

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS COMO VEHÍCULOS DE TRANSFECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Tesis para optar por el título de Licenciada en Biotecnología
de la Universidad Nacional de San Martín

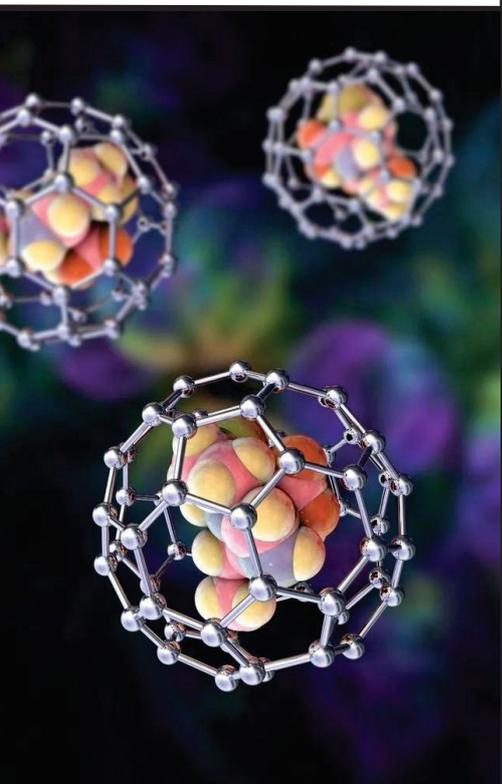
Autora: Valentina Hjelt

Director: Martin Williams

Co-Director: Mariano Nicolás Belaich

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas
(IIBio - UNSAM)

- Diciembre 2023 -



AGRADECIMIENTOS

A la UNSAM y a todos los docentes excepcionales que han contribuido de manera significativa a mi formación como Licenciada en Biotecnología.

A Martín, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesina en su *Startup* SYTE.bio. Gracias por tu dedicación y eterna paciencia, por enseñarme a trabajar en la mesada de un laboratorio, por transmitirme todo tu conocimiento con pasión, y por ver el potencial en mí.

A Mariano, por su participación como co-director en este proyecto. Gracias por tu compromiso y orientación, y por tus valiosas sugerencias que han enriquecido tanto mi escritura como mi formación.

A Leo, por dedicar tiempo a analizar y buscar soluciones a cada intento fallido de nuestros experimentos, y por siempre aspirar a ir más allá. Gracias por enseñarme la verdadera esencia de la pasión en la investigación.

A Marga, por estar siempre cerca cuando lo necesité, por escucharme y aconsejarme en todo momento. Gracias por hacer del espacio de trabajo un lugar divertido.

A Silvia y a Galo, por su valiosa colaboración y por ayudarme a resolver las dudas que surgieron durante la síntesis y caracterización de las nanopartículas.

A mi familia, por su apoyo incondicional desde el inicio de mi carrera. Especialmente a mi mamá y a mi papá, por celebrar cada pequeño logro como si fuera inmenso y por recordarme a diario cuánto se enorgullecen de mí. No menos importante, gracias por sobrellevar mis momentos difíciles, por respetar mis pedidos de silencio durante mis estudios y por acompañarme en los picos de estrés previos a los exámenes. A mis abuelos, les agradezco su constante interés en mi desempeño académico y la alegría que comparten por mis logros.

A mis amigos de la facultad, por hacer las cursadas un poco más divertidas, por compartir rondas de mates y horas de estudio, y por hacer más llevadero el desafío de estudiar durante la pandemia. En especial a Toti, mi media naranja y futura colega, por motivarnos mutuamente a seguir adelante y alcanzar juntas el final de esta carrera. Me llevo amistades muy hermosas y recuerdos inolvidables.

A mis amigas del colegio, por bancarme y entender mis tiempos, y por estar siempre a mi lado desde chiquitas.

Gracias a todos los que formaron parte de mi vida en estos seis años de carrera.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	3
RESUMEN	5
ABREVIATURAS	6
CAPÍTULO I	10
Introducción	10
I.1 ENFERMEDADES GENÉTICAS	11
I. 2 TERAPIA GÉNICA	13
I.2.a. Enfoques de la terapia génica	15
I.2.b. Historia de la terapia génica	19
I. 3 SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE GENES TERAPÉUTICOS	22
I.3.a. Sistemas de administración biológica	22
I.3.b. Sistemas de administración física	24
I.3.c. Sistemas de administración química	25
I.3.c.i. Nanoportadores orgánicos	28
I.3.c.ii. Nanoportadores inorgánicos	30
I.3.c.iii. Toxicidad de las nanopartículas	34
I. 4 BARRERAS BIOLÓGICAS PARA LA ENTREGA DE GENES	35
I.4.a. Barreras extracelulares	37
I.4.b. Barreras intracelulares	38
I. 5 HIDRÓXIDOS DOBLES LAMINARES	41
I.5.a. Métodos de síntesis y caracterización de LDH	43
I.5.b. Aplicación como sistemas de administración de genes	46
CAPÍTULO II	49
Hipótesis y Objetivos	49
II. 1 HIPÓTESIS	50
II. 2 OBJETIVOS	50
CAPÍTULO III	51
Metodología	51
III. 1 OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN GÉNICA REPORTERA	52
III. 2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LDH	53
III.2.a. Síntesis de MgAl-CI LDH NPs	53
III.2.b. Caracterización de MgAl-CI LDH NPs	54

III. 3 FORMULACIÓN DE COMPLEJOS LDH:ADN	54
III.3.a. Estudio de la interacción entre LDH y ADN	54
III.3.b. Caracterización de los complejos LDH:ADN	55
III.3.c. Capacidad de protección del ADN complejado	55
III.3.d. Eficiencia de escape endosomal de los complejos LDH:ADN	55
III. 4 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GFP EN CÉLULAS DE MAMÍFERO	56
III.4.a. Mantenimiento de líneas celulares de mamíferos	56
III.4.b. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de mamífero	56
III.4.c. Transfección de LDH:ADN en líneas celulares de mamífero	58
CAPÍTULO IV	59
Resultados	59
IV. 1 OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN GÉNICA REPORTERA	60
IV. 2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LDH	61
IV.2.a. Caracterización de las MgAl-Cl LDH NPs	61
IV.2.b. Cuantificación estequiométrica de las MgAl-Cl LDH NPs	64
IV. 3. FORMULACIÓN DE COMPLEJOS LDH:ADN	65
IV.3.a. Estudio de la interacción entre LDH y ADN	65
IV.3.a. Caracterización de los complejos LDH:ADN	67
IV.3.c. Capacidad de protección del ADN complejado	67
IV.3.d. Eficiencia de escape endosomal de los complejos LDH:ADN	68
IV. 4 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GFP EN CÉLULAS DE MAMÍFERO	69
IV.4.a. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de mamífero	69
IV.4.b. Transfección de LDH:ADN en líneas celulares de mamífero	71
CAPÍTULO V	73
Discusión, Conclusiones y Perspectivas a Futuro	73
V. 1 DISCUSIÓN	74
V. 2 CONCLUSIONES	77
V. 3 PERSPECTIVAS A FUTURO	77
CAPÍTULO VI	79
Bibliografía	79

RESUMEN

La expresión de proteínas o moléculas de RNA en tejidos y células de mamíferos a partir de ácidos nucleicos recombinantes transferidos, para perseguir fines diagnósticos, terapéuticos o preventivos, se ha instalado como un prometedor enfoque médico y veterinario, ya sea como acción primaria de intervención, o como complemento a otros procedimientos disponibles (Anguela & High, 2019). Sin embargo, la transfección de ácidos nucleicos en células de mamíferos es un proceso complejo que requiere de procedimientos y compuestos que permitan obtener una alta selectividad, baja toxicidad y alta eficacia (High & Roncarolo, 2019; Lanigan et al., 2020). Estos métodos se pueden clasificar según los mecanismos empleados, lo cual incluye a sistemas de administración virales (biológicos) o no virales (físicos o químicos) (Patil et al., 2019). Se ha visto que varios de estos procedimientos funcionan en escala laboratorio, pero son difíciles de aplicar en la práctica clínica, no solo por su limitada eficacia, sino también por requerir de instrumental específico y metodologías complejas.

Actualmente, los métodos de mayor interés para lograr estos objetivos son los no virales dado que presentan ventajas de producción, seguridad y respuesta (Zu & Gao, 2021). Concretamente, destacan aquellos que utilizan nanoportadores de composición orgánica para llevar a cabo la transfección, debido a sus propiedades físico-químicas, su amplia utilidad y versatilidad en cuanto a diseño y mecanismos de acción. Sin embargo, muchos tienen limitaciones debido a su inestabilidad y a las barreras naturales que presentan los seres vivos (Mirón-Barroso et al., 2021). Por ello, se buscan modelos que optimicen estos procesos, destacando las nanopartículas inorgánicas por su adaptabilidad, estabilidad y capacidad de llevar cargas genéticas cuando están funcionalizadas. Esto las posiciona como grandes candidatas a ser las elegidas en el campo de los ácidos nucleicos terapéuticos, conformando una alternativa a los sistemas más estudiados. Además, sus peculiares características ante distintos estímulos, tanto externos como internos, les hacen tener gran variación de diseños que optimizan la entrada del material genético en la célula con gran eficacia (Mitchell et al., 2021).

El presente proyecto propone estudiar algunos de estos sistemas, particularmente los hidróxidos dobles laminares (LDH), como una alternativa a los métodos no virales convencionales, con la perspectiva de llevarlos a la práctica clínica. Las LDH son materiales arcillosos aniónicos con una estructura de capas cargadas positivamente por hidróxidos metálicos, conteniendo aniones y moléculas de agua en su capa intermedia (Karmakar et al., 2022). Se presenta la síntesis y caracterización de LDH de magnesio-aluminio intercalados con cloruro (MgAl-Cl LDH) capaces de cargar ADN mediante una reacción de intercambio aniónico. La evaluación de estos nanomateriales como sistemas de administración génica en líneas celulares de mamíferos reveló que las MgAl-Cl LDH presentaron menor citotoxicidad en comparación con agentes poliméricos de transfección comunes. Sin embargo, su eficiencia de transfección se vio limitada en las líneas celulares CHO-K1 y A-375, indicando desafíos en la superación efectiva de las barreras para la entrega de ácidos nucleicos bajo las condiciones ensayadas. Es necesario profundizar en la comprensión de estas limitaciones y desarrollar estrategias mejoradas para superar las barreras intracelulares, con el objetivo de mejorar la eficiencia de transfección.

ABREVIATURAS

AAV = Virus adenoasociados

ADN = Ácido Desoxirribonucleico

ADNdc = ADN doble cadena

ADNdc CCC = ADN doble cadena circular covalentemente cerrado

ADNdc LCC = ADN doble cadena lineal covalentemente cerrado

ADNp = ADN plasmídico

$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ = Cloruro de Aluminio hexahidratado

AO = Naranja de Acridina

AON = Oligonucleótido antisentido

ARN = Ácido Ribonucleico

ARNi = RNA de interferencia

ARNm = Ácido Ribonucleico mensajero

ATP = Adenosin Trifosfato

AV = Adenovirus

BE = *Base editing*

CAGR = *Compound Annual Growth Rate*

CAR = Receptor antigénico quimérico

cm^2 = Centímetros cuadrados

CMV = Citomegalovirus

CNT = Nanotubos de carbono

CO_2 = Dióxido de carbono

CPN = Complejo de poro nuclear

CPP = Péptidos de Penetración Celular

CRISPR = *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CVD = Deposición química de vapor

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO = Dimetil Sulfóxido

DSB = Rotura de doble cadena

E. coli = *Escherichia coli*

EC = Extracelular

EDTA = *Etilen Di-Amino Tetra Acético*

EEF1A1 = Factor de elongación de la traducción eucariota 1 alfa 1
EGFP = *Enhanced Green Fluorescent Protein*
EMA = *European Medicines Agency*
EPF = Enfermedades Poco Frecuentes
EPR = Efecto de permeación y retención mejorada
EtBr = Bromuro de Etidio
EtOH = Etanol
FDA = *Food and Drug Administration*
g = Gramos
HDR = *Homology-Directed Repair*
IC = Intracelular
IONP = Nanopartículas de óxido de hierro
kbp = Kilo pares de bases
kDa = Kilodaltons
LNP = Nanopartículas Lipídicas
LV = Lentivirus
M = Molar
MCS = *Multiple Cloning Site*
mg = Miligramo
MgAl-Cl LDH = Hidróxidos Dobles Laminares de magnesio-aluminio intercalados con cloruro
MgCl₂·6H₂O = Cloruro de Magnesio hexahidratado
miARN = micro ARN
mL = Mililitro
mM = Milimolar
N = Normal
NaCl = Cloruro de Sodio
NaOH = Hidróxido de Sodio
ng = Nanogramo
NHEJ = *Non-Homologous End Joining*
nm = Nanómetros
MSN = Nanopartículas de sílice mesoporosa
MTOC = Centro organizador de microtúbulos
MWCNT = Nanotubos de carbono de pared múltiple
NLS = Señal de Localización Nuclear

NPs = Nanopartículas
ON = *Over Night*
ORF = *Open Reading Frame*
ORI = Origen de Replicación
p/v = % peso en volumen
PAM = *Protospacer Adjacent Motif*
PAMAM = Poli(amidoamina)
pb = Pares de bases
PBAE = Poli(β -amino ésteres)
pDMAEMA = Poli[(2-dimetilamino)etil metacrilato]
PE = *Prime editing*
PEG = Poli(etilenglicol)
pegRNA = ARN guía de edición principal
PEI = Poli(etilenimina)
PLL = Poli(L-lisina)
RISC = *RNA-Induced Silencing Complex*
ROS = Especies reactivas de oxígeno
rpm = Revoluciones por minuto
RSV = Virus Respiratorio Sincitial
RV = Retrovirus
SD = Desvío estándar
SDS = Dodecil Sulfato de Sodio
SFB = Suero Fetal Bovino
SFM = Sistema Fagocítico Mononuclear
sgRNA = ARN guía
siARN = ARN pequeño de interferencia
SLN = Señal de Localización Nuclear
SN = Solución
SPION = Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro
SSB = Rotura de simple cadena
SV40 = Virus Simio 40
SWCNT = Nanotubos de carbono de pared simple
TALEN = *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*
TBE = Tris-Borate-EDTA

Tris-Cl = Tris Cloruro

U = Unidades

UBC = Ubiquitina C humana

UV = Ultra Violeta

v/v = % volumen en volúmen

ZFN = *Zinc Finger Nuclease*

μg = Microgramo

μL = Microlitro

CAPÍTULO I

Introducción

I.1 ENFERMEDADES GENÉTICAS

Un desorden genético es una afección patológica que se origina por la alteración de uno o más genes en el genoma de un individuo, ya sea heredado o adquirido (Tripathy & Nanda, 2011). Las enfermedades genéticas pueden verse influenciadas o desencadenadas por una multitud de factores, que incluyen infecciones bacterianas o virales, alérgenos, teratógenos (como productos químicos o radiación), agresiones físicas, toxinas o condiciones ambientales. La interacción del entorno con los genes puede inducir cambios en su expresión mediante mecanismos epigenéticos, comprometiendo así la salud humana (Tiffon, 2018).

Las enfermedades hereditarias humanas, originadas por alteraciones monogénicas, se encuentran determinadas por los alelos de un único *locus* génico, y se transmiten a las generaciones sucesivas mediante un patrón de heredabilidad descrito por las leyes de Mendel (González-Lamuño & García Fuentes, 2008). La localización cromosómica del gen involucrado y las características del fenotipo permiten definir los diferentes patrones de herencia mendeliana. De este modo, los trastornos dominantes son aquellos donde la portación de un alelo alterado del gen es suficiente para que se presente la enfermedad, mientras que los trastornos recesivos requieren de que ambos alelos sean deficientes para que el individuo se vea afectado (Khan et al., 2015). A su vez, una enfermedad es autosómica cuando el gen comprometido se localiza en uno de los 22 pares de autosomas, mientras que si éste se encuentra en un cromosoma sexual se trata de un trastorno ligado al sexo. Por el contrario, la mayoría de las enfermedades genéticas no siguen un patrón de herencia bien definido, y su desarrollo deriva de interacciones entre múltiples genes afectados y diversos factores ambientales. Por lo tanto, cada una de las variantes genéticas de susceptibilidad contribuyen a un aumento en el riesgo de enfermedad, pero individualmente no son suficientes para contraer la misma (Ramírez-Bello, 2019). Dentro de los trastornos complejos o poligénicos más conocidos se encuentran la enfermedad de Alzheimer, esclerodermia, asma, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, osteoporosis, enfermedades autoinmunes, enfermedades renales, enfermedades del tejido conectivo, entre otras.

Las enfermedades poco frecuentes o raras (EPF), también conocidas como enfermedades huérfanas, son aquellas que se presentan con escasa frecuencia en la población general y afectan a un número reducido de personas en una población determinada. La clasificación de una enfermedad como rara puede variar según la región: en la Unión Europea, se considera rara si afecta a una persona entre 2000 (Comisión Europea)ⁱ, mientras que en Estados Unidos debe afectar a menos de 200.000 personas para recibir esta clasificación (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, FDA)ⁱⁱ. En Argentina, según lo establece la Ley 26.689 (artículo 2º)ⁱⁱⁱ se consideran EPF a aquellas enfermedades cuya prevalencia poblacional es igual o inferior a una en 2.000 personas referida a la situación epidemiológica nacional. Se estima que entre el 3,5% y el 5,9% de la población mundial, lo que equivaldría a 263 a 446 millones de personas en todo el mundo, se ve afectada por enfermedades raras (Nguengang Wakap et al., 2020).

Actualmente se describen alrededor de 10.000 enfermedades raras en la literatura médica, y aún se desconocen las causas de muchas de ellas (Smith et al., 2022). Un 80% de estas enfermedades raras tiene una base genética identificada, con la implicación de uno o varios genes y la presencia de mutaciones tanto en la línea germinal como somática. Dentro de las EPF de origen genético, muchas son monogénicas (Posey, 2019) y algunas presentan patrones de herencia no mendeliana, que incluyen alteraciones epigenéticas (como el síndrome de Beckwith-Wiedemann) y trastornos mitocondriales (por ejemplo, el síndrome de Rett). Una minoría de estas enfermedades también pueden ser causadas por factores ambientales, infecciosos o inmunológicos (Braga et al., 2022).

No hay clasificaciones universalmente validadas para las enfermedades raras. Sin embargo, ciertas clasificaciones, como la que se expone en la **Figura 1**, ofrecen una perspectiva integral al organizarlas jerárquicamente según las dolencias y afecciones que generan^v.

Tabla 1. Clasificación jerárquica de las Enfermedades Raras en *Orphanet* (ficheros accesibles en formato XML, disponibles en versión inglesa, <http://www.orphadata.org/cgi-bin/inc/product3.inc.php>)

Rare cardiac diseases	Rare immunological diseases
Developmental anomalies during embryogenesis	Rare systemic and rheumatological diseases
Inborn errors of metabolism	Rare odontological diseases
Rare gastroenterological diseases	Rare circulatory system diseases
Rare neurological diseases	Rare bone diseases
Rare abdominal surgical diseases	Rare otorhinolaryngological diseases
Rare hepatic diseases	Rare infertility disorders
Rare respiratory diseases	Rare tumors
Rare urogenital diseases	Rare infectious diseases
Rare surgical thoracic diseases	Rare intoxications
Rare skin diseases	Rare gynaecological and obstetric diseases
Rare renal diseases	Rare surgical maxillo-facial diseases
Rare eye diseases	Rare allergic disease
Rare endocrine diseases	Teratologic disorders
Rare haematological diseases	Rare cardiac malformations
	Rare genetic diseases

Figura 1. Clasificación jerárquica de las enfermedades raras en según las dolencias y afecciones que generan. Recuperado de: *Orphanet*.

A pesar de los esfuerzos notables realizados en los últimos años para promover el desarrollo de terapias destinadas a enfermedades raras, la mayoría de estas afecciones aún carece de tratamientos específicos. Actualmente, menos del 5% de las EPF cuentan con tratamientos aprobados, y estos tienden a abordar los síntomas en lugar de la cura de las patologías subyacentes (Roessler et al., 2021). No obstante, los avances en biología molecular y genómica de las últimas décadas han ampliado las posibilidades de nuevos enfoques terapéuticos. El tamaño del mercado de tratamiento de enfermedades raras alcanzó más de 195.000 millones de dólares en 2022, y se espera que crezca a una tasa compuesta anual (CAGR, por sus siglas en inglés) del 20% durante el periodo previsto para 2023 y 2031 debido a la creciente investigación y aprobación de medicamentos^{iv}. Una vez que más terapias genéticas lleguen al mercado, pueden ser una alternativa a los tratamientos actualmente disponibles para enfermedades genéticas raras, como los reemplazos de enzimas, los trasplantes autólogos y las terapias con anticuerpos (Kaufmann et al., 2018).

I. 2 TERAPIA GÉNICA

Desde que se introdujo en la década de los 70 del siglo pasado el concepto de tratar una enfermedad mediante el reemplazo del ADN dañado por uno corregido en el paciente, la terapia génica ha planteado una revolución en la medicina. Se define como terapia génica a cualquier procedimiento mediante el cual se modifican genéticamente las células de un paciente por medio de la transferencia horizontal de ácidos nucleicos, con el propósito de corregir alteraciones en el ADN y revertir así un fenotipo alterado causante de una patología (Gonçalves & Paiva, 2017). A diferencia de la farmacología tradicional, las terapias génicas tienen el potencial de corregir los defectos genéticos subyacentes a una enfermedad, ofreciendo una cura en lugar de simplemente controlar los signos y síntomas. El mecanismo de acción ocurre a nivel de la transcripción del ADN a ARN mensajero, o de la traducción del ARN mensajero a proteínas; y el efecto terapéutico está directamente relacionado con la secuencia de ácido nucleico que se administra, o con el producto de la expresión génica de esta secuencia (Silva, 2022). Por lo tanto, una terapia génica exitosa puede requerir sólo una dosis única para conferir una mejoría de por vida, eliminando la necesidad de un tratamiento continuo (Gicquel et al., 2023).

Como agentes terapéuticos, los ácidos nucleicos tienen el potencial de intervenir directa o indirectamente en todas las funciones celulares, permitiendo así abordar una amplia variedad de condiciones de enfermedad. En el contexto de la terapia génica, se pueden distinguir tres enfoques distintos: la terapia de adición de genes; la terapia de inhibición o silenciamiento génico; y la edición del genoma (**Figura 2**). El enfoque más tradicional es la terapia de adición de genes, que implica la administración de copias normales de un gen defectuoso con el fin de restaurar la función del mismo en las células afectadas. Esta estrategia puede ser adecuada para enfrentar enfermedades causadas por mutaciones con pérdida de función, común en trastornos genéticos que siguen un patrón de herencia autosómico recesivo. En aquellos trastornos genéticos que siguen un patrón de herencia autosómico dominante, donde generalmente la mutación genera una sobreexpresión de ciertos genes, la terapia de inhibición génica tiene como objetivo administrar una secuencia inhibidora para eliminar la expresión del gen alterado que tiene una mutación de ganancia de función. El tercer enfoque, conocido como edición del genoma, incorpora herramientas de edición genética específicas para corregir mutaciones en el genoma con ganancia o pérdida de función. En función del enfoque de terapia génica utilizado, las características y composición de la carga genética varían considerablemente (Sainz-Ramos et al., 2021).

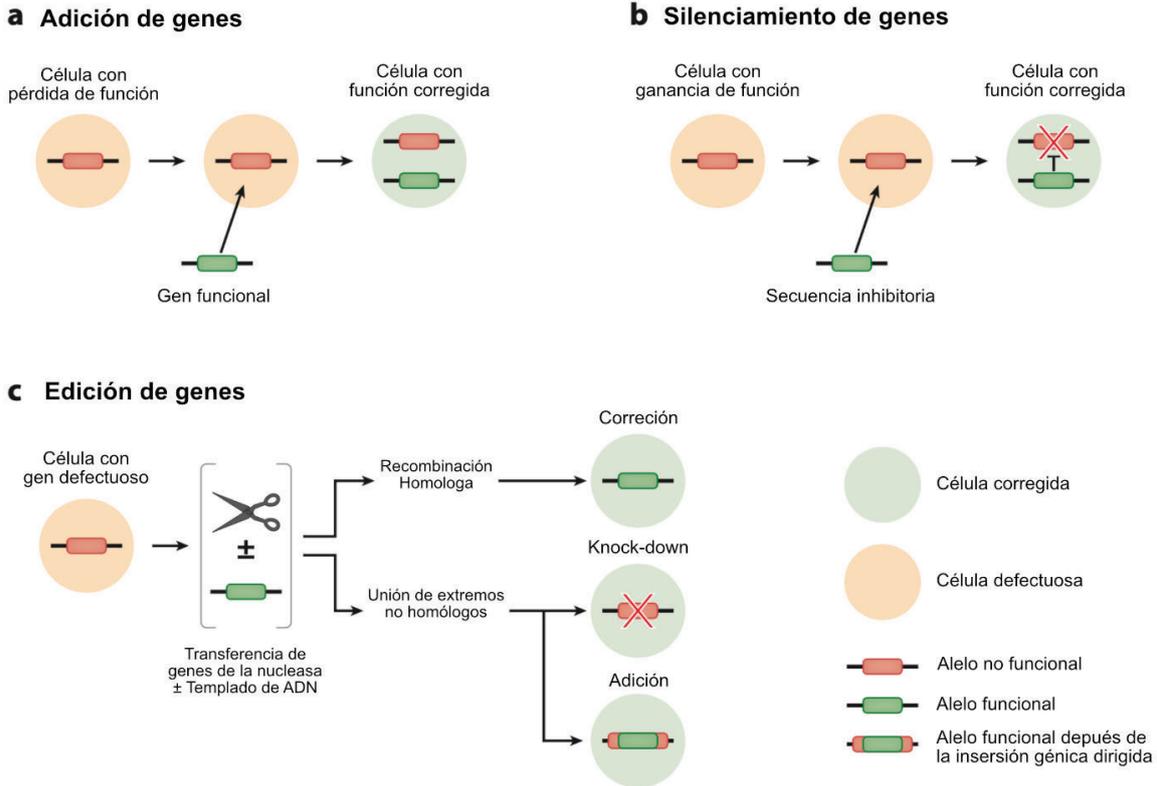


Figura 2. Esquema representativo de la terapia de adición de genes (A), la terapia de silenciamiento génico (B) y la edición del genoma (C). Adaptado de: (Anguela & High, 2019)

Debido a la complejidad del enfoque terapéutico en análisis, éste puede clasificarse de múltiples maneras. En función al tipo celular tratado, es posible distinguir la *terapia génica de línea germinal*, de la *somática*. En el primer caso, el material genético es integrado al genoma de las células implicadas en el desarrollo y formación de líneas germinales (ya sean gametos o embriones preimplantacionales), y las modificaciones introducidas mediante ingeniería genética son heredables, siendo una estrategia útil para tratar enfermedades hereditarias. En cambio, la terapia génica somática se encuentra dirigida a células somáticas, y las modificaciones no pasan de generación en generación, sino que su efecto se encuentra restringido al individuo comprometido. Por lo tanto, este enfoque podría curar una enfermedad genética en el paciente, pero no evitaría la transmisión del gen defectuoso a la descendencia (Gonçalves & Paiva, 2017). A pesar que la edición de la línea germinal hereditaria humana actualmente no se encuentra aprobada para ensayos clínicos, numerosos estudios preclínicos han sido llevados a cabo para el tratamiento de enfermedades monogénicas graves (Kratzer et al., 2022).

