



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

TRABAJO FIN DE GRADO
NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS COMO
VECTORES NO VIRALES PARA
TRANSFECCIÓN GÉNICA

Autor: Alexey Sanduev
Tutor: Blanca González Ortiz
Convocatoria: Junio

ÍNDICE: NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS COMO VECTORES NO VIRALES PARA LA TRANSFECCIÓN GÉNICA

1. Resumen	3
2. Introducción y antecedentes	3
· Transfección génica.....	3
· Métodos de transfección.....	4
· Nanopartículas orgánicas	5
· Nanopartículas inorgánicas	6
3. Objetivos	7
4. Material y métodos	7
5. Resultados y discusión	7
· Sistemas estímulo-respuesta basados en nanopartículas inorgánicas (Estímulo exógeno).....	7
· Estímulo lumínico	7
· Nanopartículas de oro.....	8
· Grafeno	12
· Nanopartículas de conversión ascendente ...	15
· Estímulo magnético.....	15
6. Conclusión	18
7. Bibliografía.....	20

1.RESUMEN

El proceso de transfección génica es complejo y requiere métodos que permitan tener una alta selectividad, poca toxicidad y alta eficacia. Estos métodos se dividen según el mecanismo empleado ya que pueden ser métodos virales (biológicos) o no virales (ya sean físicos o químicos). Pero muchos de ellos son difíciles de aplicar en la práctica clínica, además de por su limitada eficacia, por requerir instrumental específico y técnicas complejas.

Actualmente los métodos de mayor interés son los químicos no virales, concretamente los métodos que permitan utilizar nanopartículas (NPs) para llevar a cabo la transfección, debido a sus propiedades físico-químicas, su amplia utilidad y versatilidad en cuanto a diseño y mecanismos de acción. Sin embargo, muchas de ellas tienen limitaciones debido a su inestabilidad y a las barreras naturales que tienen de los organismos vivos. Por ello se buscan modelos que optimicen estos procesos, y con ello destacamos las nanopartículas inorgánicas ya que su adaptabilidad, estabilidad y capacidad de llevar cargas genéticas cuando están funcionalizadas les permite ser grandes candidatas a ser las elegidas en este campo como alternativa a sistemas más estudiados. Además, sus peculiares características ante distintos estímulos, tanto externos como internos, les hacen tener gran variación de diseños que optimizan la entrada del material genético en la célula con gran eficacia. Por ello, es interesante estudiar algunos de estos sistemas con el fin de verificar su uso como alternativa a los otros métodos no virales, valorar su toxicidad y la posibilidad de llevarlas a la práctica clínica. También es importante saber las claves de estos procesos de cara a futuras investigaciones y comprobar cuáles son sus puntos débiles y fuertes de cara a la seguridad, eficacia, efectividad y eficiencia.

2.INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Transfección Génica

La transfección es un proceso por el cual se consigue introducir material genético exógeno (MGE) en el interior de una célula. Este material puede ser DNA, RNA, RNA mensajero (mRNA de sus siglas en inglés), RNA pequeño de interferencia (siRNA de sus siglas en inglés), oligonucleótidos de RNA de silenciación, microRNA (miRNA) y RNA de horquilla corta (shRNA de sus siglas en inglés). En la actualidad se investiga su utilización en la terapia génica de algunas enfermedades, en la producción de líneas celulares estables y a nivel de producción de proteínas recombinantes. Para poder introducir este MGE se utilizan distintos métodos que se eligen en función de la reproducibilidad, eficacia, toxicidad y de como pueden afectar a otras células del organismo (1).

Métodos de Transfección

Estos métodos se dividen según el mecanismo que emplean. Pueden ser virales, o también llamados los métodos biológicos, que utilizan virus recombinados como adenovirus, retrovirus y lentivirus para la vectorización de los ácidos nucleicos (AN), pues permiten una alta eficacia y una integración a largo plazo. Pero también tienen inconvenientes como una toxicidad residual, fallos en la integración del MGE en el genoma y expresiones génicas a corto plazo. Por esta razón la comunidad científica se ha enfocado en los métodos no virales, que pueden ser físicos o químicos (2).

Entre los métodos físicos destaca la **microinyección directa**, que consiste en una introducción directa del MGE a través de una aguja fina. Es una forma precisa de introducir los AN en la célula, pero únicamente permite la inserción individual. En cambio, en el caso de la **biolística de partículas** se puede hacer la inserción en un número amplio de células al mismo tiempo, pues consiste en utilizar pistolas que disparan partículas de oro cargadas de MGE. Su inconveniente se encuentra en el daño físico que casusa a las células. La **electroporación** es otro de los métodos de especial interés, ya que se trata de aplicar pulsos eléctricos sobre las membranas de la célula. Esto permite generar poros a través de los cuales entra el MGE. Una vez que se interrumpen los pulsos los poros se cierran, pero una sobrecarga genera alta toxicidad de las células, lo cual es un problema. Por último, se debe mencionar entre los métodos físicos la **transfección mediante láser**, ya que permite aumentar la permeabilidad celular de forma temporal, lo que aprovecha el MGE para entrar el citoplasma, se denomina laserfección. Es un método que facilita trabajar con células de tamaño pequeño, aunque su uso es limitado debido a su coste y a la necesidad de un equipo especializado (1). Estos métodos tienen además la desventaja de que es difícil su aplicación en la práctica clínica, por lo tanto se han buscado otros métodos para poder administrarlos por vía parenteral (3).

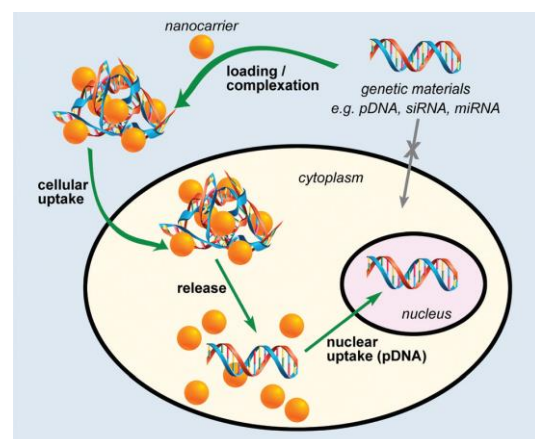


Figura 1: Muestra el proceso mediante el cual se introduce MGE unido a las NPs para poder realizar la transfección génica. Loh XJ, Lee T-C, Dou Q, Deen GR. Utilising inorganic nanocarriers for gene delivery. *Biomaterials Science*. 2016;4(1):70-86.

Estos métodos son los métodos químicos, que son los más usados en la actualidad. Se basan en el principio de unión con las cargas negativas de los AN. Esta unión permite el acercamiento a la membrana celular y una posterior fagocitosis o endocitosis (1).

