



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**“Nanopartículas inorgánicas como vectores no  
virales para la transfección génica”.**

Autor: López Gallego, Cristina Valverde

Fecha:07/02/2020

Tutor: Gonzalez Ortiz, Blanca

## ÍNDICE

➤ Resumen	pag.3
➤ Introducción y antecedentes	pag.3
➤ Objetivos	pag.3
➤ Metodología	pag.3
➤ Resultados y discusión	pag.3
• Transfección génica	pag.3
• Métodos de transfección	pag.4
• Vectores	pag.4
• Vectores no virales	pag.5
• Barreras de transfección	pag.6
• Diseño de sistemas de liberación no virales	pag.7
• Nanopartículas de oro	pag.9
• Aplicaciones NPsAu para la transfección	pag.13
-Terapia génica	pag.13
- Terapia fototérmica	pag.15
➤ Conclusión	pag.19
➤ Bibliografía	pag.19

## Resumen:

La transfección génica es un proceso por el cual se introduce material genético al interior de una célula eucariota animal. Dicho proceso se lleva a cabo por distintos métodos: biológicos, físicos y químicos.

A continuación haremos una revisión de las distintas dificultades de las nanopartículas para conseguir alcanzar la diana y nos centraremos dentro de los métodos químicos en los vectores no virales tanto orgánicos como inorgánicos ahondando en los ejemplos más significativos.

## Introducción y antecedentes:

La transfección génica *in vivo* es un gran reto en la actualidad ya que cada vez es más extendido el uso de material genético como método terapéutico y no solo para obtención de productos biotecnológicos.

En este trabajo abordaremos las diferentes barreras que tiene que afrontar el material genético para introducirse en la célula diana y alcanzar el resultado deseado. Para llevarlo a cabo podemos poner en marcha distintas estrategias de diseño para aumentar la eficiencia transfectiva. Los métodos físicos solo se pueden usar *ex vivo* y los métodos biológicos (virus) pueden dar lugar a una alta toxicidad, por estos motivos se han abierto líneas de investigación muy prometedoras en sistemas de liberación usando vectores no virales.

En concreto las nanopartículas de oro parece que tienen usos muy prometedores en terapia génica, entre otros campos debido a la amplia gama de características especiales que presentan y en las cuales ahondaremos. Ilustraremos estas aplicaciones con ejemplos de interés.

## Objetivos:

Realizar un análisis objetivo de las nanopartículas de oro y las propiedades que las hace tan únicas dentro un contexto. Para ello primero tendremos que fijar una serie de conceptos básicos.

## Metodología:

La realización de el trabajo aquí presente se ha llevado a cabo mediante el uso de bases de datos como *Scifinder scholar*, *Scielo* y *Pubmed*. Además de la consulta del libro de microbiología, Prescott. Para editar y realizar el texto se ha utilizado *Microsoft Office Word 2007*.

## Resultados y discusión:

### Transfección

La transfección es una técnica que consiste en introducir nucleótidos en una célula eucariota animal, cuya finalidad es la manipulación del material genético produciendo un cambio en el funcionamiento de la misma(1).

Básicamente, la transfección génica es una entrega intracelular de materiales genético en células específicas para generar un efecto pudiendo utilizarse para fines terapéuticos como solventar una anomalía existente o proporcionar a las células una nueva función. Por otro lado, se aplica también a la industria biotecnológica para dar lugar a productos como hormonas.

Lo ideal sería poder transportar el material genético desnudo pero hay distintos inconvenientes por los cuales necesitamos un sistema para entregar la información genética.

## Métodos de transfección:

### ➤ Métodos físicos:

Son técnicas de naturaleza física que destacan por ser muy invasivas, solo compatibles para procesos *in vitro*. Estos métodos se basan en hacer la penetración del ADN transitoria en la membrana de las células diana mediante modificaciones de la membrana celular por medio de técnicas mecánicas, eléctricas, ultrasónicas, hidrodinámicas, o láser-energía.(2)

- Electroporación
- Microinyección
- Ultrasonido
- Magnetofección

### ➤ Métodos biológicos:

En éste caso, la vectorización de los ácidos nucleicos se produce mediante el uso de sistemas biológicos, dentro de los cuales el más extendido es el uso de virus para la transfección *in vivo*.

Para llevarlo a cabo se buscan secuencias que codifiquen para factores de virulencia, se sustituyen por secuencias que se deseen insertar. La propia naturaleza del virus es la que va a provocar la infección de la célula.

La gran ventaja de este método es la alta eficiencia en comparación con el resto.

Por otro lado, los inconvenientes son el coste y la complejidad de la síntesis de este tipo de vectores y la toxicidad debida a la posibilidad de producir reacciones inmunogénicas o por la recuperación de su virulencia. Es el único método que está en fase de ensayo clínico pero debido a sus limitaciones recurrimos a los métodos químicos. (2)

### ➤ Métodos químicos:

La búsqueda de un método de transfección que presente un sistema de liberación que presente baja citotoxicidad, barato, alta eficiencia y que tenga margen de mejora ha aumentado su interés. Actualmente no se ha encontrado ninguno que reúna dichas características.

El gran problema de los métodos químicos es su eficiencia de transfección, para aumentarla deberemos de sortear ciertas barreras y plantear un diseño del vector lo más optimizado posible.

## Vectores:

La gran diversidad de situaciones en las que podría aplicarse la terapia génica hace imposible la existencia de un solo tipo de vector adecuado. Sin embargo, pueden definirse las siguientes características para un "vector ideal" y adaptarlas luego a situaciones concretas:

- Que sea reproducible.
- Que sea estable.
- Que permita la inserción de material genético sin límite de tamaño.
- Que permita la transducción tanto en células en división como en aquellas que no están proliferando.
- Que posibilite la integración del gen en un sitio específico del genoma.
- Que se integre una vez por célula, para poder controlar la dosis.
- Que reconozca y actúe sobre células específicas.
- Que la expresión del gen terapéutico pueda ser regulada.

- Que carezca de elementos que induzcan una respuesta inmune.
- Que pueda ser caracterizado completamente.
- Que sea inocuo o que sus posibles efectos secundarios sean mínimos.
- Que sea fácil de producir y almacenar.
- Que todo el proceso de su desarrollo tenga un coste razonable.

Los vectores van a contener los elementos que queramos introducir al paciente, que no van a ser solo los genes funcionales, sino también elementos necesarios para su expresión y regulación, como pueden ser promotores, potenciadores o secuencias específicas que permitan su control bajo ciertas condiciones.

Podemos distinguir dos categorías principales en vectores usados en terapia génica: no virales y los virales (los cuales no proceden en este trabajo). (22)

## **Vectores no virales:**

Los vectores no virales ofrecen varias ventajas frente a los vectores virales como la baja respuesta inmunogénica, la seguridad, la alta capacidad genética y la estabilidad y flexibilidad del diseño químico, han recibido cada vez más atención. Además, en la práctica es fácil crear y alterar químicamente vectores no virales a gran escala. Lo más importante es que el sistema vectorial no viral no está restringido por el tamaño molecular del gen que se introducirá. (13)

### **1. Vectores de naturaleza lipídica.**

El vector de ADN puede ser cubierto por lípidos formando una estructura organizada, como una micela o un liposoma. Cuando la estructura organizada forma un complejo con el ADN entonces se denomina lipoplexe.

Los lípidos catiónicos son vectores genéticos no virales importantes con potencial, tienen ventajas como la biodegradabilidad, la baja citotoxicidad, la variedad de estructura y la fácil producción, en comparación con otros sistemas. A pesar de su baja inmunogenicidad, no toxicidad y fácil síntesis, los lípidos catiónicos tienen baja eficiencia de transfección (14) Por otro lado los aspectos que aumentan la eficacia para la transfección génica son el enlace entre la cabeza hidrofílica y la cola hidrofóbica además de las cadenas de polietilenglicol. (15)

### **2. Polímeros catiónicos:**

Se han utilizado varios sistemas de polímeros catiónicos para el suministro de ácido nucleico. Se ha explorado una amplia gama de estructuras, incluidos los polímeros no degradables lineales y ramificados, así como los polímeros y oligosacáridos biodegradables y bioresorbibles. Todos los polímeros catiónicos tienen grupos amino primarios que son protonados a pH neutro, lo que permite la interacción electrostática con el ácido nucleico aniónico. La poli-L-lisina (PLL) fue uno de los primeros agentes poliméricos de transfección de genes desarrollados, y se demostró que condensa el ADN en pequeños complejos.