Por otra parte, existe otra clasificación en función a la estrategia de transferencia aplicada (**Figura 3**), que distingue el enfoque *in vivo* y *ex vivo*. La terapia génica *ex vivo* requiere de la extracción de células autólogas (es decir, de células madre o las células diana que se buscan tratar) o alogénicas (como las células de un donante no necesariamente histocompatible), para luego ser aisladas y cultivadas *in vitro*. Luego de ser modificadas por transferencia de material genético, las células con el fenotipo de interés son seleccionadas y amplificadas, para ser nuevamente trasplantadas al paciente. Entre sus mayores ventajas, se encuentra una alta eficacia en la transferencia de la secuencia de interés y seguridad del paciente, debido a la posibilidad de selección de células *in vitro* antes de ser infundidas, y al grado de control que puede mantenerse durante el procedimiento. Sin

embargo, la limitación en los tipos celulares que pueden ser crecidos en cultivo fuera del organismo, junto con la complejidad del proceso y los costos elevados de los protocolos requeridos son una desventaja para este enfoque (Naldini, 2011). Contrariamente, la administración de genes terapéuticos directamente al organismo, a través del torrente circulatorio o células de la piel, se conoce como terapia génica *in vivo*. A diferencia del enfoque *ex vivo*, se evitan los obstáculos prácticos de extracción y manipulación *in vitro*. Si bien este enfoque presenta una mayor sencillez respecto a la terapia *ex vivo*, presenta dificultades en el control de la transferencia de material genético a las células diana, y la eficiencia se ve reducida por la imposibilidad de amplificar las células transducidas (Tang & Xu, 2020).

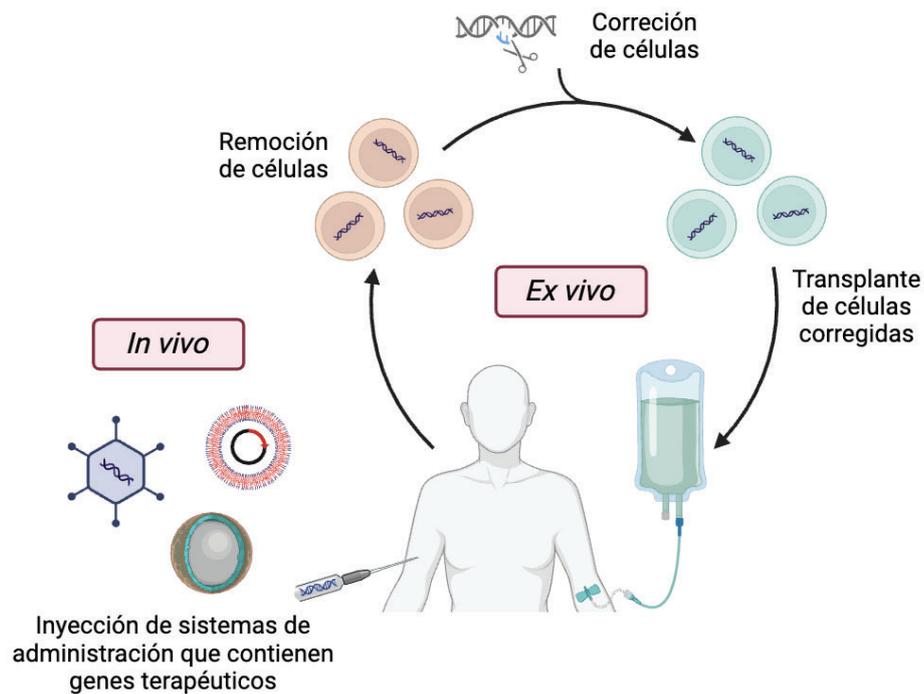


Figura 3. Representación esquemática de la terapia génica *in vivo* y *ex vivo*. Las células del paciente pueden aislarse y modificarse mediante ingeniería genética *ex vivo* y reintroducirse en el mismo paciente (derecha), o un paciente puede tratarse mediante la administración directa de agentes terapéuticos *in vivo* (izquierda) utilizando sistemas de administración virales o no virales. Creado en: BioRender.

1.2.a. Enfoques de la terapia génica

Terapia de adición de genes

El polinucleótido más comúnmente utilizado para la terapia de adición de genes es el ADN plasmídico (ADNp), una construcción de ADN circular doble cadena, normalmente entre 1,5 y 20 kpb, que impulsa la expresión transgénica transitoria en el núcleo de las células diana, codificando la proteína de interés. Se suelen utilizar plásmidos episomales que replican de forma autónoma, con el fin de reducir el riesgo de mutagénesis por inserción relacionado con los vectores virales. Los plásmidos de expresión génica se componen de un esqueleto procariota que consiste de un origen de replicación (ORI) para la amplificación del plásmido y un casete de genes de resistencia a los antibióticos para su

selección (o sistema equivalente), y un de casete de expresión eucariota (compuesto por el gen de interés, un promotor, intrones y un terminador de la transcripción o señal de poliadenilación) que permite la expresión del gen en el hospedador eucariota (**Figura 4A**) (Han et al., 2000). Por lo general, una transfección mediada por moléculas de pDNA convencionales es moderada y se mantiene activa durante uno a dos meses. No obstante, tanto el nivel como la duración de la expresión del transgén pueden ser mejorados y controlados mediante la elección cuidadosa del promotor, la constitución del plásmido, su vida media, y la presencia o ausencia de dinucleótidos CpG. Los promotores virales, como los derivados del citomegalovirus (CMV), el virus respiratorio sincitial (RSV) y el virus simio 40 (SV40) permiten alcanzar altos niveles de expresión en una variedad de líneas células, pero la misma suele ser transitoria. En cambio, los promotores constitutivos de mamíferos, como el factor de elongación de la traducción eucariota 1 alfa 1 (EEF1A1) y la ubiquitina C humana (UBC) permiten una expresión persistente del gen terapéutico. Además, los elementos que actúan en cis, como los intrones y las señales de poliadenilación, favorecen un aumento en el nivel y la persistencia de la expresión de transgen (Yin et al., 2014).

Si bien el esqueleto procariota resulta necesario para la producción y amplificación del vector en bacterias, la entrega de secuencias procariotas innecesarias a una célula eucariota genera un riesgo de transferencia génica horizontal de los genes de resistencia a antibióticos, respuestas inmunoestimuladoras mediadas por motivos CpG, y a una expresión transgénica disminuida por inducción de un estado antiviral en la célula diana (Sum et al., 2014). Sumado a esto, aquellos plásmidos que poseen un tamaño mayor a 10 kpb son potencialmente inestables durante su producción en bacterias, por lo que para la mayoría de las estrategias de transferencia de genes se suelen utilizar construcciones de dimensiones menores a ese valor (Lanza et al., 2013). En tal sentido, se han desarrollado versiones más pequeñas de un ADNp convencional en donde se elimina el esqueleto procariota para la generación de vectores más pequeños (**Figura 4B**), conocidos como minicírculos de ADN doble cadena circular covalentemente cerrados (ADNdc CCC) y minivectores de ADN doble cadena lineal covalentemente cerrados (ADNdc LCC). Esta estrategia permite que solamente los genes terapéuticos sean administrados al organismo hospedador, mejorando a su vez la biodisponibilidad y la expresión transgénica entre 10 y 100 veces, prolongando el efecto por algunos años (Sum et al., 2014).

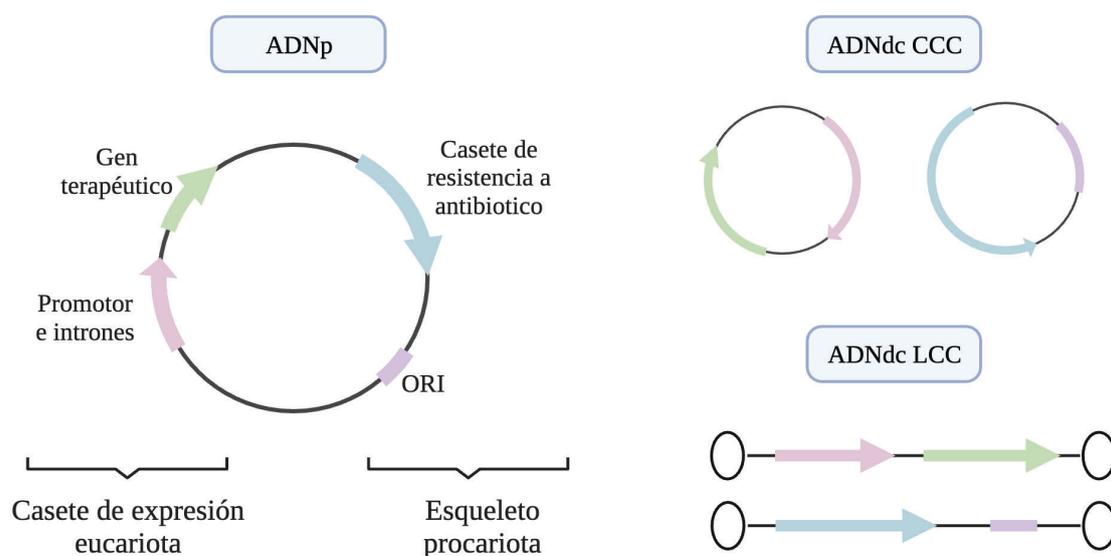


Figura 4. Esquema representativo de un vector de ADNp, con los elementos del casete de expresión eucariota y del esqueleto procariota, y de minicírculos y minivectores de ADN. Creado en: BioRender.

Otro polinucleótido comúnmente utilizado en el enfoque de adición de genes es el ARN mensajero de cadena sencilla (ARNm), que representa una estrategia altamente prometedora debido a las ventajas que presenta. El ARNm ofrece un perfil más seguro, al disminuir el riesgo de mutagénesis e inmunogenicidad, y permite una modulación más eficiente de la expresión del gen objetivo, ya que actúa en el citoplasma. Sin embargo, el efecto mediado por los ARNm también es transitorio, lo que limita su duración en el organismo. Además, su estabilidad en plasma es aún menor que la del ADNp, con una vida media de aproximadamente una hora, debido a su estructura menos estable y la presencia de grupos hidroxilo que favorecen su degradación (Sainz-Ramos et al., 2021).

Terapia de inhibición o silenciamiento génico

La terapia de inhibición génica implica la administración de secuencias inhibidoras de la expresión génica, conocidas como ARN de interferencia (ARNi). Estas moléculas de ARNi, como el microARN (miARN) monocatenario y el ARN pequeño de interferencia (siARN) bicatenario, actúan en complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) del citoplasma para inhibir transitoriamente la expresión génica post transcripcionalmente (Traber & Yu, 2023). Otras estructuras sintéticas y más pequeñas de ARN o ADN monocatenario, conocidas como oligonucleótidos antisentido (AON), involucran cadenas cortas de nucleótidos modificados que se dirigen al ARN de una manera específica de secuencia. En este caso, la secuencia de oligonucleótidos interfiere con el pre-ARN y el ARNm en el núcleo o el citoplasma a través de un mecanismo de hibridación complementario de mayor especificidad, pero con una menor eficiencia de eliminación (Kuijper et al., 2021). Los mecanismos de acción de las tres moléculas se resumen en la **Figura 5**.

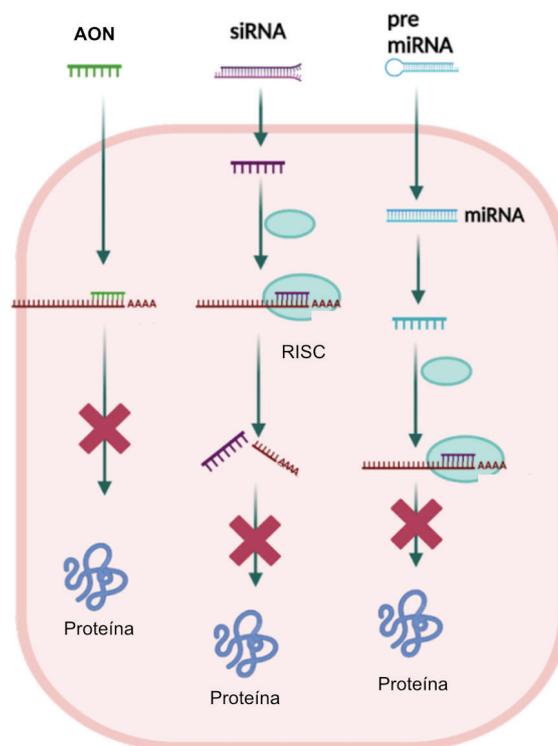


Figura 5. Terapia de inhibición o silenciamiento génico mediante la entrega de AON, siARN y miARN. Adaptado de: (Sarkar et al., 2023)

Terapia de edición génica

Aparte de las estrategias de adición e inhibición de genes, otro enfoque consiste en la corrección permanente del gen mutado con el uso de herramientas específicas de edición del genoma (**Figura 6**). La edición de genes se realiza comúnmente utilizando nucleasas que reconocen secuencias de ADN e introducen roturas de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés) en sitios específicos, lo que desencadena los mecanismos de reparación celular de DSB. Esto puede ocurrir mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) o por recombinación homóloga (HDR, por sus siglas en inglés) en presencia de un templado de ADN donador. Mientras que NHEJ es propensa a cometer errores y se puede utilizar para generar una mutación de pérdida de función o la desactivación de un gen, HDR es útil para realizar la inserción y el reemplazo de genes con alta precisión (Salsman & Delleire, 2017; Tang & Xu, 2020).

Estas endonucleasas se pueden clasificar según si utilizan estructuras proteicas o moléculas de ARN para reconocer secuencias de ADN específicas (**Figura 6**). Las nucleasas con dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) emplean estructuras proteicas que pueden modificarse para apuntar a sitios específicos; mientras que el sistema CRISPR/Cas9 utiliza un único ARN guía (sgRNA) para dirigir la nucleasa al sitio de interés, que contiene motivos adyacentes al protoespaciador (PAM) deseados (Pogue et al., 2018).

La simplicidad y versatilidad de los sistemas CRISPR/Cas9 ha llevado a su rápida adopción como la tecnología de edición génica más utilizada para manipulaciones de ADN de sitios específicos. Aunque esta tecnología ha revolucionado la edición genética, la inducción de DSBs conlleva riesgos, especialmente en aplicaciones terapéuticas, motivando la búsqueda de estrategias de edición de ADN sin DSB. Los editores de base (BE, *base-editing*) son proteínas de fusión que incluyen una Cas9 modificada con una nucleasa (nCAs9), que causa roturas de cadena sencilla (SSB), y un dominio de desaminasa de citosina (CBE) o adenina (ABE). Esto permite que la sgRNA reconozca una secuencia específica e introduzca una mutación de transición dentro de una ventana de edición definida por el sitio PAM. Los BEs son ideales para su uso en células post-mitóticas de división lenta, como fibroblastos y queratinocitos, evitando la necesidad de HDR, que es menos común en células post-mitóticas. Sin embargo, los BE no son universalmente aplicables para corregir alelos que causan enfermedades relacionadas con inserciones, eliminaciones o ciertas sustituciones de bases específicas. Los editores principales (PE, *prime-editing*), en cambio, consisten de una transcriptasa inversa fusionada con la nCas9 y emparejada con un ARN guía de edición principal (pegRNA), que especifica el sitio objetivo y que codifica la edición deseada. Los PEs pueden abordar todo tipo de mutaciones, como inserciones y eliminaciones, editar mutaciones a una mayor distancia del sitio PAM que los BE (Brooks et al., 2023; Zhao et al., 2023).

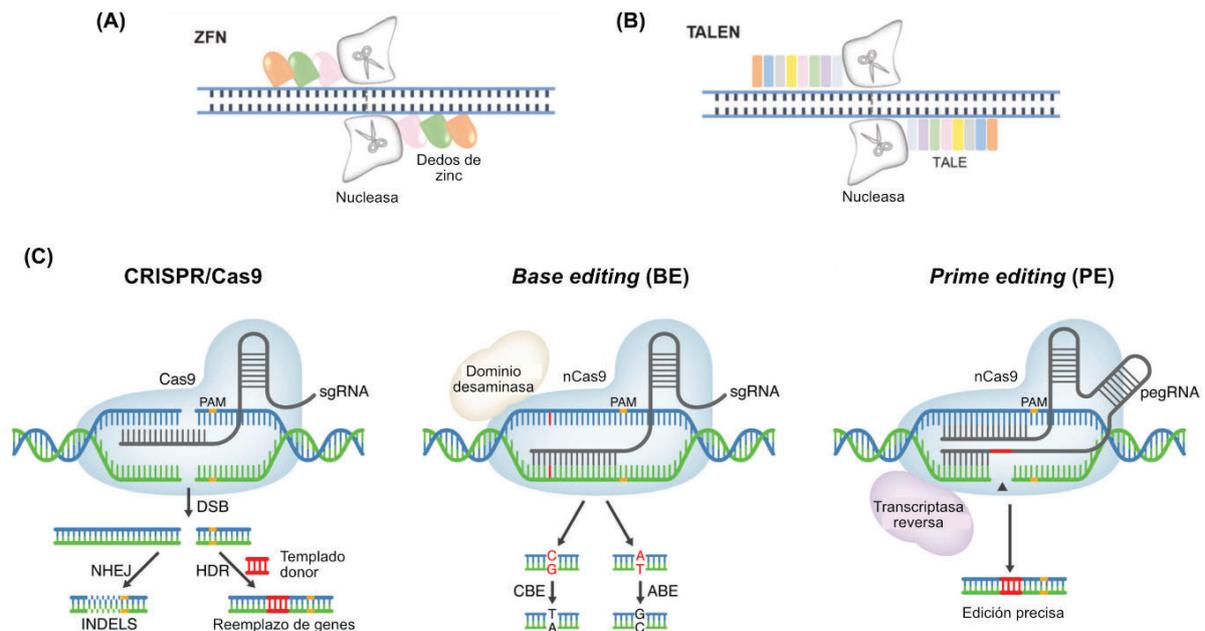


Figura 6. Plataformas de edición del genoma. (A) ZFN, (B) TALEN y (C) CRISPR/Cas9, BE y PE. ZFN y TALEN actúan *ex vivo*, mientras que CRISPR/Cas9 lo hace tanto *in vitro* como *in vivo*. Adaptado de: (H. Li et al., 2020; Nishiyama et al., 2021)

1.2.b. Historia de la terapia génica

La terapia génica ha emergido durante los últimos años como una de las áreas más prometedoras en el campo de la medicina moderna, como potencial tratamiento de enfermedades genéticas causadas por alteraciones en el ADN. El primer modelo de terapia génica se probó en ratones en la década de 1980, y en los años 90 se comenzaron a utilizar estrategias de terapia génica para tratar deficiencias inmunitarias y nutricionales con éxito limitado. Sin embargo, la noticia de la muerte de un paciente en un estudio clínico de terapia génica en la Universidad de Pensilvania en 1999, por complicaciones asociadas a una respuesta inmune contra el vector genético, sacudió el campo de la terapia génica y a las ciencias biomédicas (Sibbald, 2001). Si bien la terapia génica tuvo ciertas recaídas en su uso a lo largo del tiempo, ya sea por presentar ciertos problemas para la bioseguridad tanto del paciente como del científico implicado en el desarrollo, un mayor conocimiento de la biología molecular de la célula y la propuesta tecnológica del sistema CRISPR/Cas9 en el año 2012 revitalizó nuevamente esta área. De hecho, el desarrollo de la terapia génica para enfermedades raras está cobrando un impulso significativo, ya que más del 80% de las enfermedades raras tienen una causa monogénica conocida (Arabi et al., 2022).

Algunos de los descubrimientos y eventos más importantes en el campo de la terapia génica se detallan en la **Figura 7**.

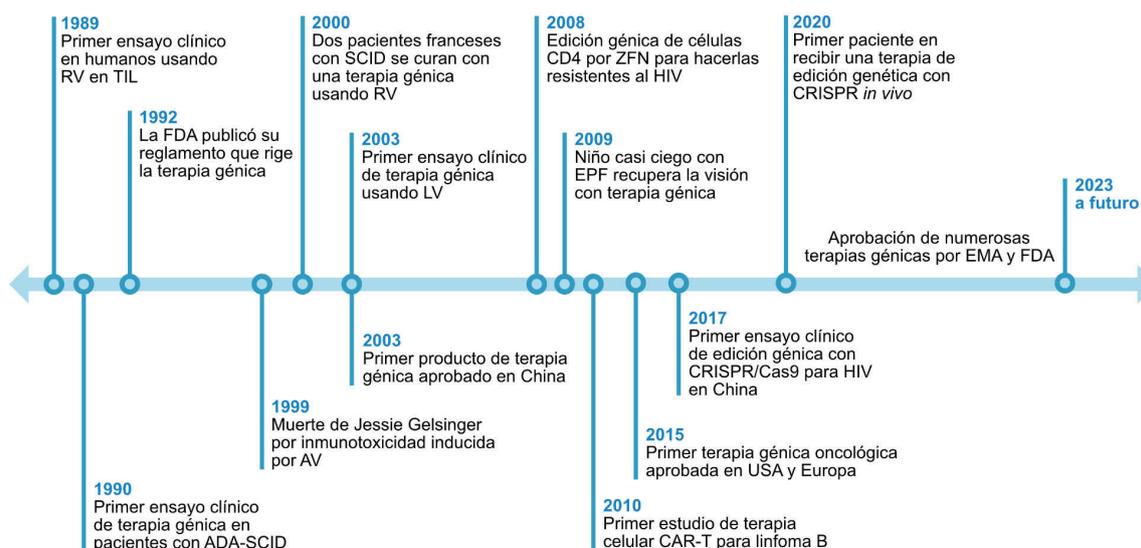


Figura 7. Línea del tiempo de los eventos clave en la historia de la terapia génica, entre 1998 y 2023. Creado en: BioRender. Abreviaciones: RV: Retrovirus, TIL: Tumor Infiltrating Lymphocytes, SCID-ADA: Severe Combined Immune Deficiency due to Adenosine Deaminase Deficiency, AV: Adenovirus, LV: Lentivirus, HIV: Human Immunodeficiency Virus.

A medida que las terapias génicas avanzan a través de los ensayos clínicos, cada vez más reciben la aprobación de la FDA y de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), demostrando una notable eficacia y seguridad en el abordaje de enfermedades hereditarias graves. En 2016, EMA dio su aprobación al primer producto de terapia génica *ex vivo*, Strimvelis. Un hito significativo se produjo en 2017 cuando la FDA otorgó la aprobación a dos productos de receptor de antígeno quimérico (CAR), Kymriah y Yescarta, allanando el camino para futuros desarrollos en el campo (Seimetz et al., 2019). En 2019, la FDA aprobó el fármaco más caro hasta la fecha, Zolgensma, un vector AAV indicado para la atrofia muscular espinal pediátrica. Desde entonces, el número de productos de terapia génica aprobados aumenta cada año (Danaeifar, 2022). Algunas de las terapias génicas y celulares aprobadas por EMA y FDA se detallan en la **Tabla I**.

Año de aprobación	Nombre comercial	Fabricante	Vector	Gen modificado	Tipo	Enfermedad tratada
2016	Strimvelis	Orchard Therapeutics	RV	ADA	<i>Ex vivo</i>	Inmunodeficiencia Combinada Severa por Adenosina Desaminasa
2016	Spinraza	Ionis Pharmaceuticals	ARN	AON SMN2	<i>In vivo</i>	Atrofia Muscular Espinal
2017	Kymriah	Novartis	LV	CD19 CAR	<i>Ex vivo</i>	Leucemia linfoblástica aguda de células B
2017	Yescarta	Kite Pharma	RV	CD19 CAR	<i>Ex vivo</i>	Linfoma no Hodgkin
2017	Luxturna	Spark Therapeutics	AAV2	RPE65	<i>In vivo</i>	Distrofia Retiniana Hereditaria

2019	Zolgensma	Novartis	AAV9	SMN1	<i>In vivo</i>	Atrofia Muscular Espinal
2020	Viltepso	NS Pharma	ADN	AON Distrofina	<i>In vivo</i>	Distrofia Muscular de Duchenne
2020	Tecartus	Kite Pharma	RV	CD19 CAR	<i>Ex vivo</i>	Linfoma de células del manto
2021	Abecma	Bluebird bio	LV	BCMA CAR	<i>Ex vivo</i>	Mieloma Múltiple
2023	Vyjuvek	Krystal Biotech	HSV-1	COL7A1	<i>In vivo</i>	Epidermólisis Ampollosa Distrófica
2023	Elevidys	Sarepta Therapeutics	AAV	DMD	<i>In vivo</i>	Distrofia Muscular de Duchenne
2023	Roctavian	BioMarin Pharmaceuticals	AAV5	Factor VIII	<i>In vivo</i>	Hemofilia A severa

Tabla I. Algunos ejemplos de productos de terapia génica aprobados por EMA y FDA, para el tratamiento de enfermedades genéticas y algunos tipos de cáncer (Arabi et al., 2022). Abreviaciones: RV: Retovirus, LV: Lentivirus, AAV: Virus adenoasociado, HSV: Herpes simplex virus.

La oncología y las enfermedades raras son las principales áreas de desarrollo de la terapia génica, siendo la modificación genética *ex vivo* la más utilizada (Gicquel et al., 2023). Según un análisis de Orphanet^{iv} sobre las enfermedades raras incluidas en registros, cohortes y bases de datos de pacientes, la fibrosis quística destaca como la enfermedad rara más representada (**Figura 8**).

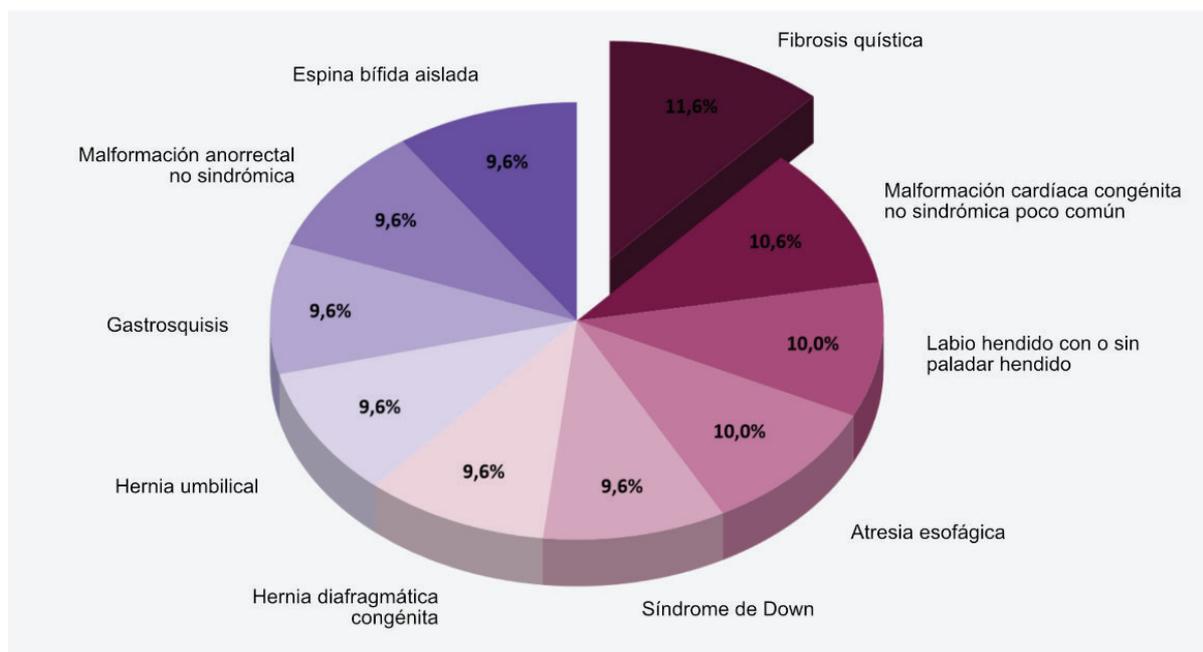


Figura 8. Proporción de las diez enfermedades o grupos de enfermedades raras con mayor número de registros de pacientes, cohortes y bases de datos. Adaptado de: Orphanet.

