



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: Nanopartículas inorgánicas como  
vectores no virales para transfección génica**

**Autor: Carlos Bellón Marrero**

**Tutor: Blanca González Ortiz**

**Convocatoria: Junio**

# Índice

– Resumen .....	2
– Introducción y antecedentes .....	2
– Objetivos.....	3
– Metodología.....	3
– Resultados y discusión .....	3
• Métodos físicos .....	4
• Métodos biológicos.....	5
• Métodos químicos.....	5
• Nanopartículas inorgánicas.....	8
• Nanopartículas de oro (AuNPs).....	10
• Nanotubos de carbono (CNTs) .....	12
• Nanopartículas basadas en el grafeno .....	13
• Sílice mesoporosa .....	14
• Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPION) .....	15
• Nanopartículas basadas en fosfato cálcico.....	16
– Conclusiones.....	17
– Bibliografía.....	18

# Resumen

---

La transfección génica es una técnica consistente en la inserción de material genético en una célula eucariota animal, buscando algún tipo de cambio en el funcionamiento de dicha célula. Éste proceso será útil en la industria biotecnológica, en la obtención de determinados productos, e incluso en la medicina genética. Así, se puede llevar a cabo por diferentes métodos, destacando entre otros los métodos químicos. Dentro de ellos aparece la posibilidad de utilizar nanopartículas de diferente naturaleza, siendo una de ellas las de origen inorgánico, tema en el que nos centraremos en este trabajo. Las nanopartículas inorgánicas presentan una serie de ventajas con respecto a las otras opciones, pero sin embargo su investigación para éste uso es relativamente reciente, por lo que aún se encuentran en un estado de desarrollo. Así, se realizará primero una presentación de lo que supone la transfección génica; se hará un ligero repaso de las opciones actuales como vehículos para la transfección; y finalmente un análisis de las propuestas más prometedoras dentro de las nanopartículas inorgánicas, sus ventajas e inconvenientes.

## Introducción y antecedentes

---

En este trabajo trataremos las posibles aplicaciones de las nanopartículas inorgánicas para su uso en la transfección génica. Así, nos centraremos en las ventajas e inconvenientes de dichos compuestos en comparación con otros vectores existentes, y por qué a la larga representan una de las opciones más interesantes a la hora de llevar a cabo éste proceso. (1)

Como antecedentes, hay que decir que el interés por las posibles aplicaciones de los materiales inorgánicos en procesos biomédicos es relativamente reciente con respecto a otros campos de la medicina, por lo que se trata de un área con un enorme desarrollo en los últimos años, que está atrayendo la atención de un gran número de grupos investigadores, y que por lo tanto las novedades están al orden del día. Aún así cabe destacar las investigaciones y revisiones llevadas a cabo por Heiser y Garnett en 2004, en las que tratan el tema de la búsqueda de vehículos para la liberación de

fármacos y de biomoléculas activas, en el que se plantean posibles métodos de liberación y los problemas a los que están sometidos, tales como la degradación enzimática o la escasa eficiencia a la hora de integrar el material genético. En el año 2000 *Kneuer et al.* describen la manera en la que el material genético se integra en las nanopartículas de sílice y *Kubo et al.* analiza el uso de campos magnéticos para conducir nanohíbridos orgánico/inorgánicos a zonas determinadas del cuerpo, por poner algunos ejemplos. (2)

## Objetivos

---

Realizar un análisis objetivo del uso y posibles utilidades de vectores inorgánicos en la transfección génica, así como sus opciones reales frente a otras opciones existentes.

## Metodología

---

Para la realización de este se ha recurrido a bases de datos más propias de las ciencias químicas, concretamente *Scifinder Scholar*, *Scopus* o *Web of Science Core Collection* (antes conocida como *Web of Knowledge*). También se ha buscado información en la base de datos *PubMed*. Como herramienta de edición de textos se ha recurrido a *Microsoft Office Word 2007*.