### **3. Nanopartículas inorgánicas:**

Las nanopartículas inorgánicas se cree que van a ser el tipo de vector con mayor futuro debido a que presentan una alta biocompatibilidad y cada tipo de nanopartículas presenta una gran diversidad de propiedades que podemos utilizar en nuestro beneficio. En consecuencia, se dedicará el resto de trabajo a las nanopartículas inorgánicas haciéndose hincapié en las nanopartículas de oro.

## Barreras en la transfección:

Para que el material genético alcance su objetivo debe sortear algunas dificultades las cuales serán expuestas a continuación:

- a. **Selectividad:** las moléculas de material genético pueden afectar a la expresión de otros genes que no sean nuestro gen diana. (1) Para minimizar estos efectos indeseables hay que elegir una secuencia de nucleótidos específica que maximice la selectividad sin modificar el funcionamiento de la célula. (2) (3)
- b. **Inmunoestimulación:** uno de los efectos indeseables más significativos es la toxicidad del complejo al producir una activación del sistema inmune innato (4) mayoritariamente por la estimulación de los receptores tipo toll que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos(PAMPs) (5). También la respuesta inflamatoria puede verse inducida por propiedades físicas (tamaño de partícula, carga...), farmacocinética, vía de administración y biodistribución. (4)
- c. **Liberación:** el mayor reto de la transfección es que la secuencia de nucleótidos llegue a el destino de liberación, ya sea el núcleo o el citoplasma debido a que nos encontramos estos obstáculos:
  - Enzimas de degradación: la estabilización es un requisito indispensable para la transfección ya que las secuencias desnudas de nucleótidos son rápidamente degradadas por las nucleasas del plasma. La modificación mas frecuente es un puente metilénico 2'-O, 4'-O que aporta estabilidad frente nucleasas, disminuye "off-target effects" e inmunorespuesta. (6) (5)  
Además las modificaciones aumentan el tiempo de excreción de la molécula, aunque normalmente se suelen usar los complejos en una inyección a nivel local. (7)
  - Reconocimiento SFM(sistema fagocítico mononuclear): Con el fin de condensar los ácidos nucleicos cargados negativamente en los vehículos de entrega, la mayoría de las nanopartículas contienen polimeros catiónicos o lípidos. La carga positiva ayuda a la captación celular, pero también promueve interacciones no específicas con células no diana y componentes extracelulares tales como proteínas séricas y matriz extracelular. (8) La unión de proteínas plasmáticas es el mecanismo principal de SFM para reconocer nanopartículas circulantes, (9) la dosis inyectada se dirige a los órganos de SFM, como el hígado, el bazo y la médula ósea inmediatamente después de la inyección intravenosa, con poca acumulación de tumores.
  - Efecto EPR(mayor permeabilidad y efecto de retención): El transporte de macromoléculas a través del endotelio tumoral es más eficiente que el del endotelio normal debido a sus estructuras vasculares con fugas y discontinuas con drenaje linfático deficiente (retención). En otras palabras, el endotelio tumoral permite la penetración de macromoléculas y la mayoría de las nanopartículas debido a una rápida angiogénesis. El efecto EPR puede ser mejorado por PEGylation porque disminuye la excreción de las nanopartículas y dan lugar a que haya mas oportunidad de que penetren.
  - Introducción en la célula: Como ya hemos comentado la pegilación de las nanopartículas protege de los macrófagos y la agregación, pero tiene el

inconveniente que dificulta tanto la fusión con la membrana para introducirse en la célula como la dificultad de escapar del endosoma, lo cual disminuye la eficacia de la transfección. Para resolver este **dilema de PEG**, se pueden introducir enlaces lábiles en la cadena de PEG, de modo que las nanopartículas no se PEGilan al llegar a las células objetivo, lo que aumenta las tasas de desestabilización de la membrana, el transporte de la carga cargada dentro de las células y la liberación del endosoma. Los lípidos sensibles al pH compuestos de PEG, un enlazador lábil a los ácidos y una cola hidrófoba se pueden usar para construir liposomas. Los ligandos dirigidos también se modifican con frecuencia en la superficie de las nanopartículas para mejorar la captación celular por endocitosis mediada por receptores.

- **Escape del endosoma:** La entrega de vehículos genéticos no virales casi siempre implica endocitosis, y escapar de los endosomas es un paso esencial para los nanovectores para evitar la degradación enzimática. Los complejos **lipídicos catiónicos** pueden unirse a lípidos aniónicos en la membrana endosoma y formar pares de iones neutros. Estos pares de iones desestabilizan la membrana del endosoma y favorecen el desmontaje del lipoplex y finalmente liberan ácidos nucleicos al citoplasma.  
Para sortear el endosoma se plantean **grupos protonables** que están cargados a pH ácido pero menos cargados a pH neutro, la protonación del lípido debido al pH del endosoma le otorga la habilidad de inducir la estructura de fase hexagonal HII y escapar. Para conseguirlo funcionalizamos al sistema con polímeros y péptidos con gran capacidad de amortiguación, captan protones y esto haría que más protones entraran en los endosomas seguidos de iones cloruro, lo que llevaría a un aumento de la presión osmótica y la ruptura endosomal, liberando la carga en el citoplasma. Este proceso se llama el **“efecto de esponja de protones”**.
- **Entrada en el núcleo:** El destino final de los oligonucleótidos antisentido, siRNA/miRNA y ARNm, es el citoplasma, mientras que el ADN debe transportarse al núcleo para la expresión génica. El transporte nuclear ocurre generalmente a través de complejos de poros nucleares, sin embargo, los condensados de ácido nucleico son impermeables debido a su gran tamaño. En las células divisorias, la membrana nuclear se desmonta durante la mitosis; la transfección de pDNA sólo puede ocurrir en esta etapa del ciclo celular debido a la eliminación de la barrera de permeabilidad. La cantidad de ADN que llega al núcleo se hace más baja debido a la nucleasa citoplasmática que puede degradar el ADN, de tal manera que la mayoría del ADN que entra en el citoplasma nunca llega al núcleo. Para facilitar la orientación nuclear, se han desarrollado muchos **péptidos de señal de localización nuclear (NLS)** para permitir la entrada nuclear de ADN a través de complejos de poros nucleares. Las importinas (receptores citoplasmático reconocen los NSL y estas interactúan con las nucleoporinas posibilitando el paso por la membrana. Por otro lado, algunas secuencias de ADN en sí tienen actividad de importación nuclear basada en su capacidad para unirse a factores de transcripción específicos de células.

### **Diseño de sistemas de liberación no virales:**

En base en la comprensión avanzada de los nVGDS (sistemas de liberación de genes no virales), se deben considerar varios factores en su diseño para aumentar la eficiencia de la transfección y disminuir la citotoxicidad. Estos incluyen la condensación de ADN, la estabilidad del complejo, la actividad de la membrana, la absorción celular, la capacidad de amortiguación del endosoma, la degradabilidad del vector y la propiedad de direccionamiento. Además, las combinaciones de diferentes tipos de materiales o potenciadores de la transfección pueden aumentar significativamente la eficiencia y la fiabilidad, y minimizar los efectos secundarios. (12)

### **Mejorar la eficiencia de transfección:**

La tasa de expresión de una proteína objetivo es una etapa clave para la eficiencia de transfección. El enfoque para mejorar la eficiencia de la transfección varía según las diferentes etapas seleccionadas durante la transfección. (13)

### **Condensación de ADN y estabilidad del complejo.**

El primer paso en el nVGD es la condensación y la protección del ADN durante el cual el ADN debe ser de tamaño nanométrico para un transporte seguro a través de las barreras. Los restos hidrofóbicos como los poli (etilenglicol) (PEG) pueden mejorar la condensación y la estabilidad compleja. Un PEG puede aumentar la hidrofilia de una sustancia, y las cadenas laterales hidrofóbicas pueden proporcionar una función protectora. (14) Existen conjugados catiónicos que muestra una actividad excesiva de la membrana que conduce a daños irreversibles en las membranas celulares, se puede modular estructuralmente por PEGilación para alterar la capacidad de complejación con el ADN, la interacción con las membranas celulares / endosómicas y, en última instancia, la eficiencia de la transfección. (15)

