable. Suelen tener tamaños comprendidos entre 10 y 200 nm, lo cual les permite aprovechar el efecto de EPR. Estos vectores también se pueden recubrir con polímeros hidrofílicos, haciendo que sean menos reconocidos y, por tanto, se prolongue su tiempo de circulación y disminuya su inmunogenicidad (se reduce su opsonización). Una de las grandes ventajas de estos vectores es que son capaces de autoensamblarse formando estructuras geométricas controladas, siguiendo los principios de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Las cadenas actúan tanto de soporte como de pegamento, permitiendo confeccionar prácticamente cualquier tipo de estructura, tanto bidimensional como tridimensional (36). Además, se pueden programar para responder a estímulos concretos, por ejemplo a pH ácidos o concentraciones elevadas de glutatión (36).

Se distinguen cuatro tipos de nanovectores de ADN. El primero son enrejados, hidrogeles y dendrímeros: a partir de la cohesión que ofrecen los extremos de las hebras, se construyen bloques con uniones que dan lugar a múltiples brazos o ramas. Este tipo de enrejados se conocen como “azulejos de ADN” (Fig. 6, A) y permiten confeccionar estructuras del tipo de dendrímeros, hidrogeles (Fig. 6, E) o cristales. El segundo son microesponjas, nanoflores y nanoovillos: la replicación en círculo rodante (RCA) (Fig. 6, B) se ha utilizado recientemente para generar complejas estructuras de ADN, como microesponjas, “nanoflores”, “nanoovillos” y nanocápsulas. Estas nanoestructuras

ensambladas mediante RCA presentan una estabilidad excepcional ante ambientes fisiológicos que inducen a la desnaturalización. Además, se pueden añadir marcadores fluorescentes u otros elementos funcionales mediante procesos enzimáticos isotérmicos o por hibridación. El tercero es origami de ADN: es una técnica en la que la forma deseada de “origami de ADN” (Fig. 6, C) se consigue mediante andamios de ADN (normalmente viral). El ADN se pliega de forma concreta y cientos de hebras sujetan la estructura como si fuesen grapas. Estas están diseñadas para ser complementarias a las regiones concretas del andamio que sujetan. Estas “grapap” también pueden ser funcionalizadas. El cuarto y último tipo son azulejos monocatenarios (SST): son estructuras con las que se puede establecer una analogía con piezas de lego. Cada “pieza” de ADN constituye una cadena monocatenaria de ADN con cuatro dominios cortos de unión en los que solo encajan estructuras específicas y predefinidas, permitiendo el ensamblaje de SST a través de la formación de dos cadenas de ADN.

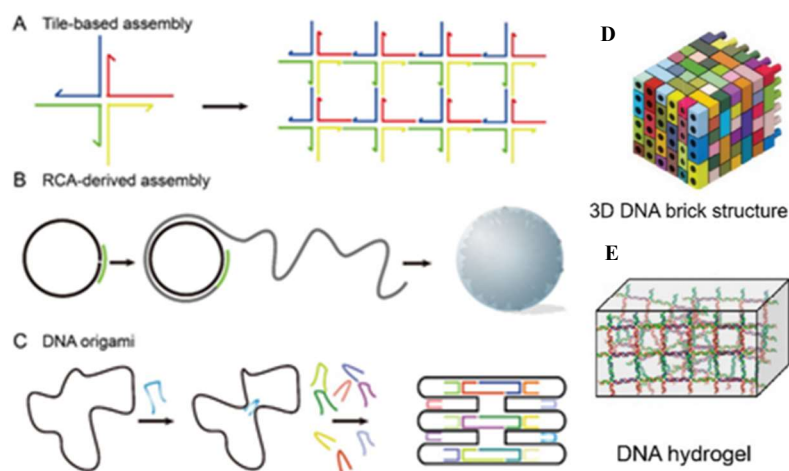


Fig. 6. Tipos de nanovectores de ADN. A) Azulejos de ADN. B) Ensamblaje mediado por RCA. C) Origami de ADN. D) Estructura tridimensional formada a partir de “ladrillos” de ADN. E) Hidrogel de ADN (36).

6. CONCLUSIONES

Los vectores no víricos reemplazan a los vectores víricos, ya que producen baja inmunogenicidad, son capaces de transportar mayores cargas de material genético y son más fáciles de fabricar.

Entender y diseñar correctamente vectores no víricos es esencial para obtener sistemas que cumplan con las prestaciones deseadas. Uno de los puntos clave es la necesidad de que los grupos fosfato de los ácidos nucleicos interactúen electrostáticamente con las cargas positivas de los vectores.