Básicamente son métodos de transfección mediante la vectorización no viral con nanopartículas (NPs). Estas son partículas de distintos materiales cuyos tamaños se encuentran en la escala nanométrica (1-100 nm). Ofrecen varias ventajas como poca inmunogenicidad, protección a los AN en su interior (lo que permite pasar por distintos compartimentos del organismo sin alterarlos), además de poseer una alta eficacia y una relación coste-efectividad que depende de los materiales utilizados. Estas NPs se diferencian en orgánicas e inorgánicas. Véase la **figura 1**.

Nanopartículas orgánicas

Las NPs orgánicas son polímeros que se obtienen mediante distintas técnicas de unión de monómeros que forman una esfera o cápsula en cuyo interior están los AN. Pueden ser: polímeros de polietilenimina (PEI), polietilenglicol (PEG), polilisina (PLL), poli-láctico-co-glicólico (PLGA) y poli-beta-amino ésteres (PBAE). Entre sus características destacan su fácil y barata producción, su alta estabilidad y su baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradación.

También se incluyen los dendrímeros como NPs orgánicas. Pues son repeticiones de ramificaciones de NPs con tres dominios (central, hiperramificado y dominio con grupos funcionales). Dentro de ellos destacan: poliaminoamida (PAMAM), polipropilenimina (PPI), carbosilano, PEG y PLL. Presentan características como: interacción electrostática con AN, baja inmunogenicidad, posibilidad de adaptar distintas formas y tamaños, solubilidad en agua y biocompatibilidad. Existen también NPs con base de carbono como PEG, PAMAM y etilendiamina cuyas propiedades son: gran superficie de adsorción, fácil producción a gran escala, no se degradan fácilmente y poseen capacidad de translocación. Por último, están las NPs liposomiales y micelares que están hechas de 1,2-distearoil-sn-glicero-fosfoetanolamina (DSPE) y poli(óxido de etileno)-poli-bloque-poli(e-caprolactona) (PEO-b-PCL). Como propiedades poseen gran absorción celular, biocompatibilidad, fácil conjugación, funcionalización y fabricación (2).

Nanopartículas inorgánicas

Al otro lado, están las NPs inorgánicas que han llamado la atención debido a sus propiedades fisicoquímicas, que no poseen las NPs orgánicas, como: propiedades ópticas, magnéticas, de estabilidad y funcionalización (4). Entre ellas podemos destacar nanopartículas metálicas como oro y plata que poseen alta estabilidad, son modificables, fáciles de fabricar y son biocompatibles. Su versatilidad permite que tengan un amplio abanico de aplicaciones. También están las NPs cerámicas, que formadas por sílice, titania o alúmina, presentan características como alta estabilidad, biocompatibilidad, alta superficie de reacción, buena funcionalización y porosidad controlada. Por otro lado, están las NPs magnéticas hechas de óxido de hierro que destacan por ser dirigidas hacia los tejidos diana aplicando un campo magnético, además de su alta estabilidad química. También están los puntos cuánticos que están hechos de sulfuro de zinc o de cadmio. Por último, cabe destacar las NPs híbridas de fosfato de calcio y lípidos, que poseen alta eficiencia, baja toxicidad, buena vectorización y liberación controlada (2).

Sin embargo, la vectorización con NPs no se libra de inconvenientes como la toxicidad o cierta inmunogenicidad, aunque son menores que con los demás métodos. Hay que tener en cuenta que al ser descubrimientos relativamente nuevos no hay demostraciones *in vivo* de su seguridad y eficacia, tan solo hay estudios *in vitro* (2).

Actualmente las investigaciones se centran en tres aspectos sobre las NPs: primero en añadir componentes activos a las NPs para que atraviesen la membrana celular o que puedan ser endocitadas por la célula, en segundo lugar, se buscan sistemas que eviten las defensas celulares que puedan degradar o impedir su función y, finalmente, se busca optimizar los

cambios que producen las NPs en las células.

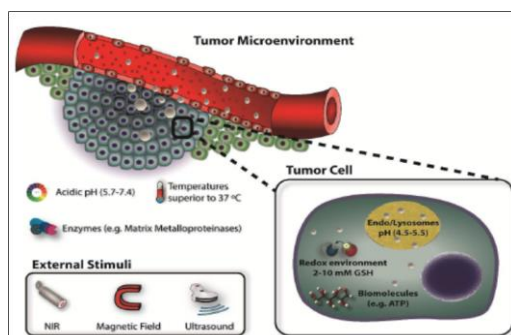


Figura 2: Muestra algunos de los estímulos utilizados en la transfección génica, ya sean exógenas o endógenas. Moreira AF, Dias DR, Correia JJ. Stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy: A review. *Microporous and Mesoporous Materials*; 2016;236:141-57.

Para facilitar la entrada de las NPs se pueden aprovechar los **sistemas estímulo-respuesta**. Estos se basan en un estímulo, o bien endógeno (como cambios enzimáticos, redox o de pH),

o bien exógeno (como la luz, temperatura, campo magnético o ultrasonido) que genera una respuesta en forma de internalización de NPs en la célula (5). Véase la **figura 2**.

Por lo tanto, en este trabajo se hará una descripción de algunos de los sistemas estímulo-respuesta con nanopartículas inorgánicas que existen para la vectorización no viral en la transfección génica con el fin de poder valorar su potencial dentro de este campo, así como ventajas y inconvenientes respecto a los demás métodos que utilizan NPs inorgánicas como vectores.

3.OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo consisten en hacer un análisis de los estudios que se han hecho de los sistemas estímulo-respuesta o sistemas inteligentes que usen nanopartículas inorgánicas como vectorización no viral para la transfección génica. Para posterior valoración de su potencial como alternativa en las terapias génicas eficaces, selectivas y poco tóxicas.

4.MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se han utilizado distintas bases de datos para la obtención de información, figuras, datos y gráficas sobre el tema a tratar. Estas bases de datos son: *Pubmed*, *Web of Science*, *Google Academic*, *SciFinder*, y *Scincedirect*. Como herramienta de redacción de texto se ha utilizado *Microsoft Word 2016*.

En cuanto a la metodología, se han analizado algunos estudios con la idea de comparar distintos trabajos publicados para sacar una conclusión acerca de las nanopartículas inorgánicas y sus sistemas estímulo-respuesta como alternativa en las terapias génicas.

5.RESULTADO Y DISCUSIÓN

Como se ha visto anteriormente, existe una gran variedad de métodos para la realización de la transfección génica, pero cada uno de ellos presenta ciertas desventajas que desvían la mirada de la comunidad científica hacía otras estrategias. Una de estas estrategias es la utilización de **sistemas estímulo-respuesta basados en nanopartículas inorgánicas**, que, a su vez, se dividen en NPs inorgánicas que responden ante estímulos exógenos lumínicos o magnéticos.

Estímulos exógenos:

Estímulo lumínico: los sistemas que responden ante este estímulo pueden ser de distintos tipos como las NPs de oro, de grafeno y/o las nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs, de sus siglas en inglés) de lantánidos.