### **Disminución de interacciones no específicas:**

La forma más común de disminuir las interacciones no específicas es proteger la superficie de nanopartículas con polímeros hidrofílicos, no cargados como el polietilenglicol (PEG). El recubrimiento de superficie PEG obstaculiza estéricamente la interacción y la unión de los componentes sanguíneos con la superficie de nanopartículas e impide la opsonización y el reconocimiento por los fagocitos de la SFM, (10) lo que provoca una circulación prolongada de nanopartículas en la sangre. La semivida de circulación de nanopartículas puede variar por cambios en la longitud de la cadena PEG, densidad PEG, recubrimiento superficial, tamaño de partícula y carga superficial de la nanoestructura subyacente. (11)

### **Actividad de membrana y captación celular:**

La actividad de membrana determina la tasa de captación celular de un nVV. Las moléculas incorporadas más comúnmente en el diseño de nuevos nVV son los péptidos que penetran en las células (CPP). Estos son un grupo de péptidos que pueden ingresar a las células cruzando la membrana plasmática directamente o mediante la absorción a través de la vía endocitótica. Se pueden usar como vectores de ácido nucleico o como un método de modificación para mejorar la actividad de la membrana de los vectores genéticos no virales (nVGV) (17)

### **Materiales inorgánicos y nVGDS combinatorios :**

Los materiales inorgánicos tienen un papel importante en el nVGD y pueden incorporarse en materiales híbridos para optimizar los nVGDS. Los materiales inorgánicos pueden usarse de manera independiente un solo tipo de biomaterial o se pueden hacer combinaciones para modificar un aspecto de la transfección y de esta forma aumentar la eficiencia. (21)

En los próximos apartados comentaremos estos aspectos de interés.

Existen varios tipos de nanopartículas, aunque en el resto del trabajo vamos a centrar en las NPs de oro. En esta tabla se recogen los grupos más representativos.

Nanopartícula	Citotoxicidad	Características
NPs de grafeno	Media	Capa de carbono de un solo átomo de espesor
NPs de sílice mesoporosa	Alta	Alta área superficial para mayor carga de fármacos.
NPs de Fe superparamagnéticas	Media	Propiedades magnéticas usadas para el direccionamiento de la NP
NPs de fosfato cálcico	Baja	1º biomaterial con el que se experimentó
Nanotubos de carbono	Alta	Presenta absorción NIR

### Nanopartículas de oro

En este trabajo de fin de grado he querido desarrollar las nanopartículas de oro debido a que tienen una gran proyección en diversos campos, pero sobre todo en oncología, el cual me interesa profundamente. Además, las nanopartículas de oro poseen una combinación única de propiedades que les permite actuar como agentes anticancerígenos altamente multifuncionales como la terapia fototérmica o como andamios para la administración farmacológica.

- Pueden mostrar una mayor afinidad de unión y selectividad de **direccionamiento** cuando se funcionalizan con múltiples grupos, así como una captación selectiva por los tumores debido a su tamaño.
- Los conjugados de nanopartículas de oro presentan baja **citotoxicidad** debido a esto pueden administrarse sistémicamente, provocando respuestas inmunogénicas bajas y demostrando una vida media circulatoria larga.
- La **cinética** del transporte de fármacos contra el cáncer puede incrementarse rápidamente mediante la endocitosis de conjugados de nanopartículas y los compuestos quimioterapéuticos poco solubles pueden administrarse eficazmente mediante la funcionalización de nanopartículas de oro.
- Los **nanoconjugados** de oro se pueden usar conjuntamente con agentes de contraste de imagen, moléculas para dirigir la localización intracelular o secuencias de ácido nucleico para la terapia genética dirigida contra el cáncer.
- Poseen características **ópticas** y **electrónicas** únicas propiedades que pueden explotarse en aplicaciones terapéuticas fototérmicas selectivas para el cáncer o imágenes de diagnóstico no invasivas.
- Su **tamaño** intrínseco, su forma y su reactividad superficial se pueden utilizar para dirigir y modificar selectivamente los procesos celulares asociados con la progresión maligna ya que es fácil de modificar su tamaño. (27)

#### **Síntesis:**

Normalmente las nanopartículas de oro esféricas se usan en administración de fármacos y tratamiento antineoplásico y nanopartículas de oro en forma de barra (es decir, nanorods) en aplicaciones terapéuticas fototérmicas.

- Las **nanoesferas** de oro de  $\geq 10$  nm se sintetizan a partir de la reducción de ácido cloroáurico acuoso por citrato. 1973, Frens desarrolló sistemáticamente métodos para sintetizar nanoesferas de oro de diámetro variable mediante reducción mediada por citrato. Los tamaños de nanopartículas están regidos por la relación estequiométrica del oro y el agente reductor. (28)
- Los **nanocilindros** de oro se sintetizan mediante el llamado método de "crecimiento mediado por semillas". En este método, las semillas pequeñas (3–5 nm de diámetro) cubiertas por un tensioactivo catiónico anfifílico se sintetizan a partir de la reducción del ácido cloroáurico acuoso por borohidruro en presencia del estabilizador de superficie mediante una solución acuosa de crecimiento de ácido cloroáurico a la que se le añade luego, las semillas actuando como sitios de nucleación. (28)
- Las partículas de núcleo-cubierta o **nanocapa** en esta síntesis las nanopartículas de oro aniónico se adsorben electrostáticamente a la superficie de las nanopartículas de sílice modificadas con amina (sitios de nucleación) se agregan luego a una solución acuosa de ácido cloroáurico ligeramente reducida y se usa un agente reductor para reducir el oro adicional en las partículas, produciendo una nanocapa de oro conforme. (30)
- Las **nanojaulas** de oro comprenden otra clase de nanoestructuras de oro biomédicamente relevantes. Síntesis de nanoestructuras de metales nobles de núcleo hueco basadas en el método de desplazamiento galvánico. La técnica se basa en el uso de una plantilla de nanopartículas metálicas menos nobles (por ejemplo, Ag) se reemplazan espontáneamente por la adición de iones de un metal más noble (por ejemplo, Au, Pt, Pd). (30)

### Conjugación:

La superficie de nanopartículas de oro representa una de las bases más estables y fácilmente funcionalizables para la conjugación molecular. Las superficies de Au pueden funcionalizarse con una variedad de **monocapas orgánicas autoensambladas** (SAM) para permitir una dispersión estable de partículas tanto en medios acuosos como orgánicos. El intercambio de la monocapa se puede realizar para funcionalizar nanopartículas para ligandos dirigidos, terapéuticos o estabilizadores. (32)

### Biocompatibilidad

Los ambientes fisiológicos exhiben altas concentraciones iónicas y séricas que pueden alterar y disminuir la capacidad estabilizadora de muchos ligandos de nanopartículas. La **suspensión de las nanopartículas** se considera **estable** si la distancia de trabajo de sus fuerzas repulsivas supera a la de sus fuerzas atractivas. Las fuerzas atractivas generalmente se atribuyen a las interacciones de van der Waals y las fuerzas repulsivas generalmente se asocian con la separación carga-carga (es decir, electrostática) o física (es decir, estérica). Debido a la alta concentración iónica presente tanto en los fluidos fisiológicos como en los medios de crecimiento celular, la repulsión electrostática por sí sola a menudo es insuficiente para superarla, se utiliza la separación física usando ligandos poliméricos hidrófilos es una práctica común y permite una suspensión estable de las partículas en entornos de alta concentración iónica y concentración sérica. El poli (etilenglicol) (PEG) es el ligando superficial más común, el PEG consiste en repeticiones de poli (óxido de etileno) hidrófilas y puede ramificarse si se desea una mayor estabilidad y tamaño.

La funcionalización con tales polímeros no solo aumenta la hidrofilia, sino que también disminuye la respuesta inmunogénica de las nanopartículas, así como su reconocimiento / eliminación por el sistema reticuloendotelial (RES) al minimizar la adsorción de proteínas y moléculas (es decir, opsoninas) que inician la captación fagocítica. Juntas, estas estrategias sirven para maximizar la vida media circulatoria y, por lo tanto, la acumulación de tumores mediante estrategias de orientación activa o pasiva.