Tras describir la gran variedad que hay dentro de los elementos a vectorizar y de los vectores, se concluye que los vectores no víricos presentan un amplio espectro de aplicaciones terapéuticas, siendo el cáncer, las enfermedades y disfunciones cerebrales y las enfermedades infecciosas las más importantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. acidonucleicos.net. acidonucleicos.net Barcelona2018 [updated 01/04/2018]. Available from: www.acidosnucleicos.net.
2. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. 1953;171(4356):737-8.
3. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Structure of nucleic acids. *Molecular Cell Biology* 4th edition: WH Freeman; 2000.
4. OpenStax B. Nucleic acids. OpenStax CNX: Rice University; 2015 17 nov 2018]. Available from: <http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5-b51e-f14f21b5eabd@9.85>.
5. Opalinska JB, Gewirtz AM. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002;1:503.
6. Sridharan K, Gogtay NJ. Therapeutic nucleic acids: current clinical status. *British journal of clinical pharmacology*. 2016;82(3):659-72.
7. Hernández FJ, Hincapié JAB. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *Iatreia*. 2012;25(2):159-68.
8. Sandy P, Ventura A, Jacks T. Mammalian RNAi: a practical guide. *BioTechniques*. 2005;39(2):215-24.
9. Sylentis. RNA interferencia 2019 [updated 31 enero 2019; cited 2019 7 febr 2019]. Available from: <https://sylentis.com/index.php/es/tecnologia/2-uncategorised/15-arn-de-interferencia>.
10. Monroy GJ. Modelos en desarrollo de terapias derivadas de biotecnología. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2007;36(1).
11. Müller S. Ribozymes and RNA Catalysis. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2017.
12. Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development*. 2016;143(11):1838-47.
13. Dong Y, He D, Peng Z, Peng W, Shi W, Wang J, et al. Circular RNAs in cancer: an emerging key player. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1):2.
14. Jato JLV. Nanotecnología Farmacéutica: Una galénica emergente. *Discursos*. 2006.
15. Luis VJJ. Tecnología Farmacéutica. Volumen II Editorial Síntesis SA Año. 2001.
16. Suárez AIT. Sistemas de liberación controlada. Available from: <http://depa.fquim.unam.mx/liberacion/pdf/vectorizacion.pdf>.
17. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release*. 2016;224:86-102.
18. Santa CF, López Osorio BL. Materiales poliméricos en nanomedicina: transporte y liberación controlada de fármacos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2013;37(142):115-24.
19. Zhang P, An K, Duan X, Xu H, Li F, Xu F. Recent advances in siRNA delivery for cancer therapy using smart nanocarriers. *Drug discovery today*. 2018;23(4):900-11.
20. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*. 2009;11(4):671.
21. del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A. Applications of lipid nanoparticles in gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;109:184-93.
22. Qadir A, Gao Y, Suryaji P, Tian Y, Lin X, Dang K, et al. Non-Viral Delivery System and Targeted Bone Disease Therapy. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(3):565.
23. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene therapy*. 2002;9(24):1647.

24. Riley M, Vermerris W. Recent advances in nanomaterials for gene delivery—a review. *Nanomaterials*. 2017;7(5):94.
25. Regí MV, editor *Biocerámicas: evolución y aplicaciones*. Anales de Química; 2011.
26. Andrade Guel ML, Díaz Jiménez L, Cortés Hernández D. Materiales nanoestructurados cerámicos como vehículo para la liberación de principios activos. *Avances en Química*. 2013;8(3).
27. Kakizawa Y, Harada A, Kataoka K. Glutathione-sensitive stabilization of block copolymer micelles composed of antisense DNA and thiolated poly (ethylene glycol)-b lock-poly (l-lysine): a potential carrier for systemic delivery of antisense DNA. *Biomacromolecules*. 2001;2(2):491-7.
28. Lin AJ, Slack NL, Ahmad A, George CX, Samuel CE, Safinya CR. Three-dimensional imaging of lipid gene-carriers: membrane charge density controls universal transfection behavior in lamellar cationic liposome-DNA complexes. *Biophysical journal*. 2003;84(5):3307-16.
29. Klumpp C, Kostarelos K, Prato M, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2006;1758(3):404-12.
30. van den Brand D, Mertens V, Massuger LF, Brock R. siRNA in ovarian cancer—Delivery strategies and targets for therapy. *J Control Release*. 2018;283:45-58.
31. Kim HJ, Kim A, Miyata K, Kataoka K. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;104:61-77.
32. Shende P, Ture N, Gaud R, Trotta F. Lipid-and polymer-based plexes as therapeutic carriers for bioactive molecules. *Int J Pharm*. 2019.
33. Rogers M-L, Rush RA. Non-viral gene therapy for neurological diseases, with an emphasis on targeted gene delivery. *J Control Release*. 2012;157(2):183-9.
34. Lin G, Li L, Panwar N, Wang J, Tjin SC, Wang X, et al. Non-viral gene therapy using multifunctional nanoparticles: Status, challenges, and opportunities. *Coordination Chemistry Reviews*. 2018;374:133-52.
35. Liu Y, Liu Z, Wang Y, Liang Y-R, Wen X, Hu J, et al. Investigation of the performance of PEG-PEI/ROCK-II-siRNA complexes for Alzheimer's disease in vitro. *Brain research*. 2013;1490:43-51.
36. Jiang Q, Zhao S, Liu J, Song L, Wang Z-G, Ding B. Rationally designed DNA-based nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019.