I. 3 SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE GENES TERAPÉUTICOS

En las aproximaciones *in vivo* de terapia génica, el desafío más importante radica en lograr un adecuado transporte de las secuencias terapéuticas dentro de las células consideradas como diana para el tratamiento. Este proceso implica superar diversas barreras biológicas que limitan la administración sistémica y la distribución adecuada de los genes, dependientes de la vía de administración y el tejido u órgano objetivo (Mitchell et al., 2021). La penetración de la membrana celular, el direccionamiento específico al núcleo y la activación del ADN exógeno representan los principales obstáculos en la terapia génica. A esto se suma la carga negativa y la baja solubilidad y estabilidad de los ácidos nucleicos, lo que hace imprescindible la búsqueda y desarrollo de sistemas de administración de genes eficientes y seguros a nivel celular, capaces de sortear estas barreras durante el proceso (Xu & Lu, 2006).

Existen dos clases generales de sistemas de administración comúnmente empleados en la terapia génica *in vivo* (**Figura 9**): los sistemas virales y los no virales. Los sistemas virales más utilizados derivan de adenovirus (AV), virus adenoasociados (AAV), retrovirus (RV) y lentivirus (LV); mientras que los sistemas no virales se pueden dividir en dos categorías: sistemas de administración física y sistemas de administración química a través de vectores sintéticos (Patil et al., 2019).

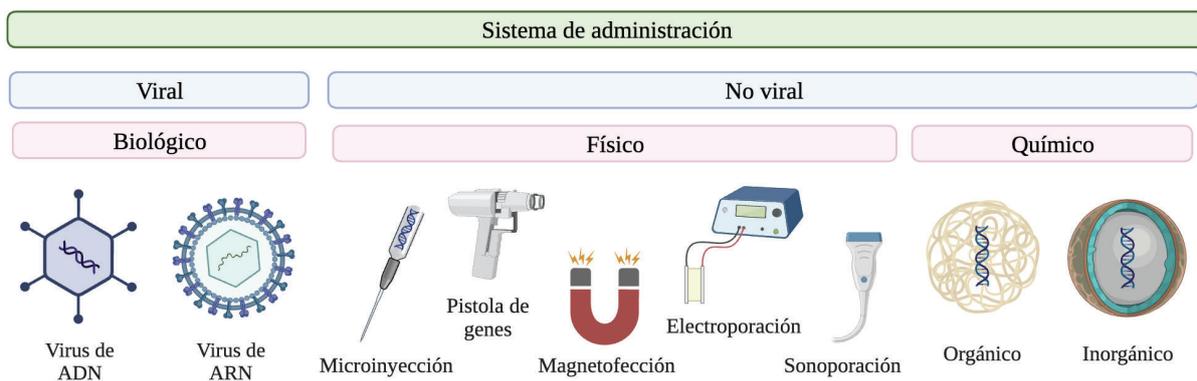


Figura 9. Clasificación de los sistemas de administración virales (biológica) y no virales (física y química). Creado en: BioRender.

I.3.a. Sistemas de administración biológica

Los sistemas biológicos de administración de genes están basados en el uso de virus modificados genéticamente para introducir material genético en células específicas. Se basan en la capacidad de los virus para infectar células vivas, y se han convertido en el método más eficiente de entrega de genes para el tratamiento de defectos genéticos, dado el gran poder de transducción que éstos evidencian (Goswami et al., 2019). El desarrollo de plataformas de vectores virales consiste en la reducción de los genomas de virus a sus secuencias funcionales mínimas, reemplazando los genes que causan virulencia por la secuencia del gen terapéutico. Por lo que a diferencia de los virus, los vectores virales están diseñados para no causar enfermedad (Wirth et al., 2013). La generación de vectores virales es un campo en evolución y mejora, y se están desarrollando constantemente nuevas tecnologías y técnicas para mejorar la eficiencia y la seguridad de estos sistemas. Dentro de los métodos más comunes, se encuentran la transfección de células con plásmidos virales recombinantes y

la producción de virus recombinantes en células hospedadoras específicas (Manfredsson & Benskey, 2019).

Idealmente, los vehículos virales deben ser genéticamente estables, no inmunogénicos, seguros en su manipulación, no tóxicos para las células hospedadoras, y deben presentar una elevada capacidad de empaquetamiento y alta eficiencia de transducción. Éstos pueden clasificarse de acuerdo a su genoma en vectores de ADN, como los AV, AAV y poxvirus, y en vectores de ARN, como el RV y LV (Alnasser, 2021).

El tratamiento de enfermedades genéticas mediante terapia génica requiere de la expresión persistente de un transgen terapéutico en la célula diana. En células quiescentes, el vector de ADN puede mantenerse estable de manera extracromosómica como plásmido episomal en el citoplasma celular, sin la necesidad de integrarse al genoma celular. Sin embargo, para evitar que el ADN no integrado se diluya en las células mitóticamente activas, es necesario que el vector se integre al genoma de las mismas (Kotterman et al., 2015). En este sentido, los vectores virales poseen la capacidad de transducir tanto células en división como quiescentes; además, los retrovirus y lentivirus (de genoma ARN simple cadena), poseen la capacidad de integrarse al genoma de la célula transducida. Esta característica limita su aplicación a únicamente terapias génicas *ex vivo*, debido a problemas de seguridad como la fuerte inmunogenicidad y la posibilidad de recombinación de genes con el genoma celular, ocasionando mutagénesis por inserción y carcinogénesis (Nyamay'Antu et al., 2019).

Además de los efectos secundarios mencionados, el uso de vectores virales como vehículo de transporte se encuentra limitado por la generación de inmunidad preexistente que impide administraciones repetidas del vector, la falta de especificidad de direccionamiento provocando efectos *off-target* no deseados en células no diana, el tamaño del gen terapéutico transportado, la incapacidad de producir títulos elevados del virus modificado, y los altos costos de su producción (A. Li et al., 2011).

A continuación, en la **Figura 10**, se resumen los sistemas de administración virales más utilizados en terapia génica (Manfredsson & Benskey, 2019).

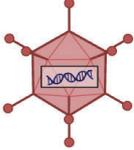
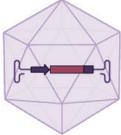
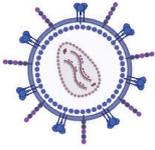
	Adenovirus	Virus adenoasociado	Retrovirus	Lentivirus
				
Tamaño	90 - 100 nm	18 - 26 nm	80 - 100 nm	80 - 100 nm
Genoma	ADNdc	ADNsc	ARNsc	ARNsc
Capacidad	8 - 36 kb	5 kb	10 kb	8 kb
Transducción celular	Células quiescentes y mitóticas	Células quiescentes y mitóticas	Células mitóticas	Células quiescentes y mitóticas
Integración	No integrativo	No integrativo	Integrativo	Integrativo
Expresión	Transitoria	Estable	Estable	Estable
Inmunogenicidad	Alta	Baja	Moderada - alta	Moderada - alta
Terapia génica	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i>	<i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo</i>

Figura 10. Descripción y características de los vectores virales más usados en terapia génica. Abreviaciones: dc: doble cadena, sc: simple cadena. Creado en: BioRender.

Si bien los plásmidos desnudos o sus derivados ADNdc CCC y ADNdc LCC son capaces de transfectar células *in vitro*, su eficacia es limitada debido a la baja internalización celular atribuida a su carga polianiónica (Nyamay'Antu et al., 2019). En tal sentido, para superar éste desafío se han desarrollado una variedad de vectores no virales basados en métodos físicos o químicos para introducir el material genético en una célula.

1.3.b. Sistemas de administración física

Los sistemas de administración física de genes se basan en la alteración de la membrana celular mediante fuerzas físicas para promover la entrada de plásmidos desnudos al interior celular. A diferencia de los vectores biológicos, estos métodos normalmente dan lugar a eficiencias de transfección más altas, pero solo en el área local sometida a la fuerza física. Dentro de los métodos más comunes se encuentran la microinyección, la electroporación, la nucleofección, la administración de balística o “pistola de genes”, la sonoporación, y la magnetofección (**Figura 11**) (Sokolova & Epple, 2008). Cada una de estas técnicas tiene sus propias ventajas y desventajas en términos de eficiencia, seguridad y capacidad de carga de material genético; y la elección del método depende del tipo de células o tejidos que se están tratando, así como del objetivo específico de la manipulación genética (Chou et al., 2011).

La microinyección implica la inyección directa y dirigida del material genético en el núcleo de la célula utilizando una aguja micrométrica. La pistola de genes utiliza partículas de oro o tungsteno recubiertas de material genético que se disparan a alta velocidad mediante un cañón de gas para penetrar la membrana celular y llegar al citoplasma. Tanto la sonoporación como la electroporación se basan en la inducción de una permeabilidad transitoria mediante generación de poros en la membrana

celular para permitir la entrada del ADN en la célula, mediante la aplicación de ultrasonido de baja intensidad o de un campo eléctrico, respectivamente. La tecnología de nucleofección se basa en los mismos principios físicos que la electroporación, pero el material exógeno se entrega directamente al núcleo, siendo un método utilizado para células que son más difíciles de transfectar. La magnetofección utiliza nanopartículas magnéticas asociadas al material genético, las cuales son sometidas a un campo magnético externo para concentrarlas dentro de las células diana (Chou et al., 2011; Sum et al., 2014).

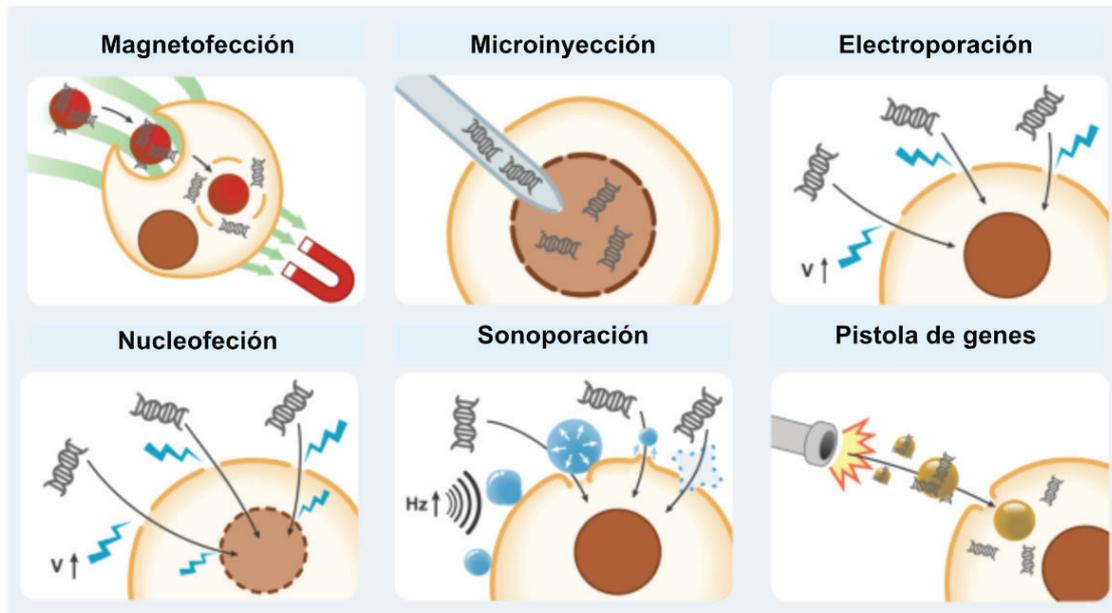


Figura 11. Métodos físicos de administración de genes utilizados en aproximaciones de terapia génica *in vitro*. Adaptado de: (Nóbrega et al., 2020).

La problemática que presentan los sistemas de administración física es que la mayoría no son aplicables para la transferencia de genes *in vivo*, debido a la necesidad de grandes cantidades de ADN y a la inaccesibilidad que presentan las células diana dentro del organismo para la manipulación directa. En vista de la dificultad de transfectar células *in vivo*, es que se ha avanzado en el campo de la nanotecnología para el desarrollo de vehículos de transporte sintéticos basados en nanomateriales de composición orgánica e inorgánica (Sayed et al., 2022).

1.3.c. Sistemas de administración química

La implementación de la nanotecnología en la administración de genes para la terapia génica ha supuesto un avance significativo hacia la medicina personalizada, ofreciendo nuevas posibilidades para el tratamiento de enfermedades que antes eran difíciles de abordar (Mirón-Barroso et al., 2021). Unos cuantos medicamentos basados en nanopartículas (NPs) ya han sido aprobados por la FDA en Estados Unidos y se están utilizando actualmente en pacientes, mientras que otros están progresando exitosamente hacia la etapa clínica (Anselmo & Mitragotri, 2015; Min et al., 2015).

Las NPs pueden ser ensambladas modularmente a partir de diferentes composiciones de materiales blandos (orgánicos) o duros (inorgánicos), con diferentes propiedades físicas y químicas.

Esta síntesis puede llevarse a cabo mediante dos enfoques principales: *bottom-up* o *top-down*. En el enfoque *bottom-up*, se parte de especies moleculares o iónicas que se van coordinando entre ellos mediante reacciones químicas para formar el nanomaterial deseado; mientras que en el enfoque *top-down* se comienza con un material *bulk*, y mediante métodos como molienda, litografía o deposición, se lo va reduciendo hasta obtener la nanoestructura deseada (Sharma et al., 2015). Tal flexibilidad en la libertad de diseño, sumado a la facilidad en la modificación de su superficie con una variedad de ligandos para el direccionamiento biológico, permite la adaptación de las NPs para aplicaciones intracelulares específicas como vehículos de administración de fármacos (**Figura 12**) (T. Sun et al., 2014).

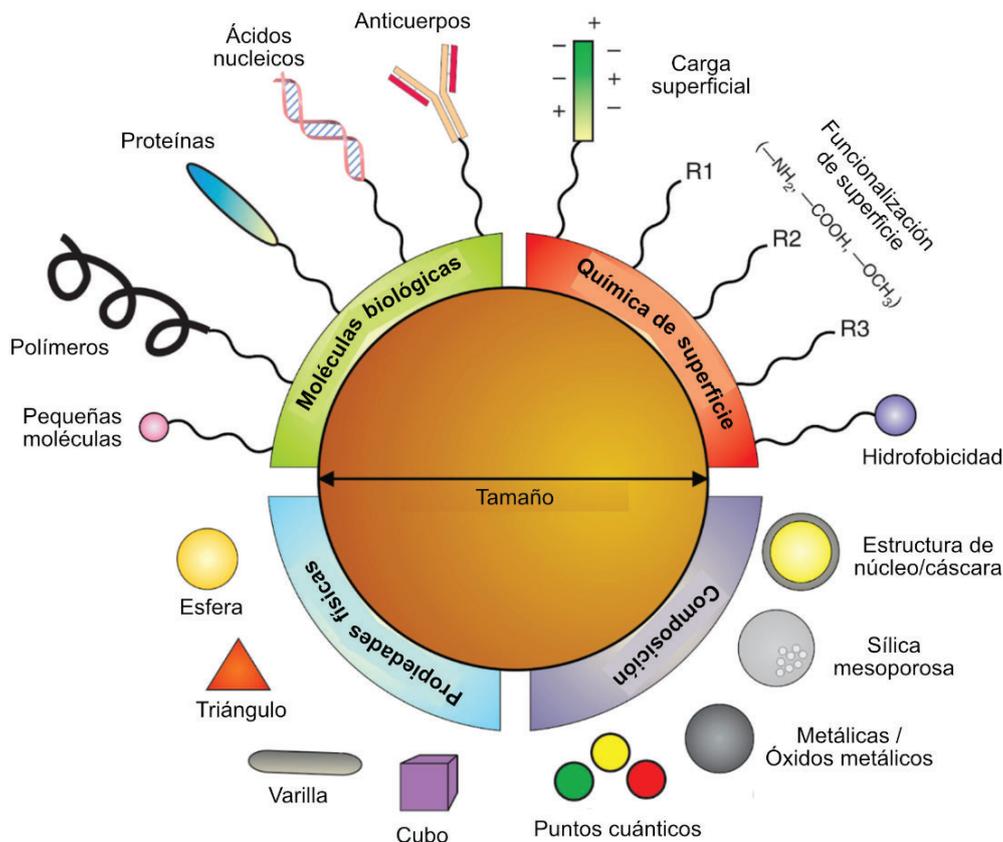


Figura 12. Representación esquemática de las características esenciales de los nanomateriales que influyen en la absorción celular y la posterior interacción con los componentes celulares, y permiten una entrega mejorada. La composición material, la química superficial y las propiedades físicas se pueden modificar en diseños inteligentes para adaptar la plataforma a una aplicación específica, junto con la posibilidad de funcionalización de la superficie de las NPs con ligandos biológicos específicos o grupos funcionales. Adaptado de: (Patel & Lee, 2015)

Las propiedades más importantes para el uso de NPs como vehículos de administración de fármacos son la biocompatibilidad y la biodegradabilidad de las mismas, así como el aumento en la biodisponibilidad de material genético, la posibilidad de control de la liberación de fármacos mediante diferentes estímulos, y la entrega efectiva a los sitios de destino; lo que resulta en una mayor eficacia terapéutica y en una reducción de efectos secundarios (Lim et al., 2013). La eficiente carga y liberación de los genes terapéuticos depende de la capacidad de carga del nanoportador y de las

interacciones electrostáticas entre las NPs y los ácidos nucleicos altamente cargados. Por ello, suelen utilizarse nanoportadores con carga positiva, donde los componentes catiónicos básicos son capaces de interactuar con el esqueleto-fosfato aniónico de los ácidos nucleicos, lo que permite su conjugación directa en la superficie de las NPs o su encapsulación en su interior (T. Sun et al., 2014).

Dentro de las propiedades físicas de las NPs, el tamaño desempeña un papel crucial en su comportamiento durante la entrega de genes, ya que se busca un equilibrio entre un tamaño más grande que facilite una circulación prolongada en la sangre y un tamaño más pequeño que permita una internalización eficiente en las células, dentro del rango de 1 a 100 nm. No obstante, resulta difícil determinar un rango de tamaño de partícula óptimo para lograr una eficiencia de transfección ideal dado que el efecto del tamaño varía considerablemente según la vía de captación celular y el tipo de vector. La forma de las NPs también ha demostrado influir en su internalización por células, siendo que las formas esféricas son captadas con mayor eficiencia. Sin embargo, las NPs más alargadas circulan más tiempo y evitan la fagocitosis con mayor eficacia que las partículas esféricas. Por su parte, el potencial zeta se utiliza para caracterizar la carga superficial, y se encuentra influenciado por su composición así como por el medio en el que se suspende la nanopartícula. Aquellas con potencial zeta neutro o ligeramente negativo evitan interacciones electrostáticas no específicas y reducen la eliminación por parte del sistema retículo-endotelial, mientras que un potencial zeta positivo favorece la absorción e internalización celular de las NP (Sunshine et al., 2011; Zu & Gao, 2021).

Para maximizar la eficacia terapéutica, minimizar la dosis y reducir los efectos secundarios fuera del objetivo, un sistema de administración ideal debe dirigir los ácidos nucleicos sólo a las células que requieren el tratamiento. La ingeniería de la superficie de nanoportadores sintéticos mediante la funcionalización con ligandos biológicos permite desarrollar sistemas específicos con la capacidad de dirigirse selectivamente al sitio de acción (Kasina et al., 2022). Además, al recubrir la superficie con polímeros hidrofílicos como poli(etilenglicol) (PEG), se evita la adsorción de proteínas plasmáticas y la captación por macrófagos, protegiéndolos del aclaramiento sanguíneo rápido. Los polisacáridos también pueden ser utilizados como recubrimientos sigilosos, al evitar la activación del sistema del complemento y la opsonización (Spirescu et al., 2021; Suk et al., 2016). Gracias a su alta superficie activa en comparación con su pequeño volumen, las NPs no solo se destacan como excelentes transportadores de biomoléculas terapéuticas, sino que de acuerdo a su composición también presentan características intrínsecas que permiten su seguimiento intracelular y su utilización con fines diagnósticos (Gessner & Neundorf, 2020).

En resumen, el uso de NPs como plataforma para la administración de genes ofrece una matriz infinita de posibilidades con un enorme potencial en el campo de la medicina y la terapia génica. Gracias a su capacidad de ser sintetizadas y ensambladas en diversas geometrías y configuraciones, y al poder ser recubiertas con agentes de orientación, se vuelven versátiles para aplicaciones en etiquetado molecular y celular, detección, administración dirigida de fármacos, e imágenes médicas *in vivo* con alta sensibilidad y funcionalidad (Chou et al., 2011). Aunque han demostrado una prometedora eficacia como vehículos de transporte de medicamentos o material genético, hay menos NPs en uso clínico de lo que uno podría predecir en base a los amplios estudios preclínicos. Esta disparidad se atribuye principalmente a la toxicidad potencial originada por mecanismos que aún no se comprenden completamente, una preocupación particularmente relevante para las NPs administradas en tratamientos crónicos (T. Wu & Tang, 2018).

1.3.c.i. Nanoportadores orgánicos

Los nanoportadores orgánicos se clasifican según su composición básica en lípidos, polímeros y péptidos catiónicos (**Figura 13**) (Sum et al., 2014). La carga neta positiva de los mismos es aprovechada para lograr la complejación del vector con el esqueleto-fosfato aniónico de los ácidos nucleicos por medio de interacciones electrostáticas, logrando una condensación del ADNp a una escala adecuada para la internalización (Sunshine et al., 2011). A comparación con los sistemas virales, los vectores sintéticos presentan numerosas ventajas como su biodegradabilidad, baja inmunogenicidad, mayor simplicidad y reproducibilidad en su fabricación, y mayor capacidad de carga pudiendo administrar genes de mayor peso molecular (Senapati et al., 2019). No obstante, esta carga catiónica también puede generar una elevada citotoxicidad celular, baja eficiencia de transfección, menor liberación de ADN y transporte reducido a través del citoplasma (Balcomb et al., 2015).

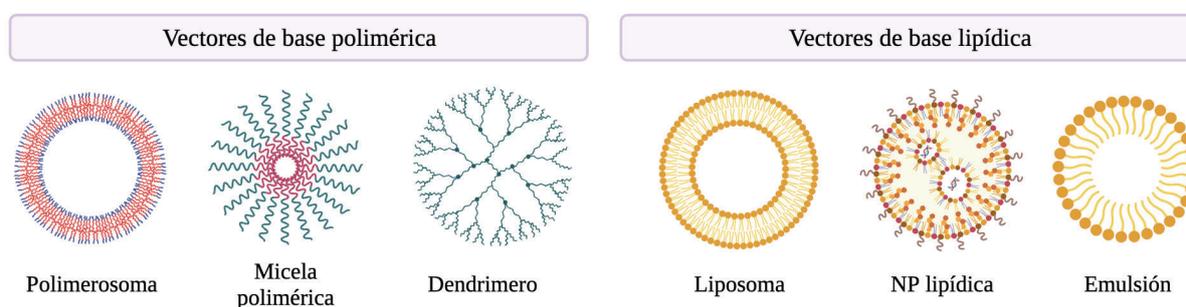


Figura 13. Esquema representativo de las clases de vectores orgánicos de base polimérica y lipídica. Creado en: BioRender.

A continuación, se destacan los nanoportadores orgánicos más utilizados en terapia génica.

Vectores de base polimérica

Los polímeros son macromoléculas compuestas por una o varias unidades químicas conocidas como monómeros, que se repiten a lo largo de toda la cadena. En particular, los polímeros catiónicos contienen una alta densidad de grupos amina, que al protonarse a pH neutro les permite la interacción electrostática con el ácido nucleico aniónico, dando la formación de estructuras denominadas *poliplex* (Sunshine et al., 2011).

La gran diversidad química, la elevada capacidad de carga y el potencial de funcionalización de los *poliplex* ofrece una alternativa atractiva para el desarrollo de sistemas de administración no virales para fines terapéuticos. Los vectores de base polimérica se clasifican en dos grandes categorías: nanoesferas compuestas por sistemas de matriz polimérica sólida, y nanocápsulas formadas por una cavidad rodeada por una membrana polimérica. Por lo tanto, dado que los productos terapéuticos pueden tanto unirse a la superficie o conjugarse químicamente con el polímero, como encapsularse dentro de la matriz polimérica, son capaces de entregar una variedad de biomoléculas en cuanto a tamaño e hidrofobicidad (Weng et al., 2020).

Los sistemas poliméricos pueden sintetizarse a partir de materiales naturales o sintéticos. Los polímeros sintéticos incluyen la poli(etilenimina) (PEI), la poli(L-lisina) (PLL), la poli(amidoamina) (PAMAM) y la poli[(2-dimetilamino)etil metacrilato] (pDMAEMA). Si bien se encuentran dentro de

los vectores genéticos poliméricos más antiguos y más utilizados para terapia génica, presentan limitaciones para su aplicación *in vivo* debido a la elevada citotoxicidad y baja biocompatibilidad. En cambio, los polímeros naturales a base de carbohidratos como el quitosano o los polímeros de poli(β -amino ésteres) (PBAE), al ser biodegradables presentan una mayor biocompatibilidad y menor citotoxicidad que los sintéticos (Zu & Gao, 2021). La eficiencia de transfección de los mismos suele depender del peso molecular, el grado de ramificación, el potencial zeta y el tamaño de los polímeros.

Además, son capaces de formar estructuras de micelas, dendrímeros y polimerosomas (**Figura 13**). Los polimerosomas son vesículas artificiales formadas por una membrana compuesta por copolímeros anfífilos, mientras que las micelas poliméricas resultan del autoensamblaje de copolímeros en nanoesferas de núcleo hidrofílico y un revestimiento hidrofóbico, ambos protegiendo al cargo en su interior. Los dendrímeros presentan una arquitectura tridimensional esférica bien definida, compuesta por polímeros hiperramificados y simétricos, con una elevada densidad de grupos funcionales en su superficie. Un ejemplo es el dendrímero de PAMAM, compuesto por un núcleo central de aminas terciarias que proporcionan una capacidad amortiguadora favorable para el escape endosomal, un esqueleto de amida formado por unidades repetitivas del polímero radiales y concéntricas al núcleo, y aminas primarias como grupos funcionales que permiten la interacción con el ADN y la captación celular. La posibilidad de realizar modificaciones específicas en la superficie del dendrímero permite aumentar la eficiencia de transfección, y limitar la citotoxicidad. Sin embargo, la biocompatibilidad depende de la naturaleza estructural, siendo la carga superficial, el tamaño y la concentración los parámetros más críticos (Mitchell et al., 2021).

Vectores de base lipídica

Los lípidos son biomoléculas compuestas por un grupo de cabeza hidrofílico ionizable, comúnmente formado por grupos fosfato y amina, y un dominio hidrofóbico de cadenas alifáticas saturadas o insaturadas, colesterol o anillos de esteroides. Ambos dominios se encuentran unidos entre sí por un conector, cuya naturaleza de enlace (éster, éter, amida o carbamato) determina la flexibilidad, la estabilidad y la biodegradabilidad del lípido catiónico (Yin et al., 2014). Los lípidos ionizables, al ser neutros a pH fisiológico, presentan una citotoxicidad e inmunogenicidad reducida.