❖ **Nanopartículas de oro (AuNPs):**

Entre ellos se haya el sistema cuyo estímulo lumínico es una radiación electromagnética en la región de infrarrojo cercano o UV-VIS láser. Algunos estudios publicados desvelan la posibilidad de hacer irradiar un láser de baja intensidad (LBI) sobre las AuNPs para facilitar la transfección, este proceso se denomina fotoporación. Es un método modificado del método físico de transfección mencionando antes, la llamada laserfección, pero en vez de irradiar el láser sobre las células directamente se hace sobre las AuNPs (200 nm) adheridas a las membranas celulares por cargas electrostáticas. Dando lugar a que las AuNPs sufran el fenómeno de resonancia de plasmones de superficie (RPS), cuyo efecto depende del tamaño, forma y superficie. Este efecto se debe a la capacidad del oro de absorber la radiación UV-VIS y la infrarroja (IR) provocando un elevamiento de su temperatura local y emisión de radiación que puede ser captada por los equipos especializados. A esto se le suma su versatilidad, ya que son capaces de atravesar barreras biológicas sin perder su integridad ni dar lugar a efectos tóxicos a nivel celular.

Al estar las AuNPs en la membrana de las células, el calor que emiten forma poros en la membrana debido a la transición de la fase local de la capa lipídica o por desnaturalización de las glicoproteínas integradas. La formación de poros permite la entrada de las NPs en el citosol. En el caso de que el calor generado se difunda, puede generar estrés celular provocando un decremento de su viabilidad. Por otro lado, se ha visto que existe otra posibilidad de formar poros sin tener que desnaturalizar la membrana por calor, y es evaporar el agua alrededor de las AuNPs formando nanoburbujas que producen poros en la membrana celular por acción física y no térmica. En dicho estudio se mencionan los experimentos realizados para comparar la irradiación directa del láser sobre AuNPs y la generación de nanoburbujas por vapor. Se trabajó sobre células HeLa con los dos métodos de transfección por láser mediante AuNPs con FITC-dextrano y siRNA (6).

En los resultados se observó que la técnica de formación de nanoburbujas por vapor es más eficiente que la irradiación directa, pues su eficiencia en el daño celular es mayor del 80% frente al 40% que se obtiene con el método directo. También se vio que, en el caso de la irradiación directa, los poros formados permiten la entrada solo de pequeñas moléculas mientras que en el caso de nanoburbujas generadas por vapor se producen poros que permiten el paso de grandes moléculas. El inconveniente radica en la gran cantidad de energía que se necesita para producir estas nanoburbujas. Pero lo positivo es que en su formación no se registró ningún daño a otras células que no fuesen las diana (6). Véase la **figura 3**.

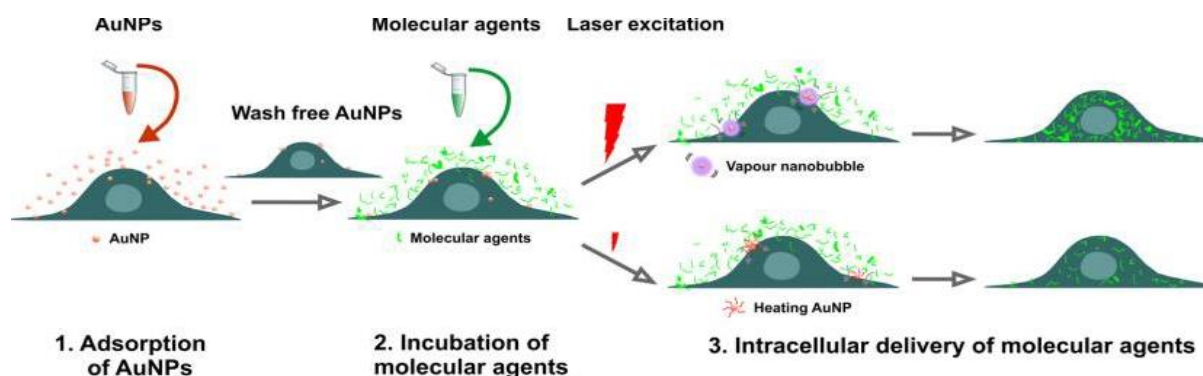
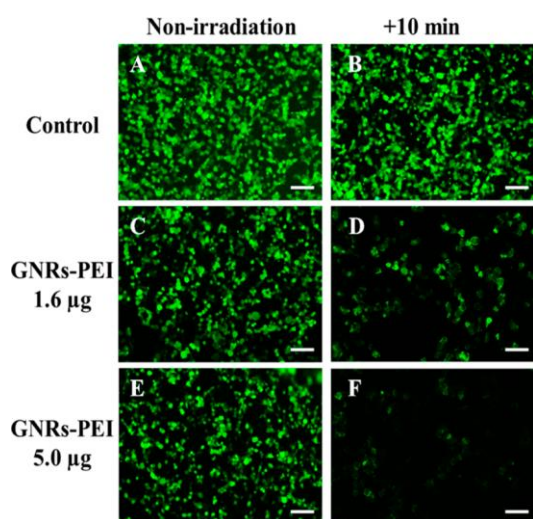


Figura 3: Esta imagen muestra cómo se produce la fotoporación por generación de nanoburbujas por vapor (rama de arriba) y por calor directo de AuNPs (rama de abajo). Xiong R, Raemdonck K, Peynshaert K, Lentacker I, De Cock I, Demeester J, et al. Comparison of Gold Nanoparticle Mediated Photoporation: Vapor Nanobubbles Outperform Direct Heating for Delivering Macromolecules in Live Cells; 2014;

Sin embargo, tanto el láser como la radiación UV-VIS tienen un bajo poder de penetración, por ello solo se podrían utilizar sobre tejido superficial o líneas celulares *in vitro*.



En cambio la radiación infrarroja (IR) es capaz de penetrar hasta los tejidos más profundos debido a que los tejidos tienen una tasa de absorción de IR baja. La IR comprende la región entre 700-800 nm en el espectro de luz, y al igual que con el láser, produce RPS al incidir sobre la superficie de las AuNPs. Esta propiedad de excitación con IR y la posibilidad de realizar múltiples diseños ha hecho que las AuNPs tengan un papel relevante en el futuro de terapias génicas (7).

Figura 4: Observación de células que emiten radiación fluorescente debido a que no han sufrido transfección, a tiempo 0 y a los 10 minutos. La imagen control muestra las células que no han sido expuestas a IR, y debajo se muestran las células expuestas a IR con distintas dosis de AuNPs-PEI/DNAp. Chen J, Liang H, Lin L, Guo Z, Sun P, Chen M, et al. Gold-Nanorods-Based Gene Carriers with the Capability of Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. ACS Applied Materials & Interfaces; 2016;8(46):31558-66.