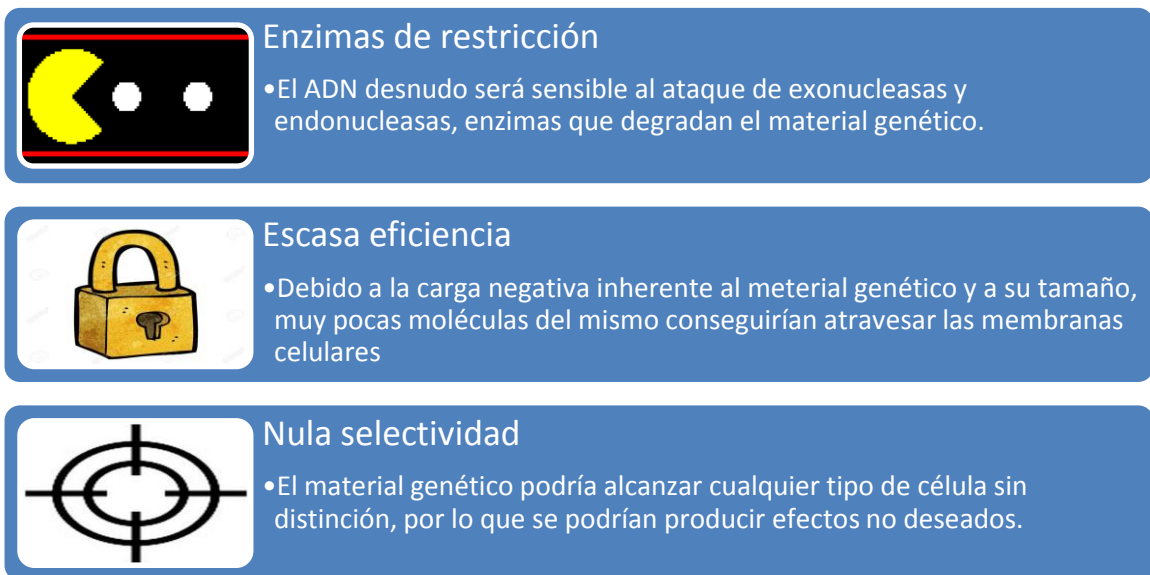
## Resultados y discusión

---

La transfección génica es, como se ha dicho anteriormente, una técnica que consiste en la manipulación del material genético de una célula eucariota animal mediante la inserción de ácidos nucleicos en la misma, logrando un cambio en el funcionamiento o en el estado de la célula. Éste procedimiento es ampliamente utilizado en la industria biotecnológica, ya que es útil en la producción de productos animales *in vitro*, tales como hormonas. Sin embargo, éste método podría ser utilizado también en el

tratamiento de múltiples enfermedades de etiología genética, siendo éste el campo en el que más proyección encuentra. Es un procedimiento similar a la transformación en células eucariotas vegetales, con la diferencia de que los cultivos vegetales son más sencillos y baratos que los cultivos de células animales. En cualquier caso, el campo en el que más se está investigando este procedimiento, y en el que resulta más interesante, es en la transfección *in vivo* a células disfuncionales de un organismo vivo, con el objetivo de tratar las enfermedades citadas anteriormente. (1)

La manera más sencilla de llevar a cabo este proceso, al menos idealmente, sería por inserción del ADN desnudo en la célula. Sin embargo, este proceso conlleva una serie de problemas a solventar, resumidos en el siguiente esquema:



**Enzimas de restricción**

- El ADN desnudo será sensible al ataque de exonucleasas y endonucleasas, enzimas que degradan el material genético.

**Escasa eficiencia**

- Debido a la carga negativa inherente al material genético y a su tamaño, muy pocas moléculas del mismo conseguirían atravesar las membranas celulares.

**Nula selectividad**

- El material genético podría alcanzar cualquier tipo de célula sin distinción, por lo que se podrían producir efectos no deseados.

Para solventar este tipo de problemas se ofrecen una serie de procedimientos. Estos métodos se clasificarían en tres grandes grupos según sus características, apareciendo con ellos un nuevo problema: la toxicidad; ya que según el método utilizado se condicionará la supervivencia de la célula.

### **Métodos físicos**

Este tipo de métodos agrupa una serie de procedimientos de tipo físico, con una alta eficiencia pero que destacan por ser invasivos y eminentemente aplicables a procesos *in vitro* y biotecnológicos. Entre ellos destacan:

- **Electroporación:** Consiste en depositar el ácido nucleico deseado en una solución determinada de cultivo celular por la que se hace recorrer una corriente eléctrica, produciéndose una apertura de poros en la membrana

celular que permite la migración del material genético al citoplasma. Presenta una eficiencia de transfección alta en comparación con otros métodos, pero sin embargo se puede condicionar la supervivencia celular y su aplicación *in vivo* es inviable. (2)

- **Microinyección:** Este proceso consiste en la inyección directa del ADN en la matriz celular por medio de una aguja. Posee una eficiencia muy alta y la viabilidad celular es mayor que en la electroporación, pero sin embargo es un proceso más laborioso por tener que ir célula por célula. Además, es un proceso muy invasivo *in vivo*, por lo que su uso normalizado en la terapia génica es complejo. (2)

### ***Métodos biológicos***

En este grupo se encuentran el uso de sistemas biológicos para llevar a cabo la vectorización de los ácidos nucleicos. El uso de virus es el sistema de vectorización de material genético más desarrollado actualmente para procedimientos *in vivo*, siendo el único tipo de vector que se encuentra en ensayo clínico. Consiste en eliminar las secuencias del virus que codifiquen para factores de virulencia, sustituirlas por las secuencias que se desean insertar y a continuación aprovechar la propia naturaleza de los virus para infectar las células animales. Es una técnica con una alta eficiencia en comparación con el resto de sistemas de vectorización. Sin embargo presenta una serie de limitaciones, como son el hecho de la complejidad y coste del preparado, y la toxicidad. Ésta es debida a, por un lado, la posibilidad de producir una reacción inmunogénica debido a sus características víricas, y por otro, el hecho de que se puede producir una reversión del virus para recuperar sus factores de virulencia. Estos problemas tienen como resultado la búsqueda de otros vehículos menos agresivos con el ser vivo. (2)

### ***Métodos químicos***

Debido a las limitaciones de los métodos anteriores, la búsqueda de sistemas inertes, biocompatibles, baratos y con un alto rendimiento de transfección es el área de mayor investigación y con mayor margen de mejora. A pesar de ello aún no se ha conseguido ningún vector que cumpla con todas las premisas. Estos métodos se enfrentan a una serie de barreras que deben sortear:

