



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

Nanorrobots de ADN

Autor: Óscar Carballo de la Cal

Tutor: M^a Concepción Civera Tejuca

Convocatoria: Febrero 2018

Índice

1.	Resumen.....	3
2.	Introducción y antecedentes	3
3.	Objetivos	4
4.	Material y métodos	4
5.	Resultados y discusión	5
5.1.	Nanotecnología de ADN	5
5.2.	Componentes de un nanorrobot.....	7
5.3.	Tipos de nanorrobots	8
5.4.	¿Cómo conseguir que un nanorrobot alcance su diana?	9
5.5.	ADN origami	10
5.5.1.	Efectos conformacionales de la luz UV	11
5.6.	Aplicaciones.....	11
5.6.1.	Biosensores.....	14
5.6.2.	Terapia antitumoral.....	16
5.7.	Experimentos en animales	17
6.	Conclusiones	18
7.	Bibliografía	18

1. Resumen

La nanorrobótica es el campo de las tecnologías emergentes que crea máquinas o robots cuyos componentes están o son cercanos a escala nanométrica (10^{-9} metros). El objetivo de la nanorrobótica de ADN es el diseño y fabricación de nanoestructuras de ADN dinámicas capaces de llevar a cabo tareas específicas a través de una serie de cambios de estado.

El ADN es un material excelente para la construcción de nanomáquinas porque es un material biocompatible, puede ser fácilmente ajustado y programado y posee la capacidad de autoensamblarse en multitud de estructuras en 2D y 3D.

Las máquinas creadas ofrecen aplicaciones dentro del campo de la nanomedicina como biosensores y sistemas de liberación modificada capaces de transportar y liberar el fármaco bajo unas condiciones específicas allá donde se necesite.

2. Introducción y antecedentes

Los fármacos con una baja biodisponibilidad requieren de una administración a altas dosis debido a que solamente una pequeña fracción de la misma alcanza la diana terapéutica. De esta forma se intenta garantizar la llegada del fármaco al lugar de acción. El objetivo de la liberación dirigida y controlada es un mejor manejo de la farmacocinética, farmacodinamia, toxicidad e inmunogenicidad del fármaco y lograr una mayor eficacia en el tratamiento.

El uso de nanorrobots como agente transportador -siendo éstos máquinas o robots cuyos componentes están o son cercanos a la escala nanométrica- permitiría la liberación del fármaco de manera precisa, dirigida y controlada en la diana terapéutica, lo que produciría el aumento de la concentración del fármaco exclusivamente en su lugar de acción y la disminución, al mismo tiempo, de la aparición de posibles efectos secundarios. (1)

La nanotecnología -término surgido en 1974 de la mano del profesor Torio Taniguchi (2)- es una rama de la tecnología que tiene como objeto de estudio la manipulación de la materia a escala nanométrica, esto es, dimensiones comprendidas entre 1 y 100 nanómetros generalmente, haciendo hincapié en la manipulación de átomos y moléculas de forma individual.

En los últimos años, el desarrollo de la nanotecnología de ADN ha pasado del estudio estructural de las mismas a la búsqueda y exploración de la funcionalidad y aplicaciones que dichas estructuras pueden ofrecer. Dentro de este marco, la síntesis y desarrollo de sistemas de liberación de fármacos se ha convertido en uno de los campos más estudiados.

La razón del uso de estructuras construidas a partir de material genético resulta bastante obvia: los principios estructurales inherentes de las nanoestructuras de ADN, así como la programabilidad de los bloques de construcción individuales en números y patrones diseñados racionalmente. Estas propiedades ofrecen, por ejemplo, la posibilidad de modificar la interacción de estas estructuras con las células vivas mediante el ajuste de la posición y estequiometría de las moléculas funcionales. Además, las nanoestructuras de ADN tienen el potencial único para controlar grandes cambios dinámicos inducidos por las reacciones de desplazamiento de la cadena. (3)

El alto grado de programabilidad del ADN basado en el apareamiento de bases combinado con la reducción en el coste de su síntesis ha convertido al ADN en un material ampliamente usado en la fabricación de estructuras y dispositivos moleculares dinámicos.

El éxito de la nanotecnología de ADN proviene de dos factores clave:

- La racionalización de los procesos termodinámicos del ADN nos permite predecir de forma precisa cómo se pliegan las cadenas de ADN lineal y cómo interaccionan unas con otras.
- La rápida disminución en los costes y el aumento de calidad en la síntesis de ADN. (4)

3. Objetivos

El objetivo del siguiente trabajo es proporcionar información sobre los últimos avances dentro del campo de la nanorrobótica y los nanorrobots, especialmente de aquéllos fabricados íntegramente, o al menos en su mayoría, con material genético, así como ofrecer una visión de las posibles aplicaciones como biosensores y en el transporte y liberación de nuevos fármacos.

4. Material y métodos

Se realizó una revisión bibliográfica en las bases de datos de “PubMed”, “Scholar Google” y “Scopus”, utilizando palabras clave como “nanorobot”, “DNA nanorobot”, “DNA nanotechnology” y “DNA origami”. La selección inicial se llevó a cabo basándose en la fecha de publicación del artículo, escogiendo los más recientes y las revistas de mayor índice de impacto.

La figura 1 muestra un gráfico que incluye el número de artículos publicados con los términos “dna nanotechnology” y “drug delivery” en títulos, resumen o palabras clave de acuerdo con la base de datos Scopus.

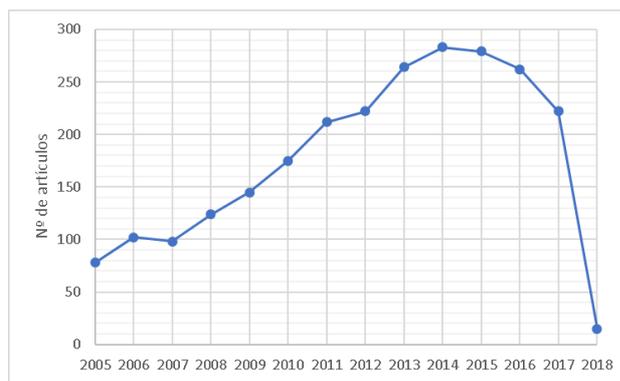


Figura 1. Artículos publicados sobre nanotecnología de ADN y liberación de fármacos.