Se han hecho estudios donde se recubren AuNPs con PEI y se combinan con un plásmido de DNA (pDNA, de sus siglas en inglés) que contiene genes que inducen la apoptosis celular. Estas NPs se incubaron con células embrionarias de riñón humano que expresan una proteína que emite radiación fluorescente verde. A continuación, estas células se irradiaron con IR de 808 nm para comprobar la eficacia de transfección con respecto a células que no han sido expuestas a IR. Y se vio que la apoptosis *in vitro* es significativamente mayor con el estímulo de IR sobre las AuNPs-PEI que sin la IR (8). Véase la **figura 4**.

En otro estudio, se probó la posibilidad de utilizar estructuras huecas de AuNPs (HAuNPs) en cuya superficie se deposita siRNA para silenciar la expresión del factor de transcripción NF- κ B tumoral que impide la activación del mecanismo de apoptosis. En este estudio se observó que las fototerapias con IR y con HAuNPs son eficaces en los tumores. Esta observación se obtuvo con una serie de experimentos con sistemas de siRNA unido por los grupos tiol a las HAuNPs. Inicialmente se intentó comprobar si la liberación de MGE con estos sistemas podría realizarse sin dañar a otras células, y después, se intentó averiguar si era posible utilizar el ácido fólico unido a PEG-HAuNPs/siRNA para mejorar y facilitar la entrada en células tumorales que tienen gran demanda de folato.

El primero de los experimentos fue un éxito, pues se demostró que el siRNA unido a HAuNPs se separa del complejo por la rotura de enlaces provocada por el calor, el mismo que se genera por RPS al incidir IR sobre HAuNPs a 800 nm. Se obtuvieron resultados *in vivo* que mostraron, pasadas las 24, 48, 72 y 96 horas, una eficacia del 30 %, 90 %, 92 % y 84 % de células con factor p65 inhibido. Este factor está implicado en la expresión del factor NF- κ B. Sin embargo, se vio también que una exposición prolongada y de alta intensidad puede deformar la estructura de las HAuNPs.

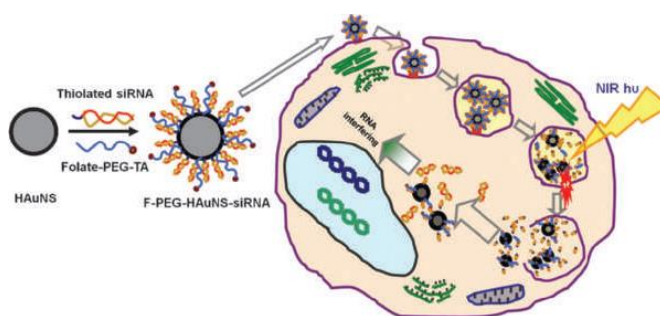


Figura 5: Esta imagen muestra el proceso de transfección con Folato-PEG-HAuNPs/siRNA mediada por IR. Lu W, Zhang G, Zhang R, Flores LG, Huang Q, Gelovani JG, et al. Tumor Site-Specific Silencing of NF- κ B p65 by Targeted Hollow Gold Nanosphere-Mediated Photothermal Transfection. *Cancer Research*; 2010;70(8):3177-88.

En el segundo experimento, el resultado observado fue que la eficacia de endocitosis de las HAuNPs/siRNA es mayor con el complejo formado con folato que sin él y que se obtiene con siRNA libre. Se vio además que la aparición de siRNA libre en el citosol solo es posible por la activación mediante radiación IR. Véase la **figura 5**.

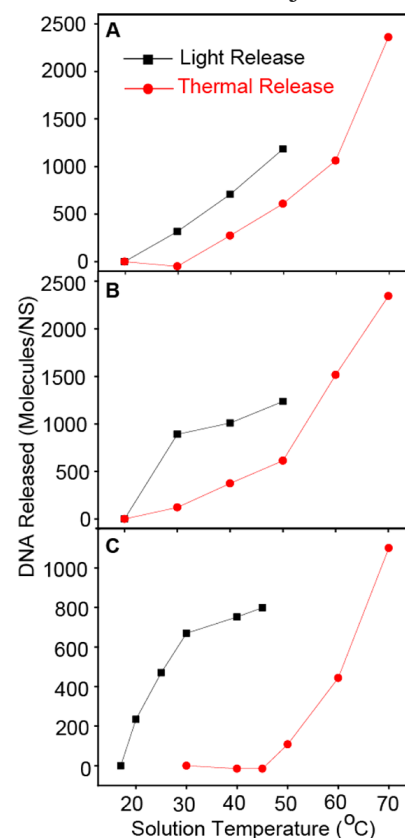
Para finalizar, se hizo un experimento *in vivo* con un grupo de ratones para tratar tumores cervicales. Se observó que mediante esta combinación con folato se redujo hasta un 23% el tumor en los ratones.

Por lo tanto, esta publicación muestra la eficacia de las HAuNPs en las terapias antitumorales con irradiación infrarroja (7).

También hay estudios que han pretendido mostrar la diferencia de la eficacia de transfección entre dos estrategias distintas que utilicen un estímulo lumínico y AuNPs. En concreto, han utilizado un sistema en el que se forma una matriz de sílice y una capa de fina de oro que la cubre formando nanocápsulas de oro (AuNCs).

Esta combinación permite obtener una señal que puede ser detectada en la región del IR debido al cambio de tamaño del núcleo y la finura de la capa de oro. En este trabajo se plantean estrategias para realizar la transfección de tres tipos de RNA de interferencia para provocar la muerte de células tumorales: RNA de interferencia corto (crRNA), RNA de interferencia largo (lgRNA) y RNA con fosfato modificado para evitar su degradación por nucleasas (mfRNA). Una de las estrategias consistía en transfección solo por luz, sin cambios de temperatura (no térmica), pues al incidir la luz de un láser sobre las AuNCs, estas se fragmentaban en partículas más pequeñas provocando la rotura de los enlaces covalentes que las unían al iRNA. Otra estrategia era aprovechar la elevación de temperatura (térmica) local en las AuNCs al incidir con láser en la región IR.

Figura 6: Muestra las diferencias cuantitativas, de la liberación de los tres tipos de iRNA (correspondiendo la gráfica A al crRNA, la B al mfRNA y la C al lgRNA), entre la estrategia térmica (línea roja) y la no térmica (línea negra) en relación a la temperatura que se registra en la solución donde están las células incubadas con respecto a la temperatura ambiente. Huschka R, Barhoumi A, Liu Q, Roth JA, Ji L, Halas NJ. Gene Silencing by Gold Nanoshell-Mediated Delivery and Laser-Triggered Release of Antisense Oligonucleotide and siRNA. ACS Nano;2012;6(9):7681-91.