1. La síntesis del vector, y la carga del material genético en el mismo. Para ello es necesario que el vector escogido posea cierta carga positiva, para así favorecer la interacción con el material genético, que posee carga negativa debido a los grupos fosfato, ionizados a pH fisiológico. Además, el complejo resultante debe ser suficientemente estable en un medio acuoso, y proteger adecuadamente al ácido nucleico de su degradación. (3)
2. Interacción con la membrana celular e integración del complejo vector/ácido nucleico. En este caso, de nuevo la carga positiva parece jugar un papel fundamental, ya que el carácter positivo permite la interacción con la membrana, debido al carácter aniónico de la misma. (3)
3. Escape del endosoma. Para que este paso suceda es importante tener en cuenta que no se puede romper el complejo, ya que de hacerlo el material genético quedaría a merced de las endonucleasas. La polietilenimina (PEI) es un vector que presenta un gran número de aminas secundarias y terciarias que son capaces de absorber los hidrones ( $H^+$ ), impidiendo la acidificación del endosoma, de manera que la acumulación de iones cloruro acaba resultando en la rotura del endosoma. Otra táctica sería la funcionalización del complejo con péptidos como la melitina, que debido a su secuencia aminoacídica tiende a adoptar un estado neutro en el medio ácido del endosoma, lo que permite que la lisis únicamente de la membrana de dicho compartimento. (3)

Así, nos encontramos con tres grandes grupos:

- Nanopartículas de naturaleza lipídica: En este grupo aparecen todo tipo de partículas de naturaleza lipídica, que además suelen poseer carga positiva para permitir la incorporación del material genético. Lo son los liposomas catiónicos, los lípidos catiónicos, los lípidos sólidos catiónicos y las emulsiones catiónicas. Son preparaciones con moléculas de carácter anfipático, con una cabeza polar catiónica que actúa como puente con el material genético y un cuerpo lipídico que favorece la endocitosis celular, protegiendo además a los ácidos nucleicos de su posible degradación. De entre todas ellas, destacan los liposomas, presentando la ventaja frente a los virus de poder vectorizar moléculas de material genético más grandes y la posibilidad de funcionalización con determinados grupos químicos que favorezcan la vectorización. Sin embargo

también poseen ciertas complicaciones, como pueden ser su toxicidad y estabilidad en medios acuosos. (2)

- **Nanopartículas poliméricas:** En este grupo se incluyen todas las partículas cuya formulación provenga de polímeros. En este grupo cabe destacar a los dextrans, un tipo de polisacáridos coloidales a partir de glucosa ramificada que permite albergar el material genético en su interior. Estas moléculas presentan la propiedad de que, al ser derivados de la glucosa, su biocompatibilidad es alta. Sin embargo, su tasa de transfección y su selectividad es escasa en comparación con otras opciones. Otra opción de alto interés es el uso de proteínas recombinantes. Estas proteínas presentan la cualidad de ser biocompatibles, biodegradables y con una alta tasa de transfección, ya que pueden utilizar canales específicos de aminoácidos para traspasar las membranas, además de hacer posible la vectorización para casos clínicos con determinados requerimientos aminoacídicos. Sin embargo, presentan la complicación de ser muy caros de fabricar, y la posibilidad de que sean degradados por peptidasas, por lo que su estabilidad puede no ser suficiente. Además, su uso *in vivo* podría conllevar reacciones inmunogénicas importantes. Finalmente también hay que hablar de los polímeros catiónicos como el PEI, cuya tendencia a ionizarse con carga positiva permite la unión con el material genético y la posterior interacción con la membrana celular y el escape del endosoma. Sin embargo, dichas cargas positivas pueden resultar también en un problema de toxicidad, ya que pueden desestabilizar la membrana. Es por ello que su uso suele estar sujeto a la complejación con otros compuestos para formar vectores de menor toxicidad, como son las nanopartículas inorgánicas. (2)
- **Nanopartículas inorgánicas:** Las nanopartículas inorgánicas son el tipo de vehículo de mayor proyección, debido a propiedades que suplen las debilidades de los otros grupos, tales como su biocompatibilidad y la variabilidad de propiedades según el material elegido. Por ello, se le dedicará un capítulo únicamente a estos tipos de nanopartículas. (1)

## *Nanopartículas inorgánicas*

Las nanopartículas inorgánicas son el área más reciente de investigación en este campo, debido al creciente interés en los biomateriales en la medicina. Este aumento de interés se debe a propiedades tales como su biocompatibilidad, biodegradabilidad y otras características propias y únicas que pueden resultar altamente útiles, como pueden ser sus propiedades ópticas y magnéticas. Además, en general suelen ser productos de fácil obtención y baratos en comparación con otras opciones anteriormente citadas. Sin embargo es necesario tener en cuenta que la estructura inorgánica en general no podrá vehículo del material genético como tal, por falta del carácter positivo necesario para interactuar con los ácidos nucleicos, por lo que será necesario acoplar la estructura inorgánica a otra que sí tenga dicha densidad electrónica. Por tanto el complejo para la mayoría de estas nanopartículas será de tipo material inorgánico-estructura catiónica-material genético, siendo dicha estructura alguno de los vectores no inorgánicos, como liposomas, dextranos o el PEI, por ejemplo. (1)

De todas las opciones posibles, destacan especialmente las nanopartículas a base de oro (AuNPs), los derivados del carbono como los nanotubos de carbono o el grafeno, los compuestos derivados de silicio, los derivados de óxidos de hierro y los precipitados de fosfato cálcico. A continuación se procederá a un análisis de las expectativas de dichos vectores, cuyas características se resumen en la tabla 1. (1 y 2)