El uso de nanopartículas de oro no estabilizadas y / o no recubiertas, además de ser fisiológicamente inestables, generalmente produce una cito / genotoxicidad significativa y, por lo tanto, se evita en todas las aplicaciones biomédicas actuales.

### **Propiedades ópticas**

Los metales presentan una nube electrónica que al incidir una radiación electromagnética (en éste caso de un haz láser pulsado de alta energía) pueden absorber o dispersar ésta energía. El oro es un metal noble que se caracteriza por una alta estabilidad de enlace (electron de la última capa altamente ligado al átomo) y por un rango de frecuencia electrónica de energía plasmónica de tipo térmico.

Al absorber la energía se producirá una cierta extracción atómica de electrones (mínima debido a su alta estabilidad) junto con una radiación X característica, pero sobretodo se producirá excitación electrónica a seminiveles energéticos superiores que producirán emisión de fonones (radiación térmica) cuya frecuencia pertenece al rango plasmonico. Debido a la estabilidad de la estructura metálica del oro, los e extraídos del átomo se moverán por la estructura pero no llegarán a abandonar la superficie de la misma (lo que evita la emisión de radiación tipo beta de carácter ionizante y por lo mismo mutageno) y la radiación x emitida será absorbida por átomos vecinos lo que creará mayor excitacion electrónica.

De esta forma se consiguen partículas con alta conductividad y emisión térmica y se evitan reacciones mutagenas en cadena.

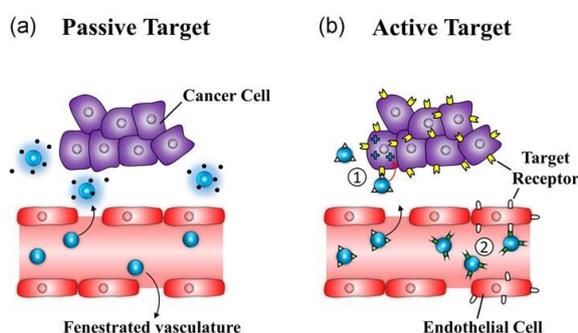
### **Acumulación, absorción y eliminación**

- **Absorción:** Una ventaja particular de los conjugados de nanopartículas de oro anticancerígenos es su acumulación selectiva de tamaño en los sitios tumorales debido al efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR) Las células malignas requieren mayores cantidades de nutrientes para mantener su crecimiento y división acelerados. Para satisfacer esta demanda, los tumores sólidos estimulan la producción de nuevas vasculaturas a través de las cuales se pueden suministrar cantidades crecientes de sangre (es decir, angiogénesis). A diferencia de los vasos normales, la neovasculatura angiogénica se caracteriza por un endotelio altamente desordenado con grandes espacios que permiten la penetración preferencial de conjugados nanoescalados. El drenaje linfático característicamente disminuido del intersticio tumoral también sirve para aumentar la retención de dichos compuestos en el sitio del tumor, lo que resulta en una penetración aumentada y una disminución del aclaramiento de los nanoconjugados circulantes. (33). El efecto EPR se ha demostrado utilizando una variedad de complejos de proteínas / ADN / polímeros, así como nanopartículas que incluyen micelas, liposomas y nanoestructuras metálicas. Como era de esperar, el tamaño óptimo para EPR de un conjugado de nanopartículas de oro varía según la etapa, la ubicación y el tipo de cáncer, sin embargo, las partículas con un diámetro hidrodinámico (HD) mayor que el umbral de aclaramiento renal (aproximadamente 6 nm) y se puede esperar que hasta 2 mm en HD exhiban acumulación tumoral preferencial. (33)

Hay dos tipos de focalización en tumores: pasivo y activo.

- La focalización **pasiva** utiliza procesos naturales como el EPR, en el cual la vasculatura tumoral permeable y la falta de drenaje linfático eficiente en un tumor sólido conduce a la acumulación pasiva de drogas o partículas en el sitio del tumor, dado el tiempo de circulación suficiente. (4)
- La orientación **activa** consiste en un ligando adicional para ayudar en la localización o internalización, como los anticuerpos o fragmentos, fólido ácido, azúcares, péptidos y aptámeros de ácido nucleico. Sin embargo, los restos de direccionamiento grandes pueden dificultar la internalización y el desempaquetado de genes.

Por ejemplo, las nanopartículas de oro pueden complejarse con PEG-NH<sub>2</sub> y ácido fólico a través de interacciones no covalentes y pueden ser absorbidas por las células cancerosas proporcionalmente al grado de receptores de ácido fólico expresados en ellas. Sin embargo, el suministro involuntario al hígado y los riñones también puede ocurrir debido a la sobreexpresión de los receptores de ácido fólico allí también.



- **Aclaramiento:** El aclaramiento farmacocinético de los conjugados de nanopartículas de oro circulantes también es de importancia clave para la eficacia posterior.<sup>27</sup> Las nanopartículas de oro polianiónicas de hasta 4 a 6 nm en HD generalmente exhiben una excreción urinaria eficiente mientras que las partículas policatiónicas de hasta 6 a 8 nm en HD pueden igualmente despejadas. La mayor propensión a la excreción urinaria policatiónica se debe a la atracción electrostática con la carga negativa neta de los capilares que separan la sangre circulante de los filtrados urinarios aunque, en contrapunto, las nanopartículas polianiónicas normalmente exhiben una disminución de la penetración celular. Las nanopartículas circulantes administradas por vía intravenosa que no pueden ser filtradas por el sistema renal son capturadas y degradadas por las células de Kupffer o llegan al hígado donde son metabolizados o acumulados en hepatocitos y excretados en la bilis.
- La acumulación de las nanopartículas atendiendo a su tamaño se ha observado que a mayor tamaño la semivida es mas corta y la acumulación de RES es mas rápida además se acumulan predominantemente en el hígado y el bazo. En cambio las nanopartículas mas pequeñas también se acumulan hígado, el bazo y el pulmón; y alcanzan la acumulación máxima en mas tiempo.

En conclusión, las nanopartículas de oro estabilizadas con polímeros presentan una baja toxicidad aguda y subaguda, no obstante se necesitan mas investigaciones en la toxicología a largo plazo ya que tiene una alta acumulación en tejidos.

## Aplicaciones nanopartículas de oro:

### Terapia génica:

La regulación controlada de la expresión génica es otro método por el cual las neoplasias malignas pueden tratarse utilizando nanotecnologías de oro.

La terapia génica es el conjunto de técnicas que utilizan la transferencia de material genético para prevenir o curar enfermedades genéticas, cuando hablamos de transfección solo hablamos de introducción de material genético en la célula eucariota animal. En éste apartado veremos como podemos usar las nanopartículas de oro para introducir en la célula

Los inhibidores de HSP90 tienen el potencial para tratar muchos tipos de cáncer debido a la dependencia de las células tumorales en el HSP90 para el crecimiento y la proliferación celular. Se requiere la ubiquitina ligasa E3 de Cullin-5 (Cul5) para que los inhibidores de HSP90 induzcan la degradación de la proteína objetivo y la posterior muerte celular. Cul5 se expresa a niveles bajos de células de cáncer de mama en comparación con los controles pareados del paciente. Esta baja expresión de Cul5 observada puede desempeñar un papel en la disminución de la eficacia informada de 17-AAG y los inhibidores de HSP90 relacionados como monoterapia. Se ha desarrollado un método para la entrega de 17-AAG más ADN Cul5 a las células a través de nanopartículas de oro (AuNP). La administración de AuNP que contienen ADN de Cul5 aumenta la sensibilidad de las células AU565 deficientes en Cul5 a 17-AAG. La caracterización de AuNP por espectro UV-vis, TEM, ensayo de electroforesis en gel y 1H NMR indica la unión de la carga útil de 17-AAG y ADN, así como la estabilidad de AuNP. Los estudios en células AU565 (células metastásicas de cáncer de mama que sobreexpresan HER2) deficientes en Cul5 revelan que la administración de Cul5 y 17-AAG juntos aumentan la citotoxicidad. Nuestros resultados proporcionan evidencia de que el suministro de ADN con el fármaco puede servir como un método para sensibilizar las células tumorales resistentes a los fármacos. (34)