Para ello se diseñaron AuNCs funcionalizadas con PLL, que permite la protección de AN y mejora la captación celular de las AuNCs. Además forman, por un lado, enlaces covalentes con la superficie de oro y, por otro, enlaces débiles con AN. Al elevarse la temperatura de las AuNCs los enlaces que unen el iRNA con PLL se rompen, y los liberan sin tener que

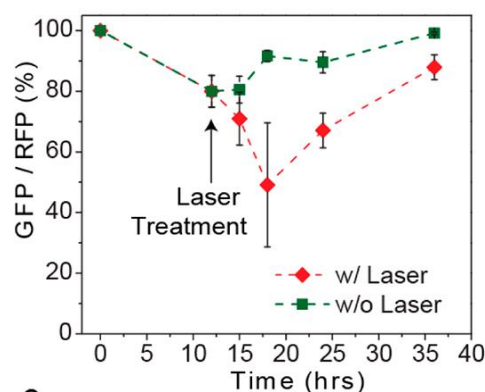
modificar la estructura. Debido a estas ventajas que ofrece la PLL, se ha utilizado en ambas estrategias. La estrategia no térmica produce una liberación de iRNA antes que la térmica, debido a que no necesita una elevación de temperatura muy alta. En cambio, la totalidad del iRNA liberado es mucho mayor en la estrategia térmica. Véase la **figura 6**.

También se puede ver que el tipo de iRNA no tiene mucha influencia en la variación de eficacia, lo que nos indica que no depende del tamaño ni de la modificación de fosfatos. Se ha visto que la capacidad de carga con mRNA es mucho mayor respecto a los otros dos y, sin embargo, la descarga de AN es similar.

Hay que aclarar que la liberación en la estrategia no térmica puede ser debido a la transferencia fotónica de los electrones que pueden romper los enlaces débiles entre PLL y AN, lo que permite su separación sin elevar tanto las temperaturas y de forma rápida.

De hecho, en la liberación de iRNA en la estrategia no térmica se alcanzan temperaturas fisiológicas (37° C), lo que podría ser importante para experimentos *in vivo* pues se evita causar daño a otras células.

En este estudio también se comprobó la utilización del estímulo lumínico con láser respecto a métodos sin láser en células cancerígenas H1299 de pulmón que expresan una proteína fluorescente. Y se observó que, tras un periodo de incubación y aplicación del láser, había menos porcentaje de células que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP de sus siglas en inglés) tratadas con láser que no tratadas con láser. Esto demostró la eficacia de este método con respecto a otros que no utilizan un estímulo lumínico.



Véase la **figura 7**.

Figura 7: Muestra como varía el porcentaje de células que expresan GFP a lo largo del experimento en células tratadas con láser (línea roja) y células no tratadas con láser (línea verde). Huschka R, Barhoumi A, Liu Q, Roth JA, Ji L, Halas NJ. Gene Silencing by Gold Nanoshell-Mediated Delivery and Laser-Triggered Release of Antisense Oligonucleotide and siRNA. ACS Nano; 2012;6(9):7681-91.

En la **figura 7** se ve que las células tratadas con láser tienen menor proporción de GFP.

Gracias a estos datos se llegó a la conclusión de que la transfección con el complejo

AuNCs-PLL tiene éxito y no muestra toxicidad significativa (9).

❖ Grafeno:

El grafeno y óxido de grafeno (GO) son materiales muy estudiados en las aplicaciones biomédicas, concretamente GO debido a que posee una relación superficie/volumen 10 veces mayor que el resto de materiales, además ofrecen determinadas propiedades fototérmicas y fotoacústicas. Son capaces de absorber IR y UV-VIS. También son capaces de interactuar con moléculas de DNA mediante enlaces covalentes estables (10).

Sin embargo, por sí solo el GO es tóxico a dosis dependiente, por lo que es necesario funcionalizarlo para mejorar su biocompatibilidad. Ha habido estudios que han demostrado una mejoría en la biocompatibilidad con PEG o PEI por separado, tanto en nano-GO (NGO) como en GO-reducido (RGO). Incluso hubo otro estudio que se planteó la posibilidad de utilizar ambos materiales para funcionalizar GO al mismo tiempo, es decir, realizar una doble funcionalización y utilizar este complejo en una transfección estímulo-respuesta con IR. Para ello se diseñó una serie de experimentos para poder verificar su eficacia.

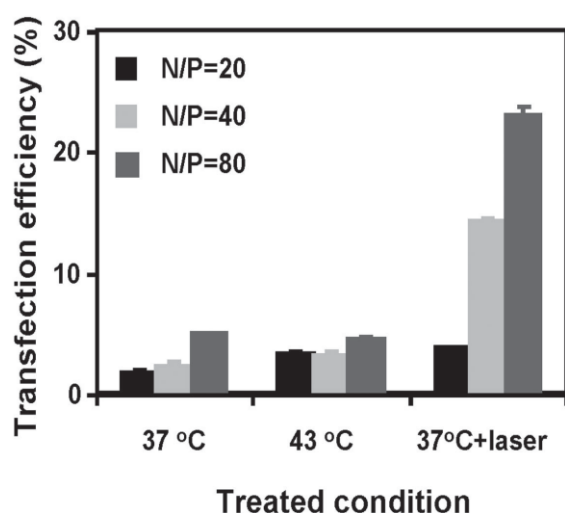


Figura 8: Muestra la eficacia de la transfección del complejo PEI-PEG-GO/pDNA con distintos radios con y sin irradiación de láser infrarrojo. Feng L, Yang X, Shi X, Tan X, Peng R, Wang J, et al. Polyethylene Glycol and Polyethylenimine Dual-Functionalized Nano-Graphene Oxide for Photothermally Enhanced Gene Delivery. *Small*; 2013;9(11):1989-97.

Primero se hizo un análisis a distintos tiempos y distintas intensidades de IR, en la transfección del complejo PGI-PGE-GO para ver el rango óptimo de su captación por células HeLa. Se observó que una radiación de baja intensidad a 808 nm y durante 20 minutos era suficiente para que la transfección fuese eficaz. Además, se vio

que las temperaturas alcanzadas estaban dentro de un rango de entre 37 °C y 43 °C. Este efecto se asoció al elevamiento de temperatura local que aumentaba la permeabilidad de las membranas. Después se hizo otro experimento en el que unían al complejo PEI-PEG-GO un plásmido de DNA que contenía genes para el EGFP e hicieron una incubación de 20 min con NPs de PEG-PEI-GO/DNAp con distintos radios (20, 40 y 80). Se dieron cuenta de que la eficacia de transfección en las células irradiadas con IR era 10 veces mayor que aquellas que permanecieron en oscuridad a 37°C. También vieron que el radio de 80 nm ofrecía mayor eficacia de transfección. Véase la **figura 8**.

Lo que hicieron a continuación en este estudio fue comprobar la eficacia con iRNA y mRNA (que llevó el código para la expresión de la proteína Plk1) en las células MDA-MB-435s. Se vio que, como ocurría en el primer experimento, la eficacia de transfección era considerablemente mayor usando estos complejos y el estímulo de IR que utilizando otros métodos que no utilicen una de las dos circunstancias (11).