Compuesto	Forma y tamaño aproximado	Citotoxicidad (mg/mL)	Ventajas	Inconvenientes
Nanopartículas de oro	Esféricas o en barras, 1-100 nm	Baja	Ductilidad, biocompatibilidad, absorción de infrarrojo-cercano	Caro, escasa interiorización
Nanotubos de carbono	Tubular, 1-10 nm	Alta, aunque mejora con funcionalización	Permite genes de gran tamaño, absorción de infrarrojo-cercano	Baja eficiencia
Nanopartículas de grafeno	Laminar	Media	Gran superficie, absorción infrarrojo-cercano	Escasez de experimentación <i>in vivo</i>
Nanopartículas de sílice mesoporosa	Ésféricas, 5-100 nm	Alta	Permite adición de fármacos y genes de gran tamaño	Toxicidad, pueden producir inflamación
Nanopartículas de hierro súper paramagnéticas	Esféricas, 1-50 nm	Media	Propiedades magnéticas	Aplicaciones limitadas
Nanopartículas de fosfato cálcico	Indeterminada, Precipitado	Baja	Alta biocompatibilidad, baratos, buenas tasas de transfección	Tendencia a agregarse, dificultad de obtener preparados adecuados

Tabla 1. Características de las principales nanopartículas inorgánicas. *Xu Z, Zeng Q, Lu G, Yu A. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. Chemical Engineering Science. 2006;61(3):1027-1040.*

## ***Nanopartículas de oro (AuNPs)***

Las nanopartículas a base de oro se caracterizan por su baja citotoxicidad y su biocompatibilidad debido a la inercia química de este metal, por lo que son una opción importante a tener en cuenta. Pueden adoptar diferentes formas aparte de las esféricas según la síntesis y la aplicación hacia la que estén dirigidas. Así, el proceso normal para obtener nanopartículas esféricas será por disolución de ácido tetracloroáurico ( $HAuCl_4$ ) en agua purificada para a continuación aplicar un agente reductor y obtener así oro elemental en su forma sólida. (3) Sin embargo también se pueden obtener “nanorods” (barras de oro a nivel nanométrico) o “shells” (láminas de oro en monocapa que pueden rodear moléculas y partículas de pequeño tamaño). Para incorporar el material genético se realiza una funcionalización con amino-alquil tioles, para a continuación llevar a cabo la conjunción con la polietilenimina, a la que se unirá el ácido nucleico. Esta funcionalización es posible debido a la especial afinidad del enlace entre el oro y el azufre, siendo éste un enlace muy especial, ya que a pesar de su naturaleza covalente destaca por una afinidad propia de un enlace iónico. Por otra parte, la adición de grupos tioles también puede permitir la unión a moléculas que favorezcan la selectividad, como pueden ser anticuerpos o péptidos víricos selectivos para ciertos tipos de células. Además, la conjunción de las nanopartículas Au-PEI con N-dodecil-PEI multiplica la tasa de transfección por dos. (1)

Otra de las propiedades interesantes de este tipo de moléculas es su comportamiento óptico, ya que en su presentación como nanobarras presentan un efecto llamado resonancia de plasmones superficiales (en inglés, *Surface Plasmons Resonancy* o SPR) que dispersa la luz y la absorbe a diferentes longitudes de onda según su estado de agregación, lo que permite un seguimiento de las nanopartículas en tiempo real. Además, es posible la estimulación por luz de espectro infrarrojo-cercano (tipo de radiación que presenta una alta penetrabilidad en tejidos) para así producir calor, siendo ésta una propiedad interesante para la terapia fototérmica de cáncer, ya que se minimizan los efectos adversos al necesitar menos intensidad de radiación para conseguir el mismo efecto. Además, esta propiedad podría favorecer la integración de la nanopartícula en la célula, ya que la producción de calor al ser estimuladas facilitaría el trasvase a través de las membranas, además de facilitar el escape del endosoma. Esto se debe a que el calor producido tendría como consecuencia la formación de nanoporos en

la membrana celular, permitiendo el paso de la nanopartícula a través de las membranas. (1 y 3)

*Ortega-Muñoz y col.* trabajaron con nanopartículas de oro-PEI en diferentes proporciones, demostrando que la transfección de este complejo cuando la relación oro-PEI es de 1:32 era más eficaz en comparación con el b25kPEI (un tipo de polietilenimina ramificada de 25 kiloDalton) aislado y el preparado Lipofectamine 2000 (preparado comercial con el que se va a realizar la comparación). Esto se debería a la internalización por una vía diferente a los otros preparados: mientras que los complejos ADN-b25kPEI y ADN-Lipofectamine 2000 utilizan una vía clatrina dependiente (aporta un medio ácido que podría degradar los complejos), se ha visto que los complejos con oro utilizan una vía de endocitosis por caveolas (con un medio neutro estable), lo que explicaría la mayor tasa de transfección. Para demostrarlo, acompañaron la administración de las nanopartículas con dos fármacos: clorpromazina, que inhibe la vía clatrina-dependiente, y genisteína, que inhibe la vía mediada por caveolas. Los resultados se pueden ver en la tabla 2. (4)