5. Resultados y discusión

5.1. Nanotecnología de ADN

El ganador del premio Nobel de Física de 1965, Richard Feynman, fue el primero en hacer referencia a las posibilidades de la nanociencia y la nanotecnología. En un discurso que ofreció en el Caltech (Instituto Tecnológico de California) el 29 de diciembre de 1959 titulado “There’s plenty of room at the bottom” (“En el fondo hay sitio de sobra”) describió la posibilidad de la síntesis de pequeñas máquinas mediante la manipulación directa de los átomos. (5)

Inspirado en los conceptos de Feynman, de forma independiente, K. Eric Drexler usó el término “nanotecnología” en su libro del año 1986 “Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology” (“Motores de la Creación: La Llegada de la Era de la Nanotecnología”), en el que propuso la idea de un “ensamblador” a nanoescala que sería capaz de construir una copia de sí mismo y de otros elementos de complejidad arbitraria con un nivel de control atómico (6). En el mismo año co-fundó “The Foresight Institute” (“El Instituto de Estudios Prospectivos”) para ayudar a aumentar la conciencia y comprensión pública de los conceptos sobre la nanotecnología y sus implicaciones.

Así, el surgimiento de la nanotecnología como un campo en la década de 1980 ocurrió por la convergencia del trabajo teórico y público de Drexler, quien desarrolló y popularizó un marco conceptual para la nanotecnología, atrayendo especial atención sobre el control atómico de la materia.

La nanotecnología de ADN involucra el diseño y la construcción artificial de estructuras a partir de ácidos nucleicos con el propósito de usos tecnológicos. En la nanotecnología de ADN, los ácidos nucleicos son usados como materiales (no-biológicos) “de construcción” y no como las moléculas portadoras de información genética que son en las

células. Investigadores en este campo han creado estructuras estáticas tales como redes cristalinas de 2 y 3 dimensiones, nanotubos y figuras arbitrarias, así como máquinas funcionales a nivel molecular y computación basada en ADN. Este campo de investigación se ha comenzado a utilizar como una herramienta para resolver problemas de ciencia básica, problemas en biología estructural y biofísica, incluyendo las aplicaciones de cristalografía de rayos X y espectroscopía de proteínas para la determinación de las mismas. Aplicaciones potenciales a nivel molecular en electrónicos y en nanomedicina también están siendo investigados.

El concepto de “nanotecnología de ADN” fue acuñado por primera vez a principios de 1980 por Nadrian Seeman (7) pero no fue hasta mediados del año 2000 que el concepto fue definido como un campo de investigación y comenzó a ganar cierta atención. El hecho de poder utilizar los ácidos nucleicos como materiales de construcción radica en las estrictas reglas de apareamiento entre las bases nitrogenadas, lo que permite que hebras con secuencias complementarias de ADN se unan y formen estructuras rígidas y fuertes de cadena doble. Como resultado se obtienen estructuras complejas que se ensamblan selectivamente gracias al diseño racional en la secuencia de bases y que pueden ser controladas a nanoescala. Existen diversos métodos de ensamblaje para construir estas estructuras. Por ejemplo, las estructuras basadas en azulejos (las cuales se construyen a partir de estructuras más pequeñas), el método del “ADN origami” (en el cual las estructuras se doblan), o las estructuras reconfigurables (las cuales se pueden reestructurar a partir de técnicas de desplazamiento en las cadenas).

Estas cualidades hacen que el ensamblaje de estructuras de ácidos nucleicos sea fácil de controlar durante el diseño y la construcción. Esta propiedad de apareamiento entre bases no aparece en otro tipo de materiales usados en la nanotecnología como las proteínas (para el cual el diseño es muy complicado), y algunas nanopartículas, las cuales no tienen la capacidad de un ensamblaje inducido específico.

La estructura de una molécula de ADN consiste en una secuencia de nucleótidos que puede ser distinguida según las bases nitrogenadas que contenga. En el ADN, pueden presentarse 4 bases que son: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C). Los ácidos nucleicos tienen la propiedad de que solamente dos moléculas se unirán una a otra, si las cadenas son complementarias, para formar de esta manera la doble cadena. Esto significa que una base se aparea con su base complementaria: A solo se aparea con T y C solo se aparea con G (8). Ya que el correcto apareamiento entre las bases es termodinámicamente favorable, las cadenas de ácidos nucleicos se unen espontáneamente unas con otras de modo que se

maximiza el número correcto de apareamientos. Esto implica entonces que la secuencia de bases en un sistema de cadenas determina el patrón de cómo éstas se unirán y, por lo tanto, permite un control fácil de la estructura en general. En la tecnología de ADN, las secuencias de las cadenas son diseñadas lógicamente por los investigadores para que el apareamiento entre bases y sus interacciones cause un plegamiento determinado para obtener la estructura deseada. A pesar de que el ADN es el material de construcción más utilizado, se pueden realizar estructuras a partir de otros materiales como el ARN y el ácido péptido nucleico (por sus siglas en inglés, PNA). (9)

5.2. Componentes de un nanorrobot

Todo nanorrobot posee tres partes esenciales, a saber:

- Navegador: se encarga del desplazamiento de la máquina. Puede ser autónomo si el nanorrobot se desplaza por movimiento browniano o gracias a variaciones del gradiente de concentración de ciertas sustancias; o externo si se usan señales ultrasónicas, campos magnéticos, rayos X, calor, etc.
- Reservorio: espacio destinado a contener el fármaco.
- Fuente de propulsión: proporciona al nanorrobot la capacidad de desplazarse. (10)

En la tabla 1 se muestra una comparativa de las partes constituyentes de un robot a macroescala frente a un nanorrobot de ADN y los materiales que los componen. (11)

Tabla 1. Macrorrobot versus nanorrobot de ADN		
Componentes	Macrorrobot	Nanorrobot de ADN
Elementos estructurales y uniones	Metal, polímeros de plástico	Nanotubos de ADN
Articulaciones	Metal, polímeros de plástico	Bisagras de ADN, enlaces moleculares, articulaciones sintéticas
Actuadores	Motores eléctricos/neumáticos/hidráulicos, materiales inteligentes	Motores de flagelo de proteína ATPasa, actuadores de ADN, motores de proteínas virales, etcétera
Elementos de transmisión	Resortes de metal/polivinilo, cojinetes, engranajes	Hojas β
Sensores	Sensores de luz/fuerza/posición/temperatura	Rodopsina, factor de choque térmico

5.3. Tipos de nanorrobots

La enorme versatilidad del ADN como material de construcción junto con el desarrollo de nuevas técnicas de síntesis como el ADN origami hace que, hoy en día, no haya casi límites a la hora de fabricar nanoestructuras con este elemento.