Otro estudio que se hizo con el GO fue la internalización fotoquímica mediada por ruptura de endo/lisosomas utilizando el estímulo de IR. Lo que se intentó era utilizar el complejo formado por PEG, polietilamina ramificada conjugada y RGO (PEG-BPEI-RGO) para transfectar pDNA que contiene genes de una proteína que se puede detectar en las células PC-3 y NIH/3T3 irradiadas o no con IR. El IR tenía la función de generar calor local en endosoma provocando una desruptura de la membrana, por un mecanismo desconocido.

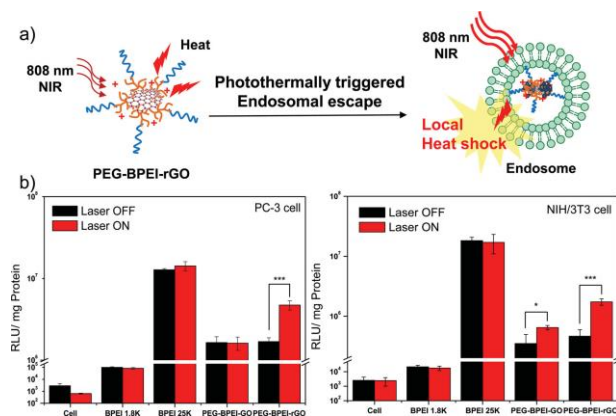


Figura 9: Muestra el apartado a) donde se ve el esquema del proceso de ruptura de endosoma al incidir IR sobre el complejo PEG-BPEI-RGo. El apartado b) muestra con la gráfica de la izquierda la eficacia en función de proteína expresada en las PC-3 con y sin IR, y la gráfica de la derecha muestra la eficacia de la transfección con y sin IR en las células NIH/3T3. Kim H, Kim WJ. Photothermally Controlled Gene Delivery by Reduced Graphene Oxide-Polyethylenimine Nanocomposite. *Small* ; 2014;10(1):117-26.

Para poder hacer la comparación, el experimento se hizo con BPEI 18K, BPEI 25K, PEG-BPEI-GO y PEG-BPEI-RGO. Los autores se dieron cuenta de que con los tres primeros no hubo una eficacia notable, pero en el caso del cuarto si la hubo (2-3 veces mayor con IR que sin IR). La **figura 9** muestra los resultados obtenidos en este experimento con los dos tipos de célula. Se ve que la expresión de la proteína expresada por los genes transfectados es mayor en presencia de IR.

Para explicar este hecho se adoptó la teoría del efecto de esponja de protones. Que resulta de la acidificación del interior de endosoma interrumpiendo la bomba protones que da lugar a que el endosoma no se rompa. Para evitar que esto ocurra se añadió bafilomicina A1 que inhibe la bomba de protones que evita que el medio se acidifique. Y efectivamente se vio que la utilización de bafilomicina A1 aumentaba hasta 100 veces los resultados anteriores, aunque permanecía la diferencia de eficacia entre los tres primeros vectores y el vector PEG-BPEI-RGO (incluso era hasta 7 veces mayor). Se llegó a la conclusión de que mientras la

baciclomicina A1 inhibía el efecto de esponja de protones, la IR rompía el endosoma por elevamiento local de temperatura.

Para finalizar este estudio se hizo un seguimiento del material genético transfectado con dos marcadores fluorescentes. Se observó que una vez roto endosoma el material genético se distribuye ampliamente por el citosol (12).

❖ **Nanopartículas de grafeno de conversión ascendente:**

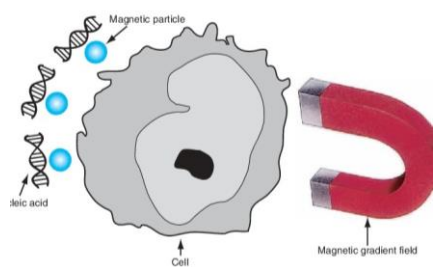
Por último, hay mencionar las NPs de conversión ascendente (UCNPs) dotados con lantánidos, pues se ha visto que poseen propiedades de absorber la IR y UV-VIS. En un estudio se publicó que utilizando un núcleo de sílice y un recubrimiento de iterbio y tulio (fluoruro de itrio sódico co-dopado -NaYF₄) era posible realizar la transfección de siRNA con un marcador fluorescente sobre células HeLa *in vitro*, y a posteriori con pDNA con gen EGFP sobre el mismo tipo de células para comprobar la silenciación. Como comparador se ha utilizado sistemas lipídicos como vectores (Lipo2k/siRNA). Los resultados mostraron que la eficacia óptima se obtenía al irradiar a 980 nm (UV-VIS), con 75% de células que emitían señal fluorescente mientras que en caso de vector lipídico la señal era bastante débil. Por otro lado, se vio que con IR la señal era bastante menor que con UV-VIS, pero aun así garantizaba una transfección eficaz. En el experimento con EGFP se obtuvieron resultados similares, por lo que se consideró estos UCNPs como prometedores sistemas estímulo-respuesta para futuros avances de vectorización de genes no tóxicos en el campo de la biomedicina. (13)

Estímulo Magnético:

Otro de los estímulos exógenos posibles que puede ser utilizado en la transfección es el campo magnético. Este estímulo actúa sobre nanopartículas de óxido hierro (IONPs de sus siglas en inglés). Las IONPs ofrecen baja toxicidad, fácil obtención y alta superficie de reacción (14).

El método de transfección utilizando IONPs y el campo magnético se denomina magnetofección, y tiene aplicaciones en campos de vectorización magnética de genes (VMG) o vectorización magnética de medicamentos (VMM). La magnetofección se utiliza debido a que en presencia de campo magnético externo (CME) se optimiza el proceso de transfección, ya que disminuye la dosis del vector, aumenta la eficacia del proceso y disminuye el tiempo de incubación de la transfección.

Figura 10: Muestra el fundamento de la magnetofección, en la cual las IONPs cargadas con MGE son atraídas por un campo magnético, entre ambos se encuentra la célula donde se quiere dirigir las FeNPs. Plank C, Anton M, Rudolph C, Rosenecker J, Krötz F. Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. Expert Opin Biol Ther. 2003;14



En la **figura 10** podemos ver el principio básico del proceso de magnetofección que consiste fundamentalmente en hacer atracción de IONPs hacia un campo magnético haciendo que penetre en la célula en un determinado período de tiempo.

Como ocurría con las AuNPs, las NPs de hierro también son recubiertas con algunos polímeros orgánicos como PEG con el fin de mejorar la biocompatibilidad de las mismas, además de poder evitar ser captadas por macrófagos. Incluso también puede haber recubrimientos con PEI, de hecho, se ha visto que ofrece las mismas posibilidades que el PEG, pero añade la capacidad de formar enlaces con AN más estables (15).