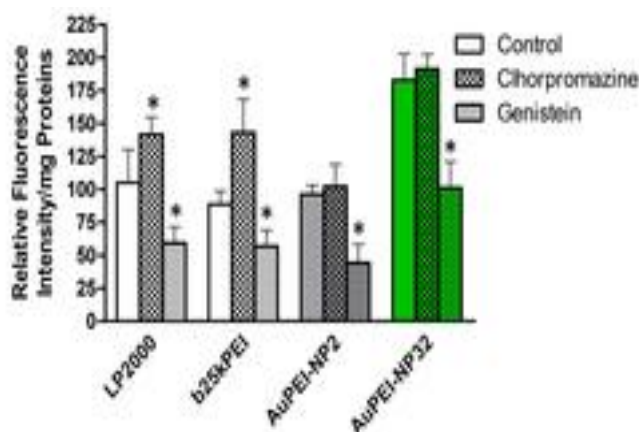


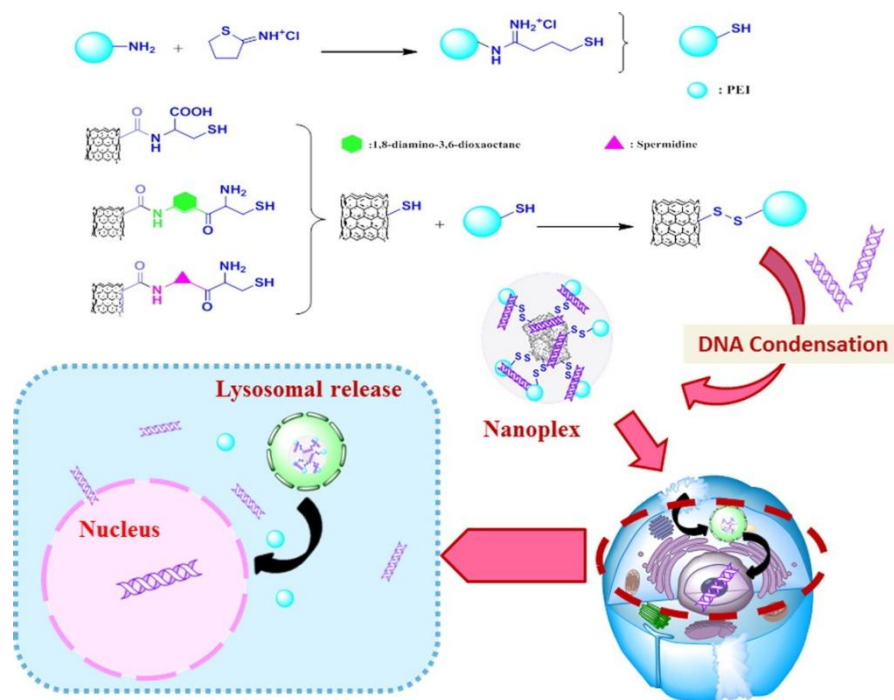
Tabla 2. En esta tabla se observan los niveles de expresión de una proteína fluorescente cuya secuencia ha sido previamente transfectada con diferentes vectores: Liposamine 2000 (LP2000), b25kPEI, nanopartículas de oro-PEI en proporción 1:2 (AuPEI-NP2) y en proporción 1:32 (AuPEI-NP32), siendo ésta última la que mejor tasa de transfección ha obtenido. *Ortega-Muñoz M, Giron-Gonzalez M, Salto-Gonzalez R, Jodar-Reyes A, De Jesus S, Lopez-Jaramillo F et al. Polyethyleneimine-Coated Gold Nanoparticles: Straightforward Preparation of Efficient DNA Delivery Nanocarriers. Chemistry - An Asian Journal. 2016;11(23):3365-3375.*

## ***Nanotubos de carbono (CNTs)***

Los nanotubos de carbono son nanoestructuras ordenadas, de forma tubular hueca. Están formadas por una única capa de átomos de carbono asociados entre sí. Para su síntesis se puede recurrir a una amplia variedad de técnicas, pero principalmente destacan la ablación láser, la descarga de arco y la deposición química de vapor. Una vez sintetizados, se puede ajustar su tamaño al deseado por ultrasonidos. (3) Además, pueden ser de tipo monopared, o de tipo multipared, cuando varias capas se distribuyan de forma concéntrica unas con otras. Este tipo de compuesto destaca por ser de naturaleza hidrófoba, por lo que para limitar su toxicidad se tienden a conjugar con grupos amino para así aumentar su hidrofilia y reducir su toxicidad, además de permitir así su adhesión con el material genético a introducir. (1 y 2) Con respecto a las nanopartículas de forma esférica, este tipo de material tiene la ventaja de que al ser tubular la superficie específica es mayor, y por tanto se permite la incorporación de material genético de mayor tamaño en la superficie del nanotubo. Además, también presenta la posibilidad de ser conjugado con anticuerpos y otras proteínas, para así favorecer la selectividad. Sin embargo, a pesar de lo dicho anteriormente, su toxicidad sigue siendo suficientemente alta como para ser importante, por lo que será uno de los aspectos a corregir. Una posibilidad es cubrir los nanotubos con un dendrímero PAMAM (poliamidoamina), mejorando así la estabilidad acuosa y la integración celular del complejo. Otra opción es cubrirlos con glucodendrímeros, reduciendo notablemente la citotoxicidad.. (2)

Otra cualidad interesante es su comportamiento óptico. Igual que las nanopartículas de oro, presenta absorción de infrarrojo cercano, por lo que también serán útiles en terapias fototérmicas, así como para facilitar la integración y el escape a los endosomas. (3)

