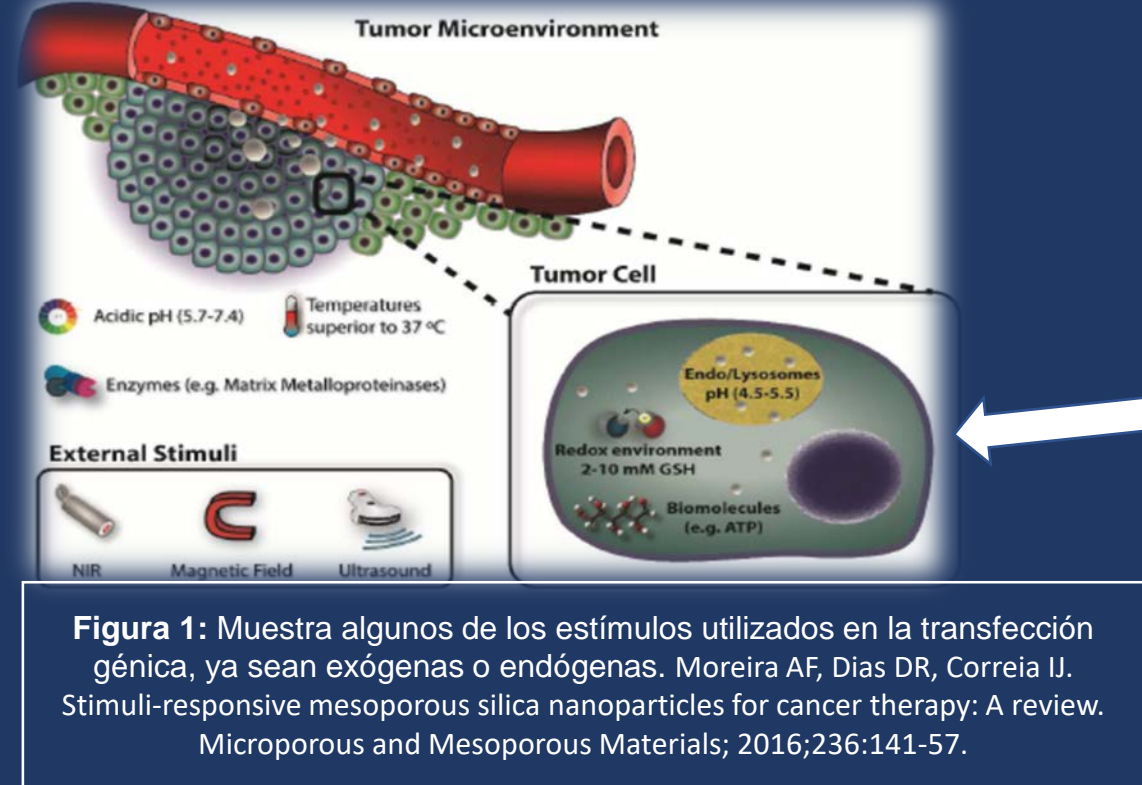




## Introducción

La **transfección génica** es un proceso mediante el cual se introduce material genético externo (tanto DNA como RNA) dentro de una célula (1).



- Facilitar la entrada
- Evitar degradación
- Optimizar cambios
- Evitar(3).

## Objetivos

- Análisis de estudios publicados sobre sistemas estímulo-respuesta que utilizan nanopartículas inorgánicas como vectores no virales en transfección génica
- Valoración como alternativa en terapias génicas eficaces, selectivas y poco tóxicas

## Material y Métodos:

Se ha utilizado bases de datos *Scifinder*, *sciencedirect*, *pubmed*, *web of science*, *Google Academic* y como herramienta de creación *Power Point 2016*