- **Proteína de choque térmico 90 (HSP90):** comprenden 1–2% del total de proteínas citosólicas solubles en la célula eucariota y están altamente conservadas en todas las especies. La estructura de HSP90 contiene un dominio N-terminal, donde se ubican el bolsillo de unión de ATP y la región de enlace cargada, un dominio medio responsable de la vinculación con otras moléculas y un dominio C-terminal, responsable de la unión de co-chaperonas. HSP90 interactúa con más de cien moléculas diferentes, muchos de los cuales son quinasas o factores de transcripción que pueden desregularse en las células tumorales. (34) Por ejemplo, se ha demostrado un circuito de retroalimentación positiva entre las isoformas HSP90  $\alpha$  y  $\beta$  y Las vías de señalización STAT3 y MAPK contribuyen a la supervivencia de las células malignas. (36)

HSP90 **estabiliza a las proteínas sobreexpresadas** con mutaciones que contribuyen a la progresión del tumor y la inhibición da como resultado la degradación de éstas, lo que lo convierte en un buen objetivo para la terapia contra el cáncer. Anteriormente hemos informado que tras la inhibición con geldanamicina, una benzoquinona ansamicina natural, las proteínas diana Hsp90, HER2 y el factor inductor de hipoxia-1A (HIF1A) son ubiquitinados por la ubiquitinlinasa de Cullin5 (Cul5) y degradados a través del proteasoma. La función de HSP90 depende de la unión de ATP para cambiar la conformación de abierto a cerrado. Muchos inhibidores de Hsp90 bloquean la unión de ATP. (36)

Los inhibidores de Hsp90 han recibido mucha atención para tratar el **cáncer de mama HER2+**, ya que se ha informado que la inhibición de Hsp90 causa una disminución en los niveles de HER2 en la membrana celular (Citri et al., 2004).

- **17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG)**, conocida comercialmente como Tanespimicina, es un derivado de la gelanamicina. (37)

Durante los últimos 20 años, dieciocho inhibidores de Hsp90, incluido 17AAG, han ingresado a ensayos clínicos, sin embargo, estos inhibidores no han logrado pasar los ensayos clínicos de fase II como monoterapia .

Los inhibidores de HSP90 matan las células en parte al inducir el estrés del retículo endoplásmico (que conduce a la activación de JNK y la apoptosis dependiente de caspasa) e inducen la respuesta de proteína desplegada.<sup>19</sup> Los resultados de los experimentos in vivo e in vitro han demostrado que la tanespimicina inhibe la proliferación y supervivencia de las células MM.<sup>20</sup> La tanespimicina es citotóxica para las células primarias, incluidas las líneas celulares resistentes a la quimioterapia convencional en tumores sólidos y neoplasias hematológicas. (36)

En el caso del cáncer de mama HER2 +, la expresión reducida de Cul5 puede contribuir al bajo rendimiento de 17-AAG como monoterapia en ensayos clínicos. Anteriormente informamos que se requiere Cul5 para la degradación inducida por GA de HER2 y HIF1A .Samant y col. (2014) informaron que el agotamiento de Cul5 resultó en una disminución de la sensibilidad a 17-AAG en colorrectal, mama, pulmón y líneas celulares de melanoma.

- Datos de interés: En un estudio de 50 casos de cáncer de mama, se informó una disminución de 2.2 veces en la cantidad de Cul5 presente en el tumor versus tejido sano (39)

Elegimos las nanopartículas de oro debido a su baja inmunogeneidad, gran relación superficie/volumen y absorción endosómica.

Los **ligandos** sirven para mantener la agrupación de los átomos de oro, estabilizando así los grupos de fondo de oro, para permitir la funcionalización con la carga útil, y para dar al AuNP una característica específica, como una carga positiva para facilitar la absorción (Smith et al. al., 2015). Utilizamos **glutatió**n (GSH) como ligando ya que se informa que las células cancerosas tienen niveles aumentados de GSH probablemente para proteger las células de las especies reactivas de oxígeno. (40)

Además, las NPsAu recubiertos con GSH eran estables en el torrente sanguíneo y no formaban agregados. Se cree que las nanopartículas alcanzan el sitio del tumor a través del efecto de retención de permeabilidad mejorada (EPR).Es decir, sintetizamos AuNP ultrapequeños usando GSH como ligando que tiene ADN Cul5 y 17-AAG unidos.

En conclusión, el uso de AuNP para administrar ADN más fármaco puede servir como un medio para sensibilizar las células tumorales que son resistentes a los fármacos quimioterapéuticos debido a la resistencia derivada de un defecto genético.

### **Terapia fototérmica:**

La **terapia fototérmica** (PTT) es un método de tratamiento del cáncer que, como la quimioterapia, se basa en la aplicación selectiva o en la creciente sensibilidad de las células cancerosas al daño citotóxico, en este caso por el calor o la hipertermia. Se puede usar una amplia variedad de fuentes de radiación electromagnética en estos tratamientos, aplicados en procedimientos de cuerpo entero o enfocados a regiones específicas de interés, donde es absorbida y disipada como calor por moléculas intrínsecas (es decir, fisiológicamente endógenas) como la melanina y el agua, o mediante agentes de contraste fototérmicos que pueden aplicarse directamente a tumores sólidos o administrarse por vía intravenosa y acumularse en sitios malignos mediante direccionamiento activo / pasivo.

Las terapias fototérmicas que implican **nanopartículas de oro plasmónicas** se pueden clasificar en función de los mecanismos por los cuales alcanzan la muerte celular.

- Los aumentos leves de la temperatura a menudo derivan a vías apoptóticas y son bien conocidos por perturbar una variedad de funciones celulares normales. Estos pueden resultar en la desnaturalización de proteínas/enzimas, inducción de proteínas de choque térmico, interrupción de la señalización metabólica, hinchazón endotelial, microtrombosis, disminución del suministro vascular, deterioro del reconocimiento de receptores, transporte de membrana disfuncional y síntesis de nucleótidos inhibidas.
- Los aumentos más grandes y rápidos de temperatura, a menudo denominados tratamientos "ablativos", derivan en células necróticas. En estos casos, la interrupción de la membrana celular es a menudo predominante, sin embargo la cavitación y posterior destrucción física de los orgánulos también pueden ocurrir.

Seguidamente vamos a ilustrar la terapia fototérmica mediante un ejemplo de terapia combinada usando la fototerapia, quimioterapia y terapia génica en un mismo sistema siendo vectorizado por nanopartículas de sílice huecas.

### **Terapia combinada, ejemplo.**

#### **Introducción:**

Las nanopartículas de sílice mesoporosa exhiben perspectivas prometedoras en diversas áreas biomédicas con las virtudes de una superficie específica alta, morfología controlada, biocompatibilidad favorable y funcionalización de superficie fácil. (40) Particularmente, se han explorado intensamente en la construcción de sistemas de administración de fármacos / genes. Se ha demostrado que la morfología de las nanopartículas influye en el proceso de absorción celular y la eficiencia de la administración intracelular. (41)

Se observó una adhesión mejorada mediante **superficie rugosa** para facilitar la internalización celular con nanopartículas de sílice de tipo rambután con superficies puntiagudas. También se demostró que poseen una capacidad mejorada de unión al ADN plasmídico y mejores rendimientos de transfección en comparación con análogos con otras topografías de superficie. (42) Estos resultados sugieren el gran potencial de la rugosidad nanopartículas en aplicaciones biomédicas. Sin embargo, el trabajo anterior solo abordaba las pruebas in vitro de las nanopartículas rugosas. Además, la funcionalidad realizada parece limitada. Por lo tanto, desde la perspectiva de las aplicaciones prácticas, sería deseable diseñar nanopartículas multifuncionales con superficies rugosas y evaluar su rendimiento in vivo. Los **nanocilindros** (nanorods) de oro (Au NRs) con absorción óptica favorable en la región del infrarrojo cercano (NIR) son candidatos atractivos para aplicaciones biomédicas generalizadas como la terapia fototérmica (PTT) y la imagen fotoacústica (PA). (43) (44)

Las nanoplataformas emergentes que integran nanopartículas de sílice y Au NR son impresionantes en la realización de teranósticos multifuncionales. Las heteronanopartículas de nanopartículas de sílice huecas (HSN) como nanocápsulas son mejores para la administración de fármacos sobre las contrapartidas sólidas, ya que la cavidad hueca podría mejorar la capacidad de carga. (45) A este respecto, una estrategia de "barco en una botella" podría explotarse fácilmente para crecer y atrapar Au NR dentro de la cavidad interior de HSNs. Además, la cavidad interior también podría proporcionar suficiente espacio para la carga del fármaco, mientras que la cubierta externa podría diseñarse a través de una fácil funcionalización de la superficie.