*Nia y col.* compararon el uso de diferentes formulaciones de nanotubos en monocapa para comprobar cuál era más eficaz, comparándolo además con el rendimiento del b25kPEI como vector único. En los resultados observaron que en cualquier caso podían llegar a ser 1500 veces más eficientes que el PEI-ADN, siendo el que mayor rendimiento obtuvo el nanotubo de carbono de tipo SWCNT-CO-Cisteína en conjunción con el PEI de 1'8 KDa. El esquema de su experimento se muestra en la imagen 1. (5)



Dibujo 1. En él se puede observar el resumen del experimento realizado por Nia y col. . Nia A, Eshghi H, Abnous K, Ramezani M. *The intracellular delivery of plasmid DNA using cationic reducible carbon nanotube — Disulfide conjugates of polyethylenimine. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017;100:176-186.*

### ***Nanopartículas basadas en el óxido de grafeno***

El grafeno es otra de las posibles configuraciones que puede adoptar el carbono  $\text{sp}^2$ , que se caracteriza por una disposición hexagonal plana. Serán útiles en la transfección debido a su amplia superficie específica, sus excelentes propiedades térmicas y de conducción eléctrica, así como la facilidad de funcionalización las convierten en una gran opción. Sin embargo, es necesario realizar una funcionalización para la incorporación de los ácidos nucleicos. Para ello, se conjuga la versión oxidada de los grafenos con polietilenimina (PEI) y polietilenglicol (PEG), permitiendo así la unión con dicho material genético y reduciendo al mismo tiempo la toxicidad de la nanopartícula resultante (el grafeno oxidado produce efectos reacciones de hipersensibilidad). Además, al poseer también absorción de infrarrojo-cercano se podría plantear su uso en terapias fototérmicas, así como para facilitar la transfección y la rotura de los endosomas. Sin embargo, su uso y experimentación *in vivo* es escaso a pesar de ser un material tan prometedor. (1)

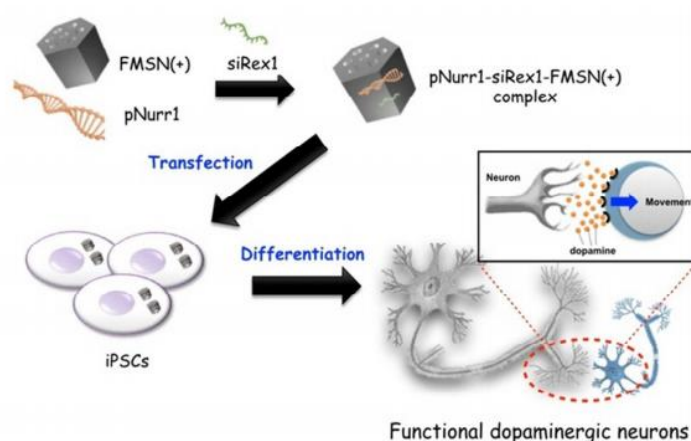
Como trabajo destacado, *Huang et al.* utilizaron nanopartículas de tipo PEI-grafeno oxidado para acoplar un siRNA contra CXCR4 (marcador metastásico del cáncer de mama) sobre una línea celular de cáncer de mama invasivo (MDA-MB-231). Tras medir en tiempo real por diferentes métodos los niveles de expresión de la proteína en cuestión, se observó una disminución importante de dichos niveles, confirmando que se había reducido el potencial metastásico de las células. (8)

### ***Nanopartículas de sílice mesoporosa***

La sílice mesoporosa es un material que está encontrando un gran número de posibilidades en el campo de los biomateriales, y la transfección génica no podía ser una excepción. Para su síntesis se recurre a una solución de tetraetil ortosilicato con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), a la que se aplican condiciones reductoras con hidróxido sódico o amoníaco, todo ello a una temperatura de 80°C aproximadamente. (3) Una vez sintetizadas, las nanopartículas de sílice encuentran la ventaja de tener una gran superficie específica debido a la formación de canales en su estructura. Esto, sumado a la capacidad de funcionalización a partir de los grupos silanol en la superficie de la misma (podemos producir partículas con animosilano para aportar la carga positiva necesaria para cargar el material genético en la molécula), permiten una vectorización por proteínas o inmunoglobulinas, y las convierten en una buena opción. En su superficie externa se pueden incluir estructuras nucleicas de gran tamaño, y la presencia de poros permite una posibilidad única en este campo: la adición simultánea de fármacos y otras moléculas como ácidos nucleicos de pequeño tamaño (siRNA). Por poner un ejemplo, esta propiedad podría ser de utilidad en el tratamiento del cáncer, ya que se podría recurrir a una terapia mixta génica-farmacológica, reduciendo la cantidad de fármaco utilizado (y por tanto su toxicidad) y por otro asegurando la muerte de las células, ya sea debido al fármaco o al material genético introducido. Por otro lado, se ha visto en estudios *in vitro* que la integración de los complejos de ADN-nanopartícula en líneas celulares de tipo COS-7 o CHO está a la altura o incluso supera a la propia de otros sets de vectores de transfección comerciales existentes. Este efecto se debería a la sedimentación de las nanopartículas cargadas alrededor de las células, facilitando la integración del material genético. Sin embargo, a la hora de aplicar éste método *in vivo*, nos encontramos con problemas relacionados con su toxicidad. Las nanopartículas de sílice presentan un efecto proinflamatorio por activación de los macrófagos. Se ha observado que esta toxicidad podría estar

relacionada con el tamaño de la nanopartícula: a menores tamaños, mayor es la superficie de interacción con las células, y por lo tanto mayor es la toxicidad.. (1 y 2)