Las primeras estructuras con formas geométricas simples como rectángulos y triángulos dieron paso a otras con patrones de diseño más complejos, composiciones en múltiples capas y nanoestructuras en tres dimensiones. En la figura 2 se muestran diferentes nanoestructuras de ADN. (12)

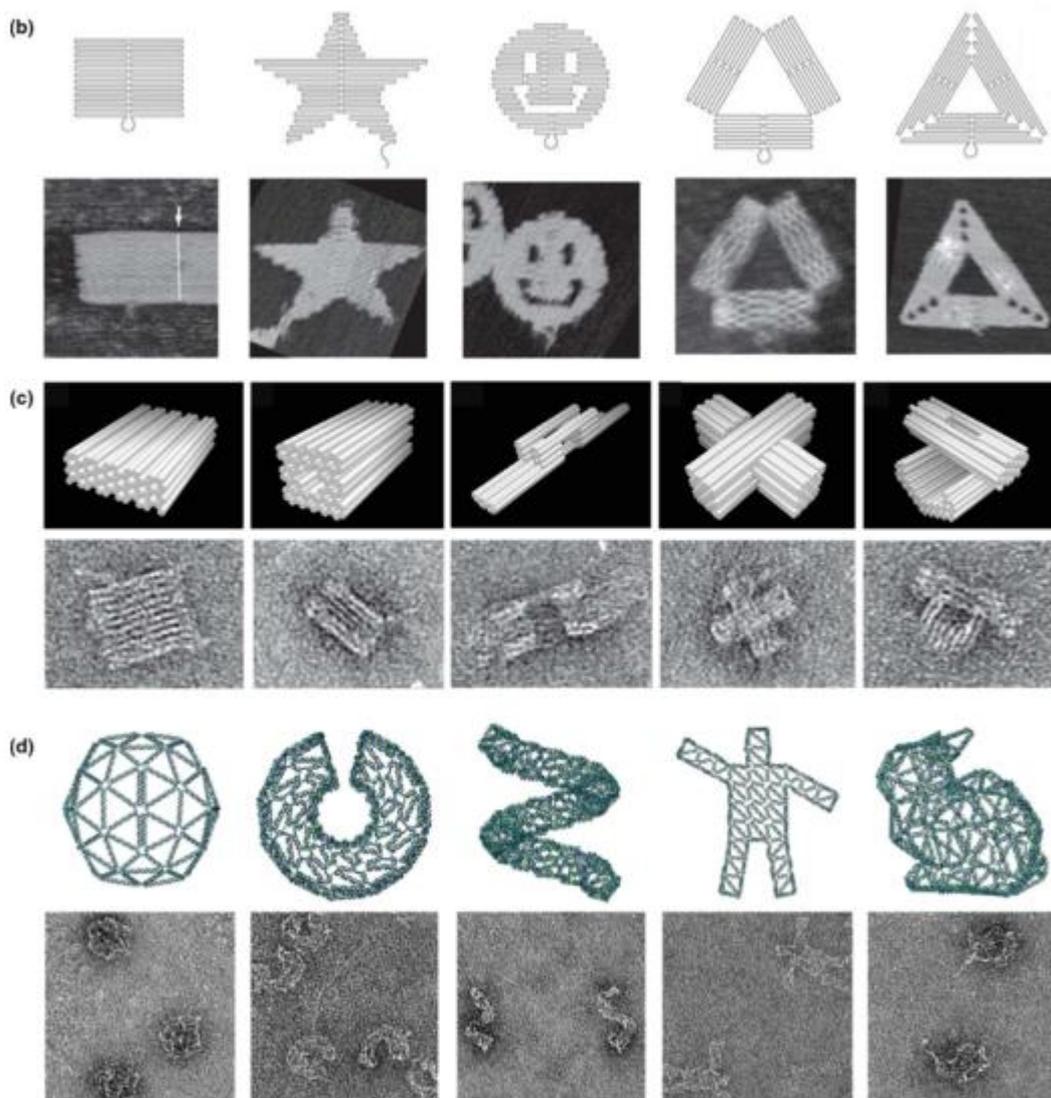


Figura 2. Nanoestructuras de ADN. (b) Primeras estructuras de ADN origami construidas por Rothemund. (c) Nanoestructuras de ADN origami en multicapas. (d) Esqueletos (*wireframe*) de ADN origami. (12)

5.4. ¿Cómo conseguir que un nanorrobot alcance su diana?

Uno de los desafíos más importantes en la nanotecnología es conseguir transportar con precisión un objeto a nanoescala desde una ubicación a otra siguiendo una ruta programable.

Hasta hace pocos años, los dispositivos nanomecánicos de ADN disponibles mostraban exclusivamente movimientos localizados no extensibles, tales como apertura/cierre, extensión/contracción y rotación reversible. Además, estos movimientos no eran ejercidos de manera autónoma, sino que estaban mediados por cambios ambientales como la variación en el gradiente de concentración de ciertos iones.

Existen dos diseños de dispositivos de ADN capaces de andar de forma autónoma que consisten en un camino y un caminante. El camino de cada dispositivo contiene una matriz lineal periódica de sitios de anclaje que es secuencialmente recorrida por el caminante de manera autónoma y unidireccional.

Cada dispositivo hace uso alternativamente de enzimas de restricción y ligasas para conseguir el movimiento traslacional a costa del consumo de ATP como fuente de energía. Este método de desplazamiento está inspirado en la forma en que los ribosomas celulares producen péptidos moviéndose a lo largo del ARNm para producir la cadena de aminoácidos correspondiente.