La formación de lipoplex es un proceso entrópico impulsado por el autoensamblaje de los mismos, que a pH bajo se protonan adquiriendo carga positiva, en una vesícula que protege al ácido nucleico cargado negativamente en su interior. La proporción de carga nitrógeno a fosfato (N+/P-) debe ser mayor a la unidad (es decir, un exceso de lípidos respecto al ADN) para permitir la completa complejación del ADN a través de fuerzas electrostáticas, formando lipoplexes discretos que se separan por repulsión electrostática, evitando así su agregación en solución (Sum et al., 2014). La naturaleza lipídica de este sistema de administración facilita su internalización celular mediante fusión de la envoltura liposomal con la membrana plasmática, por medio de interacciones hidrofóbicas.

Los lipoplexes suelen estar presentes como liposomas, NPs lipídicas sólidas o emulsiones lipídicas. Los liposomas son vesículas esféricas de tamaño nanométrico compuestas por una bicapa lipídica de fosfolípidos y esteroides, y un núcleo central acuoso. Gracias a su composición, los liposomas pueden encapsular tanto compuestos hidrofílicos (en la cavidad acuosa interna), lipofílicos (en la bicapa lipídica) como anfífilos (en la interfaz de la bicapa). Las NPs lipídicas (LNPs) se diferencian de las anteriores por la capacidad de formar estructuras micelares dentro del núcleo de la partícula. Son nanoportadores sólidos compuestos por un núcleo lipídico y una monocapa de tensioactivo que lo estabiliza de la dispersión acuosa. En este caso, los lípidos más utilizados para su síntesis son los triglicéridos, los ácidos grasos y los fosfolípidos. La estabilidad de las mismas es

mayor que la de los liposomas, dado que se mantienen sólidas tanto a temperatura ambiente como corporal. Por otra parte, las nanoemulsiones lipídicas son dispersiones de una fase oleosa y otra acuosa estabilizadas por un tensioactivo. Las nanoemulsiones pueden ser de aceite en agua (O/W, *Oil/Water*), donde las gotas de aceite se dispersan en la fase acuosa, o de agua en aceite (W/O, *Water/Oil*) siendo las gotas de agua que se dispersan en la fase oleosa (Plaza-Oliver et al., 2021).

Respecto a los nanoportadores de base polimérica, los sistemas lipídicos ofrecen muchas ventajas, incluida una mayor estabilidad, mayor biodisponibilidad, simplicidad en su formulación, mejora en la solubilidad de compuestos poco solubles en agua, y menor toxicidad. Sin embargo, los lípidos catiónicos presentan ciertas limitaciones como sistema de administración, dado que presentan un rápido aclaramiento renal, una baja eficiencia de encapsulación de moléculas hidrofílicas, y costos elevados de producción (Mitchell et al., 2021).

Vectores de base peptídica

Los péptidos son cadenas cortas de residuos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, cuya carga neta se encuentra determinada por los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos que lo componen. Los péptidos compuestos por repeticiones de aminoácidos cargados positivamente, como poli(L-lisina), poli(L-arginina) y poli(L-glutamato), han sido utilizados para la administración de genes debido a que permiten una eficiente condensación del ADN por su alta densidad de carga positiva (Zu & Gao, 2021). La interacción mediada por fuerzas electrostáticas, y en algunos casos por enlaces covalentes, permite la formación de los denominados *peptiplex*.

Debido a su naturaleza biodegradable, su biocompatibilidad, y su citotoxicidad e inmunogenicidad reducidas, varios péptidos funcionales han sido incorporados en diferentes vectores sintéticos para superar numerosas barreras durante el proceso de administración (detalladas en la siguiente sección). Por ejemplo, los péptidos dirigidos a células (como el péptido RGD) permiten lograr una administración dirigida mediante el reconocimiento de receptores de superficie celular, mientras que los péptidos de penetración celular (CPP) pueden moverse fácilmente a través de las membranas celulares, y permiten una captación celular mejorada. Por otro lado, los péptidos endosmolíticos (como los péptidos fusogénicos y ricos en histidina) son útiles para el escape endosomal; y los péptidos de señal de localización nuclear (NLS) permiten dirigir el vector al núcleo de la célula (Sum et al., 2014).

1.3.c.ii. Nanoportadores inorgánicos

Los nanoportadores inorgánicos son una herramienta emergente y prometedora en el campo del suministro terapéutico debido a sus propiedades y estructuras únicas. A diferencia de los nanoportadores orgánicos, estos nanomateriales nanoestructurados pueden ser formulados con mayor precisión a partir de materiales duros o inorgánicos, lo que permite el diseño de una amplia variedad de tamaños, geometrías y superficies. Además, presentan propiedades eléctricas, magnéticas y ópticas excepcionales, derivadas del propio material base a escala nanométrica, que se pueden ajustar en función de su tamaño y forma (Bayda et al., 2018; Gessner & Neundorf, 2020). Su mayor estabilidad química, menor riesgo de toxicidad y menor degradación en el cuerpo contribuyen a prolongar su tiempo de circulación y aumentar la eficacia de la administración. Sumado a esto, poseen una capacidad de carga superior debido a su estructura cristalina y mayor densidad de carga superficial, lo que les permite cargar y transportar una mayor cantidad de genes o fármacos en una sola partícula.

Estas ventajas convierten a las NPs inorgánicas en una opción atractiva para el desarrollo de nuevas estrategias de suministro terapéutico (Zu & Gao, 2021).

Todas las NPs inorgánicas comparten una estructura típica de núcleo/cáscara. El núcleo central determina las propiedades de la nanopartícula, mientras que la cubierta protege al núcleo de las interacciones químicas con el ambiente externo y sirve además como sustrato para la conjugación con biomoléculas, tales como anticuerpos, proteínas y oligonucleótidos (Núñez et al., 2018). En general los materiales se clasifican de acuerdo a su composición química en metales, óxidos de metales, carbono, sílica, y arcillas (**Figura 14**).

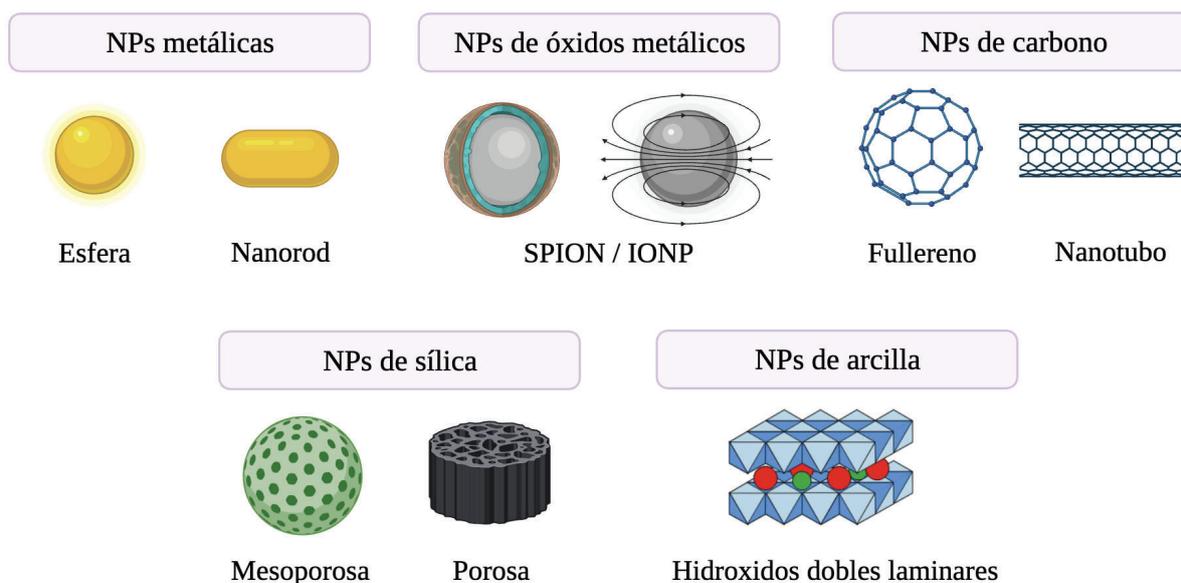


Figura 14. Esquema representativo de las clases de vectores inorgánicos. Creado en: BioRender.

A continuación, se destacan los nanoportadores inorgánicos más utilizados en terapia génica.

Nanopartículas metálicas

Las NPs metálicas incluyen NPs compuestas por metales nobles como oro (AuNP), plata (AgNP), platino (PtNP), paladio (PdNP), entre otros. Por lo general, se preparan mediante la reducción de las sales metálicas correspondientes a su estado elemental en presencia de un agente reductor, y se agrega un estabilizante adecuado que mantiene las NPs en solución y evita la agregación al proporcionar fuerzas repulsivas para el control del crecimiento de las mismas (Sunshine et al., 2011). Las propiedades ópticas y las características de resonancia plasmónica superficial de las AuNPs (dependientes del tamaño y la forma), así como a su alta estabilidad química, ha permitido su utilización en el desarrollo de sistemas teranósticos, que integran el diagnóstico, la imagenología y la terapéutica para mejorar la efectividad de la terapia (Najahi-Missaoui et al., 2020). Su formulación con alta precisión y monodispersidad hace que puedan adoptar diversas formas y tamaños, como esferas, varillas o decaedros; y la facilidad de modificar su superficie permite su conjugación con una amplia gama de moléculas orgánicas para mejorar su estabilidad y especificidad. Con un tamaño típico ultra pequeño de 10-20 nm y baja citotoxicidad, las AuNPs funcionalizadas con ligandos biológicos son especialmente útiles en la transfección y administración dirigida de genes a través del complejo de

poro nuclear (Mirón-Barroso et al., 2021). En particular, las AuNP se destacan por exhibir propiedades fototérmicas, dado que poseen electrones libres en su superficie que oscilan continuamente a una frecuencia determinada por su tamaño, lo que permite su uso en aplicaciones biomédicas como el tratamiento del cáncer (Mitchell et al., 2021).

Nanopartículas de óxidos metálicos

Las NPs de óxido de hierro (IONP o SPION, por sus siglas en inglés) han ganado gran interés en los últimos años debido a sus propiedades superparamagnéticas. El núcleo de las mismas está formado por moléculas metálicas de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita (Fe_2O_3) sintetizadas comúnmente por coprecipitación, y su superficie se suele modificar revistiendo el núcleo con polímeros orgánicos (dextrano, alginato y PEG, entre otros) con el fin de mejorar su biocompatibilidad, disminuir la toxicidad y proporcionar estabilidad en condiciones fisiológicas (Núñez et al., 2018). Debido a su capacidad de responder a un campo magnético externo, las SPIONs son utilizadas comúnmente como nanoportadores para la administración dirigida de genes a través de magnetofección, como potenciadores de contraste para imágenes de resonancia magnética, y en hipertermia magnética anticancerígena, reparación de tejidos e inmunoensayos (Gupta & Gupta, 2005). En cuanto a la toxicidad de las SPIONs, se ha demostrado que los iones de hierro liberados por estas nanoestructuras se incorporan al metabolismo celular natural, lo que disminuye las preocupaciones sobre su toxicidad (Gessner & Neundorff, 2020).

Nanopartículas de carbono

Los nanotubos de carbono (CNT), los nanomateriales derivados del grafeno y los fullerenos son parte de una familia de nanoestructuras basadas en carbono. Al ser un material natural, las NPs de carbono pueden formarse en la naturaleza como resultado de la erosión de materiales geológicos, así como de la descomposición de materiales biológicos, principalmente residuos vegetales. También pueden sintetizarse mediante una variedad de métodos físicos que incluyen ablación con láser, descarga de arco, evaporación del carbón grafito, o deposición química de vapor (CVD) (Weber et al., 2008). Los fullerenos son la tercera forma alotrópica de carbono, en la que los átomos de carbono adoptan la forma de una esfera o elipse regular y hueca, pudiendo variar en forma y tamaño. La estructura más estable es la del fullereno C60, formada por 60 átomos de carbono con simetría icosaédrica unidos por dos tipos de enlaces: C5-C5 simple en las caras pentagonales y C5=C6 doble en las caras hexagonales (Goodarzi et al., 2017). Los CNT, en cambio, son estructuras cilíndricas compuestas de átomos de carbono con enlace sp^2 dispuestos en láminas enrolladas, con diámetros de unos pocos nanómetros y longitudes de hasta 1 mm. Teniendo en cuenta el número de capas que forman la pared de los nanotubos, los CNT se dividen en: de pared simple (SWCNT) y de pared múltiple (MWCNT) (Sajid et al., 2016).

Las NPs basadas en carbono se caracterizan por presentar una excelente biocompatibilidad, una elevada relación superficie/volumen, una buena conductividad térmica y eléctrica, elevada resistencia mecánica y propiedades ópticas. Han encontrado aplicación en la nanomedicina y nanoelectrónica como biosensores, en la administración y liberación controlada de fármacos, y en aplicaciones de ingeniería de tejidos (Zhou et al., 2017). Una de las múltiples ventajas de usar CNT como sistemas de administración es la gran capacidad de carga en comparación con los nanomateriales de forma esférica. Su forma de aguja también puede permitir la penetración de las membranas celulares con mayor facilidad, y su capacidad para absorber luz en una longitud de onda infrarroja es de gran utilidad para el seguimiento de la entrega y para la obtención de imágenes (Negri et al., 2020). Sin embargo, también presentan desafíos en términos de su toxicidad, ya que son coloidalmente inestables en solución acuosa debido a su hidrofobicidad. Estrategias como la funcionalización de la superficie de los CNT con polímeros o grupos amina han demostrado mejorar su hidrofiliidad y

solubilidad en agua, permitiendo a su vez la formación de complejos iónicos con ácidos nucleicos para aplicaciones de administración de genes. No obstante, dado que los nanotubos de carbono no son biodegradables, su destino dentro de una célula no está claro, y requieren ser excretados por mecanismos adecuados sin degradación (Lisik & Krokosz, 2021).

Nanopartículas de sílica

Como componente principal de la arena, la sílice es conocida por su compatibilidad en sistemas biológicos. En las últimas décadas, se han utilizado una amplia variedad de nanoestructuras basadas en sílice en diversas aplicaciones biomédicas (Mirón-Barroso et al., 2021). Las NPs de sílice mesoporosa (MSN) han recibido un interés particular en el contexto de la administración de fármacos, atribuido principalmente a la presencia de poros bien definidos a nanoescala, que permiten una mayor capacidad de carga de las moléculas terapéuticas y una cinética de liberación controlada en respuesta a estímulos internos o externos. Además, la capacidad de generación de imágenes se puede integrar fácilmente en los MSN para monitorear y guiar el proceso terapéutico (Chen et al., 2019). Durante el proceso de síntesis mediante reacciones sol-gel en soluciones acuosas, se puede controlar con éxito el tamaño de partícula, la forma, la porosidad y la química de la superficie de las MSN. La alta densidad de grupos silanol superficiales también permite una fácil funcionalización con una amplia diversidad de ligandos biológicos (Wang et al., 2015). A pesar de sus muchas ventajas, se ha observado que algunas MSN pueden activar macrófagos y producir citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno, lo que destaca la importancia de optimizar su diseño y funcionalización para reducir cualquier posible toxicidad. Por ejemplo, el severo efecto hemolítico de los grupos silanol superficiales puede aliviarse mediante la modificación de polímeros (Nóbrega et al., 2020). A pesar que las NPs inorgánicas presentan una menor biocompatibilidad que las derivadas de lípidos o polímeros, se ha estudiado detalladamente el mecanismo de degradación de las MSN y se ha revelado el ácido silícico como un producto de degradación biocompatible y eliminable, lo que respalda su potencial uso seguro en aplicaciones biomédicas (Gessner & Neundorf, 2020).

Nanopartículas de arcilla

Los hidróxidos dobles laminares (LDH) constituyen una clase de materiales arcillosos aniónicos compuestos por una estructura de capas cargadas positivamente de hidróxidos metálicos, que a su vez contienen aniones de equilibrio de carga y moléculas de agua dentro de la capa intermedia. El método comúnmente utilizado para la síntesis de LDH es la coprecipitación rápida a pH variable o constante, seguido por un lavado y una reacción hidrotérmica controlada para dispersar los agregados de LDH en pequeños cristallitos individuales (Xu et al., 2006). A diferencia de la mayoría de las NPs inorgánicas, que requieren premodificaciones químicas y/o biológicas para obtener propiedades deseables para la entrega celular, la propiedad de intercambio aniónico de las LDH permite la carga directa de una variedad de biomoléculas cargadas negativamente (como el ADN, proteínas, vitaminas, y azúcares); y, aunque esta intercalación disminuye su carga superficial generalmente positiva, siguen siendo lo suficientemente cargados positivamente como para facilitar la captación celular. Esto ha abierto la posibilidad de utilizar estas NP en la administración de fármacos y genes, con una alta biocompatibilidad y una liberación controlada a una velocidad que depende del pH y la fuerza iónica del medio circundante (Sunshine et al., 2011). Además, las LDH se disuelven durante la acidificación del endosoma, amortiguando el pH endosómico y facilitando el escape al citoplasma para alcanzar eficiencias de transfección superiores y permitiendo su eliminación de las células en forma iónica (Ladewig et al., 2009). Debido a estas características, las LDH están bien posicionadas para superar algunos obstáculos que suelen dificultar la entrega exitosa.

1.3.c.iii. Toxicidad de las nanopartículas

El avance en la ingeniería de NPs con aplicaciones biomédicas significativas ha abierto nuevas oportunidades y desafíos para el campo de la farmacología y la terapéutica. Estos nanomateriales tienen el potencial de convertirse en pilares fundamentales para el desarrollo de dispositivos innovadores, que serán utilizados para la entrega de fármacos, la identificación de biomarcadores y el diagnóstico molecular (Medina et al., 2007). Sin embargo, el desafío principal de la implementación de la nanotecnología en este campo recae en la toxicidad de las NPs.

A diferencia de las NPs poliméricas o lipídicas, las NPs inorgánicas exhiben una mayor solubilidad, lo que les permite disolverse tras la exposición. La persistencia de nanomateriales excipientes en el cuerpo humano todavía plantea preocupaciones en términos de toxicidad, y estudios han demostrado la capacidad de las NPs para acumularse en las células e inducir toxicidad específica de órganos, dependiendo de la vía de administración y de su distribución sistémica (Weng et al., 2020). Sumado al aumento constante de la exposición humana no intencional a estas NPs, surge la necesidad de diseñar nanoportadores seguros y establecer pautas estrictas para su desarrollo con respecto a las pruebas de toxicidad (Najahi-Missaoui et al., 2020). Los mecanismos que median la toxicidad de las NPs en sus órganos diana incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño en el ADN, modificación de las estructuras y funciones de las proteínas y alteración de la integridad de la membrana. Las propiedades intrínsecas de las NPs que parecen facilitar estos mecanismos incluyen el tamaño, el área superficial, la carga superficial y el estado de agregación. De hecho, se ha comprobado que estas propiedades influyen significativamente en la distribución y el depósito de las NPs en diversos sistemas de órganos, así como en sus interacciones moleculares con distintas proteínas y macromoléculas presentes en el organismo (Elsaesser & Howard, 2012; Sharifi et al., 2012).

El desarrollo de un vector no viral eficaz y seguro es esencial para traducir la terapia génica a la práctica clínica, y el efecto citotóxico puede evaluarse cualitativamente mediante diferentes técnicas basadas en análisis microscópicos, así como cuantitativamente mediante un amplio espectro de kits colorimétricos de viabilidad celular disponibles (Sainz-Ramos et al., 2021). En este sentido, es imprescindible poseer un conocimiento completo de las propiedades fisicoquímicas y biológicas tanto del material genético como del portador utilizado, así como de la fisiología de las células diana y del proceso de transfección inducido por el vector a nivel molecular. Se sugiere que las estrategias de recubrimiento de superficies son fundamentales para disminuir el riesgo de toxicidad y mejorar eficacia de la nanotecnología utilizada. Estos recubrimientos con compuestos naturales modifican selectivamente las propiedades de las NPs y, si se eligen adecuadamente, pueden proporcionar biocompatibilidad y afectar el comportamiento y destino de las NPs después de su administración en sistemas biológicos complejos. Al alterar el estado de dispersión de las NPs mediante recubrimientos no covalentes, es posible mejorar su biodisponibilidad y reducir los posibles efectos toxicológicos, lo que resulta crucial para el desarrollo de nanoterapias seguras y efectivas (Najahi-Missaoui et al., 2020).

Hoy en día, la mayoría de los fármacos orientados a la terapia génica comercialmente disponibles utilizan virus recombinantes modificados en el laboratorio para transportar su carga genética. Sin embargo, en los últimos años ha habido un notable aumento en la investigación preclínica y en las publicaciones relacionadas con diversas estrategias de vectores no virales. Este enfoque ha demostrado ser un campo en rápida evolución con un gran potencial para el desarrollo de terapias génicas seguras y efectivas.

I. 4 BARRERAS BIOLÓGICAS PARA LA ENTREGA DE GENES

La baja eficiencia de transfección asociada con los sistemas de entrega no virales se atribuye directamente a las diversas barreras biológicas encontradas durante el proceso de entrega de genes. Las mismas se dividen en dos categorías (**Figura 15**): barreras extracelulares (EC) e intracelulares (IC) (Sum et al., 2014). Independientemente del método de entrega específico aplicado, la transferencia de genes a células de mamíferos debe lograr tres objetivos fundamentales: i) transportar el material genético exógeno a través de la membrana celular; ii) liberarlo dentro de la célula en el citoplasma o el núcleo y transportarlo al sitio de acción; y iii) activar el material genético al liberarlo de su complejo y prepararlo para su expresión o interacción con el genoma celular. Además, en los métodos de transferencia génica *in vivo*, deben también facilitar el traslado del ADN desde el sitio de administración hasta la superficie de las células objetivo (Ladewig et al., 2009).

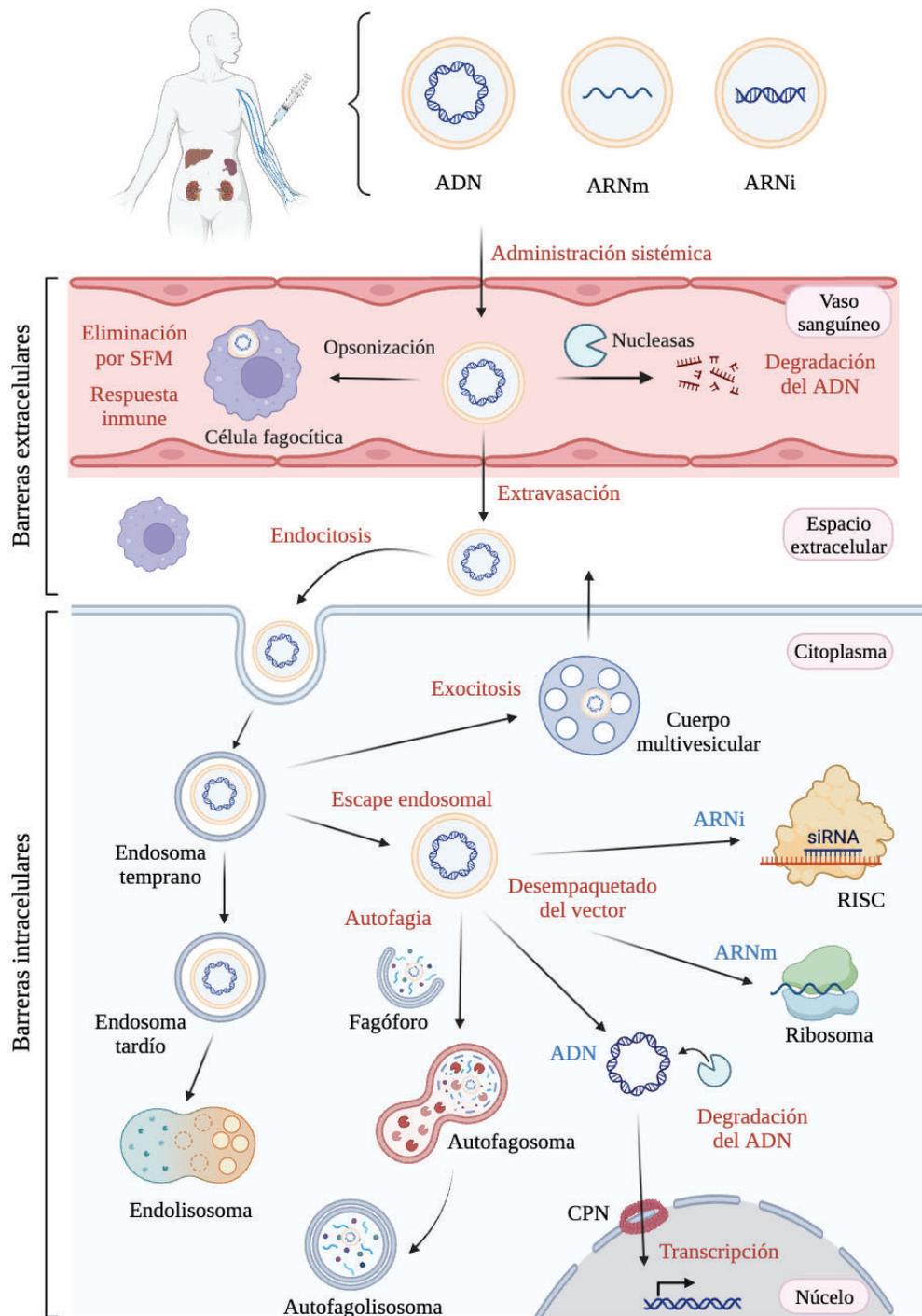


Figura 15. Esquema representativo de las barreras biológicas extra e intracelulares para los sistemas no virales de entrega de genes mediante administración intravenosa. Los ácidos nucleicos (ADN, ARNm y ARNi) suelen acomplejarse en NPs para su administración sistémica. Las barreras EC incluyen la eliminación a través del sistema fagocítico mononuclear (SFM) o aclaramiento renal, y la extravasación. Dentro de las barreras intracelulares, las NPs deben atravesar la membrana plasmática mediante vías endocíticas, escapar del endosoma y liberar su carga, evitando ser reciclado de regreso al medio EC. Una vez que se alcanza el citoplasma, las NPs internalizadas se enfrentan a la autofagia y la degradación citoplasmática. Finalmente, el ADN debe superar la envoltura nuclear para ser entregado al núcleo. Creado en: BioReneder.

1.4.a. Barreras extracelulares

Las barreras EC son aquellas que deben superarse desde el sitio de administración del vector hasta alcanzar la célula objetivo. Éstas dependen principalmente de la vía de administración, siendo la vía intravenosa la más empleada para la entrega de terapias génicas no virales. Tras la inyección, el vector ingresa directamente al sistema circulatorio, donde los ácidos nucleicos desprotegidos pueden ser fácilmente degradados por las endo y exonucleasas presentes en los fluidos fisiológicos y en el espacio extracelular (Weng et al., 2020). Se ha demostrado que la vida media del ADNp desnudo es de 10 minutos desde su administración sistémica en ratones (Kawabata et al., 1995), es por ello que su empaquetado en vectores sintéticos puede ofrecer protección contra las nucleasas y ayuda a prolongar el tiempo de circulación. Las propiedades fisicoquímicas de los vectores basados en NPs juegan un rol importante en la eficiencia en el direccionamiento, la biodistribución, la eliminación y la toxicidad a nivel de órganos y sistemas (T. Sun et al., 2014).