Así pues, estos últimos años ha habido múltiples estudios con estos sistemas cuyo resultado ha sido más o menos exitoso. En el año 2014 se publicó un estudio donde se pretendía comprobar si la utilización de la magnetofección aumentaba la eficacia de la transfección tradicional sobre los fibroblastos embrionarios primarios de ratas (FEPR) y fibroblastos fetales porcinos (FFP) utilizando nuevos métodos de suspensión celular en columna. Se utilizó el híbrido de PEH-IONPs cargado de plásmido de pDNA para realizar el experimento. En este experimento se utilizó varias NPs de diferente naturaleza para poder establecer comparación, además de distintos métodos de transfección, incluida la que no es activada por campo magnético. Tras los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que se obtiene un 60% de FEPR transfectados con 4-16 pg de pDNA con PEG-IONPs y al aplicar un campo magnético no homogéneo. Además, se vio una notable mejoría en la transfección mediante magnetofección con acercamiento directo sobre la superficie de las células con esta técnica que, en los demás métodos, incluidos aquellos que utilizan NPs lipídicas y no realizan atracción específica sobre las Nps. Lo que hizo atribuir esta mejoría a la activación por el campo magnético directo y específico (16).

Previamente en el año 2003 se publicó un estudio cuya intención era observar las posibilidades que ofrecía la magnetofección en inhibir la síntesis de p22pho subunidad de NADP(H) oxidasa endotelial implicado en la formación de especie reactivas de oxígeno (ROS) que tienen relación con la aparición de enfermedades cardiovasculares. Experimentalmente se hizo una incubación de células endoteliales de vena umbilical humana

con PEI-NPs magnéticas cargadas con oligonucleótidos y que entran en el núcleo de estas células e inhiben la producción de dicha subunidad. Al obtener los resultados se observó que con el método de magnetofección se obtenía una eficacia en la transfección (se detectó los oligonucleótidos en el núcleo de las células) del 84% en tan solo 2 horas, mientras que con los métodos convencionales se alcanzaba tras 24 horas. Además, se concluyó que para obtener esos resultados no necesitaban mucha dosis de vector, al igual que no necesitaban tanto tiempo de incubación. Esto dio lugar a la asociación de la disminución de la toxicidad con la magnetofección, llegando a obtener una viabilidad de las células hasta 96% frente al 78% que se obtenía con la transfección tradicional (17).

Otra posibilidad es realizar destrucción de células tumorales con fármacos antitumorales como la lectina cuya eficacia en estimulación de apoptosis es estadísticamente significativa, después de realizar magnetofección durante 15 minutos (18).

Cabe destacar también la creación de un protocolo para realizar una doble magnetofección eficaz con cDNA y shRNA en las células neuronales primarias, concretamente las interneuronas GABAérgicas del hipocampo. Esto tiene su importancia debido a las dificultades de realizar la transfección con otros métodos por la sensibilidad de las neuronas a cambios en el entorno. En este estudio se realizaron tres experimentos para comprobar los posibles usos que se le podría dar a la magnetofección dentro del campo de neurociencia. El primero de los experimentos era comprobar la expresión de la proteína geferina 11 antes y después de la transfección, en el segundo experimento se buscó realizar una doble transfección para expresar un receptor acetilcolina nicotínico y la expresión de una proteína PICK1 enzima que interviene en la circulación del neurotransmisor glutamato. El último experimento procuró observar la posibilidad de utilizar NPs manéticas para llevar a cabo una transfección de shRNA para inhibir la actividad GTPasa de la proteína SynCap. Los tres experimentos tuvieron éxito y se llegó a la conclusión de que la magnetofección ofrece ventajas como la transfección en neuronas jóvenes y maduras, mientras que los otros métodos solo lo permiten en las jóvenes, además, de que le este procedimiento no es tóxico para las células neuronales, reduce el tiempo de preparación hasta 1 hora. Incluso permite realizar expresiones de dos proteínas de mamíferos en una misma neurona, y tener expresión a largo plazo. En cuanto a la relación coste-efectividad se vio que era bastante buena, pues no requiere un equipo caro (19).

Sin embargo, no solo tienen aplicación en nanomedicina, también en el campo de la biotecnología, por ejemplo, en la regeneración de nuevas cosechas o en obtención de plantas transgénicas. Para ello se utiliza la magnetofección para cargar el polen con MGE con el fin de producir una generación de futuras plantas o cosechas transgénicas (20).

Por último, hay que mencionar las de utilización de NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION) que ofrecen la posibilidad de utilizar NPs de menor tamaño (menor de 20 nm), mayor estabilidad y posibilidad de funcionalización (14).

Al igual que ocurría en casos anteriores la funcionalización mejora la biodegradabilidad y biocompatibilidad de los SPION. En uno de los estudios se sintetizó un complejo formado por quitosano-PEI-SPION para vectorizar DNA hacia una mitocondria con el fin de matar a la célula. Para ello se añadió también un ligando endógeno PK11195 que es ligando de la proteína translocadora de mitocondria (TSPO). Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos con Lipofectamine 2000®. Se observó que había una gran diferencia al aplicar y no aplicar el campo magnético externo, pues al aplicarlo se obtenía una captación celular significativa debido a que las SPION se concentran en la membrana de la célula lo que favorece su endocitosis. También, se ha visto que añadiendo bacilomicina A1, el éxito de la transfección era mucho mayor, lo que no ocurría con Lipofectamine 2000®, sino que de hecho disminuía. Asimismo, no se vio ningún cambio morfológico en las células lo que indicaba una buena biocompatibilidad. Por lo tanto, se evidenció su eficacia en la transfección como sistemas inteligentes de estímulo-respuesta, ya que además de proporcionar estabilidad, protección y condensación de DNA, garantizan su captación por células mayor que los métodos a los que se compara (21).

6. CONCLUSIÓN

Según los estudios publicados sobre los sistemas estímulo-respuesta que utilizan nanopartículas inorgánicas en la vectorización de una carga génica en el interior de una célula, podemos deducir que es probable realizar una transfección selectiva, poco tóxica y eficaz con nanopartículas y más aun con estos sistemas. No obstante, esto no se puede afirmar con total seguridad, debido a que no existen muchos estudios *in vivo*, ni tampoco hay estudios clínicos de su seguridad y efectividad tanto a corto como a largo plazo.

Por otro lado, se ha visto que su eficacia es bastante mayor respecto a los métodos a los que se les compara de transfección, es decir, a los métodos que utilizan los estudios como

referencia para establecer una comparación fiable. Igualmente se ha observado que muchos de ellos tienen una relación coste-efectividad bastante buena, dado que su obtención es relativamente sencilla y no requiere técnicas instrumentales costosas. Incluso se ha visto que una de las grandes ventajas que ofrecen es la reducción de tiempo, tanto de preparación de las técnicas como la obtención de resultados.