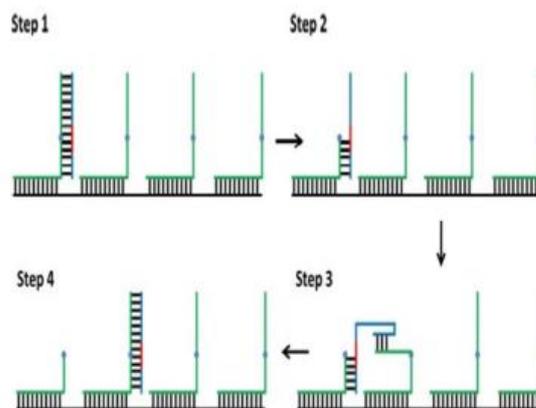


Figura 3. Pasos secuenciales del caminante de ADN. (13)

En la figura 3 se muestra la secuencia de pasos realizada por un caminante de ADN de una sola pierna. En el primer paso una enzima de restricción corta una pequeña secuencia del estátor (verde), dejando expuesto un extremo 3' del motor (azul) que se une al siguiente eslabón de la cadena gracias a la acción de una ligasa en el paso 3 y consiguiendo el movimiento traslacional completo del motor en el último paso. Siguiendo este principio se han diseñado multitud de caminantes de una sola pierna, bípedos e incluso multipedales, los

cuales literalmente ruedan sobre una superficie de ARN modificado, pudiendo recorrer mayores distancias en menos tiempo. (14)

5.5. ADN origami

El término origami hace referencia al arte tradicional japonés consistente en el plegado del papel con el fin de obtener figuras de formas variadas; asimismo, el ADN origami consiste en el plegamiento de una larga cadena de ADN mediante la adición de pequeñas cadenas que actúan a modo de grapas, obligando a la cadena de ADN a adoptar la forma deseada. El método está basado en el doblamiento de una larga cadena de ADN monocatenario (ssDNA), normalmente el genoma de 7,3 kilobases del bacteriófago M13, con un exceso de pequeñas cadenas complementarias, generalmente de 32 bases, que son complementarias de, al menos, dos segmentos distintos de la cadena de ADN. Tanto la cadena de ADN monocatenario como un exceso de las pequeñas cadenas complementarias son calentadas e introducidas en un tampón con una alta concentración de magnesio para la formación del ADN origami. (13)

En la figura 4 se muestra una estructura de ADN origami con forma de caja. (13)

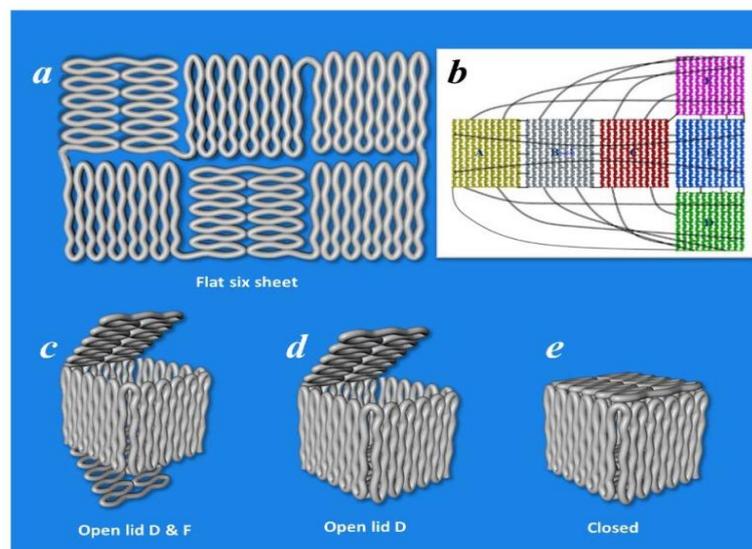


Figura 4. Caja en 3D formada por ADN origami. (a) Los seis dominios planos de ADN origami y (b) las conexiones entre éstas (líneas negras) forman una caja en tres dimensiones. (c-e) Diferentes estados conformacionales de la caja de ADN origami. (13)

Los pasos en la generación conceptual del ADN origami comprenden dos fases: una primera en la cual se genera a mano un modelo geométrico aproximado compuesto por bloques rectangulares que simulan una vuelta de ADN de ancho y una hélice de ADN más el espacio de interhélice en altura para posteriormente generar una ruta de plegado mediante el relleno de la trama; la segunda fase es desarrollada por un programa de ordenador, el cual

genera un diseño preliminar basado en el modelo geométrico y la ruta de plegado, y produce el refinamiento de las longitudes del dominio helicoidal para minimizar la tensión en el diseño y la rotura y fusión de las hebras. (15)

Comparados con otros sistemas a nanoescala diseñados para la liberación de fármacos, como las micelas de polímero y las partículas inorgánicas, las construcciones basadas en ADN origami presentan numerosas ventajas:

- Mismo tamaño, forma y carga para cada partícula en lugar de la distribución de tamaño observada a menudo en las nanoestructuras autoensambladas.
- Perfecto control en la distribución de funcionalidades en la estructura usando oligos específicos. (16)

5.5.1. Efectos conformacionales de la luz UV

A principios del año pasado un estudio realizado de forma conjunta por investigadores de la Universidad de Purdue y la Universidad Tecnológica de Chalmers de Suecia observaron las respuestas conformacionales de estructuras de ADN origami frente a radiación UV aplicada a diferentes dosis y longitudes de onda. Al final de dicho estudio los resultados demostraron que la luz ultravioleta de longitud de onda corta y media puede causar fotolesiones en el ADN origami mientras que, a dosis moderadas, las lesiones no solo no causan defectos visibles en el origami ni afectan significativamente la capacidad de hibridación, sino que además ayudan a aliviar el estrés interno en la estructura y a restaurarla a la conformación diseñada. A dosis altas aumenta la disociación de las “grapas”, lo que causa la desintegración estructural. La luz UV de longitud de onda larga no produjo ningún efecto en la conformación del origami en sí misma. Así, el estudio muestra que se puede utilizar un determinado rango de UV en conjunto con moléculas fotoactivas para foto-reconfiguración mientras se evita cualquier daño a las estructuras de ADN. (17)

5.6. Aplicaciones

Las nanoestructuras de ADN autoensambladas han demostrado un gran potencial en un amplio rango de campos, especialmente en la biodetección y la administración de fármacos. Las nanoestructuras de ADN diseñadas racionalmente pueden aumentar enormemente la capacidad de reconocimiento biomolecular en la interfaz de detección con una densidad y orientación de sonda mejor controlada, así como la pasivación de superficie, proporcionando una plataforma versátil y eficiente para desarrollar una amplia gama de

biosensores electroquímicos y ópticos para diversas proteínas, ácidos y moléculas pequeñas. Por otro lado, las nanoestructuras de ADN dinámicas y permeables a las células han demostrado respuestas lógicas bien controladas a los estímulos ambientales. Por lo tanto, es posible desarrollar sistemas de transporte basados en nanoestructuras de ADN con sensores inteligentes integrados para el diagnóstico *in vivo* y la liberación controlada de fármacos. (18)