#### **Sorafenib(SF):**

El sorafenib (SF) es un fármaco antiproliferativo y antiangiogénico hidrófobo, ha sido aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento del carcinoma hepatocelular maligno (CHC) (46). La escasa solubilidad del SF obstaculizó en gran medida su eficacia terapéutica. Para aumentar la biodisponibilidad y evitar los efectos adversos, el desarrollo de un sistema avanzado de administración de SF es apremiante. Se han utilizado una variedad de nanoportadores para cargar SF a través de la interacción hidrofóbica, la adsorción física, el enlace de hidrógeno y la interacción  $\pi - \pi$ .<sup>23-25</sup> Aunque estos sistemas de administración han realizado la administración conjunta de múltiples fármacos y la terapia guiada por imágenes, <sup>24-28</sup> casi no hay diseños para nanoportadores con superficies rugosas para una mejor entrega de SF a las células HCC. Recientemente, un sistema de administración de fármacos sensible a la luz basado en nanopartículas de sílice mesoporosas para la liberación controlable de fármacos ha atraído la atención para lograr una efectividad terapéutica altamente específica, que podría aplicarse en la liberación de SF controlada de forma precisa.<sup>29,30</sup>

Como tratamiento complementario de la quimioterapia, la **terapia génica (GT)** muestra un gran potencial para el tratamiento del cáncer a través de la entrega efectiva de genes para regular los procesos celulares. (47) Además, PTT proporciona una modalidad alternativa de fototerapia basada en luz NIR, que es práctica y menos tóxica.<sup>33,34</sup> Podría ser ideal para producir heteronanopartículas rugosas de núcleos de Au NR y cápsulas de sílice para terapia trimodal de genes / quimio / fototerapia.

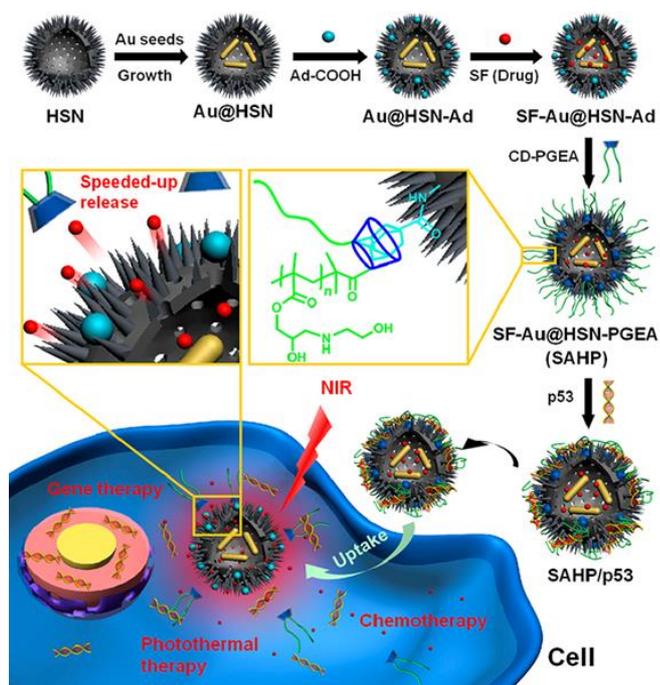


Ilustración 2: (51) Esquema de la síntesis y la actuación de las heteronanopartículas.

#### • Construcción de la heteronanopartícula:

Como se puede ver en la imagen, construimos nanocápsulas rugosas con estructura de cascabel (Au @ HSN-PGEA, AHP) compuestas de núcleos de Au NR formados in situ y capas de sílice mesoporosa policationica para la terapia complementaria trimodal del cáncer. El concepto de diseño es combinar las ventajas de la rugosidad de la superficie, la capacidad de respuesta NIR y la forma de liberación controlada para el tratamiento con HCC. Los HSN con superficies rugosas se sintetizaron primero como nanoreactores. Luego, los núcleos de Au NR se sintetizaron in situ dentro de la cavidad de los HSN utilizando un enfoque de "envío en una botella", lo que resultó en nanovasos rugosos de Au @ HSN.

La capa exterior de las nanopartículas se funcionalizó con un polication superior, **CDPGEA** (poli (metacrilato de glicidilo funcionalizado con etanolamina de dos brazos) con un núcleo de  $\beta$ -ciclodextrina) (48) (49) para transportar genes para terapia génica. El espacio interior alrededor de los núcleos de Au NR estaba reservado para la carga de sorafenib. Se espera que la característica de superficie rugosa de los AHP facilite la absorción celular. En este sentido, la irradiación de la luz NIR no solo podía inducir la terapia fototérmica sino también

desencadenar la liberación del fármaco al abrir la capa de polimerización. Se investigó en detalle la viabilidad del tratamiento multimodal gen / quimio / fototérmico complementario con imágenes de fotoacústica in vitro e in vivo. (48) (50) (49)

Se demostró que los AHP rugosos con estructura de cascabel con núcleos de Au NR fototérmicos encapsulan el fármaco antitumoral SF en la cavidad y condensan el ADNp en las superficies externas, que se anticipa para la terapia complementaria de gen / quimio / fototérmica. La eficacia de la terapia combinada se evaluó primero mediante las pruebas preliminares in vitro. En este ejemplo, el antioncogen p53 de uso común se empleó para suprimir la proliferación de células tumorales para terapia génica. Además, se descubrió que la quimioterapia sinérgica y la terapia bimodal gen / fototérmica ( $S > 0$ ) potencian el efecto antitumoral. (51)

Se supone que PTT podría mejorar la absorción celular de drogas y genes a través de la capacidad de respuesta NIR, 31 lo que puede contribuir al efecto prominente de la nanoplateforma SAHP / p53.

- **Caracterización de la heteronanopartícula:**

Las **imágenes multimodales** integradas con la terapia podrían proporcionar información completa y valiosa para la respuesta terapéutica para evaluar y ajustar el tratamiento. Las imágenes de **fotoacústica y tomografía computerizada** bimodales podrían combinar las ventajas de una alta resolución espacial / densidad y una alta sensibilidad. Luego se verificó la viabilidad de los AHP rugosos con estructura de cascabel como agentes de contraste de imagen PA y CT in vitro e in vivo. La intensidad de las señales de PA aumentó con la concentración de AHP, mientras que se detectó un brillo mejorado en las imágenes de PA correspondientes, que surge del Au NR fototérmico.

Después de la inyección intratumoral de AHP, las brillantes señales fotoacústicas adquiridas de la región tumoral verificaron la penetración de la luz NIR y el potencial de AHP para obtener imágenes de PA in vivo, confirmando la acumulación adecuada de AHP alrededor del tumor. Además, la intensidad de la atenuación de rayos X aumentó linealmente con la concentración de la solución de AHP, y se observaron señales de contraste de CT (tomografía computerizada) mejoradas en la región del tumor después de la inyección de AHP, de acuerdo con los resultados de las imágenes de PA .

A este respecto, se podría lograr una intrigante terapia complementaria guiada por imagen de PA / TC de modo dual para controlar la acumulación de AHP y los efectos terapéuticos. (52)

Después de la inyección intratumoral de AHP, las brillantes señales de PA adquiridas de la región tumoral verificaron la penetración de la luz NIR y el potencial de AHP para obtener imágenes de PA in vivo, confirmando la acumulación adecuada de AHP alrededor del tumor. Además, la intensidad de la atenuación de rayos X aumentó linealmente con la concentración de la solución de AHP, y se observaron señales de contraste de CT mejoradas en la región del tumor después de la inyección de AHP, de acuerdo con los resultados de las imágenes de PA . A este respecto, se podría lograr una intrigante terapia complementaria guiada por imagen PA / CT de modo dual para controlar la acumulación de AHP y los efectos terapéuticos.