## Resultados y Discusión

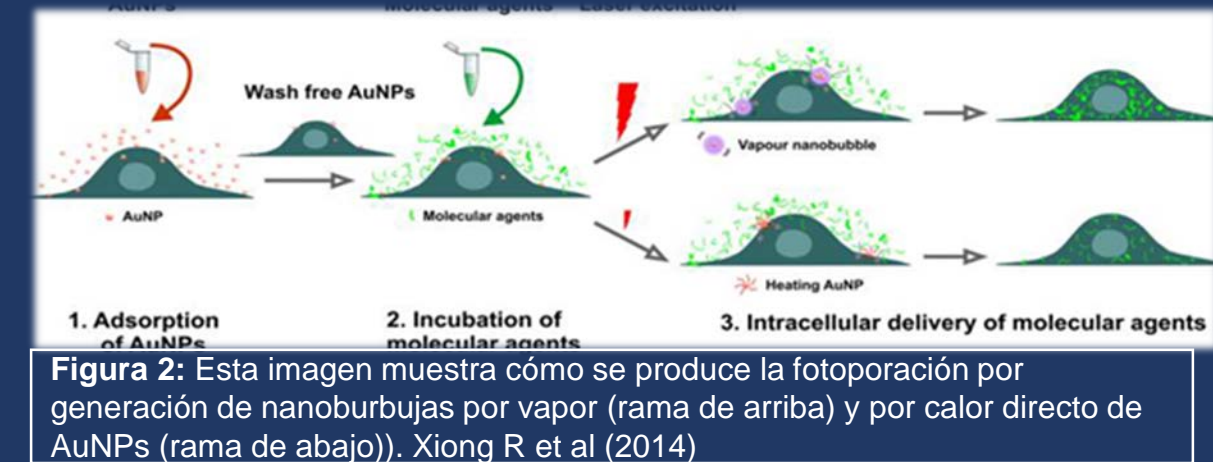
| Métodos    | Tipo                       | Mecanismo de acción  | Ventajas/Inconvenientes  |
|------------|----------------------------|--|--|
| Biológicos | Virales                    | Utilización de virus atenuados (adenovirus, retrovirus y lentivirus)   | +Eficacia y integración a largo plazo<br>-toxicidad residual, fallo en la integración y expresiones a corto plazo            |
|            | Microinyección directa     | Introducción directa con aguja fina  | +Precisa<br>-Inserción individual  |
| Físicos    | Biolístico                 | Proyectiles de oro cargadas de MGE   | +Amplio nº de células<br>-Daño físico a las células  |
|            | Electroporación            | Pulsos eléctricos sobre membrana celular   | +Aumenta la permeabilidad de la membrana<br>-Toxicidad y daño celular  |
|            | Laserfección               | Irradiación con un laser las células de interés  | +Permite el paso de moléculas pequeñas<br>-Coste y equipamiento  |
|            | Nanopartículas orgánicas   | Polímeros de PEI, PEG, PLGA y PBAE<br>Dentrímeros (PAMAM, PPI, Carbosilano, PEG y PLL)<br>Carbono (PEG, PAMAM y etilendiamina)<br>Liposomales y micelares DSPE y PEO-b-PCL | Biocompatibilidad, poca inmunogenicidad, alta estabilidad, buena reacción coste-eficacia, fáciles de obtener, biodegradables |
| Químicos   | Nanopartículas inorgánicas | Oro y plata<br>Cerámicas de sílice, titania y alúmina<br>Magnéticas de óxido de hierro<br>Puntos cuánticos de sulfatos de zinc o cadmio                                    | Biocompatibilidad, estabilidad, propiedades físico-químicas, ópticas, magnéticas y funcionalización                          |
|            | Híbridas                   | Fosfato de Calcio y lípidos  | Baja toxicidad, alta vectorización, alta eficacia y liberación controlada  |

Tabla 1. Métodos de transfección Sheikh S. (2016) y Wong J et al (2017)

## Estímulo Lumínico

### Nanopartículas de oro

Las AuNPs son versátiles, estables, poco tóxicas, absorben IR y la UV-VIS por RPS que deriva al elevamiento de temperatura y/o emisión de radiación. Eficacia de nanoburbujas 80% vs 40% método directo. No daño celular y los poros formados por nanoburbujas permiten la entrada de AN más pequeños(4).