En 2006, Erben y sus colaboradores demostraron que podían encapsular una sola proteína, el citocromo c, en la cavidad central de un tetraedro de ADN. Este trabajo inspiró la idea de utilizar nanoestructuras de ADN como nanovehículo para la administración de fármacos. (19)

Probablemente uno de los estudios más interesantes sea el llevado a cabo en el año 2012 por Douglas y sus colaboradores, los cuales presentaron un nanorrobot de ADN autónomo capaz de transportar cargas útiles moleculares a las células, detectando antígenos de superficie específicos y reconfigurando su estructura para la liberación de dicha carga útil. El dispositivo se puede cargar con una variedad de moléculas de una manera altamente organizada y está controlado por una compuerta lógica codificada por aptámeros (puerta AND), lo que le permite responder a una amplia gama de señales. En la figura 5 se muestra el nanorrobot de ADN creado por Douglas y su equipo. (20)

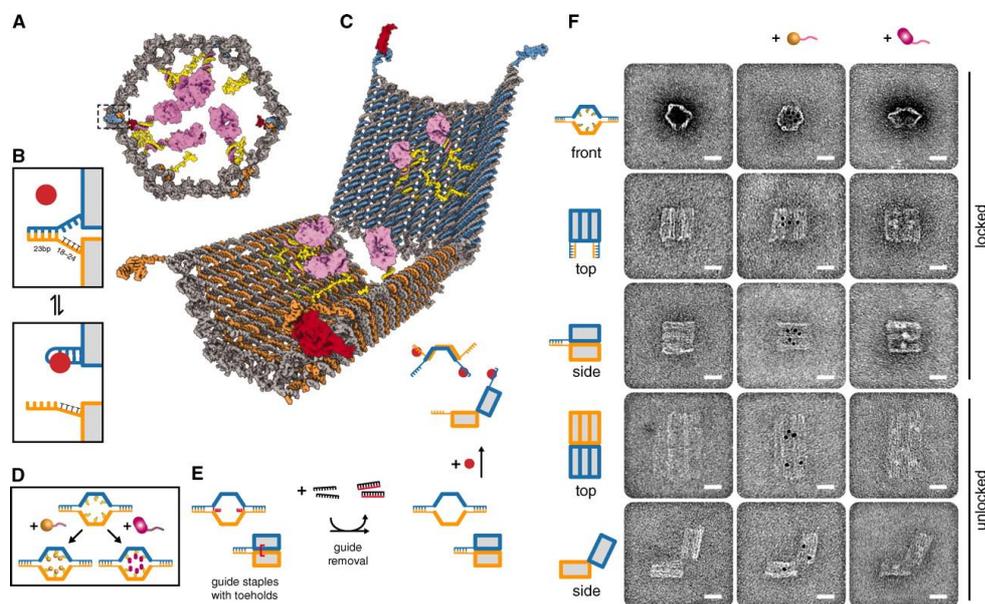


Figura 5. Diseño y análisis al microscopio electrónico de transmisión (MET) del nanorrobot de ADN. (A) Vista ortográfica frontal del nanorrobot cargado. (B) Mecanismo de bloqueo del aptámero. Las esferas rojas representan las “llaves” o secuencias clave que permiten la apertura del nanorrobot. (C) Vista en perspectiva del nanorrobot abierto. (D) El nanorrobot puede ser cargado con diferentes moléculas como nanopartículas de oro (naranja) o fragmentos de anticuerpos (rosa). (E) Vista frontal, lateral y superior del nanorrobot. En rojo se muestran guías que ayudan al ensamblaje del nanorrobot y que son posteriormente retiradas usando oligos

complementarios (en negro). (F) Imágenes al MET del nanorrobot de ADN en diferentes estados conformacionales. Columna izquierda: descargado; columna central: cargado con partículas de oro de 5 nm; columna derecha: cargados con fragmentos Fab (fragmentos de unión al antígeno). Barras de escala: 20 nm. (20)

Las nanoestructuras de ADN poseen una mayor estabilidad y permiten una internalización más eficiente comparadas con sus homólogos en forma de cadena monocatenaria y doble hélice, probablemente, debido a la mayor complejidad estructural y capacidad de modificación que éstas pueden ofrecer. (16,21,22)

Una opción atractiva para mejorar la administración de fármacos sería combinar la modularidad de las estructuras de ADN con la capacidad de las partículas de los virus para encapsular ácidos nucleicos y dirigirse a diferentes tipos de tejidos (tropismo). Siguiendo esta idea se han realizado estudios, los cuales han demostrado que las estructuras de ADN origami pueden interactuar con las proteínas de la cápsida del virus de forma controlable para formar nuevas nanoestructuras y mejorar así la entrega celular. Aunque actualmente este método no esté optimizado y probablemente pueda mejorarse añadiendo ligandos dirigidos a células, ligandos penetrantes o empleando virus completamente diferentes a los usados hasta ahora, los resultados obtenidos lo muestran como un excelente punto de partida para el desarrollo de diversas aplicaciones biomédicas, no solo en la administración de fármacos, sino también en la organización de reacciones intracelulares mediante plantillas basadas en origami. La encapsulación completa brinda la posibilidad de liberar múltiples origamis de ADN funcionalizados en las células y, de esta manera, utilizar combinaciones programables de fármacos específicos para lograr procedimientos de tratamiento alcanzables/realizables. Un ejemplo aparece en la figura 6 donde se puede observar estructuras rectangulares de ADN origami (72 nm × 92 nm) unidas a proteínas de la cápsida del virus del moteado clorótico del caupí. (23)

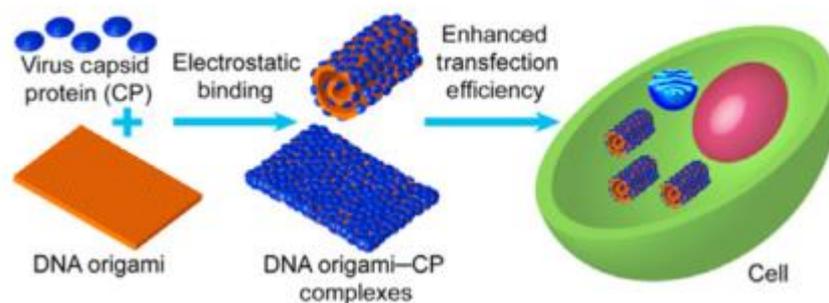


Figura 6. La proteína de la cápsida del virus (azul) se muestra cubriendo rectángulos de ADN origami (naranja). La proporción de ADN origami y proteínas de la cápsida controla la morfología resultante del complejo. La eficacia de la transfección aumenta al aumentar la concentración de proteínas de la cápsida del virus. (23)

5.6.1. Biosensores

Ácidos nucleicos funcionales tales como las desoxirribozimas (*DNAzymes*) y los aptámeros se han usado de manera extensa en el campo de la biosensibilidad con el fin de detectar niveles de varias especies moleculares en entornos celulares. Presentamos a continuación solo algunos de los múltiples ejemplos del uso de nanorrobots como biosensores.