El equipo de *Chang J.* utilizó nanopartículas de sílice mesoporosa para la incorporación de dos ácidos nucleicos diferentes de manera simultánea a células madres pluripotentes inducidas (iPSCs en inglés), consiguiendo una diferenciación a neuronas dopaminérgicas. La elección de este tipo de nanopartícula se debió a la necesidad de incorporar un plásmido de ADN llamado Nurr1 y una secuencia de siRNA conocida como siRex1 al mismo tiempo, algo que permiten las nanopartículas de sílice mesoporosa. Para obtener los complejos nanopartícula de sílice mesoporosa con los ácidos nucleicos incubaron un microgramo de pNurr1 con las nanopartículas de sílice en diferentes relaciones: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64, en un medio DMEM durante 30 minutos. A continuación añadieron 0'25 µg de siRex1 y se volvieron a incubar. Finalmente, llevaron a cabo la separación por electroforesis en gel de agarosa al 1%. (6)



Dibujo 2. Esquema del trabajo de *Chang y col. Chang J, Tsai P, Chen W, Chiou S, Mou C. Dual delivery of siRNA and plasmid DNA using mesoporous silica nanoparticles to differentiate induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons. J Mater Chem B. 2017;5(16):3012-3023.*

## ***Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPION)***

Las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (o SPIONs, según su nombre en inglés, *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) resultan una opción muy interesante para cuando se quieran dirigir las nanopartículas a una zona concreta y

determinada del organismo. La síntesis se suele llevar a cabo por coprecipitación en agua del hierro, obteniéndose un núcleo de óxido ferroso que será cubierto a continuación con un material relativamente anfipático, como puede ser un dextrano o almidón. La partícula resultante se conjuga con otro vector de transfección génica, en el que se integra el material genético. La nanopartícula final obtenida, como tal, no posee cualidades magnéticas; sin embargo, ante la presencia de un campo magnético se induce esta propiedad. (3)

Como se ha dicho anteriormente, este tipo de nanopartículas serían de utilidad cuando se desee que acudan a un punto concreto. Para ello, se puede recurrir a un campo magnético externo, menos invasivo, o a la inserción de un imán en el lugar al que se deban dirigir. Esto sería de utilidad en situaciones en las que se quiera llevar a cabo una terapia génica para un tumor localizado, por ejemplo, o para la limpieza del lugar tras la extracción del mismo, buscando evitar una metástasis. Este tipo de nanopartícula presenta el problema de ser útil únicamente para el tratamiento de enfermedades muy localizadas y concretas, por lo que tienen un espectro de uso limitado. Además presentan la característica de ser rápidamente eliminadas, teniendo lugar el metabolismo en el hígado, pudiendo pasar el hierro a formar parte de las reservas de hierro del organismo. De ocurrir esto se puede producir una hematopoyesis, cuya importancia dependerá de la dosis y tiempo de exposición a las nanopartículas. (1 y 2)

*Mannell y col.* plantearon la creación de nanopartículas magnéticas acopladas a una microburbuja de naturaleza lipídica que envuelve a un lentivirus para la transfección a una línea celular de tipo HMEC (Human Dermic Microvascular Endothelial Cells). Con esta combinación consiguen dirigir las nanopartículas al interior celular rápidamente mediante un campo magnético externo, para a continuación aplicar ultrasonidos que rompen las microburbujas y liberan el lentivirus en el citoplasma, consiguiendo una tasa de transfección más alta que utilizando el virus únicamente. (7)

### ***Nanopartículas basadas en fosfato cálcico***

Los precipitados de ADN y fosfato cálcico (hidroxiapatita) fueron el primer tipo de biomaterial utilizado para esta aplicación. Este tipo de compuestos presentan una alta biocompatibilidad debido a su similitud con la hidroxiapatita en su conformación orgánica, el principal componente de los tejidos óseos. Además presentan la capacidad

de estabilizar adecuadamente el material genético, por lo que en un principio no sería necesario la funcionalización para la carga de los ácidos nucleicos en la estructura, y su liberación una vez integrados dependería del tamaño de los poros formados. En este caso, el escape del endosoma se debe a la actuación de los fosfatos de la hidroxiapatita como amortiguadores del pH, de manera que la acidificación del endosoma no tiene lugar y se rompe la vacuola por la presión osmótica de los iones cloruro. Sin embargo, este tipo de compuestos presentan la complicación de ser muy poco estables, de tender a formar agregados y de que la síntesis con las características deseadas es muy complicada de lograr. Por ello la tendencia es crear “*nanocomposites*” de asociaciones de fosfato cálcico con otros elementos, como el silicio o el magnesio. (2 y 3)

En un ejemplo de esto último, *Shekhar y col.* obtuvieron unas nanoestructuras sustituyendo cierto porcentaje (entre un 8’3 y un 50% de los moles) de fosfatos por silicatos en la hidroxiapatita final. La nanopartícula resultante, conocida como NanoSiCaP, obtuvo un aumento de las tasas de transfección de entre un 20 y un 50% con respecto a la hidroxiapatita normal, debido a una mayor solubilidad que permitiría escapar más rápidamente a la nanopartícula del lisosoma. Porcentajes mayores de silicato, sin embargo, resultaron en menores tasas de transfección, por la pérdida de la estructura típica de la hidroxiapatita. (9)