Respecto a su seguridad, se ha visto que por lo general no afectan a otro tipo de células que no sean las células diana, y que únicamente tienen misión de ser vectores de terapias génicas sin que sean degradadas antes de tiempo, pues en ausencia de su carga terapéutica no ejercen ninguna acción perjudicial sobre el funcionamiento de la célula. Aunque no se ha encontrado estudios que muestren el destino que sufren estas nanopartículas inorgánicas después de su internalización en la célula, lo cual genera dudas sobre su seguridad y su posible efecto a largo plazo, ya que al ser complejos inorgánicos tienen limitado su bioasimilación o su biodegradación.

Tras repasar los estudios mencionados, se ha visto que, aunque sean las nanopartículas inorgánicas son las encargadas de producir una respuesta después de un estímulo y de captación celular, realmente muchas de ellas necesitan modificaciones de su superficie que mejoran su biocompatibilidad y posibilidad de mantener enlaces estables con AN, aunque no sea en todos los casos. Estas modificaciones suelen ser recubrimientos con polímeros orgánicos que facilitan su circulación a través de las membranas lipídicas e hidrófobas. Incluso es posible añadir algunos ligandos que aumenten significativamente la selectividad sobre las células dianas y permitir llevar AN de forma estable.

En cuanto a los estímulos mencionados: se ha observado que son fáciles de generar, de manejar y que no son caros, ya sea la luz infrarroja, la ultravioleta-visible y/o el campo magnético.

Para finalizar, podemos decir, que la utilización de nanopartículas inorgánicas como los vectores no virales en la transfección génica tienen un enorme potencial como futura alternativa a las terapias para enfermedades genéticas desde el punto de vista de la seguridad, eficacia, efectividad y eficiencia. Pero para llegar a este punto se debe realizar un mayor número de estudios *in vivo* y poder pasar al siguiente escalón, que sería la práctica clínica. Además, se debería ejercer un enfoque mayor sobre las posibilidades de formar

modificaciones de la superficie con el fin de aumentar su selectividad, biocompatibilidad, y eficacia.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. I. Sheikh S, Coutts A, La Thangue N. Chapter 11-Transfection. In: Jalali M, Yvonne F, Saldanha L, Jalali M, ed. by. Basic Science Methods for Clinical Researchers. San Diego: Elsevier Science Publishing Co INC; 2016. p. 191-209.
2. Wong J, Mohseni R, Hamidieh A, MacLaren R, Habib N, Seifalian A. Will Nanotechnology Bring New Hope for Gene Delivery?. Trends in Biotechnology. 2017;35(5):434-451.
3. Sharma A, Gupta L, Gupta U. Nanoparticles as nucleic acid delivery vectors. Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. 2017;:13-42.
4. Berry C. Applications of Inorganic Nanoparticles for Biotechnology. Nanobiotechnology - Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles. 2012;:159-180.
5. Sifaka P, Üstündağ Okur N, Karavas E, Bikiaris D. Surface Modified Multifunctional and Stimuli Responsive Nanoparticles for Drug Targeting: Current Status and Uses. International Journal of Molecular Sciences. 2016;17(9):1440.
6. Xiong R, Raemdonck K, Peynshaert K, Lentacker I, De Cock I, Demeester J, et al. Comparison of Gold Nanoparticle Mediated Photoporation: Vapor Nanobubbles Outperform Direct Heating for Delivering Macromolecules in Live Cells. ACS Nano. 2014;8(6):6288-96.
7. Lu W, Zhang G, Zhang R, Flores LG, Huang Q, Gelovani JG, et al. Tumor Site-Specific Silencing of NF- B p65 by Targeted Hollow Gold Nanosphere-Mediated Photothermal Transfection. Cancer Research. 2010;70(8):3177-88.
8. Chen J, Liang H, Lin L, Guo Z, Sun P, Chen M, et al. Gold-Nanorods-Based Gene Carriers with the Capability of Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. ACS Applied Materials & Interfaces. 2016;8(46):31558-66
9. Huschka R, Barhouni A, Liu Q, Roth JA, Ji L, Halas NJ. Gene Silencing by Gold Nanoshell-Mediated Delivery and Laser-Triggered Release of Antisense Oligonucleotide and siRNA. ACS Nano. 2012;6(9):7681-91
10. Dowaidar M, Abdelhamid HN, Hällbrink M, Zou X, Langel Ü. Graphene oxide nanosheets in complex with cell penetrating peptides for oligonucleotides delivery. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2017;1861(9):2334-41.
11. Feng L, Yang X, Shi X, Tan X, Peng R, Wang J, et al. Polyethylene Glycol and Polyethylenimine Dual-Functionalized Nano-Graphene Oxide for Photothermally Enhanced Gene Delivery. Small. 2013;9(11):1989-97.
12. Kim H, Kim WJ. Photothermally Controlled Gene Delivery by Reduced Graphene Oxide-Polyethylenimine Nanocomposite. Small. 2014;10(1):117-26.
13. Yang Y, Liu F, Liu X, Xing B. NIR light controlled photorelease of siRNA and its targeted intracellular delivery based on upconversion nanoparticles. Nanoscale. 2013;5(1):231-8.
14. Fang K, Liu P, Dong S, Guo Y, Cui X, Zhu X, et al. Magnetofection based on superparamagnetic iron oxide nanoparticle-mediated low lncRNA HOTAIR expression decreases the proliferation and invasion of glioma stem cells. International Journal of Oncology. agosto de 2016;49(2):509-18.
15. Ota S, Yamada T, Takemura Y. Biocompatibility and Biofunctionality of Magnetic Nanoparticles. ECS Transactions. 2015;64(31):67-74.
16. Grześkowiak BF, Sánchez-Antequera Y, Hammerschmid E, Döblinger M, Eberbeck D, Woźniak A, et al. Nanomagnetic Activation as a Way to Control the Efficacy of Nucleic Acid Delivery. Pharmaceutical Research. 2015;32(1):103-21.
17. Krötz F, Wit C de, Sohn H-Y, Zahler S, Gloe T, Pohl U, et al. Magnetofection—A highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. Molecular Therapy. 2003;7(5):700-10.
18. AlSadek DMM, Badr HA, Al-Shafie TA, El-Bahr SM, El-Houseini ME, Djansugurova LB, et al. Cancer cell death induced by nanomagnetolectin. European Journal of Cell Biology. 2017;96(6):600-11.
19. Buerli T, Pellegrino C, Baer K, Lardi-Studler B, Chudotvorova I, Fritschy J-M, et al. Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection. Nature Protocols. 2007;2(12):3090-101.
20. Zhao X, Meng Z, Wang Y, Chen W, Sun C, Cui B, et al. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. Nature Plants. 2017;3(12):956-64.
21. Kim Y-K, Zhang M, Lu J-J, Xu F, Chen B-A, Xing L, et al. PK11195-chitosan-graft-polyethylenimine-modified SPION as a mitochondria-targeting gene carrier. Journal of Drug Targeting. 2016;24(5):457-67.