En el año 2012, Pei y sus colaboradores construyeron un conjunto de nanorrobots de ADN con forma de tetraedro con uno o dos extremos reconfigurables, lo que permitía al tetraedro cambiar su forma en respuesta a señales moleculares específicas, como protones, ATP e iones de mercurio. Utilizando como estrategia de medición la transferencia de energía de resonancia de Förster (abreviado FRET en inglés), mostraron que los tetraedros cambiaban su conformación en respuesta al ATP intracelular. Esto demostró la viabilidad de combinar una nanoestructura de ADN con sensores celulares. (24)

En otro estudio se usó un sensor basado en ADN para mapear el pH de las vías endosómicas en las células vivas. El diseño se basó en unas “pinzas de ADN”, esencialmente dos hélices dobles conectadas con una bisagra flexible, pero incorporaron una estructura que actuaba como un interruptor sensible al pH para abrir y cerrar las pinzas. El sensor fue absorbido por hemocitos de mosca a través de endocitosis y enviado desde los endosomas tempranos (pH ~ 6) a los endosomas tardíos (pH ~ 5.5) y finalmente a los lisosomas (pH ~ 5). El entorno cada vez más ácido dio como resultado cambios de fluorescencia cuantificables y, por lo tanto, una medición indirecta del pH. El acoplamiento del sensor a la proteína transferrina permitió mapear los cambios de pH a lo largo de una vía endocítica mediada por un receptor específico. Un esquema del funcionamiento aparece en la figura 7. En la parte izquierda se puede observar la ruta de los biosensores de transferrina y furina, mientras que a la derecha aparecen las partes de las estructuras sensibles al pH (hebras verdes en el caso de la furina y rosas en la transferrina), las cuales forman a pH bajo un motivo que provoca que las distancias entre los cromóforos sean muy pequeñas y la emisión de fluorescencia (medible por FRET). (25)

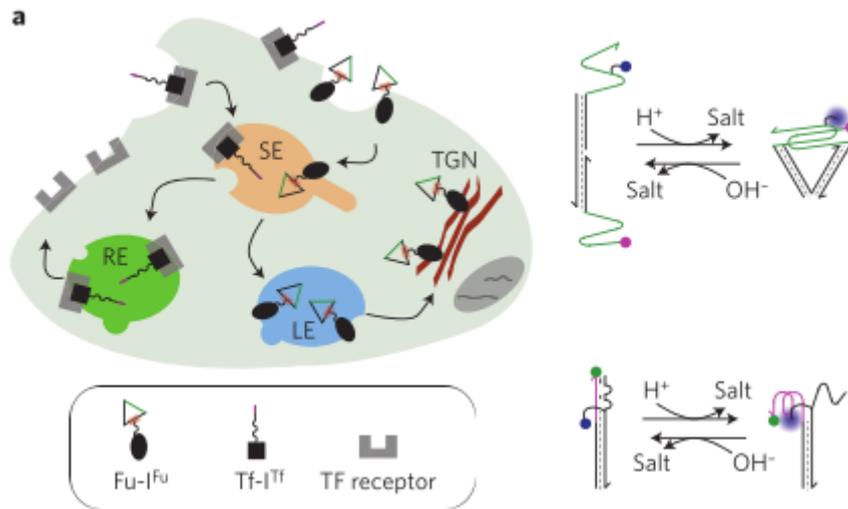


Figura 7. Nanorrobots de ADN sensibles al pH para detectar simultáneamente las vías de furina (Fu) y transferrina (Tf). Las estructuras viajan desde endosomas tempranos (SE) hasta endosomas tardíos (LE) y el aparato de Golgi (TGN) o endosomas de reciclaje (RE). (4)

Recientemente, Torelli y su equipo presentó una entidad de ADN origami híbrida, inmovilizada íntimamente a través de sondas de captura a un extremo de fibra óptica, produciendo así un nuevo biosensor. Los nanorrobots de ADN inmovilizados con una solapa deslizante pueden ser activados por un ADN objetivo específico presente en una muestra, al exponer una enzima (“*hemin/G-quadruplex DNAzyme*”), que posteriormente cataliza la generación de quimioluminiscencia, una vez que las sondas de fibra específicas se sumergen en una solución de luminol. La integración de nanorrobots orgánicos en una fibra óptica inorgánica crea un sistema híbrido que puede utilizarse en la detección de secuencias de ADN específicas. Este sistema tiene potenciales aplicaciones en una amplia gama de campos, incluido el diagnóstico en el punto de atención o biosensores celulares *in vivo* cuando se utilizan sondas de fibra óptica ultrafinas con fines de investigación. En la figura 8 aparece un esquema del genosensor de fibra óptica-ADN origami. (26)