Alentados por los prometedores resultados antitumorales de la terapia complementaria gen / quimio / fototérmica in vitro, estudiamos más a fondo el rendimiento in vivo de la versátil nanoplateforma SAHP / p53 mediante inyección intratumoral. (51)

- **Experimentación en animales:**

Los **ratones desnudos portadores de hepatoma** se dividieron aleatoriamente en cinco grupos con cuatro ratones en cada grupo para diferentes administraciones:

- PBS como grupo de control.
- AHP con irradiación NIR como grupo PTT.
- AHP / p53 como grupo GT SAHP con irradiación NIR como quimioterapia bimodal / grupo de terapia fototérmica.
- SAHP / p53 con irradiación NIR como grupo de terapia trimodal gen / quimio / terapia fototérmica.

Los volúmenes de tumores de diferentes grupos se midieron cada 2 días para adquirir curvas de crecimiento tumoral. Como los tumores de ratones en el grupo de terapia trimodal gen / quimio / fototérmica parecían casi desaparecer después de 8 días, los experimentos antitumorales in vivo se terminaron en consecuencia. Todos los ratones con hepatoma fueron sacrificados y los tumores fueron pesados y medidos (imagen 3).

- Se encontró que los tumores en el grupo de control crecieron rápidamente durante el período, que manifestó el comportamiento de crecimiento típico del hepatoma maligno.
- En comparación, el crecimiento tumoral en el grupo GT obviamente fue suprimido en cierta medida, de acuerdo con la alta eficiencia de transfección de AHP y la función antitumoral de p53. Sin embargo, el volumen promedio de tumores después del tratamiento seguía siendo 4 veces mayor que el valor inicial, lo que implica la insuficiencia de GT monomodal.
- Cuando solo se aplicó PTT, el volumen del tumor disminuyó primero y luego aumentó poco después de 2 días, lo que sugiere la proliferación de células tumorales sobrevivientes después de la irradiación de NIR. Esta situación mejoró después de la aplicación de quimioterapia bimodal / fototérmica, donde el volumen de tumores fue mucho menor debido a los efectos sinérgicos de PTT y la liberación de SF potenciada por hipertermia. En este caso obvia recurrencia de los tumores todavía se observó después de 4 días.
- Los tumores en el grupo de terapia trimodal de gen / quimioterapia / fototerapia se suprimieron totalmente y fueron significativamente más pequeños que cualquier otro grupo. La inhibición continua del crecimiento tumoral indica la superioridad de la terapia trimodal complementaria. Durante los procesos en cascada, se logró la integración sinérgica de GT y quimioterapia bimodal / terapia fototérmica, lo que podría contribuir a la eficacia terapéutica satisfactoria in vivo. A medida que los núcleos Au NR de los AHP con estructura de traqueteo funcionaban para PTT, la hipertermia que los acompañaba desencadenó el desmontaje del CD-PGEA para facilitar la liberación de SF y p53 para GT y quimioterapia.

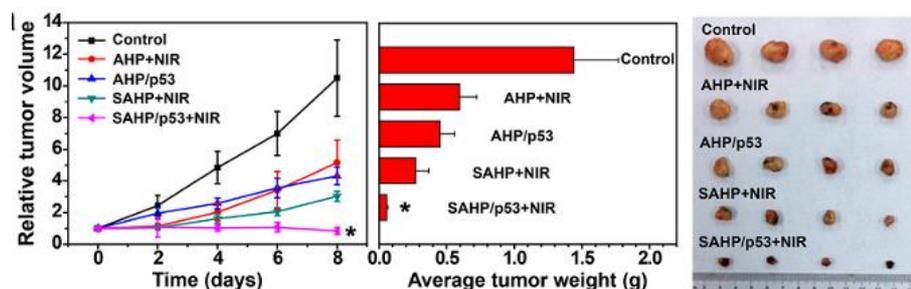


Ilustración 3: Evolución de los tumores con los cuatro grupos de ratones según el volumen y el peso. En la última imagen se pueden ver los tumores extirpados tras la experimentación. (51)

La expresión del antioncogen p53 (proteína, P53) se visualizó mediante tinción inmunohistoquímica del tejido tumoral disecado. Apenas se observó área positiva a la proteína p53 en las muestras del grupo control, grupo PTT o grupo de quimioterapia / terapia

fototérmica. En contraste, los grupos de terapia génica / quimio / fototérmica exhibieron una evidente expresión de la proteína P53 en marrón. Para evaluar los efectos terapéuticos de diferentes tratamientos, se analizaron los estados celulares en los tejidos tumorales con tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Mientras que las células de hepatoma en el grupo de control parecían normales, se observó apoptosis celular después de diferentes tratamientos. También hubo pérdida de células de hepatoma en algunas regiones. Cuando se llevó a cabo la terapia trimodal gen / quimio / fototérmica, las células de hepatoma experimentaron la apoptosis más severa entre todos los grupos. Los resultados histológicos anteriores verificaron aún más la profunda eficacia terapéutica de la terapia trimodal complementaria sensible a NIR. (51)

### **Conclusión:**

Las nanopartículas de oro son una excelente opción alternativa a otros métodos de transfección tanto los habituales como pueden ser los vectores virales debido a su baja inmunoestimulación como todos los vectores inorgánicos. La mayor diferencia dentro de los vectores inorgánicos es la capacidad que tienen de producir calor mediante radiación NIR, la cual es muy poco agresiva, y sin producir radiación ionizante que aumentase la mutagénesis en aquellas células a las que incidiese (NIR presenta alta penetrabilidad). Hay que seguir con el desarrollo de las nanopartículas debido a sus buenos resultados aunque aún queda mucho por optimizar como su alta acumulación en órganos como hígado, bazo y pulmones que podría tener efectos crónicos y subcrónicos nefastos.

### **Bibliografía:**

1. Vickers TaC. Off-target and a portion of target-specific siRNA mediated mRNA is Ago2"Slicer" independent and can be mediated by Ago1. *Nucleic Acid Res.* 2009; 37(6927-6941).
2. Xu Z ZQLGYA. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science.* 2006;61(3):1027-1040.. 2006; 61(3)(1027-1040).
3. Prescott HyK. *Microbiología.* 7th ed. Sánchez MÁyC, editor. Madrid : Mc Graw Hill; 2008.
4. Hosseinkhani H, Hosseinkhani M. Biodegradable Polymer-Metal Complexes for Gene and Drug Delivery. *Curr. Drug Saf.* 2009; 4(79-83).
5. Niculescu Duvaz D, Heyes J, Springer CJ. Structure-Activity Relationship in Cationic Lipid Mediated Gene Transfection.. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10(1233-1261).
6. Gao YG, Alam U, Ding AX, Tang Q, Tan ZL, Shi YD, et al. [12]aneN3-Based Lipid with Naphthalimide Moiety for Enhanced Gene Transfection Efficiency. *Bioorganic chemistry.* 2018; 79(334-340).
7. Jackson ABSSJKSBJMMea. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnology.* 2003; 21(635-637).
8. Fedorov YKAAEKJIDMWea. Different delivery methods-different expression profiles. *Nay methods.* 2005; 2(241).
9. Robbins MJAAaMI. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides.* 2009; 19(89-102).
10. Czech MAMaTG. RNAi-based therapeutic strategies for metabolic disease. *Nat Rev Endometrial.* 2011; 7(473-484).
11. Gao YLXaLX. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *Int J Nanomedicine.* 2011; 6(1017-1025).
12. Pan XTRMXWDaXL. Tumor-targeted RNAinterference: functional non-viral nanovectors. *Am J Cancer Res.* 2011; 1(25-42).
13. Wolff JaRD. Breaking the bonds: non-viral vectors become chemically dynamic. *Mol Ther.* 2008; 16(8-15).
14. Li SaHL. Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. *J Control Realise.* 2010; 145(178-181).
15. Wang M HHSYQLZJGGea. A pH-sensitive gene delivery system based on folic acid-PEG-chitosan—PAMAM-plasmid DNA complexes for cancer cell targeting.. *Biomaterials.* 2013; 34(20-32).
16. Raftery RM WDCIHADGCSea. Delivering nucleic-acid based nanomedicines on biomaterial scaffolds for orthopedic tissue repair: challenges, progress and future perspectives. *Adv Mater.* 2016; 28(5447-69).