En figura 3 PEI-AuNPs /pDNA transfectadas en las células que expresan GFP. Exceso de intensidad puede deformar la membrana (6).

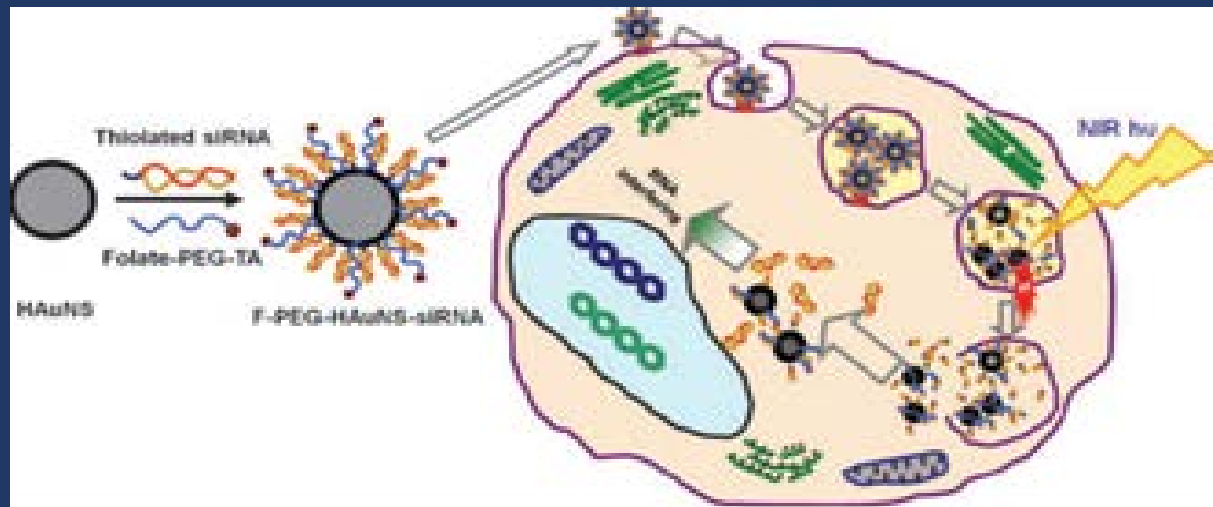


Figura 4: Esta imagen muestra el proceso de transfección con Folato-PEG-HAuNPs/siRNA mediada por IR. Lu W, Zhang et al. (2010)

Descarga de AN es mayor por ruptura de enlaces causada por temperatura y no por IR. AuNCs con matriz de sílice/IgRNA ó crRNA ó mfrRNA (7).

**Grafeno:** superficie/volumen, propiedades fototérmicas y fotoacústicas. Por si solo, es tóxico, necesita funcionalización (8). RGO-PEG –PEI permite una eficacia 10 veces mayor al irradiar con IR que en aquellas que permanecen en oscuridad (9). Véase figura 6.