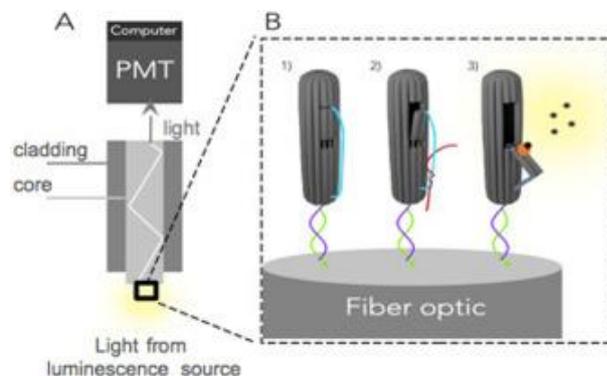


Figura 8. Sensor híbrido de fibra óptica y ADN origami. (A) Los elementos de biorreconocimiento (nanorrobot de ADN) se inmovilizan en la superficie del núcleo (parte reactiva de 2 mm de tamaño) utilizando una secuencia

de captura (verde) y una secuencia de anclaje (púrpura). (B,1) ADN origami cerrado con la sonda de hibridación (azul claro). (B,2) Cuando se produce la hibridación entre la sonda del nanorrobot y el objetivo (rojo), éste se abre exponiendo una enzima (naranja) (B,3). Las señales quimioluminiscentes resultantes llegan a un tubo fotomultiplicador (PMT) y, después de pasar por el módulo detector/sensor, se envían a un ordenador. (26)

5.6.2. Terapia antitumoral

Las nanoestructuras de ADN origami han sido objeto de numerosos estudios en los cuales se ha explorado la capacidad de transporte y liberación de fármacos antitumorales tales como la doxorrubicina, la daunorrubicina o un derivado de carbazol (diyoduro de 3, 6-bis [2-(1-metilpiridinio) etinil] -9-pentil-carbazol, en inglés BMEPC). Empleándose diferentes tamaños y formas como triángulos, rectángulos y tubos, el ADN origami puede diseñarse para variar su capacidad de internalización y velocidad de liberación dependiendo del estado de relajación de su estructura interna; sin embargo, sigue sin ser concluyente qué diseño estructural es el más adecuado. (12)

Curiosamente, cuando se carga doxorrubicina en una estructura de ADN origami, ésta es retenida en su interior y se difunde gradualmente, causando tasas de eliminación celular más lentas comparadas con las del fármaco libre y dando como resultado un mayor número de células apoptóticas. (16)

En otro estudio realizado en ratones, triángulos de ADN cargados con doxorrubicina disminuían el tamaño del tumor, mientras que los ratones no mostraban pérdida de peso en comparación con los tratados con el fármaco libre, lo que indica que los nanovehículos de ADN cargados con doxorrubicina son menos tóxicos. (27)

Debido a su gran versatilidad, el ADN origami puede no solo ser diseñado según las necesidades del investigador sino además ser asociado a otras estructuras a fin de mejorar su internalización por las células cancerosas, prologando así el efecto terapéutico a la vez que se mejora la eficacia del fármaco y se disminuyen los efectos secundarios.

La terapia fotodinámica es un tratamiento contra el cáncer que utiliza fotosensibilizadores junto con la luz para destruir a las células cancerosas. Existen varios tipos de fotosensibilizadores (porfirinas, ácido aminolevulínico, etc) que, si bien cumplen su propósito, adolecen de ciertas limitaciones tales como poseer una absorción débil, un aclaramiento rápido y/o una mala solubilidad, obteniéndose como resultado una eficacia terapéutica limitada (28). Usando nanoestructuras de ADN origami como nanovehículos de agentes fotosensibilizadores se consigue una mayor especificidad en el tratamiento de las células tumorales en la terapia fotodinámica. (29)

Además de la administración de fármacos, las nanoestructuras de ADN pueden usarse en el diagnóstico por imagen para la detección del cáncer. Los avances realizados en la terapia antitumoral, así como en nanomateriales adecuados para las ciencias biomédicas, establecen la necesidad de desarrollar nuevas herramientas en el diagnóstico por imagen capaces de investigar los cambios moleculares y microambientales asociados con la progresión del cáncer. Las sondas fluorescentes, como las moléculas de cianina, se pueden incorporar covalentemente a las cadenas de ADN origami y usarse como un medio de visualización directa en las células vivas. (12)

5.7. Experimentos en animales

El primer experimento *in vivo* usando una nanoestructura de ADN fue realizado en el año 2011 en *Caenorhabditis elegans*. Un icosaedro, de 17 nm de lado, era capaz de ser absorbido por los celomocitos del nematodo y entregar una carga, en este caso, dextrano de 10 kDa marcado con isotiocianato de fluoresceína. Para estudiar la estabilidad del icosaedro dentro del organismo se desarrolló un método basado en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) y descubrieron que su vida media era superior a las 24 horas, un tiempo bastante superior en comparación con las 14 horas mostradas por el homólogo lineal no estructurado. (30)

Uno de los trabajos más interesantes llevados a cabo consistió en observar el comportamiento de un nanorrobot de ADN en forma de barril dentro de cucarachas vivas (*Blaberus discoidalis*). Curiosamente, el estudio mostró que las estructuras dinámicas de ADN pueden realizar cálculos booleanos simples en un animal vivo. En este caso, la señal para abrir los nanorrobots fueron las proteínas humanas: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). (31)

Ambos, *C. elegans* y *B. discoidalis*, difieren de los vertebrados en que no poseen un sistema circulatorio cerrado ni una temperatura corporal fija. Para imitar mejor el entorno y los desafíos del cuerpo humano, trabajos recientes han investigado el comportamiento de las nanoestructuras de ADN en ratones.

El tetraedro de ADN de 186 pares de bases fue el primero en administrarse en ratones. Los resultados muestran que los tetraedros aumentan la vida media del fármaco encapsulado y que su administración puede reducir el crecimiento tumoral y la toxicidad de los fármacos antitumorales utilizados (incluso en administraciones a altas dosis), sin embargo, los trabajos rmanifiestan discrepancias en algunos parámetros farmacocinéticos y de biodistribución. (3)

Además de la terapia antitumoral, también se ha estudiado la inmunoestimulación usando oligonucleótidos CpG anclados a nanoestructuras de ADN *in vitro*, demostrándose una nueva cualidad: que el tetraedro de ADN se puede utilizar para presentar complejos antígeno-adyuvantes para estimular la activación de las células inmunes. (32)

6. Conclusiones

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo y riguroso y, aunque aún queda mucho por descubrir, en la actualidad contamos con un gran número de moléculas a nuestra disposición para el tratamiento de las patologías. Por tanto, hoy en día el problema no es tanto encontrar un fármaco eficaz sino cómo conseguir que dicho fármaco llegue al lugar de acción.

Varias líneas de investigación han demostrado que las nanoestructuras de ADN poseen habilidades para mejorar la eficacia de la quimioterapia, reducir los efectos secundarios e incluso eludir la resistencia a los medicamentos, además de no mostrar citotoxicidad significativa *in vitro* o *in vivo*.