En general, una carga superficial positiva favorece la interacción no específica entre el nanoportador y diferentes biomoléculas cargadas negativamente presentes en la sangre, dando lugar a la formación de un complejo denominado corona de proteínas (Mirón-Barroso et al., 2021). La absorción de opsoninas (como las inmunoglobulinas y proteínas del sistema de complemento) a la superficie conduce a la rápida eliminación del nanoportador mediante el sistema fagocítico mononuclear (SFM) y a la activación del sistema inmune. El SFM se compone de células fagocíticas (como los macrófagos, las células de Kupffer y los monocitos) que presentan receptores de membrana para las distintas opsoninas, permitiendo la endocitosis mediada por receptor de la corona y posterior degradación enzimática. Los productos de la descomposición acumulados en órganos asociados al SFM (como el hígado, el bazo y la médula ósea), junto con las respuestas inmunitarias desencadenadas que implican la secreción de interleucinas inflamatorias, conducen a una toxicidad sistémica elevada (Mitchell et al., 2021). Por otra parte, frente a concentraciones de sal elevadas, la repulsión electrostática entre los nanoportadores catiónicos se ve reducida generando su agregación en los fluidos fisiológicos, producto de la inestabilidad coloidal. Dichos agregados de gran tamaño pueden obstruir los vasos sanguíneos, aumentando el riesgo de embolia en los capilares pulmonares (Yin et al., 2014).

El aclaramiento renal de los nanoportadores es otro mecanismo por el cual son eliminados rápidamente de circulación, dependiente en este caso del tamaño de la nanopartícula. Se trata de un proceso pasivo que involucra la filtración glomerular y secreción tubular, que a diferencia del sistema MPS, elimina las NPs del cuerpo a través de la orina en lugar de acumularlas en los órganos relacionados. Solo podrán ser filtradas aquellas NPs con un radio hidrodinámico de hasta 6 a 10 nm, mientras que el sistema SFM eliminará las de mayor tamaño (T. Sun et al., 2014).

Finalmente, para que la terapia génica en circulación sea capaz de alcanzar el tejido diana y acumularse en el mismo, el nanoportador debe poder extravasarse de las paredes vasculares. Tanto el bazo como el hígado presentan un endotelio discontinuo que permite la correcta extravasación de las NPs. Sin embargo, las uniones estrechas presentes entre la mayoría de las células endoteliales en los revestimientos vasculares normales resultan una barrera para el paso de los nanoportadores, debido a su tamaño (Mirón-Barroso et al., 2021). La distribución dependiente del tamaño puede verse alterada por entornos patológicos como la vasculatura tumoral heterogénea, caracterizada por la pérdida de las uniones estrechas generando espacios intercelulares más grandes de lo normal, y un sistema linfático disfuncional que permite una acumulación del nanoportador en el tejido tumoral. Este fenómeno, conocido como efecto de permeación y retención mejorada (EPR), permite que las terapias con NPs puedan extravasarse fácilmente y entrar en el tumor sólido (Mitchell et al., 2021).

Para administrar terapias génicas de forma selectiva a otros órganos que no sean el hígado, el bazo o los tumores sólidos, es esencial considerar estrategias de orientación alternativas. El agregado de fracciones de orientación como péptidos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos (por ejemplo, aptámeros) y otras biomoléculas pequeñas a la superficie de las NPs permite mejorar su eficacia de orientación a tejidos específicos. Este proceso de orientación activa, que involucra el reconocimiento molecular entre ligando-receptor, antígeno-anticuerpo o enzima-sustrato permite que la nanopartícula se una de manera selectiva y fuerte a la superficie de un tipo específico de células. La captación de NPs por parte de las células que expresan diferencialmente el receptor puede aumentar como resultado de la endocitosis mediada por receptores, pero solo después de que las NPs se hayan extravasado de la vasculatura mediante orientación pasiva (T. Sun et al., 2014).

1.4.b. Barreras intracelulares

Una vez que el vehículo logra alcanzar la célula diana, deberá atravesar la membrana plasmática y diversas barreras intracelulares para lograr una administración exitosa del gen terapéutico en la localización subcelular correspondiente. La membrana plasmática es una bicapa lipídica selectivamente permeable, cargada negativamente y de propiedades anfífilas, con proteínas y otras biomoléculas incorporadas en una estructura de mosaico fluido (Torres-Vanegas et al., 2021). Si bien los ácidos nucleicos desnudos presentan dificultades para hacer contacto con la superficie celular debido a las fuerzas repulsivas que se presentan, su empaquetado en vehículos catiónicos facilita la captación celular mediante diferentes vías endocíticas. El proceso de endocitosis involucra la internalización celular de parches de membrana plasmática por distintos mecanismos, generalmente clasificados en fagocitosis y pinocitosis. Mientras que la fagocitosis es exclusiva de células fagocíticas (como los macrófagos, neutrófilos y monocitos), la pinocitosis es un mecanismo que se presenta en todos los tipos celulares, de cuatro maneras diferentes (**Figura 16**): macropinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolina, y endocitosis independiente de clatrina y caveolina (Augustine et al., 2020).

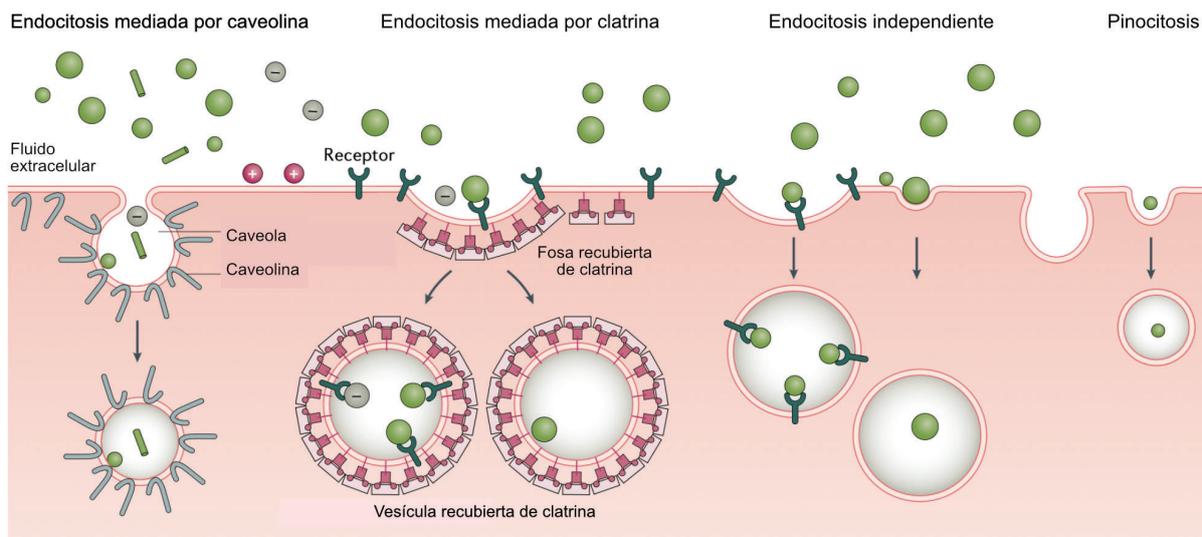


Figura 16. Esquema representativo de los mecanismos de internalización celular de NPs, como la endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, endocitosis independiente de clatrina y caveolina, y pinocitosis. Adaptado de: (Mitchell et al., 2021)

La capacitación selectiva de NPs que expresan un determinado ligando, mediada por interacción específica con un receptor localizado en la superficie celular, se denomina endocitosis mediada por receptor. Las vías más conocidas de endocitosis mediada por receptor son la endocitosis mediada por clatrina y por caveolina. En la endocitosis clatrina-dependiente, la unión del ligando a su receptor induce el reclutamiento de receptores para clatrina en pequeñas depresiones recubiertas de dicha proteína. La polimerización de la clatrina impulsa la invaginación de la membrana, formando una vesícula pequeña recubierta de clatrina, la cual es escindida por la acción de la enzima dineína (Chou et al., 2011). La endocitosis caveolina-dependiente es otro mecanismo endocítico, con la diferencia que utiliza la proteína caveolina para formar las vesículas recubiertas denominadas caveolas, donde la selección del cargo está determinada por la composición lipídica de la membrana. Alternativamente, las NPs pueden interactuar con la membrana a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, y ser absorbidas por la célula a través de la macropinocitosis. La mayoría de las células eucarióticas incorporan continuamente fluidos y solutos del medio extracelular por medio de este mecanismo (Kou et al., 2013).

Factores como el tamaño, la geometría, la carga, la presencia de grupos funcionales y la hidrofobicidad de las NPs utilizadas como vehículo de transporte pueden influir en la captación celular y en la interacción con los componentes celulares (Sum et al., 2014). Mientras que las NPs con una relación de aspecto elevada se suelen internalizar mediante macropinocitosis, la captación de NPs de menor tamaño suele depender de la endocitosis mediada por receptor. En particular, las NPs esféricas son captadas por endocitosis mediada por clatrina, mientras que los nanorods son endocitados de manera dependiente de caveolina (Herd et al., 2013). Debido al tamaño de las vesículas, la endocitosis mediada por caveolina es responsable de la captación celular de NPs de menor diámetro (20 - 100 nm) que la mediada por clatrina (100 - 350 nm) (Ju et al., 2020).

La vía endocítica por la cual las NPs entran en las células determina el transporte intracelular, así como el resultado terapéutico resultante. Después de la internalización mediante endocitosis mediada por clatrina, las NPs se localizan en compartimentos endosomales sometidos al tráfico intracelular asistido por microtúbulos hacia el centro organizador de microtúbulos (MTOC) situado en la región perinuclear. El proceso de maduración de un endosoma temprano a uno tardío viene acompañado por una acidificación intraluminal de pH de 6,5 a 5,5 debido a la actividad de las bombas de protones V-ATPasa unidas a la membrana que translocan activamente los protones hacia la luz endosomal. La posterior fusión con un lisosoma da lugar a la formación de un endolisosoma de pH 4,5. Debido a que los lisosomas se caracterizan por una elevada actividad enzimática proteolítica y bajo pH, que podrían afectar la estabilidad de las NPs y su cargo, el escape endosomal en el estadio de endosoma temprano es considerado como el paso determinante en la administración exitosa de la terapia para evitar la potencial degradación enzimática o el reciclaje fuera de la célula por exocitosis de cuerpos multivesiculares (Vermeulen, Brans, et al., 2018). En cambio, las vesículas endocitadas de manera dependiente de caveolina pueden fusionarse con el endosoma temprano o caveosoma, dado que se trata de un compartimento endosomal de pH neutro que no está sujeto a degradación lisosomal.

Dependiendo de la naturaleza de las NPs, se distinguen distintos mecanismos de escape endosomal (**Figura 17**). El más común es el efecto de esponja de protones, presente en NPs que contienen grupos funcionales sensibles al pH. A medida que desciende el pH durante el proceso de maduración del endosoma, los grupos funcionales se protonan adquiriendo una elevada capacidad de amortiguación del pH, dando como resultado una afluencia de contraiones de cloruro y moléculas de agua. La tensión mecánica ejercida durante la hinchazón de la nanopartícula contra la membrana endosomal es lo que ocasiona finalmente la lisis del endosoma, y la liberación de la nanopartícula al citoplasma (Vermeulen, De Smedt, et al., 2018). Para aquellas NPs lipídicas que poseen la capacidad

de fusionarse con la membrana endosómica, se emplea la estrategia de fusión de membrana, facilitando así la transferencia de la carga de ácido nucleico al citoplasma. En otra aproximación, ciertos péptidos con capacidad de autoensamblarse en la membrana lipídica pueden generar poros, posibilitando la salida de fármacos de bajo peso molecular hacia el citoplasma. La alteración o desestabilización de la membrana es un mecanismo de escape endosómico de las nanopartículas poliméricas, donde un aumento en la hidrofobicidad del polímero conduce a la interacción de los lípidos y, por lo tanto, a la alteración de la membrana (Cupic et al., 2019; Mirón-Barroso et al., 2021).

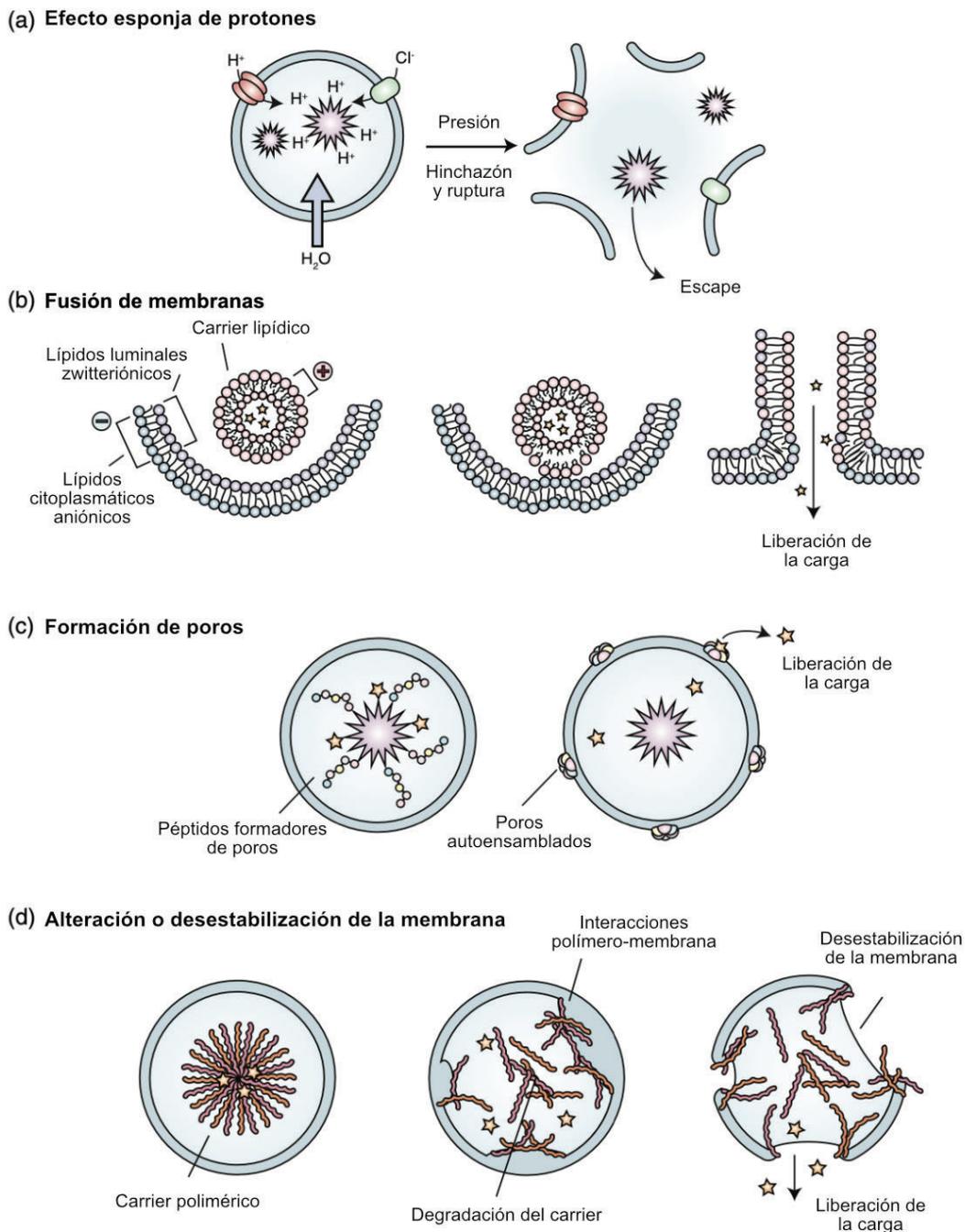


Figura 17. Mecanismos de escape endosómico. (a) Efecto esponja de protones, (b) Fusión de membranas, (c) Formación de poros y (d) Alteración o desestabilización de la membrana. Adaptado de: (Mollé et al., 2022)

Incluso si ocurre un escape endosomal, las NPs deben evitar ser degradadas por autofagia, una barrera adicional para la administración de genes dado que puede recuperar las NPs que lograron escapar y redirigirlas hacia la degradación lisosomal. Una vez en el citoplasma, el vector debe poder proteger a los ácidos nucleicos de la degradación por nucleasas intracelulares, y permitir la liberación del cargo antes que alcance su destino final. Las NPs poseen además un perfil de liberación sensible al entorno intracelular y/o a señales extracelulares, lo que permite reducir los efectos del sistema fuera del sitio target (Vermeulen, Brans, et al., 2018).

Tanto el ARNm como el ARNi tienen destino en el citoplasma, siendo su target la maquinaria de traducción y el complejo RISC (*RNA induced silencing complex*), respectivamente. En cambio, el ADNp debe ingresar al núcleo para acceder a la maquinaria de transcripción, y para ello debe atravesar una barrera adicional, la envoltura nuclear. Ésta consiste de una doble membrana lipídica con complejos de poros nucleares (CPN) insertos en la misma, y una lámina nuclear subyacente (Sokolova & Epple, 2008). Los CPN son nucleoproteínas cilíndricas huecas que restringen la entrada de biomoléculas de hasta 10 nm de diámetro (McErlean et al., 2016), lo que excluye la difusión pasiva de ADNp. Si bien el ingreso del ADNp al núcleo es uno de los mayores desafíos para las terapias génicas no virales, es posible aprovechar la ruptura de la envoltura nuclear durante la mitosis en células mitóticamente activas para favorecer la entrada del ADNp antes que la misma vuelva a formarse en las células hijas (Vaughan et al., 2006). Alternativamente, el ingreso de proteínas grandes al núcleo puede lograrse mediante la incorporación de una señal de localización nuclear (SLN), una secuencia corta de aminoácidos reconocida por importinas citosólicas, para facilitar la translocación activa de la macromolécula través del CPN (Sunshine et al., 2011).

Si bien el uso de NPs como sistema de administración no viral de genes plantea numerosos desafíos en cuanto a las barreras biológicas que deben lograr superar hasta alcanzar el sitio objetivo, el continuo avance e investigación en el campo de la nanotecnología ha abierto nuevas oportunidades en el desarrollo de terapias génicas más efectivas y precisas. La posibilidad de sintetizar NPs diseñadas para ser estables en el ambiente biológico y para permitir la liberación controlada y sostenida de los genes terapéuticos, así como la posibilidad de funcionalizar su superficie con diferentes ligandos que permitan mejorar la selectividad, la biodistribución y la farmacocinética de su cargo, son unas de las ventajas que ofrecen los nanomateriales.

I. 5 HIDRÓXIDOS DOBLES LAMINARES

Las LDH, también conocidas como materiales similares a la hidrotalcita o arcillas aniónicas, se pueden encontrar en la naturaleza como minerales y se pueden sintetizar fácilmente en el laboratorio. En la naturaleza, se forman a partir de la meteorización de basaltos o precipitaciones en fuentes de agua salina (Xu & Lu, 2006). La estructura de la hidrotalcita $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ resulta del apilamiento de capas similares a la brucita $Mg(OH)_2$. En esta configuración eléctricamente neutra, cada catión magnesio está rodeado octaédricamente por seis grupos hidroxilo ubicados en los vértices, y diferentes octaedros comparten aristas para formar una capa bidimensional infinita. La sustitución parcial de iones Mg^{2+} por iones Al^{3+} en la hidrotalcita confiere a las capas tipo brucita cargas positivas, que se equilibran por la presencia de aniones en el espacio entre capas. Como resultado, en el cristal de LDH, las capas catiónicas de tipo brucita se mantienen unidas por contraiones en la intercapa que equilibran la carga total y moléculas de agua. Las interacciones

electrostáticas y los enlaces de hidrógeno entre estas capas y el contenido de la intercapa son los responsables de mantener las capas juntas, dando lugar a una estructura tridimensional, tal como se ilustra en la **Figura 18**. En tal sentido, los materiales LDH se pueden describir mediante la fórmula general $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}(A^{m-})_{x/m} \cdot yH_2O$, en la que M^{II} representa cationes metálicos bivalentes (tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}), M^{III} representa cationes metálicos trivalentes (normalmente Fe^{3+} , Co^{3+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Ni^{3+} , Mn^{3+}), y A^{m-} un anión de valencia m de la capa intermedia (como SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Cl^- , OH^- , RCO_2^-). El valor de x denota la densidad de carga de las capas de hidróxido, y varía entre 0,20 y 0,33, lo que significa que la relación molar M^{II}/M^{III} es 2,0 - 4,0 (Ladewig et al., 2009).

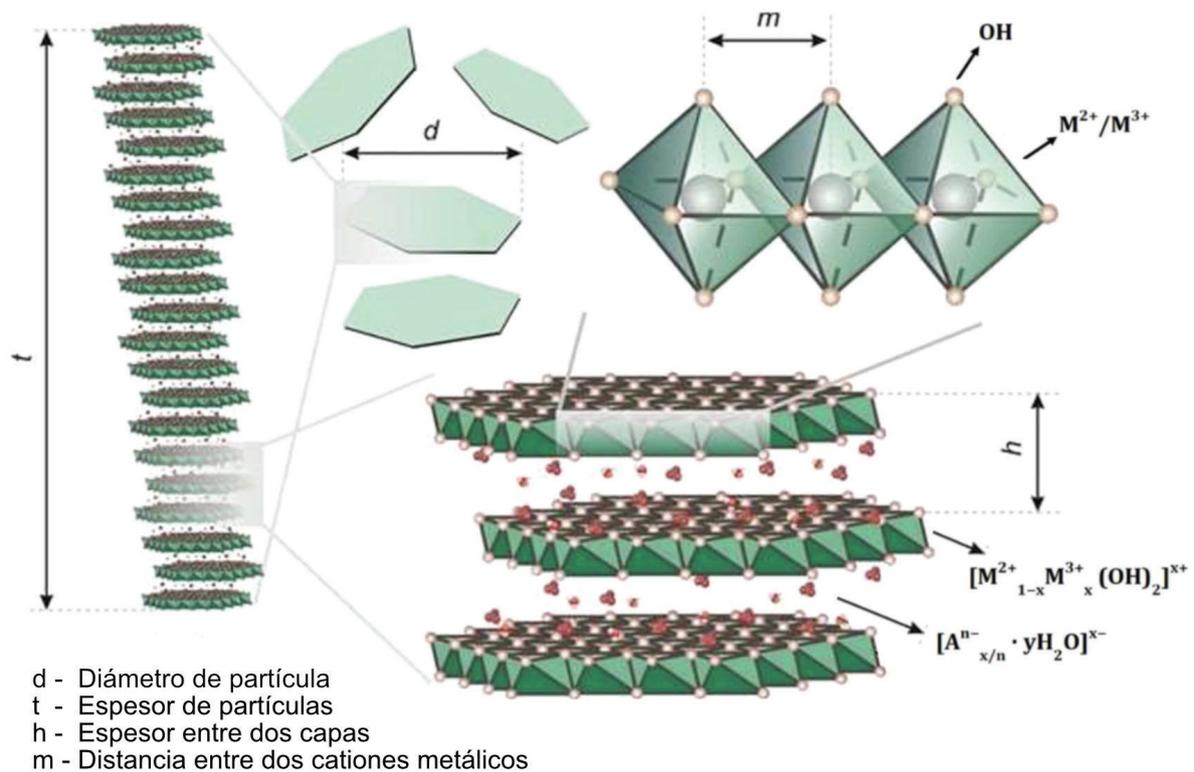


Figura 18. Esquema representativo de la estructura cristalina de las LDH. Adaptado de: (Pavlovic et al., 2022)

La capacidad superior de intercambio de aniones de las LDH permite la intercalación exitosa de cualquier molécula funcional que posea cargas negativas en su región de capa intermedia, incluyendo una diversidad de aniones inorgánicos comunes, orgánicos, poliméricos, complejos, y de naturaleza bioquímica. La versatilidad de los materiales LDH se deriva de la flexibilidad en la adaptación de la composición química de las capas de hidróxido metálico y los aniones de la capa intermedia, así como a sus propiedades físicas y químicas únicas; lo que les ha permitido extender su aplicación a campos diversos como la catálisis, la electroquímica, la adsorción, y la farmacéutica. Históricamente, las LDH han sido de gran interés como electrodos, catalizadores, soportes de catalizadores, precursores de cerámica, trampas de contaminantes aniónicos, intercambiadores de iones, y aditivos para polímeros (Mittal, 2021; Wijitwongwan et al., 2019). Las primeras aplicaciones de las LDH en el ámbito de la salud humana comenzaron como componentes activos en antiácidos y

agentes anti-peptídicos destinados a aliviar los dolores estomacales originadas por la acumulación excesiva de ácido gástrico, logrando buenos efectos curativos. En la última década, las LDH se han explorado enormemente en muchos aspectos del campo biomédico, beneficiándose de la facilidad de preparación, la capacidad de carga e intercambio aniónico superior, así como su biocompatibilidad, estabilidad, biodegradabilidad y baja citotoxicidad (Bian et al., 2023).

1.5.a. Métodos de síntesis y caracterización de LDH

Las LDH generalmente se preparan a escala industrial empleando métodos rentables y ecológicos, y pueden fabricarse con una variedad de cationes divalentes y trivalentes en combinación con diversos aniones en las capas intermedias. La síntesis de las LDH puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas de preparación, ya sea enfoques *top-down* o *bottom-up* (**Figura 19**). Las técnicas de enfoque *top-down* consisten en la disminución del tamaño o el espesor de LDH naturales hasta la nanoestructura deseada, empleando métodos físicos. Dentro de estos métodos, la síntesis mecanoquímica por reacción en estado sólido es uno de los más comunes para obtener LDH bajo esta perspectiva. Si bien la miniaturización de las LDH a granel resulta un proceso conveniente, la eliminación o división del material original puede dar lugar a superficies irregulares. La estrategia *bottom-up*, por el contrario, consiste en la generación directa de nanoláminas de LDH a partir de sales metálicas precursoras mediante procesos químicos, logrando superficies más complejas y de mayor calidad (Karmakar et al., 2022).

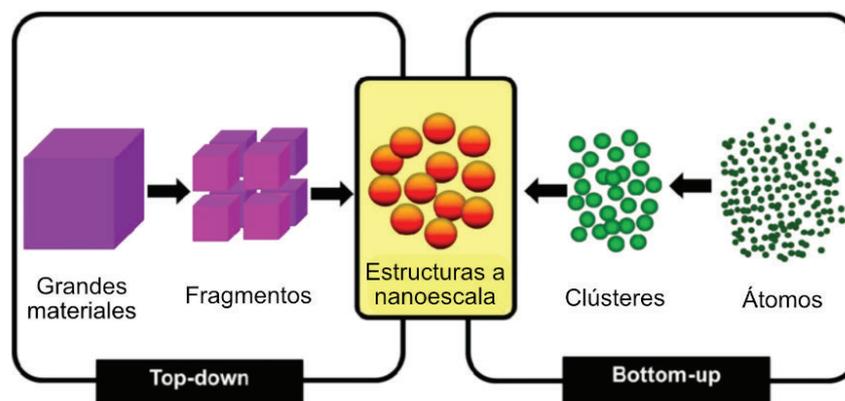


Figura 19. Esquema representativo de la estrategia *top-down* y *bottom-up* para la síntesis de nanopartículas. Adaptado de: (Rawat, 2015)

Idealmente, durante el proceso de síntesis de nanomateriales, se busca lograr la uniformidad en tamaño y forma de todas las partículas generadas, con una composición química y estructura cristalina únicas. La correcta dispersión de las NPs en una solución o su agregación controlada son esenciales para satisfacer los requerimientos y propósitos deseados (Mallakpour et al., 2020). Múltiples factores, como la relación molar M^{II}/M^{III} , la naturaleza del catión metálico y el anión en la capa intermedia, el pH y la temperatura de reacción, la atmósfera controlada y el método de fabricación, deben ser cuidadosamente controlados durante la síntesis ya que influyen en propiedades fundamentales de las LDH, tales como su estructura cristalina, morfología, área superficial y distribución del tamaño de partícula (Bukhtiyarova, 2019).