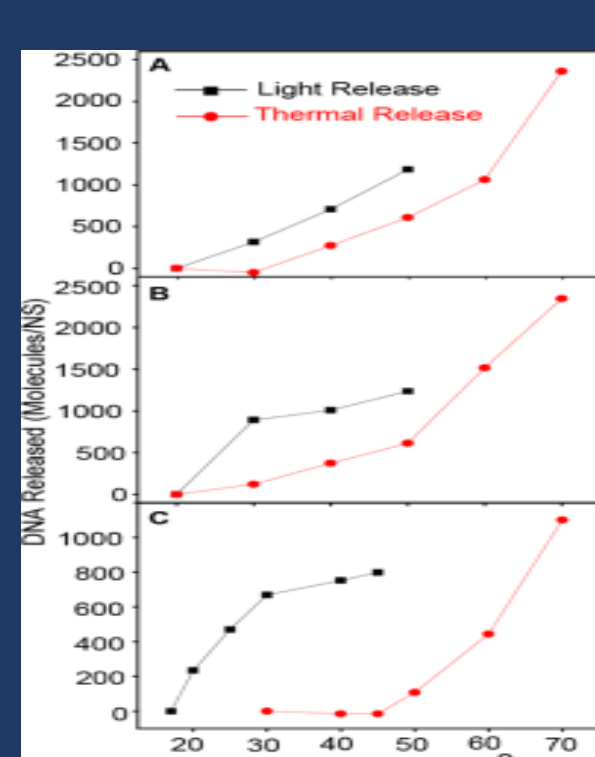


Figura 5: Muestra las diferencias cuantitativas de la liberación de los tres tipos de siRNA (correspondiendo a la gráfica A al crRNA, la B al mRNAs y la C al siRNA), entre la estrategia térmica (línea roja) y la no térmica (línea negra) en relación a la temperatura que se registra en la solución donde están las células incubadas con respecto a la temperatura ambiente. Huschka R et al. (2012)

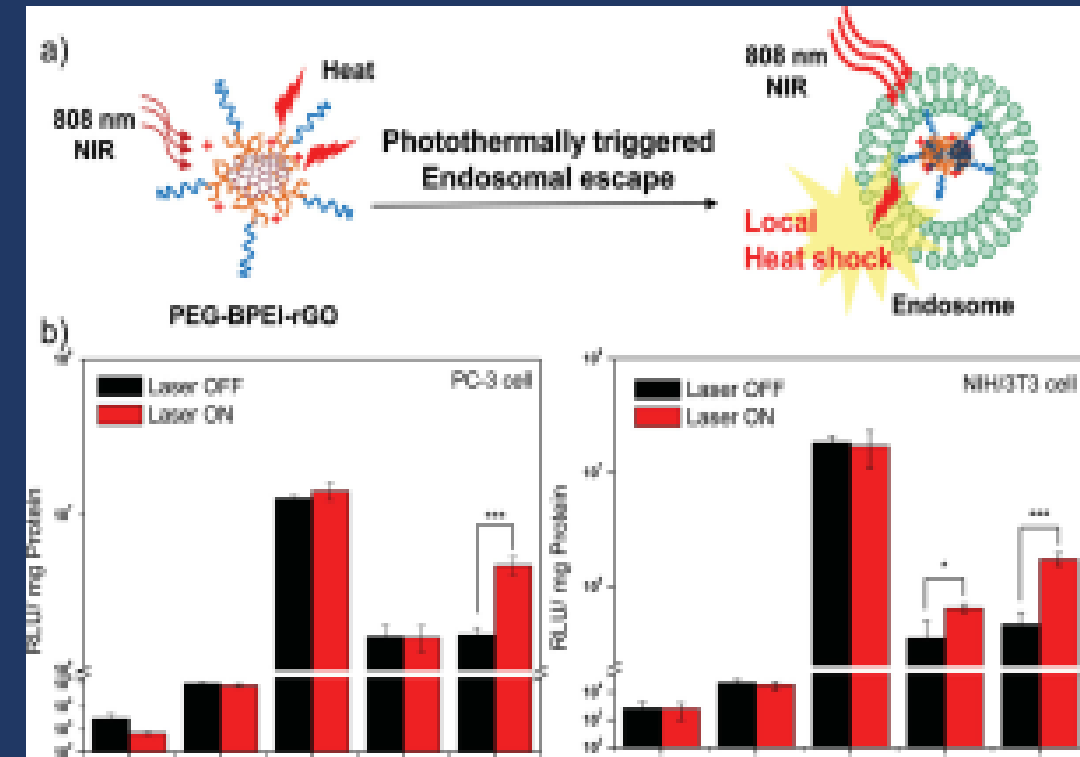


Figura 7: Muestra el apartado a) donde se ve el esquema del proceso de ruptura de endosoma al incidir IR sobre el complejo PEG-BPEI-RGO. El apartado b) muestra con la gráfica de la izquierda la eficacia en función de proteína expresada en las PC-3 con y sin IR, y la gráfica de la derecha muestra la eficacia de la transfección con y sin IR en las células NIH/3T3. Kim H et al. (2014)

Con PEG-BPEI-RGO/pDNA el resultado en la figura 7. En presencia de Baciclomocina A1 la eficacia es 100 veces mayor(10).

## Nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs)

UCNPs con recubrimiento de NaYF4 co-dopado con iterbio y tulio tenía un 75% de eficacia de transfección con UV-Vis con Si-UCNPs/siRNA, aunque menor con IR (11). Véase figura 9.

Figura 9: Imágenes de microscopio fluorescente (A,C,E,G) y de campo brillante superpuesta (B,D,F,H) tras distintos métodos de transfección (I y J) gráficas obtenidas de los mismo métodos. Se ve la eficacia de Si-UCNPs/siRNA con IR. Fang K et al. (2016)

## Estímulo Magnético

Actúa sobre IONPs que son fáciles de obtener, tienen baja toxicidad y alta superficie de reacción (12). Transfección al aplicar campo magnético (magnetofección)..

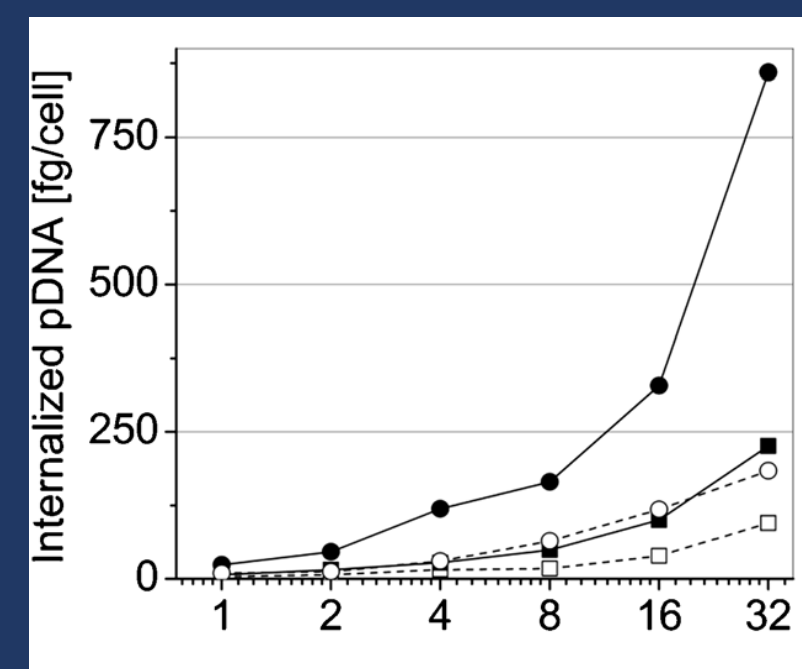


Figura 10: Magnetofección con pDNA a distinta concentración. Puntos blancos (lipofección); cuadrados negros (magnetofección simple); puntos negros (magnetofección en columna). Grzeskowiak BF et al. (2015)

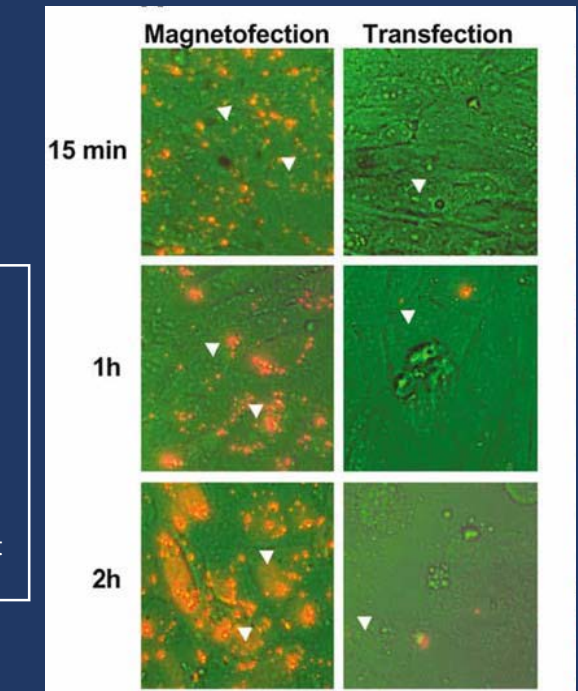


Figura 11: Magnetofección tras 15 min y 1 y 2 h vs la transfección normal. Krötz F et al. (2003)