La estabilidad de las moléculas en condiciones fisiológicas es uno de los criterios más importantes a considerar en el diseño de sistemas transportadores de fármacos, aunque los ensayos clínicos realizados revelaron que las nanoestructuras de ADN pueden sobrevivir el tiempo suficiente para llegar al lugar de acción y completar sus funciones, todavía es demasiado pronto para su aplicación. El ADN es una biomolécula que se encuentra en los organismos vivos y por tanto no debería exhibir ningún efecto citotóxico; sin embargo, en un futuro, los estudios *in vivo* de las nanoestructuras de ADN deberán explorar más a fondo aspectos clave como su integridad estructural, su retorno pasivo hacia los tumores y las interacciones con el sistema inmune, además de la citotoxicidad a largo plazo.

7. Bibliografía

1. Kshirsagar N, Patil S, Kshirsagar R, Wagh A, Bade A. Review on Application of Nanorobots in Health Care. *World J Pharm Pharm Sci.* 2014;3(5):472–80.
2. Taniguchi N, Others. On the basic concept of nanotechnology. *Proc Intl Conf Prod Eng Tokyo, Part II, Japan Soc Precis Eng.* 1974;18–23.
3. Okholm AH, Kjems J. The utility of DNA nanostructures for drug delivery *in vivo*. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017;14(2):137–9.
4. Chen Y-J, Groves B, Muscat RA, Seelig G. DNA nanotechnology from the test tube to the cell. *Nat Nanotechnol.* 2015;10(9):748–60.
5. Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom. *Am Phys Soc.* 1959;1–11.

6. Drexler KE. Engines of creation 2.0. The Coming Era of Nanotechnology. Anchor Books- Doubleday. 2006;1986:576.
7. Seeman NC. Nucleic acid junctions and lattices. *J Theor Biol.* 1982;99(2):237–47.
8. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. Vol. 171, *Nature.* 1953. 737–8.
9. Seeman NC. Nanotechnology and the double helix. *Sci Am.* 2004;290(6):64–9, 72–5.
10. Cavalcanti A, Shirinzadeh B, Freitas Jr R a, Hogg T. Nanorobot architecture for medical target identification. *Nanotechnology.* 2007;19(1):15103.
11. Ummat A, Dubey A, Mavroidis C. Bio-Nanorobotics — A Field Inspired by Nature. *Biomimetics Biol Inspired Technol.* 2006;201–26.
12. Udomprasert A, Kangsamaksin T. DNA origami applications in cancer therapy. *Cancer Sci.* 2017;108(8):1535–43.
13. Parva Jani, Gunjan Patel, Priyanka Sharma, Rinkal Patel HJ and YP. DNA Nanorobots: The complete healthcare package. 2013;4(3):1–6.
14. Xing Y, Liu B, Chao J, Wang L. DNA-based nanoscale walking devices and their applications. *RSC Adv.* 2017;7(75):47425–34.
15. Rothmund PWK. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. Vol. 440, *Nature.* 2006. 297–302.
16. Zhao Y-X, Shaw A, Zeng X, Benson E, Nyström AM, Högberg B. DNA Origami Delivery System for Cancer Therapy with Tunable Release Properties. *ACS Nano.* 2012;6(10):8684–91.
17. Chen H, Li R, Li S, Andréasson J, Choi JH. Conformational Effects of UV Light on DNA Origami. *J Am Chem Soc.* 2017;139(4):1380–3.
18. Li J, Li F, Pei H, Wang L, Huang Q, Fan C. Construction of Functional DNA Nanostructures for Theranostic Applications. *Adv Theranostics Mater.* 2015;47(2):93–130.
19. Erben CM, Goodman RP, Turberfield AJ. Single-molecule protein encapsulation in a rigid DNA cage. *Angew Chemie - Int Ed.* 2006;45(44):7414–7.
20. Douglas SM, Bachelet I, Church GM. A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads. *Science (80-).* 2012;335(6070):831–4.
21. Mei Q, Wei X, Su F, Liu Y, Youngbull C, Johnson R, et al. Stability of DNA origami nanoarrays in cell lysate. *Nano Lett.* 2011;11(4):1477–82.
22. Hahn J, Wickham SFJ, Shih WM, Perrault SD. Addressing the instability of DNA

- nanostructures in tissue culture. *ACS Nano*. 2014;8(9):8765–75.
23. Mikkilä J, Eskelinen AP, Niemelä EH, Linko V, Frilander MJ, Törmä P, et al. Virus-encapsulated DNA origami nanostructures for cellular delivery. *Nano Lett*. 2014;14(4):2196–200.
 24. Pei H, Liang L, Yao G, Li J, Huang Q, Fan C. Reconfigurable three-dimensional DNA nanostructures for the construction of intracellular logic sensors. *Angew Chemie - Int Ed*. 2012;51(36):9020–4.
 25. Modi S, Nizak C, Surana S, Halder S, Krishnan Y. Two DNA nanomachines map pH changes along intersecting endocytic pathways inside the same cell. *Nat Nanotechnol*. 2013;8(6):459–67.
 26. Torelli E, Manzano M, Srivastava SK, Marks RS. DNA origami nanorobot fiber optic genosensor to TMV. *Biosens Bioelectron*. 2018;99:209–15.
 27. Zhang Q, Jiang Q, Li N, Dai L, Liu Q, Song L, et al. DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy. *ACS Nano*. 2014;8(7):6633–43.
 28. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1(1):1–21.
 29. Du Y, Jiang Q, Beziere N, Song L, Zhang Q, Peng D, et al. DNA-Nanostructure–Gold-Nanorod Hybrids for Enhanced In Vivo Optoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. *Adv Mater*. 2016;28(45):10000–7.
 30. Surana S, Bhatia D, Krishnan Y. A method to study in vivo stability of DNA nanostructures. *Methods*. 2013;64(1):94–100.
 31. Amir Y, Ben-Ishay E, Levner D, Ittah S, Abu-Horowitz A, Bachelet I. Universal computing by DNA origami robots in a living animal. *Nat Nanotechnol*. 2014;9(5):353–7.
 32. Schüller VJ, Heidegger S, Sandholzer N, Nickels PC, Suhartha NA, Endres S, et al. Cellular immunostimulation by CpG-sequence-coated DNA origami structures. *ACS Nano*. 2011;5(12):9696–702.