El control de la morfología de los nanocristales metálicos coloidales se ha explicado principalmente mediante la teoría de nucleación y crecimiento mediada por átomos. La curva de LaMer describe el proceso en tres etapas distintas, como se ilustra en la **Figura 20**. En la primera etapa, los átomos metálicos se producen mediante la reducción de iones metálicos con reactivos reductores o mediante la descomposición térmica de compuestos organometálicos. Cuando la concentración atómica supera el punto de sobresaturación mínimo ($C_{\text{nu}}^{\text{min}}$) en la segunda etapa, los átomos se agregan para formar núcleos estables a través de la nucleación homogénea. La concentración de átomos luego disminuye rápidamente por debajo del nivel mínimo de sobresaturación ($C_{\text{nu}}^{\text{min}}$), deteniendo los eventos de nucleación. En la tercera etapa, el tamaño de los núcleos aumenta gradualmente con la adición continua de átomos metálicos, marcando el nacimiento de una semilla cuando alcanza un tamaño crítico. Esta semilla crece aún más hasta formar el nanocrystal final mediante la adición de átomos, hasta que la concentración desciende a C_s (concentración de solubilidad de los nanocristales) (Z. Wu et al., 2016; You & Fang, 2016)

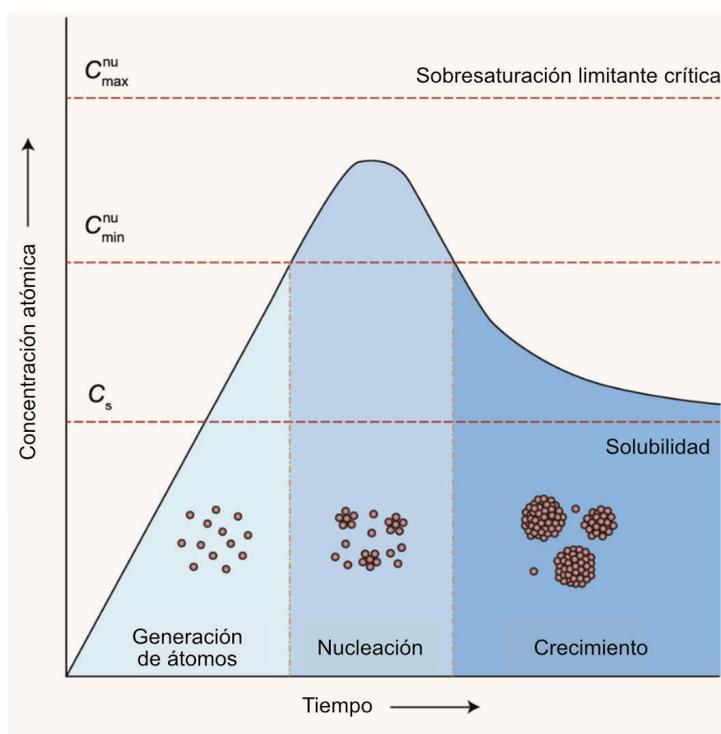


Figura 20. Curva de LaMer que describe tres etapas de formación de nanocristales metálicos en un sistema de solución. Etapa I: generación de átomos, etapa II: nucleación, y etapa III: formación y crecimiento de semillas. Adaptado de: (Y. Sun, 2015)

Diversas técnicas de síntesis directa, como los métodos de coprecipitación, hidrólisis de urea y sol-gel, se han desplegado para la preparación de las LDH.

La coprecipitación, conocida también como método de síntesis directa, es el enfoque más tradicional y ampliamente empleado en la generación de LDH. Este proceso implica la nucleación y el crecimiento secuencial de las capas de hidróxido metálico, mediante la combinación de una solución acuosa homogénea que contiene las sales de dos iones metálicos (M^{II} y M^{III}) en la proporción molar apropiada con una solución alcalina compuesta por una base fuerte que actúa como agente precipitante. Para permitir que tenga lugar la precipitación simultánea de ambas sales metálicas, el

control del pH de la solución entre 7 y 10 es esencial. En este sentido, la coprecipitación puede ocurrir en dos condiciones: baja sobresaturación con pH constante o alta sobresaturación con pH variable. Luego de la agitación vigorosa de las dos soluciones y su precipitación por centrifugación, se deben realizar lavados del precipitado con agua desionizada para eliminar las sales restantes (Xu et al., 2006). Si bien este método es uno de los procedimientos más simples, económicos y confiables para la preparación de LDH, resulta en la formación de nanocristalitos de LDH con una distribución de tamaños muy diferentes con una elevada tendencia a la aglomeración. Tratamientos posteriores a la preparación, como el envejecimiento hidrotermal post-sintético, se utilizan principalmente para dispersar los agregados de LDH (con un tamaño de 1-10 μm) en pequeños cristalitos individuales, mejorando la cristalinidad y uniformidad de las NPs obtenidas. El tamaño de las partículas se puede ajustar simplemente por la duración de la maduración y la temperatura, a saber, las partículas más pequeñas se obtienen con menos envejecimiento (Fahami et al., 2016).

El método de hidrólisis de la urea, también llamado síntesis hidrotermal, se basa en la descomposición térmica controlada de la urea en solución acuosa, que resulta en la generación de iones de carbonato y amonio. El aumento gradual del pH durante esta descomposición permite la formación homogénea de hidróxidos metálicos o hidróxidos dobles en capas, dependiendo de la combinación de sales metálicas utilizadas. La urea es una base de Bronsted débil, altamente soluble y de lenta hidrólisis, que actúa como agente precipitante y proporciona un mayor control sobre la morfología y tamaño de partícula de los LDH generados. Este proceso ha demostrado resultar en partículas monodispersas, alta cristalinidad y distribución de tamaño de partícula más estrecha en comparación con otros métodos (Mittal, 2021; Wijitwongwan et al., 2019)

El método sol-gel se destaca por su bajo costo y rápida síntesis de NPs con una gran superficie específica, alta pureza y alta homogeneidad. A diferencia del método de coprecipitación convencional, las soluciones precursoras de los iones metálicos deseados no se incorporan ni precipitan en ninguna solución alcalina. En cambio, los alcóxidos metálicos se disuelven primero en un solvente orgánico, y se someten a reflujo agregando lentamente agua desionizada dando lugar a la formación de un sol por hidrólisis forzada. La mezcla luego se condensa por agitación vigorosa a una temperatura elevada (80-160 $^{\circ}\text{C}$) para evaporar el solvente, resultando en un gel coloidal de LDH con elevada porosidad (Kameliya et al., 2023).

Como fue mencionado anteriormente, las LDH tienen la capacidad de intercalar moléculas neutras o intercambiar iones inorgánicos/orgánicos con los aniones originales de la capa intermedia. Los complejos LDH:biomolécula se pueden configurar mediante métodos de coprecipitación, intercambio de aniones y de reconstrucción de LDH por efecto memoria. El método de coprecipitación es la ruta más directa para preparar complejos LDH:biomolécula, pero los fármacos deben poder resistir los tratamientos post-preparativos, como el tratamiento hidrotérmico. La reacción se lleva a cabo en presencia de la biomolécula a intercalar, y las sales metálicas se seleccionan teniendo en cuenta que sus aniones deben tener la menor afinidad con las LDH, de lo contrario, los aniones que se incorporarán a la capa de hidróxido tendrán una mayor competencia. Por lo tanto, la mayoría de las sales de nitratos y cloruros se eligen como precursores aniónicos.

Para aquellas biomoléculas que no pueden soportar tales condiciones, es común emplear la intercalación post-sintética a través del método de intercambio iónico. En estos casos, las especies deben ser aniónicas y pueden incorporarse mediante el intercambio iónico con los contra-aniones ya presentes en los espacios intercalados de LDH. La reacción se logra simplemente agitando materiales LDH previamente sintetizados en soluciones que contienen las especies aniónicas de reemplazo. En general, la intercalación de ácidos nucleicos a través del método de intercambio es muy eficaz. La alta eficacia se atribuye a las interacciones electrostáticas entre los fármacos aniónicos y las capas de

hidróxido catiónico, sino también a las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas del fármaco (Ladewig et al., 2009; Xu & Lu, 2006). El método de reconstrucción de LDH es otro proceso de intercalación post-sintético, que aprovecha principalmente una propiedad única de los materiales LDH, el efecto memoria. En particular, cuando las LDH se calientan a una temperatura elevada (400–500 °C) en condiciones inertes, se forma una mezcla de óxidos metálicos y especies aniónicas que poseen una alta capacidad en presencia de agua para reformar las mismas capas de hidróxido que sus estructuras anteriores. Aprovechando esta propiedad, estos óxidos metálicos se dispersan en una solución de los aniones deseados, permitiendo intercalar especies aniónicas grandes en estructuras LDH que no se intercalan favorablemente en un proceso de intercambio iónico simple (Bullo & Hussein, 2015).

Características como la microestructura, la cristalinidad, la composición y la morfología de las LDH sintetizadas pueden estudiarse mediante una variedad de técnicas electrónicas y espectroscópicas. Entre ellas, se encuentran la microscopía electrónica de barrido (SEM), la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la microscopía de fuerza atómica (AFM), la espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis), la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), la dispersión de luz dinámica (DLS) y la difracción de rayos X en polvo (PXRD), entre otros (Kameliya et al., 2023; Y. Zhang et al., 2019). La intercalación de biomoléculas puede confirmarse por el aumento del tamaño de las partículas y la disminución del potencial zeta del nanohíbrido de ADN-LDH a partir de LDH prístina.

1.5.b. Aplicación como sistemas de administración de genes

La entrega de moléculas terapéuticas y bioactivas a células de mamíferos, tanto *in vitro* como *in vivo*, es un campo de investigación en constante crecimiento en la medicina. Dentro de las propiedades deseables de los nanotransportadores para garantizar una entrega celular efectiva, se encuentran la capacidad de encapsular y proteger el material genético contra la degradación causada por las nucleasas presentes tanto en el entorno intra como extracelular, estabilidad en condiciones fisiológicas, orientación celular, tiempo de circulación prolongado, y liberación controlada del ácido nucleico en el interior celular, entre otros. Si bien la mayoría de las NPs inorgánicas destinadas para este fin requieren de premodificaciones químicas y/o biológicas para lograr estas características, las LDH presentan propiedades únicas y ventajas adicionales que las destacan como sistemas de administración de genes (**Figura 21**) (Nagaraj et al., 2015; Sunshine et al., 2011).

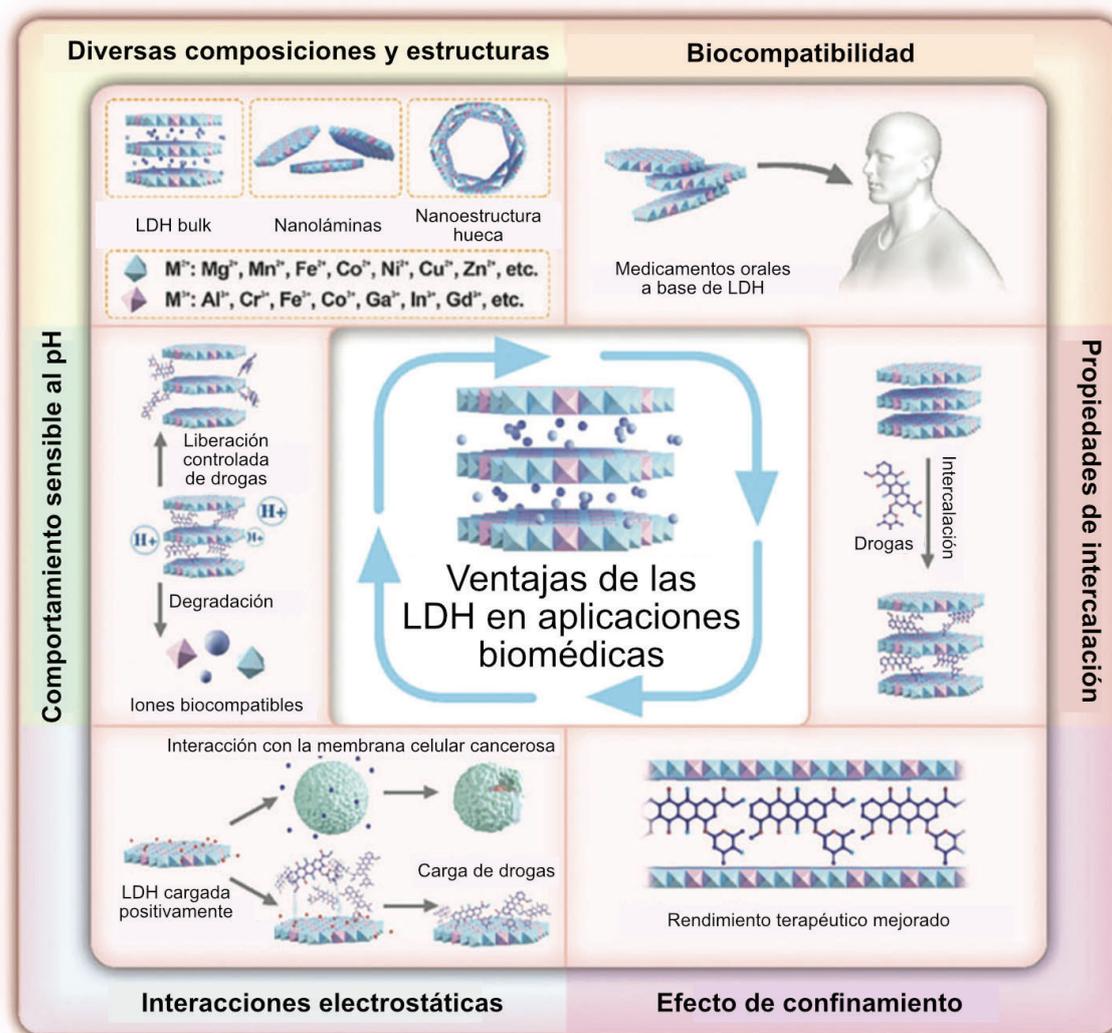


Figura 21. Esquema representativo de las características y ventajas de los nanomateriales basados en LDH para aplicaciones biomédicas. Adaptado de: (Bian et al., 2023)

La elevada capacidad de intercambio iónico de las LDH, que varía entre 2 y 4 mEq/g, les permite la carga directa de biomoléculas aniónicas entre los espacios de intercapa, dando como resultado una variabilidad en las alturas de dichos espacios que pueden oscilar desde 0,3 hasta 4 nm (Taviot-Guého et al., 2018). Debido a que los ácidos nucleicos se encuentran intercalados entre las capas de hidróxido, éstas actúan como una barrera para retener las enzimas y el oxígeno en la superficie externa de las partículas de LDH, protegiendo a los ácidos nucleicos de la degradación enzimática y otras condiciones de estrés biológico (Xu & Lu, 2006). Por su parte, la carga superficial positiva de las LDH desempeña un papel clave en la neutralización de los ácidos nucleicos cargados negativamente, disminuyendo así la repulsión electrostática que podría surgir con los grupos de cabeza cargados negativamente en la bicapa lipídica. Este fenómeno facilita el acercamiento y la adhesión de los complejos LDH:ADN con carga neta positiva a la membrana celular (Choy et al., 1999).

La captación celular y el destino intracelular de las nanopartículas de LDH se ven significativamente influenciados por su tamaño y forma (Kura et al., 2014). Los cristallitos de LDH individuales, con tamaños que oscilan entre 50 y 200 nm, suelen ser absorbidos mediante un proceso de endocitosis mediada por clatrina (J.-M. Oh et al., 2006). La fagocitosis, que involucra la captación

de NPs de un tamaño mayor a 500 nm, podría aplicarse a los agregados de LDH ligeramente aglomerados que pueden formarse en ciertas circunstancias cuando interactúan con ácidos nucleicos. La endocitosis suele conducir a una captación más rápida de los complejos LDH:ADN debido a que es un proceso mediado por receptores, y se ha observado una absorción dependiente de la concentración para tamaños de partícula menores a 350 nm (Choi & Choy, 2011). Un estudio realizado por J. Oh et al. (2009) ha demostrado que las partículas de menor tamaño exhiben una mayor eficiencia en la penetración de las membranas celulares en comparación con sus contrapartes de mayor tamaño. Además, el tamaño de las partículas influye en su localización intracelular, ya que se ha observado que las NPs de 20 nm se localizaron en el núcleo celular, mientras que las de 180 nm permanecieron en el citoplasma. En lo que respecta a la forma, ésta también juega un papel en el destino intracelular. Tanto las LDH con forma hexagonal como en barra ingresan a las células a través de la misma vía endocítica, pero las NPs con forma hexagonal se localizan preferentemente en el núcleo de las células (Kuthati et al., 2015).

Después de la internalización de las NPs a través de la vía de endocitosis mediada por clatrina, se almacenan en vesículas de acidificación lenta de la vía endosomal. Durante esta maduración, el valor del pH disminuye de 7,4 a 6,5 en el endosoma temprano, y a 5,5 en el endosoma tardío. Las LDH son inertes a pH fisiológico, pero los grupos metal-oxhidrilo (M-OH) las hacen sensibles a los medios ácidos (Jin et al., 2020). Esto da como resultado su disolución parcial en el ambiente ácido de los endosomas, que posteriormente amortigua el pH endosomal y provoca la ruptura del endosoma mediante el efecto de esponja de protones, liberando los complejos LDH:ADN y ácidos nucleicos libres en el citoplasma. Esta disolución parcial resulta en la desintegración de las LDH en sus iones precursores (Mg^{2+} , Al^{3+} y NO_3^- o Cl^-), que a concentraciones tan bajas como las generalmente utilizadas para aplicaciones de entrega, no se ha observado que ninguno de estos iones tenga efectos negativos en la viabilidad o proliferación celular (Ladewig et al., 2009). Esta propiedad es muy ventajosa, ya que no quedan restos de NPs dentro de las células, lo que las hace altamente biocompatibles.

A pesar del éxito de las LDH NPs en la administración de fármacos a células específicas *in vitro* y en algunos casos *in vivo*, sin la aparición efectos secundarios evidentes, la naturaleza misma de las LDH ha planteado ciertos obstáculos que representan limitaciones significativas para su aplicación futura en medicina y otros campos. Gran parte de los estudios actuales se han centrado en la intercalación exitosa de fármacos moleculares y ácidos nucleicos más pequeños y lineales, como fragmentos de PCR, ASO y ARNi (Choi et al., 2010; Kwak et al., 2004; Ladewig et al., 2010a; A. Li et al., 2011; Y. Wu et al., 2018; S. Zhang et al., 2023). En contraste, la intercalación efectiva de moléculas grandes ha resultado más desafiante debido a las restricciones impuestas por el espacio limitado en la capa interna y la superficie acotada de las LDH (Masarudin et al., 2009; Senapati et al., 2019; Xu et al., 2007). Las biomoléculas más voluminosas tienden adherirse a la superficie de las LDH, conduciendo a la aglomeración de las nanopartículas de LDH en presencia de ADNp. Este fenómeno afecta negativamente la eficacia de la captación celular de los aglomerados de complejos LDH:ADN mediante la endocitosis mediada por clatrina. Dependiendo del tamaño de estos agregados, es posible que recurran a vías de captación más lentas, como la fagocitosis o la macropinocitosis (Ladewig et al., 2009), lo que disminuye su eficiencia de transfección.

Por ello, resulta interesante estudiar este sistema de administración con el fin de verificar su uso como alternativa a los otros métodos no virales, valorar su toxicidad, y la posibilidad de llevarlas a la práctica clínica. También, es importante conocer las claves de estos procesos de cara a futuras investigaciones y comprobar cuáles son sus puntos débiles y fortalezas en términos de producción, seguridad y eficacia.

CAPÍTULO II

Hipótesis y Objetivos

II. 1 HIPÓTESIS

Moléculas de ácidos nucleicos recombinantes formulados en nanopartículas LDH ingresan a células viables de mamífero en cultivos celulares *in vitro* y permiten la expresión de proteínas recombinantes, de manera eficiente y sin toxicidad.

II. 2 OBJETIVOS

El **objetivo general** donde se enmarca esta Tesina de Licenciatura involucra la generación, caracterización y evaluación de nanopartículas inorgánicas que serán destinadas a formar parte de una formulación farmacéutica capaz de transportar moléculas de ADN dentro de células de mamíferos.

Los **objetivos específicos**, abordados en esta Tesina, incluyen:

- I. Amplificar una construcción genética de ADN que sea portadora de un *cassette* de expresión de una proteína reportera.
- II. Sintetizar y caracterizar nanopartículas LDH capaces de cargar ADN, y transportarlo dentro de células de mamíferos.
- III. Encontrar la mejor relación LDH:ADN y el mínimo tiempo de carga necesario para evaluar la expresión de la proteína reportera *in vitro*.
- IV. Evaluar la capacidad de protección del ADN complejado por las nanopartículas LDH, y la eficiencia del escape endosomal de los complejos LDH:ADN.
- V. Evaluar *in vitro* las nanopartículas LDH generadas para verificar su citotoxicidad, capacidad y eficiencia de transfección en células de mamíferos.

CAPÍTULO III

Metodología

Los ácidos nucleicos fueron cuantificados mediante espectrofotometría utilizando para ello el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

III. 2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LDH

III.2.a. Síntesis de MgAl-Cl LDH NPs

La síntesis de los hidróxidos dobles laminares de magnesio-aluminio intercalados con cloruro (MgAl-Cl LDH) fue realizada por el método de coprecipitación a pH variable, seguido de un envejecimiento hidrotermal post-sintético (**Figura 23**) (Vasti et al., 2020).

El procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, utilizando reactivos químicos no contaminados ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,3 M; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M; NaOH 0,25 M) y agua miliQ libre de nucleasas, para mantener la esterilidad de las NPs sintetizadas. Se prepararon soluciones stock 1 M de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 M de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 5 N de NaOH, y se filtraron con un filtro Sartorius de 0,2 μm . A partir de las mismas, se preparó una solución mixta de las sales hexahidratadas (0,3 M Mg^{2+} y 0,1 M Al^{3+}), y una solución 0,25 M de NaOH.

Se agregaron rápidamente 3 mL de la solución de los iones metálicos a 10 mL de la solución de NaOH en un tubo de 15 mL, agitando vigorosamente durante 10 minutos a 600 rpm con agitador magnético a temperatura ambiente. El contenido del tubo fue redistribuido en 10 tubos de 1,5 mL, se centrifugó a 14800 rpm durante 10 minutos para separar el *pellet* de la solución de síntesis, y se descartó el sobrenadante. Se realizaron ciclos de lavado y resuspensión del *pellet* con 800 μL de agua miliQ, con posterior centrifugación a 14800 rpm durante 5 minutos hasta que se observó turbidez en el sobrenadante.

Finalmente, se dispersaron las NPs en 1250 μL de agua miliQ, y se envejecieron las soluciones con tratamiento hidrotermal a 80 °C durante 4 hs. Este tratamiento post-sintético de los precipitados de LDH se realiza con la finalidad de aumentar la homogeneidad del producto, reducir la agregación de partículas y aumentar la cristalinidad. La dispersión obtenida fue almacenada a temperatura ambiente.

La concentración de las NPs sintetizadas fue estimada mediante estequiometría.

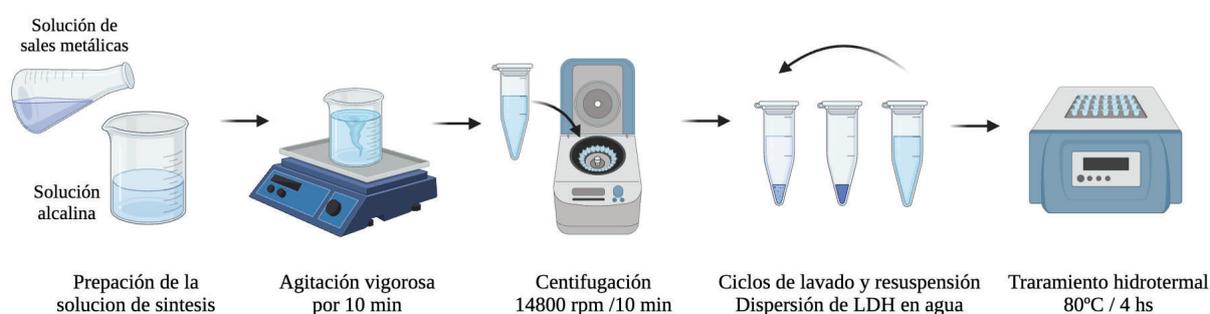


Figura 23. Esquema representativo de la síntesis de las MgAl-Cl LDH NPs por el método de coprecipitación a pH variable. Creado en: BioRender.

III.2.b. Caracterización de MgAl-CI LDH NPs

El tamaño hidrodinámico y la estabilidad coloidal de las MgAl-LDH NPs (índice de refracción = 1,55; (Liu et al., 2019)) dispersas en agua fueron medidas mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) utilizando un instrumento Zetasizer Nano (Malvern, Reino Unido).

Para el estudio del tamaño real y la morfología de las MgAl-LDH NPs, se tomaron imágenes usando un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) Zeiss EM 109T equipado con cámara digital Gatan ES1000W, a un voltaje de aceleración de 80 kV. Las imágenes fueron procesadas con el *software Fiji* (ImageJ) para realizar mediciones al azar de alrededor de 100 NPs y poder estimar así su tamaño real a partir de un histograma de la distribución del tamaño de la nanopartícula.

Las curvas de absorbancia UV-visible se midieron usando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Software V3.81) en la función de UV-Visible, con el fin de analizar las propiedades ópticas y el estado de agregación de las nanopartículas.

III. 3 FORMULACIÓN DE COMPLEJOS LDH:ADN

III.3.a. Estudio de la interacción entre LDH y ADN

Se investigó la capacidad de interacción entre la nanopartícula sintetizada y ADNp mediante un ensayo de cambio de movilidad por electroforesis en gel (EMSA, por sus siglas en inglés) (Hellman & Fried, 2007). EMSA es una técnica ampliamente utilizada para analizar interacciones en sistemas biológicos, como los vínculos entre proteínas y ácidos nucleicos, y se basa en el principio de que los complejos ADN-proteínas migran más lentamente cuando son sometidos a electroforesis en condiciones nativas a través de geles de poliacrilamida o de agarosa.

En este contexto, se adaptó el EMSA con el propósito de evaluar tanto la capacidad de carga del ADNp en las MgAl-CI LDH como el tiempo mínimo necesario para que se formen los complejos LDH:ADN. El ADN desnudo presenta una determinada movilidad en un gel de agarosa, pero al unirse a NPs con carga positiva, su movilidad disminuye significativamente. Esto se debe a una interacción no covalente entre los grupos fosfato con carga negativa en la estructura del ADN y las láminas de LDH con carga positiva, lo que resulta en la formación de un complejo LDH:ADN. La evidencia de esta interacción se refleja en desplazamientos en la posición de la banda en el gel de agarosa, cuando se comparan con moléculas de ADN sin NPs.