## Conclusiones

---

La transfección génica es una técnica que promete un amplio desarrollo en el futuro debido a sus posibles aplicaciones en la medicina. Actualmente, las opciones más útiles para llevar a cabo este proceso pasan por el uso de técnicas físicas, que se encuentran limitadas al plano *in vitro*, y las nanopartículas virales, debido a la alta tasa de transfección que presentan con respecto al resto de técnicas. Sin embargo, debido al avance agigantado que está viviendo la nanotecnología y la nanomedicina de su mano, se vaticina un cambio en esta tendencia en favor de técnicas más biocompatibles y menos agresivas. Es por ello que la ciencia de los biomateriales puede encontrar un filón en esta técnica, ya que principios básicos tales como la biocompatibilidad son cualidades también fundamentales en la transfección. Aunque actualmente ninguna de las nanopartículas inorgánicas presentadas en esta reseña alcance las tasas de

transfección de los vectores virales, es un hecho que alcanzan niveles de toxicidad menores y menos graves que los derivados de los derivados víricos. Además, la posibilidad de añadir cadenas de nucleótidos más grandes permitiría plantearse el tratamiento de enfermedades más complejas. Sin embargo, y como se ha dicho antes, queda mucho camino por recorrer y mucho que investigar, por lo que se presenta como un campo tremendamente interesante. Las nanopartículas de oro, debido a su destacada biocompatibilidad, se presentan como una opción a tener en cuenta, con la limitación de ser caras de obtener y de su baja tasa de transfección. Los elementos basados en el carbono, tales como los nanotubos y el grafeno, resultan un área con un amplio recorrido futuro, por sus propiedades de maleabilidad, funcionalización y vectorización, así como sus propiedades térmicas. Las nanopartículas de sílice mesoporosa en cambio es un material que por sus características parece prometer más en la liberación de fármacos, que en la propia transfección. En cuanto a las nanopartículas magnéticas, a pesar de sus limitadas aplicaciones, son una opción muy inteligente, con unos valores de toxicidad y de eficacia muy válidos, y cuya aplicación en la clínica no debería tardar. Las nanopartículas basadas en fosfatos cálcicos siguen siendo especialmente útiles en la transfección *in vitro* a pesar de sus complicaciones de preparación por su bajo precio y sencillez de componentes. En mi opinión, el futuro pasa por la investigación y búsqueda de nuevos materiales, y la combinación de diferentes compuestos para aprovechar lo mejor de cada uno. Elementos como los vidrios podrían dar lugar a nanopartículas que tal vez pudieran resultar útiles en la transfección. En cuanto a combinaciones, se podrían llegar a combinar técnicas orgánicas e inorgánicas para aumentar la tasa de transfección y reducir la toxicidad, con el problema lógico de que probablemente aumentaría el precio de la formulación. En cualquier caso, parece claro que la transfección avanzará como paso fundamental de la terapia genética que es, por lo que sería lógico pensar que en un plazo de diez años esta reseña quede obsoleta, superada por la tecnología.

## Bibliografía

---

1. Keles E, Song Y, Du D, Dong W, Lin Y. Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications. *Biomater Sci.* 2016;4(9):1291-1309.

2. Xu Z, Zeng Q, Lu G, Yu A. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science*. 2006;61(3):1027-1040.
3. Sunshine J, Bishop C, Green J. Advances in polymeric and inorganic vectors for nonviral nucleic acid delivery. *Therapeutic Delivery*. 2011;2(4):493-521.
4. Ortega-Muñoz M, Giron-Gonzalez M, Salto-Gonzalez R, Jodar-Reyes A, De Jesus S, Lopez-Jaramillo F et al. Polyethyleneimine-Coated Gold Nanoparticles: Straightforward Preparation of Efficient DNA Delivery Nanocarriers. *Chemistry - An Asian Journal*. 2016;11(23):3365-3375.
5. Nia A, Eshghi H, Abnous K, Ramezani M. The intracellular delivery of plasmid DNA using cationic reducible carbon nanotube — Disulfide conjugates of polyethylenimine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;100:176-186.
6. Chang J, Tsai P, Chen W, Chiou S, Mou C. Dual delivery of siRNA and plasmid DNA using mesoporous silica nanoparticles to differentiate induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons. *J Mater Chem B*. 2017;5(16):3012-3023.
7. Mannell H, Pircher J, Räthel T, Schilberg K, Zimmermann K, Pfeifer A et al. Targeted Endothelial Gene Delivery by Ultrasonic Destruction of Magnetic Microbubbles Carrying Lentiviral Vectors. *Pharmaceutical Research*. 2012;29(5):1282-1294.
8. Huang Y, Hung C, Hsu Y, Zhong C, Wang W, Chang C et al. Suppression of Breast Cancer Cell Migration by Small Interfering RNA Delivered by Polyethyleneimine-Functionalized Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters*. 2016;11(1).
9. Shekhar S, Roy A, Hong D, Kumta P. Nanostructured silicate substituted calcium phosphate (NanoSiCaPs) nanoparticles — Efficient calcium phosphate based non-viral gene delivery systems. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;69:486-495.