17. Takasu A KSIIFYHMKTea. Artificial extracellular matrix proteins containing phenylalanine analogues biosynthesized in bacteria using t7 expression system and the PEGylation.. *Biomacromol.* 2011; 12(3444–52).
18. Yin L SZKKZNTLHea. Reconfiguring the architectures of cationic helical polypeptides to control non-viral gene delivery.. *Biomaterials.* 2013; 34(2340–9. ).
19. Tseng YMSaHL. Lipid-based systemic delivery of siRNA.. *Adv Drug Delivery review.* 2009; 61(721-731).
20. Schipper MIGKACZEYAAea. Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. *Small.* 2009; 5(126-134).
21. More HT FJDJYSMJ. Gene delivery from supercharged coiled-coil protein and cationic lipid hybrid complex.. *Biomaterials.* 2014; 35(7188–93. ).
22. Yamamoto M TY. Tissue engineering by modulated gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58(535–54 ).
23. Huang XH JPESIESM. In *Nanomedicine.*: 2; 2007. p. 681–693.
24. G.Frens. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science.* 1973; 241(2022).
25. Huang X NSESMAM. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Adv. Master.* 2009 July; 21(4880-4910).
26. Lal S CSHN. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact. *Acc Chem Res.* 2008; 41(1842–1851).
27. Chen J MJSAXYLZXY. Facile synthesis of gold-silver nanocages with controllable pores on the surface. *Journal of the American Chemical Society.* 2006; 128(46)(14776-7).
28. Bard A,FL. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.*: 2nd ed. Nueva York: John Wiley & Sons, Inc; 2001.
29. Iyer AK KGFJMDDT. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today.* 2006; 11(17-18)(812-8.).
30. Lu W XCZGHQZRZJLC. Targeted photothermal ablation of murine melanomas with melanocyte-stimulating hormone analog-conjugated hollow gold nanospheres. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(876– 886).
31. K. G. Enhanced permeability and retention of macromoleculauoms: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J. Drug Target.* 2007; 15(7-8)(457-464).
32. Sarah Talamantez-Lyburna PBNH. Gold nanoparticles loaded with cullin-5 DNA increase sensitivity to 17-AAG in cullin-5 deficient breast cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics.* 2019; 564(281-292).
33. Beliakoff J,WL. Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs.* 2004; 15(651-662).
34. Dimopoulos MA. Tanespimycin as Antitumor Therapy. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* 2011; 11(17-22).
35. Whitesell L,LSL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 761–772. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5(761-772).
36. Uehara Y. Natural product origins of Hsp90 inhibitors. *Cancer Drug Targets.* 2003; 3(325–330).
37. Fay MJ,LKA,KGA. Fay, M.J., Longo, K.A., Karathanasis, G.A., Shope, D.M., Mandernach, Analysis of CUL-5 expression in breast epithelial cells, breast cancer cell lines, normal tissues and tumor tissues. *Mol. Can.* 2003; 2(40).
38. Estrela JM,OA,OE. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2006; 43(143-181).
39. Dickerson EB DEHX. Gold Nanorod Assisted Near-Infrared Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) of Squamous Cell Carcinoma in Mice. *Cancer Lett.* 2008; 269(57-66).
40. Li ZX, Barnes JC, Bosoy A, Stoddart JF, Zink JI. Mesoporous Silica Nanoparticles in Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2590–2605. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41(2590–2605).
41. Lin X, Zhao N, Yan P, Hu H, Xu FJ. The Shape and Size Effects of Polycation Functionalized Silica Nanoparticles on Gene Transfection. *Acta Biomater.* 2015; 11(381-392).
42. Song H, Yu M, Lu Y, Gu Z, Yang Y, Zhang M, et al. Plasmid DNA Delivery: Nanotopography Matters. *J. Am. Chem. Soc.* 2017; 139(18247-18254).
43. Zhao N, Li J, Zhou Y, Hu Y, Wang R, Ji Z, et al. Hierarchical Nanohybrids of Gold Nanorods and PGMA-Based Polycations for Multifunctional Theranostics.. *Adv. Funct. Mater.* 2016, 26, 5848–5861. 2016; 26(5848-5861).
44. Jung BK, Lee YK, Hong J, Ghandehari H, Yun CO. Mild Hyperthermia Induced by Gold Nanorod-Mediated

- Plasmonic Photothermal Therapy Enhances Transduction and Replication of Oncolytic Adenoviral Gene Delivery.. ACS Nano. 2016; 10(10533-10543).
45. Lin LS, Song J, Yang HH, Chen X. Yolk–Shell Nanostructures: Design, Synthesis, and Biomedical Applications.. Adv. Mater.. 2018; 30.
  46. Wang CF, Mäkilä EM, Kaasalainen MH, Liu D, Sarparanta MP, Airaksinen AJ, et al. Copper-Free Azide–Alkyne Cycloaddition of Targeting Peptides to Porous Silicon Nanoparticles for Intracellular Drug Uptake.. Biomaterials 2014, 35, 1257–1266. 2014; 35(1257-1266).
  47. Xu FJ. Versatile Types of Hydroxyl-Rich Polycationic Systems via O-Heterocyclic Ring-Opening Reactions: from Strategic Design to Nucleic Acid Delivery Applications. 2018. Prog. Polym. Sci.; 78(56-91).
  48. Zhao N, Lin X, Zhang Q, Ji Z, Xu FJ. Redox-Triggered Gatekeeper-Enveloped Starlike Hollow Silica Nanoparticles for Intelligent Delivery Systems. Small. 2015; 11(6467-6479).
  49. Duan S, Yang Y, Zhang C, Zhao N, Xu FJ. NIRResponsive Polycationic Gatekeeper-Cloaked Hetero-Nanoparticles for Multimodal Imaging-Guided Triple-Combination Therapy of Cancer. Small. 2017; 13(1606133).
  50. Aznar E, Oroval M, Pascual L, Murguía JR, MartínezMáñez R, Sancenón F. Gated Materials for On-Command Release of Guest Molecules. Chem. Rev. 2016; 116(561-718).
  51. Xinyan Chen QZLMYNZaFJX. Rattle-Structured Rough Nanocapsules with inSitu-Formed Gold Nanorod Cores for Complementary Gene/Chemo/Photothermal Therapy. ACS Nano. 2018; 12(5646-5656).
  52. Fan W, Yung B, Huang P, Chen XNfMSCT. Nanotechnology for Multimodal Synergistic Cancer Therapy. Chem. Rev. 2017; 117(13566-13638).
  53. Gao YG, Shi YD, Alam U, Tang Q, Zhang Y, Wang R, et al. Functional Lipids Based on [12]aneN 3 and Naphthalimide as Efficient Non-Viral Gene Vectors. Org. Biomol. Chem. 2016; 14( 6346–6354).
  54. Berchel M, Haelters JE, Afonso D, Maroto A, Deschamps L, Giamarchi P, et al. Functionalized Phospholipid Molecular Platform: Use for Production of Cationic Fluorescent Lipids.. Eur. J. Org. Chem.. 2014; 5(1076-1083).
  55. Yang Y LXCLHSZJCFea. Core-sheath structured fibers with pDNA polyplex loadings for the optimal release profile and transfection efficiency as potential tissue engineering scaffolds. Acta Biomaterials. 2011; 7(2533–43).
  56. Letoha T KCECKPAKESGea. Contribution of syndecans to lipoplex-mediated gene delivery. Eur J Pharm Sci. 2013; 49(500-505).
  57. Wang F WYZXZWGSJF. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. Journal Control Release.. 2014; 174(126-136).
  58. Zhang Q YWWBZJRLCQea. Linear polycations by ring-opening polymerization as non-viral gene delivery vectors.. Biomaterials. 2013; 5391–401 (34).
  59. Dreaden EC MSSQOAESM. Tamoxifen-poly(ethylene glycol)-thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment. Bioconjugate Chem. 2009; 20(2247-2253).