En tal sentido, para evaluar la capacidad de carga de las MgAl-CI LDH NPs, una cantidad constante del plásmido pFastBac Dual-pCMV-EGFP (0,5 μ g, 6,5 kb) se formuló con cantidades variables de LDH de 0 a 50 μ g, y se añadió agua miliQ hasta un volumen final de 10 μ L. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min, y se añadió una cantidad adecuada de *buffer* de carga de ADN. Los complejos LDH:ADN se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % p/v en *buffer* TBE 1X a 45 V durante 40 minutos, utilizando GelGreen (stock 20.000X: 10 mg/mL - MiniPCR) como agente intercalante revelador.

Una vez determinada la relación LDH/ADN óptima, se establecieron distintos tiempos de incubación dentro de un rango de 1 a 20 minutos, con el fin de determinar mediante EMSA el tiempo mínimo requerido para que el ADN se cargue completamente en la nanopartícula. Para ello, 0,5 μ g del

plásmido pFastBac Dual-pCMV-EGFP se formularon en una relación en masa de 100, y se añadió agua miliQ hasta un volumen final de 10 μL . Las muestras se incubaron a 37 °C durante los distintos intervalos de tiempo establecidos, y se añadió una cantidad adecuada de *buffer* de carga de ADN a cada muestra. Los complejos LDH:ADN se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % p/v en *buffer* TBE 1X a 45 V durante 40 minutos, utilizando GelGreen como agente intercalante revelador.

Los resultados de cada corrida electroforética fueron visualizados con el transiluminador de luz azul (BlueGel) y digitalizados mediante fotografía. La imagen del gel resuelto correspondiente al ensayo de capacidad de carga se analizó utilizando el *software* Fiji (ImageJ), para calcular el cambio relativo, o *Relative shift*.

Este parámetro proporciona información sobre la interacción entre el complejo de LDH y el ADN, siendo que un porcentaje más grande sugiere una interacción más fuerte entre ambos. Un porcentaje positivo indica un desplazamiento hacia el ánodo, mientras que uno negativo indica un desplazamiento hacia el cátodo. El cambio relativo se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cambio relativo (\%)} = \frac{\text{Distancia migrada por el complejo} - \text{Distancia migrada por el ADN}}{\text{Distancia migrada por el ADN}} * 100$$

III.3.b. Caracterización de los complejos LDH:ADN

Las MgAl-Cl LDH NPs sintetizadas se formularon con ADNp mediante intercambio aniónico en la relación en masa de LDH/ADN determinada como óptima, para la caracterización de los complejos LDH:ADN mediante TEM y DLS. Para un volumen final de 1 mL, se mezclaron 16,67 μL de suspensión de LDH ($\sim 6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0,5 μL de plásmido pFastBac Dual-CMV/EGFP (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 982,83 μL de agua miliQ, y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos.

III.3.c. Capacidad de protección del ADN complejado

Las NPs sintetizadas fueron evaluadas en su eficiencia para proteger las biomoléculas complejadas, como el ADN plasmídico, de los ataques de las endonucleasas presentes en el entorno extra e intracelular (Xu et al., 2006; Yuan et al., 2009). Para ello, se sometió al complejo LDH:ADN a un tratamiento con DNAsa (Minicircle-safe DNase, SBI) y/o endonucleasas de restricción de tipo II de corte único (EcoRI y NheI) en un volumen final de reacción de 10 μL . Se utilizó una unidad de enzima por microgramo de ADN para cada reacción, y la cantidad de ADN fue de 300 ng/pocillo.

Las digestiones se incubaron a 37 °C durante 30 min, y se detuvieron mediante la adición de 4 μL de *buffer* de carga. Los complejos LDH:ADN se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % p/v (*buffer* TBE) a 45 V durante 40 minutos, utilizando GelGreen como agente intercalante revelador. La integridad del ADN en el complejo se comparó con el ADN no tratado, y ADN tratado solo con DNAsa o con EcoRI/NheI como controles.

III.3.d. Eficiencia de escape endosomal de los complejos LDH:ADN

La formulación LDH:ADN generada fue evaluada en su eficiencia para escapar del endosoma mediante un procedimiento descrito en bibliografía (Senapati et al., 2019). Para ello, se trató el complejo LDH:ADN con ácido clorhídrico (HCl 0,12 M) hasta alcanzar un pH de 5, y se incubaron durante una hora para lograr una disolución parcial de las MgAl-Cl LDH NPs. Luego, se ajustó el pH

a 7,4 con hidróxido de sodio (NaOH 0,4 N), y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % p/v (*buffer* TBE) a 45 V durante 40 minutos, utilizando GelGreen como agente intercalante revelador. Se monitorearon las bandas de pDNA usando un transiluminador UV.

III. 4 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GFP EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

III.4.a. Mantenimiento de líneas celulares de mamíferos

Las líneas celulares **A-375** (ATCC® CRL-1619™) derivada de melanoma maligno de piel humano y **CHO-K1** (ATCC® CCL-61™) derivada del ovario de un hámster chino hembra adulto, fueron cultivadas en monocapa en frascos de cultivo de 25 y 75 cm² (Greiner) utilizando medio DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% v/v de SFB inactivado (30 minutos, 56 °C) y mezcla de antimicótico/antibacteriano (Invitrogen). Se realizaron recambios de medio de cultivo regularmente para asegurar el correcto aporte de los nutrientes y factores necesarios para la supervivencia de la población clonal.

Las células fueron mantenidas a una temperatura constante de 37 °C en la estufa DH4000bII (MiLab) sin suplementación de CO₂. Una vez alcanzada la confluencia de 80-90 % aproximadamente, se repicaron las mismas utilizando diluciones 1:3 – 1:5 en frascos de 25 y 75 cm². También se criopreservaron las células partiendo de monocapas a una confluencia del 90%, lavadas mediante PBS 1X, despegadas del soporte con tripsina-EDTA (tripsina 2,5 mg/mL, EDTA 0,38 mg/mL), y resuspendidas en solución de criopreservación estéril (SFB 90%, DMSO 10%). Se las mantuvo en un recipiente de congelación por 24 horas a -86 °C para lograr la disminución gradual de la temperatura (1 °C/minuto) y luego se las mantuvo a -86 °C.

Para el descongelamiento de las líneas, se tomó un criovial (de cada una de ellas) congelado a -86 °C, y se lo colocó en un baño termostático a 37 °C hasta lograr su total descongelamiento. Una vez descongelado, se diluyó el contenido en 10 mL de medio DMEM suplementado con 10% SFB y mezcla de antimicótico/antibacteriano en un tubo Falcon de 15 mL, y se lo centrifugó a 1.500 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, y se procedió a resuspender el pellet en 4 mL de medio DMEM completo, para luego traspasarlo a un frasco de 25 cm².

III.4.b. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de mamífero

La citotoxicidad de las MgAl-Cl LDH NPs sintetizadas en células de mamífero fue evaluada mediante la técnica de tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio (AO/EtBr) (Kasibhatla et al., 2006), la cual permite diferenciar células viables, células en apoptosis temprana y tardía, y células necróticas. El compuesto Naranja de Acridina (λ excitación: 510 nm, λ emisión: 505 nm) penetra en células tanto viables como muertas y se intercala en el ADN de doble cadena emitiendo fluorescencia verde, mientras que el Bromuro de Etidio (λ excitación: 502 nm, λ emisión: 526 nm) es un agente intercalante que emite fluorescencia roja-naranja en células con la membrana dañada en estados avanzados de la apoptosis o necrosis.

Para realizar este procedimiento, se cultivaron las líneas celulares de mamífero A-375 (melanoma epitelial humano) y CHO-K1 (tipo epitelial de ovario de hámster) en placas *multiwell* de

96 pocillos, considerando una densidad estándar de 2×10^5 células por pocillo en 100 μL de medio DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos a 37 °C. Una vez confirmada la confluencia del 80-90%, se eliminaron las células muertas y/o desprendidas lavando dos veces con PBS. Se prepararon concentraciones crecientes de LDH (stock 6,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en un volumen final de 100 μL de DMEM sin suero, y cada una de ellas fue sembrada por duplicado para analizar muerte celular a las 24 hs. Luego de 4 hs de incubación, se reemplazó el contenido de los pocillos con 100 μL de medio DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos, y se incubó a 37°C.

Pasadas las 24 horas de la incubación con diferentes concentraciones de LDH, las células de todos los pocillos fueron lavadas con 100 μL de PBS y cosechadas agregando a cada una de las fosas 100 μL de Tripsina-EDTA. Luego de obtener las células, se agregaron 100 μL de DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos a cada uno de los pocillos, se homogeneizó mediante pipeteo suave, y se colocó la suspensión celular en tubos del tipo Eppendorf de 1,5 mL correctamente rotulados. Luego, se concentraron las células de la suspensión centrifugando 10 minutos a 500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 15 μL de solución AO/EtBr (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AO y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EtBr en PBS). Para finalizar, se tomaron 10 μL de esta suspensión, y se colocó tal volumen en un portaobjetos junto con un cubreobjetos. Inmediatamente, cada uno de estos preparados fue observado utilizando un Microscopio Trinocular Biológico Invertido (Arcano; XYL-403-YAT-PLAN), empleando el filtro UV. Se tomaron al menos tres fotos de distintos campos en cada uno de los preparados con el *software Am-Lite* y un aumento de 20X.

Una vez obtenidos estos registros para cada uno de los tratamientos, se procedió a la observación, conteo y clasificación de células de acuerdo con las diferentes morfologías celulares esperadas por la técnica (**Figura 24**). Los valores obtenidos fueron relativizados con respecto al número total de células, y expresados en porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas.

Los resultados de la disminución de la viabilidad celular fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA), en un diseño completamente aleatorizado con dos réplicas por tratamiento. Las comparaciones entre los tratamientos se realizaron utilizando la prueba de Dunnett. Se consideraron significativas aquellas pruebas con un p-valor $< 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el programa estadístico **Prism10** (GraphPad).

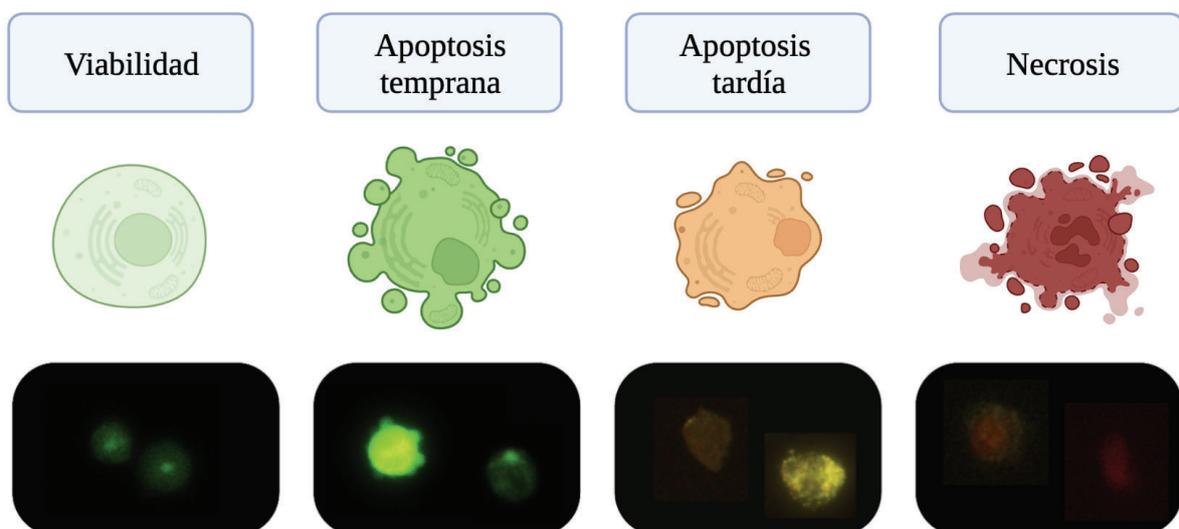


Figura 24. (A) Diferentes estadios morfológicos visualizados en células de mamíferos en el proceso de apoptosis y necrosis. Las células viables muestran núcleos fluorescentes de color verde claro con una

membrana plasmática intacta. Al avanzar en la cascada apoptótica, puede observarse una condensación de cromatina y marginación nuclear, la generación de apoptopodios y protrusiones en la membrana plasmática (denominados blebs). En estadios tardíos, puede verse un cambio en la coloración de las células (de verde anaranjado a rojo) debido a una fragmentación nuclear y degradación del ADN; y las células necróticas tienen fluorescencia roja sin fragmentación de la cromatina. (B) Microfotografías de estadios morfológicos apoptóticos observados. Creado en: BioRender.

III.4.c. Transfección de LDH:ADN en líneas celulares de mamífero

La eficiencia de transfección *in vitro* de los complejos de LDH:ADN, en comparación con la entrega de ADNp desnudo y el reactivo de transfección polimérico polietilenoimina (PEI), fue evaluada en las líneas celulares A-375 y CHO-K1 utilizando un protocolo de transfección de células de mamífero adaptado de *ThermoFisher Scientific (Invitrogen)*.

Se cultivaron células A-375 y CHO-K1 en placas *multiwell* de 96 pocillos a una densidad estándar de 2×10^5 células por pocillo en 100 μ L de medio DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos a 37 °C. Una vez confirmada la confluencia del 80-90%, se eliminaron las células muertas y/o desprendidas lavando dos veces con PBS. Se prepararon relaciones de LDH/DNA de 0, 10, 50, 80 y 100, correspondientes a las concentraciones de LDH estudiadas en el ensayo de citotoxicidad. Para ello, una cantidad constante del plásmido pFastBac Dual-pCMV-EGFP (2 μ g, 6,5 kb) se formuló con cantidades variables de LDH de 0 a 200 μ g, y se añadió DMEM sin suero hasta un volumen final de 100 μ L. Como control positivo, se utilizó el agente de transfección PEI (40 kDa 1 mg/mL) en una relación N/P de 4, donde N/P refiere a la proporción de moles de los grupos amino del polímero catiónico respecto a aquellos de los fosfatos del ADN, representado por la siguiente fórmula: $N/P = 7,53 \times \text{relación en peso de PEI/ADN}$.

Luego de cinco minutos de incubación a 37 °C para formar complejos de LDH:DNA y PEI:DNA, se agregaron a los pocillos correspondientes (por triplicado), y las células se incubaron a 37 °C. Cuatro horas después de la transfección, se reemplazó el contenido de los pocillos con 100 μ L de medio DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos, y se incubó a 37 °C. Pasadas las 24 y 48 horas de la transfección, las células de todos los pocillos fueron lavadas dos veces con 100 μ L de PBS.

Posteriormente, la eficacia de la transfección se evaluó mediante la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo un microscopio de fluorescencia. Las imágenes de células vivas se realizaron utilizando un Microscopio Trinocular Biológico Invertido (Arcano; XYL-403-YAT-PLAN).

CAPÍTULO IV

Resultados

IV. 1 OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN GÉNICA REPORTERA

Se amplificó y purificó el vector de expresión pFastBac Dual-CMV/EGFP, y se determinó la identidad del mismo mediante el análisis del patrón de restricción. En la corrida electroforética del vector linealizado con la enzima HindIII, se observó una banda de 6,5 kpb que se corresponde con el tamaño esperado de 6505 pb. Tras la digestión con las enzimas HindIII y SmaI, se liberaron fragmentos de aproximadamente 1,6 kpb y 4,8 kpb, lo cual coincide con las predicciones realizadas *in silico* (**Figura 25**).

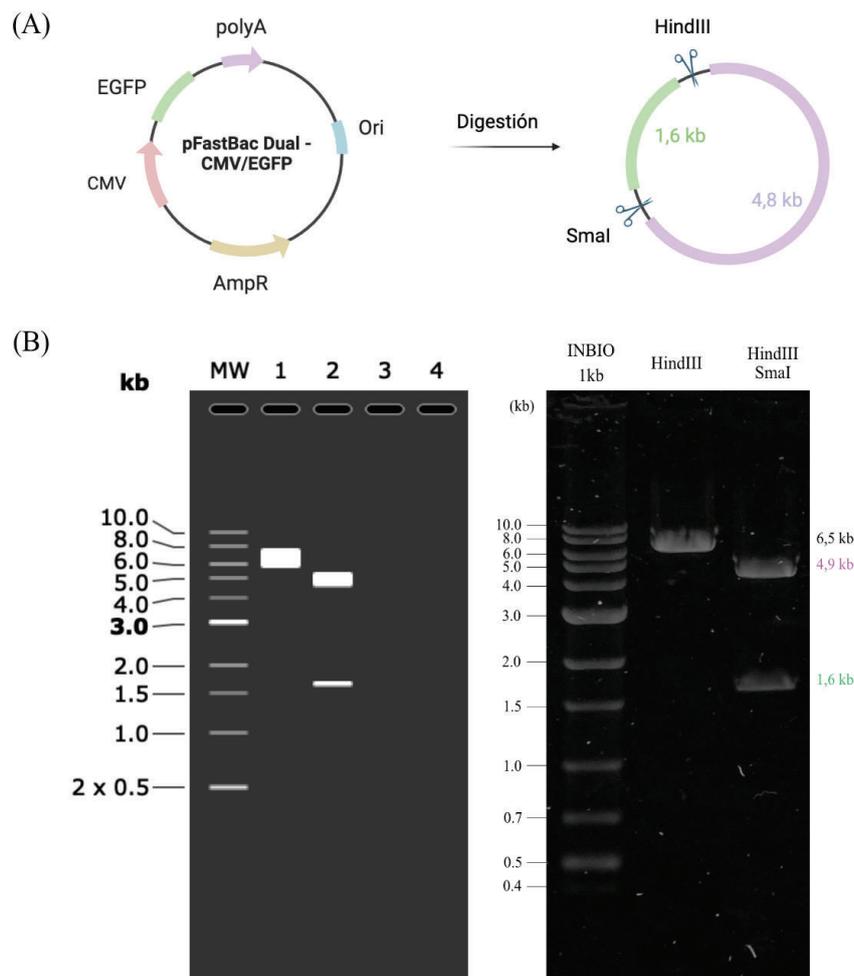


Figura 25. (A) Esquema representativo del vector pFastBac Dual-pCMV-EGFP, digerido con enzimas de restricción de corte único. (B) Corrida electroforética en gel de agarosa 0,8 % p/v revelada con GelGreen (MiniPCR) y luz Azul, donde se sembraron los productos correspondientes a las restricciones con las enzimas HindIII y HindIII+SmaI, y las comparaciones con sus respectivas digestiones *in silico*, donde se indican los tamaños teóricos de los fragmentos esperados. Se utilizó INBIO 1kb de marcador molecular.

Se verificó la pureza del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría empleando como medida la relación de absorbancias a 260 y 280 nm. La concentración resultante fue de aproximadamente 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

IV. 2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LDH

IV.2.a. Caracterización de las MgAl-CI LDH NPs

El método empleado para la síntesis de las MgAl-CI LDH NPs fue generado *ad-hoc* a partir de una adaptación de procedimientos encontrados en la literatura. Dado que las condiciones de síntesis varían en los diferentes trabajos científicos publicados, se realizó una síntesis preliminar de las NPs tomando muestras de 1 mL de distintas cantidades de ciclos de lavado y centrifugación realizados (desde uno hasta cinco, denominados L1-L5). Esto se hizo con el propósito de determinar cuántos lavados eran necesarios para obtener nanopartículas de menor tamaño y mayor monodispersidad, ya que se ha establecido que el tamaño promedio adecuado para la entrega de genes con las LDH NPs se encuentra en el rango de 50 a 200 nm (Karmakar et al., 2022; Kura et al., 2014; Kuthati et al., 2015; Vasti et al., 2016).

Las muestras L1-L5 se analizaron mediante la técnica de DLS, que permite estudiar el tamaño hidrodinámico y la estabilidad coloidal de las NPs mediante la medición de dos parámetros: el *Z-average* y el índice de polidispersidad (PDI), respectivamente. El *Z-Average* representa la distribución del tamaño del diámetro hidrodinámico medio, mientras que PDI proporciona información sobre el grado de dispersión de la muestra: valores cercanos a cero sugieren monodispersidad mientras que valores cercanos a la unidad sugieren una variedad de tamaños de NPs. Los resultados se muestran en la **Tabla II**.

Muestra	Z-Average (nm)	PdI
L0	1512,33 ± 25,0	0,39 ± 0,07
L1	745,75 ± 75,59	0,75 ± 0,07
L2	309,30 ± 29,09	0,67 ± 0,07
L3	196,40 ± 3,61	0,49 ± 0,02
L4	148,70 ± 4,07	0,33 ± 0,02
L5	141,57 ± 1,64	0,37 ± 0,04

Tabla II. *Z-average* y PDI medidos por DLS para el precipitado generado por la coprecipitación inicial (L0) y para las muestras con distinta cantidad de lavados (L1-L5). Los resultados se expresan como $X \pm DS$.

Los datos presentados en la **Tabla II** indican que a medida que aumenta el número de ciclos de lavado, el *Z-Average* de las nanopartículas disminuye, lo que sugiere una reducción en su tamaño hidrodinámico. En cuanto al PDI, se observa una tendencia similar hacia valores cercanos a cero, lo que indica una mayor uniformidad en la distribución de tamaños a medida que se realizan más lavados. Sin embargo, es importante destacar que no se observaron diferencias significativas entre la realización de cuatro o cinco lavados del precipitado inicial.

Dado que las muestras L3 y L4 presentaron un tamaño hidrodinámico promedio de (196 ± 4) nm y (149 ± 4) nm respectivamente, y que cinco lavados no mejoran la uniformidad ni el tamaño de

las NPs en comparación con cuatro lavados, se optó por sintetizar un nuevo lote de MgAl-Cl LDH NPs realizando tres y cuatro lavados. A continuación, se procedió a llevar a cabo una caracterización más detallada de estas NPs.

La **Figura 26** muestra la distribución de tamaño por intensidad para las MgAl-Cl LDH NPs medidos por DLS. La suspensión de LDH sintetizada empleando tres lavados mostró una distribución de tamaño de partícula bimodal, con picos medios de (172 ± 54) y (5171 ± 490) nm, y una intensidad del 92,3 y 7,7 %, respectivamente. Esto indica la presencia de NPs, así como la posible presencia de agregados de las mismas. Se reportó un Z-Average de 199 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0,40. Luego de realizar un lavado adicional, los agregados parecieron segregarse por completo, obteniendo NPs dispersas con un diámetro de (107 ± 22) nm y una intensidad del 100%. El valor promedio Z fue de 148 nm, y el PDI de 0,22 indicó una distribución de tamaño más homogénea.

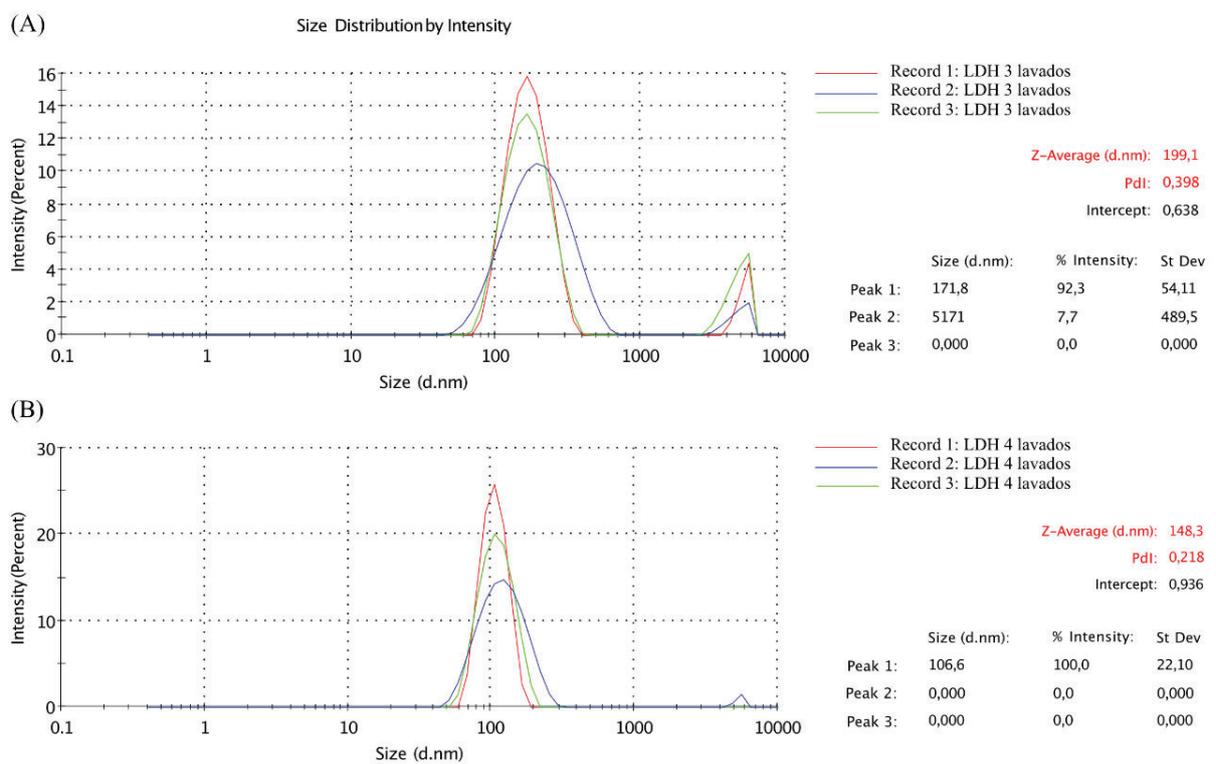


Figura 26. Distribución de tamaño por intensidad para MgAl-LDH NPs sintetizadas empleando tres (A) y cuatro (B) lavados, medidos por DLS. Los medios de pico (Peak) muestran el tamaño y el porcentaje por intensidad de hasta tres picos dentro del resultado, junto con el desvío estándar de las mediciones.

Para el estudio del tamaño real y de la morfología de las NPs, se utilizó la técnica de TEM. La **Figura 27** muestra las imágenes TEM, junto con los histogramas de la frecuencia de distribución del tamaño de las suspensiones de MgAl-Cl LDH. Es posible observar la forma hexaédrica bien definida de las MgAl-Cl LDH NPs, con un tamaño promedio de (179 ± 42) nm y (117 ± 19) nm para las muestras con tres y cuatro lavados, respectivamente.