PEI-IONPs/pDNA tienen una eficacia de 60% *in vitro*, en comparación con otros métodos de transfección la mejoría es notable (13). Véase la figura 10. La magnetofección reduce el tiempo de transfección, tras 2 horas se consigue detectar oligonucleótidos en el citosol de 84% las células vs 24 horas con otros métodos de transfección para llegar al mismo resultado (14). Véase figura 11.

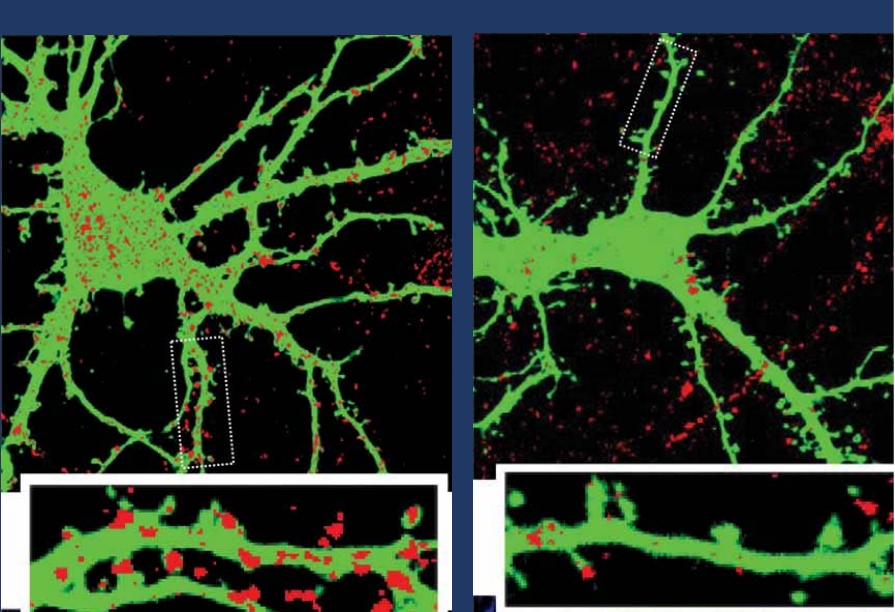


Figura 11: Magnetofección en neuronas para inhibir SypCap (Rojo). A la izquierda sin magnetofección, y la derecha con magnetofección. Buerli T et al. (2007)

La magnetofección en neuronas dalugar, expresión/inhibición de proteínas véase la figura 12. Posible transfección tanto en neuronas jóvenes como en las maduras (15). Aplicación en biotecnología para producción de plantas transgénicas o producción de cultivo (16)

SPION, dan lugar a una mejoría en la transfección con respecto a métodos de transfección lipídicos (17).

## Conclusión

- Se puede obtener transfección selectiva, poco tóxica y eficaz con sistemas estímulo-respuesta basados en nanopartículas inorgánicas.
- Buena relación coste-efectividad, son fáciles de obtener y reducen el tiempo de trabajo.
- Seguros (no hay dato de su toxicidad en el funcionamiento celular y en la estructura de la célula).
- La funcionalización aumenta su eficacia, biocompatibilidad y la biodegradabilidad.
- Los estímulos son fáciles de obtener y no requieren mucho coste.
- No hay muchos estudios, ni se conocen datos de su destino a largo plazo.
- Gran potencial como alternativas eficaces, efectivos, seguras y eficientes para los procesos de transfección. Necesario dar paso hacia la prácticas clínica.

## Bibliografía:

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