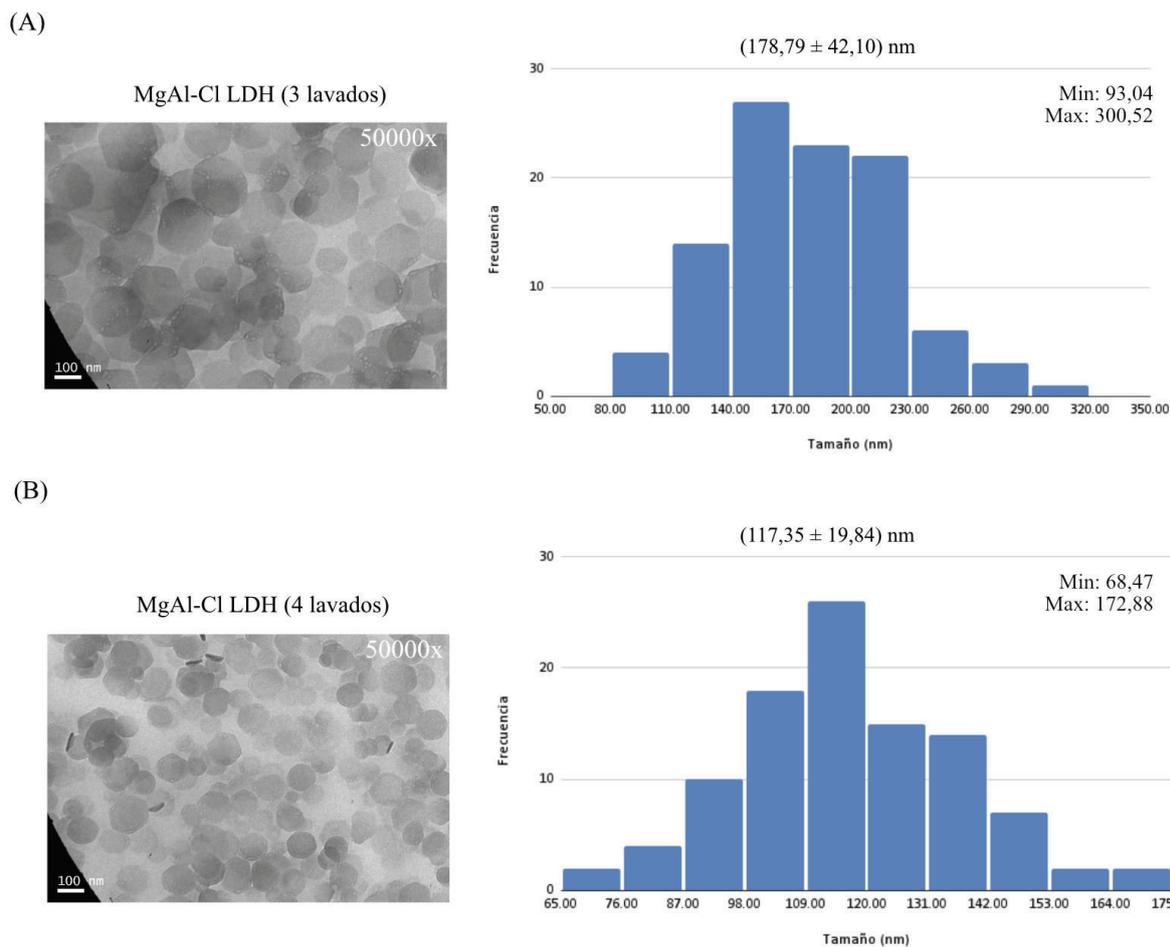


Figura 27. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión con una magnificación de 50000x y histogramas de distribución de tamaño de las suspensiones de MgAl-Cl LDH sintetizadas mediante tres (A) y cuatro (B) lavados.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de las propiedades ópticas y el estado de agregación de las NPs mediante espectroscopía UV-Visible. La **Figura 28** muestra los espectros de absorción de las MgAl-Cl LDH NPs en dispersión acuosa. Ambas muestras analizadas exhiben un pico de absorción a 230 nm en el gráfico de absorbancia en función de la longitud de onda, correspondiente a la región UVC del espectro. La diferencia de absorbancia observada entre las muestras podría atribuirse a la presencia de agregados de NPs en la muestra donde se emplearon tres lavados. La agregación de nanopartículas provoca una disminución en la intensidad de la absorbancia máxima, sin desplazar la longitud de onda a la que se produce el pico.

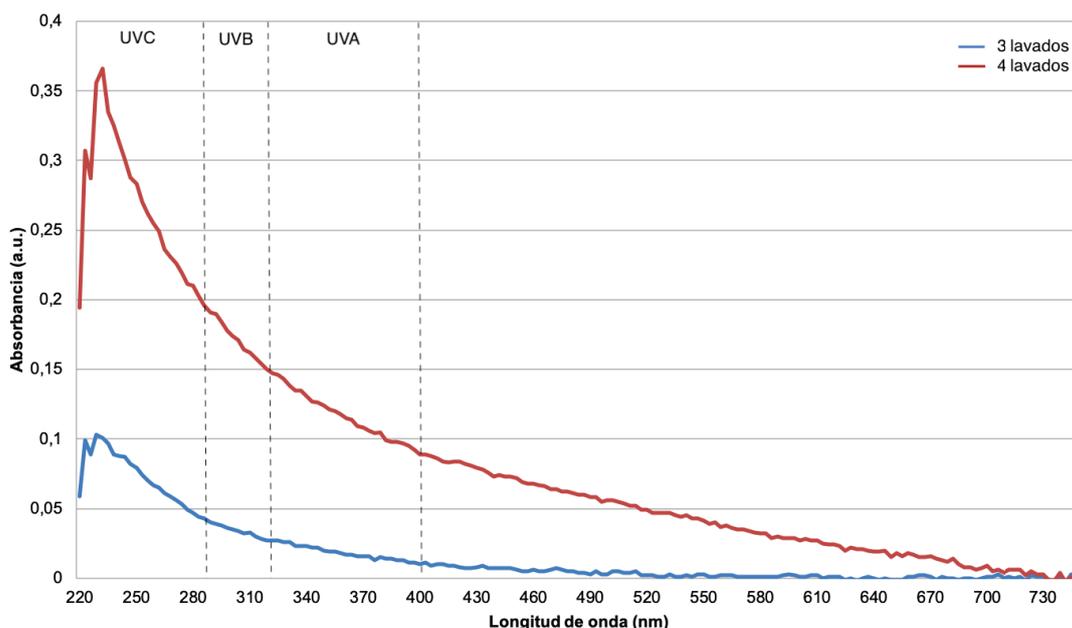


Figura 28. Espectros de absorción UV-Visible de las suspensiones de MgAl-Cl LDH sintetizadas empleando tres y cuatro lavados. Cada punto de absorbancia refleja la medición de la muestra ajustada con la absorbancia del blanco.

Por lo tanto, se concluye que la realización de cuatro lavados es óptima para la obtención de NPs de menor tamaño y mayor monodispersidad, por lo que esta condición se seleccionó para los experimentos posteriores.

IV.2.b. Cuantificación estequiométrica de las MgAl-Cl LDH NPs

Las concentración de las MgAl-Cl LDH NPs sintetizadas empleando cuatro lavados mediante el método de coprecipitación a pH variable fue estimada mediante estequiometría.

Las LDH forman capas de hidróxidos metálicos con carga positiva, con la fórmula estructural general $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}(A^{m-})_{x/m} \cdot yH_2O$, donde M^{II} y M^{III} representan cationes metálicos divalentes y trivalentes, respectivamente, y A^{m-} representa un anión de valencia m de la capa intermedia (Karmakar et al., 2022), que consisten en una amplia variedad de especies inorgánicas y orgánicas. La x denota la densidad de carga de las capas de hidróxido, cuyo valor siempre se mantiene entre 0,20 y 0,33, y está determinado por la fórmula:

$$x = \frac{\text{Carga total de los cationes trivalentes}}{\text{Carga positiva total de la lámina de LDH}} = \frac{[M^{3+}]}{[M^{3+}] + [M^{2+}]} \quad \text{donde} \quad 0,2 \leq x \leq 0,33$$

De acuerdo a las concentraciones molares de los reactivos, y teniendo en cuenta la reacción estequiométrica de síntesis de MgAl-Cl LDH: $(1-x) MgCl_2 + x AlCl_3 + 2 NaOH \rightarrow Mg_{(1-x)}Al_x(OH)_2Cl_x + 2NaCl$; se planteó el balance de carga de los iones intervinientes: $(2 [Mg^{2+}] + 3 [Al^{3+}] = 2 [OH^-] + x [Cl^-])$. De este modo, a partir de la fórmula superior se obtuvo un valor de x de $\frac{1}{3}$, y de (1-x) de $\frac{2}{3}$.

Suponiendo que la totalidad de las sales hexahidratadas de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (203,3 g/mol) y $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (241,4 g/mol) reaccionan para dar nanopartícula, se obtuvo una masa de 13,33 mg a partir de la síntesis. Considerando que el volumen final de resuspensión fue de 1,25 ml, con un rendimiento de la reacción del $\sim 60\%$, se obtuvo una concentración de 6,4 mg/mL de LDH.

IV. 3. FORMULACIÓN DE COMPLEJOS LDH:ADN

IV.3.a. Estudio de la interacción entre LDH y ADN

La capacidad de interacción entre el ADNp y las LDH fue determinada mediante un ensayo EMSA. Se evaluó tanto la capacidad de carga del ADNp en las MgAl-Cl LDH como el tiempo mínimo necesario para que se formen los complejos LDH:ADN.

Para examinar la capacidad de carga, se realizó un ensayo de retardo en gel con distintas relaciones en masa de LDH/DNA de 0 a 120. Los resultados en la **Figura 29** evidencian que al aumentar la proporción de LDH con respecto a una cantidad constante de plásmido, se reduce la movilidad del ADN en el gel de agarosa debido a su interacción con moléculas de LDH con carga positiva. La movilidad del complejo LDH:ADN se vio completamente retardada al emplear una relación de 100 a 1.

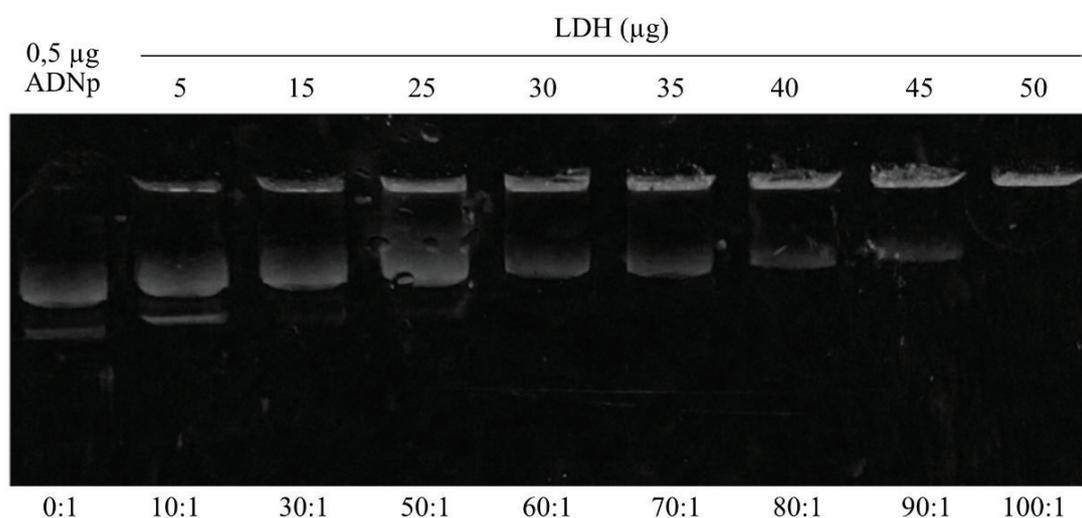


Figura 29. Ensayo de retardo en gel para la determinación de la capacidad de carga de ADN en las MgAl-Cl LDH sintetizadas. Se mezclaron 0,5 µg de ADNp con diferentes cantidades de LDH de 0 a 50 µg, y los complejos de LDH:ADN se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 0,8 % p/v revelada con GelGreen (MiniPCR) y luz UV.

El gráfico del cambio relativo en función de la relación LDH/ADN exhibido en la **Figura 30** proporciona un análisis semicuantitativo, el cual respaldó que las interacciones entre el ADNp y las LDH alcanzaron un nivel máximo en una relación de 100. Por lo tanto, éste fue el valor seleccionado para los futuros experimentos.

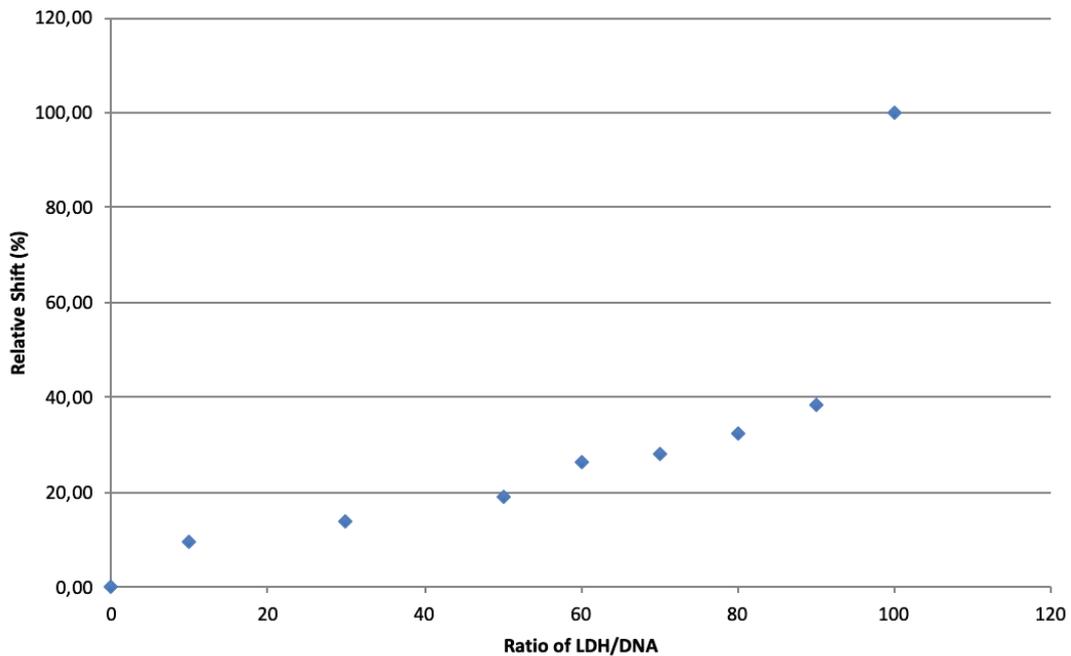


Figura 30. Cambio relativo de los complejos formulados en diferentes proporciones LDH/ADN.

La **Figura 31** muestra el ensayo de retardo en gel realizado para determinar el tiempo mínimo requerido para que el ADNp se cargue completamente en la LDH, empleando una relación de 100. Se vio que cinco minutos de incubación a 37 °C son suficientes para lograr la formación del complejo LDH:ADN a una relación de 100.

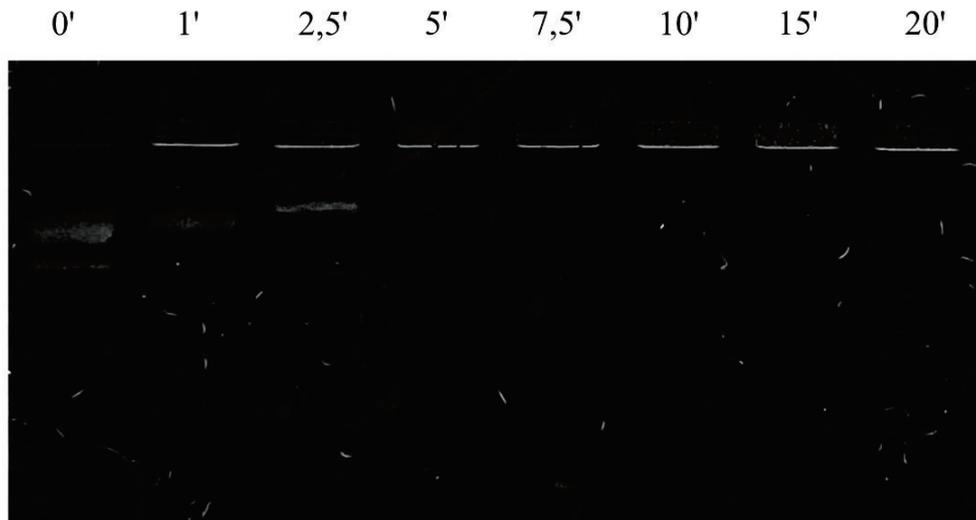


Figura 31. Ensayo de retardo en gel para la determinación del tiempo mínimo de carga de ADN en las MgAl-Cl LDH sintetizadas. Los complejos formulados en una relación de LDH/ADN de 100, incubados durante intervalos de tiempo de 0 a 20 minutos, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 0,8 % p/v revelada con GelGreen (MiniPCR) y luz UV.

IV.3.a. Caracterización de los complejos LDH:ADN

Durante la reacción de intercambio aniónico con los iones cloruro de la intercapa, el ADN puede intercalarse completamente entre las capas de LDH o adsorberse en su superficie formando aglomerados, como se ilustra en la **Figura 32A**. Para caracterizar la interacción entre el ADNp y las LDH se utilizaron las técnicas de TEM y DLS.

Las imágenes de microscopía que se presentan en la **Figura 32B**, sugieren que el ADN cargado negativamente se adsorbió en la superficie de las LDH NPs debido a la formación de aglomerados de complejos de ADN:LDH. La distribución del tamaño por intensidad de las nanopartículas antes y después de la formación de los complejos con el ADN se muestra en la **Figura 32C**. Los tamaños reportados fueron de (107 ± 22) para las MgAl-Cl LDH y (501 ± 12) nm para los complejos LDH:ADN. Se obtuvieron valores de Z-Average de 148 y 1464 nm, con PdI de 0,22 y 0,88, respectivamente.

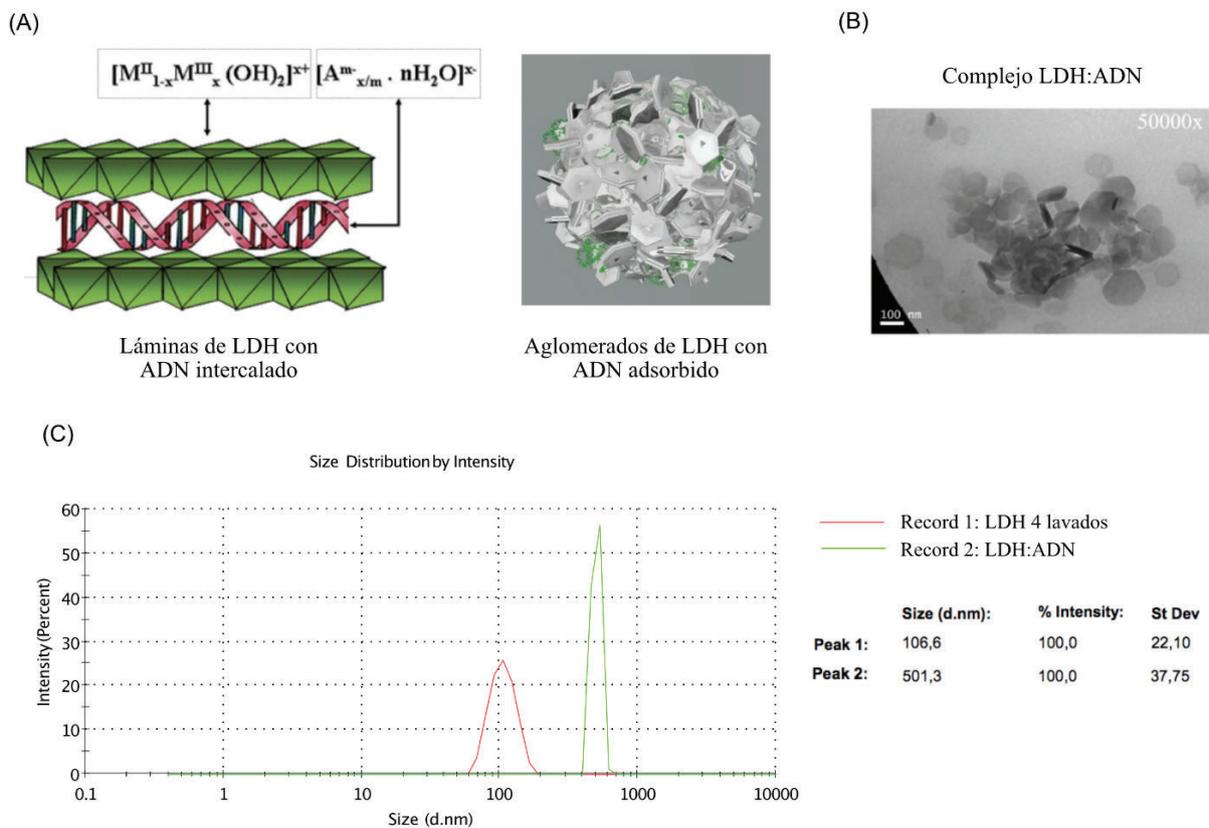


Figura 32. (A) Imagen representativa de las láminas de LDH con ADN intercalado, y de los aglomerados de LDH con ADN adsorbido. (B) Imágen de microscopía electrónica de transmisión con una magnificación de 50000x del complejo LDH:ADN. (C) Distribución de tamaño por intensidad para las MgAl-Cl LDH NPs sintetizadas empleando cuatro lavados y para los complejos LDH:ADN.

IV.3.c. Capacidad de protección del ADN complejado

Para una expresión génica satisfactoria, el vehículo de transporte debe proporcionar protección al material genético frente a la degradación por las nucleasas presentes en el entorno extracelular. La **Figura 33** muestra los distintos tratamientos realizados tanto sobre el ADNp desnudo como el que se

encuentra formando complejos con las NPs. Tras la incubación con la DNAsa, el ADNp desnudo y linealizado se degradó por completo y no se detectó en el gel luego de resolverse la electroforesis. Por el contrario, el ADNp que estaba complejo con las NPs permaneció intacto tras el tratamiento con la DNAsa. Estos resultados sugieren que las LDH sintetizadas pueden proteger eficazmente el ADNp de la degradación mediada por nucleasas, debido a la incapacidad de las enzimas para reconocer secuencias de nucleótidos ni sitios específicos en la estructura del ADN por el impedimento estérico al formar el complejo, lo que asegura la integridad del material genético complejo.

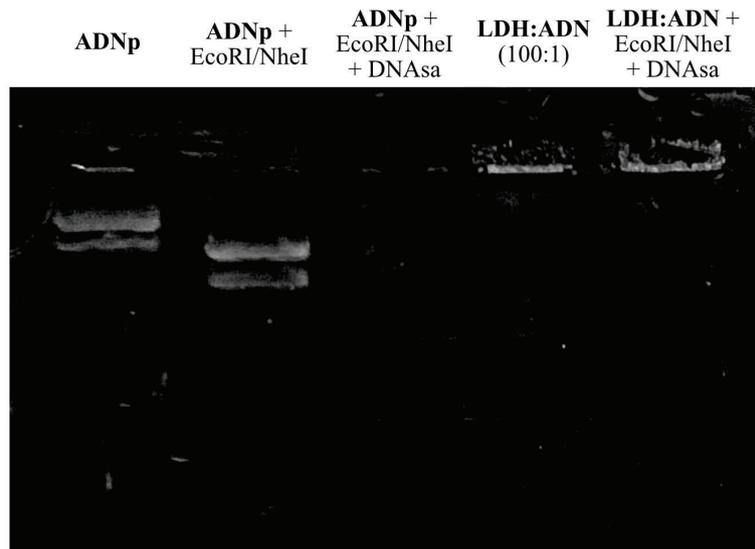


Figura 33. Ensayo de capacidad de protección del ADN complejo a DNAsas. Las calles 1 y 4 son muestras no digeridas de ADNp desnudo y complejos LDH:ADN en una relación de 100, respectivamente. Las calles 3 y 5 son las muestras anteriores expuestas a la enzima DNAsa. La calle 2 es un control de digestión con enzimas de restricción de corte único. Se utilizó una unidad de enzima por microgramo de ADN para cada reacción. La cantidad de ADN fue de 300 ng/pocillo.

IV.3.d. Eficiencia de escape endosomal de los complejos LDH:ADN

Ya determinada la interacción entre las LDH y el ADN, más la protección en la integridad del ácido nucleico, se evaluó si las LDH podrían liberar el ADN en la célula. En tal sentido, después de la internalización de las NPs a través de la vía de endocitosis mediada por clatrina, se almacenan en vesículas de acidificación lenta de la vía endosomal. Durante esta maduración, el valor del pH disminuye de 7,4 a 6,5 en el endosoma temprano, y a 5,5 en el endosoma tardío. Esto da como resultado su disolución parcial, que posteriormente amortigua el pH endosomal y provoca la ruptura del endosoma. Por lo tanto, el escape del endosoma hacia el citoplasma se considera como el paso determinante de la entrega de genes, donde la carga genética es capaz de liberarse de las NPs evitando ser degradado en el lisosoma.

La **Figura 34** muestra el ensayo realizado para evaluar la eficiencia de escape endosomal de los complejos LDH:ADN. Tras el tratamiento del complejo LDH:ADN con HCl para obtener un pH aproximado de 5, que corresponde a la acidificación típica en los endosomas, no se logró una liberación exitosa del ADN. De manera similar, cuando se expuso el complejo a un pH 3, tampoco se

obtuvo la disolución de las NPs, lo que sugiere una eficiencia limitada en el escape endosomal, al menos en las condiciones ensayadas.

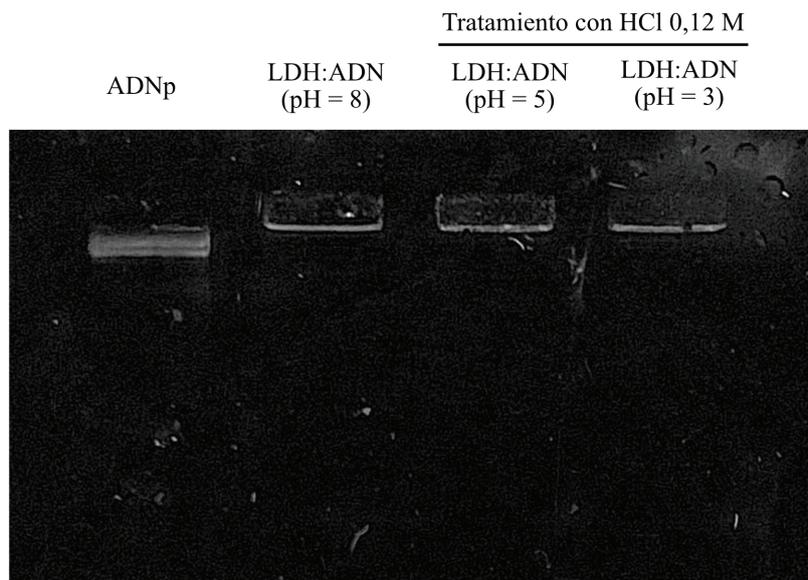


Figura 34. Ensayo de escape endosomal de los complejos LDH:ADN. Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8 % p/v revelada con GelGreen (MiniPCR) y luz UV, donde se sembraron los productos correspondientes a los tratamientos con HCl y NaOH, y los respectivos controles. Se indican sobre las calles de siembra las relaciones utilizadas y las condiciones de pH.

IV. 4 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GFP EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

IV.4.a. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de mamífero

Para evaluar la inducción de apoptosis en células CHO-K1 y A-375, se utilizó la tinción con AO/EtBr después de que las células hayan sido tratadas con distintas concentraciones de LDH. Las células teñidas se contabilizaron y caracterizaron en cuatro tipos celulares según cambios morfológicos en la forma celular y la condensación de la cromatina pasadas las 24 horas de tratamiento.

Al observar las células bajo un microscopio de fluorescencia invertida utilizando un filtro GFP (**Figura 35**), las células control mostraron un color verde claro y no presentaron manchas naranjas o rojas, lo que indica que se mantuvieron en estado viable. Luego de 24 horas de tratamiento con concentraciones de 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de LDH, se observaron alteraciones en la morfología celular de algunas células. Esto incluyó cambios como la condensación de la cromatina, la marginación nuclear y la formación de protrusiones en la membrana plasmática, que son signos de células apoptóticas tempranas. A concentraciones más elevadas (0.8 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), se observó una pérdida de la integridad de la membrana celular, y un incremento en la cantidad de células con tonalidades anaranjadas, lo que sugiere células apoptóticas en una etapa más avanzada. Algunas células incluso adquirieron un tono rojizo, lo que indica que han experimentado muerte celular por necrosis.

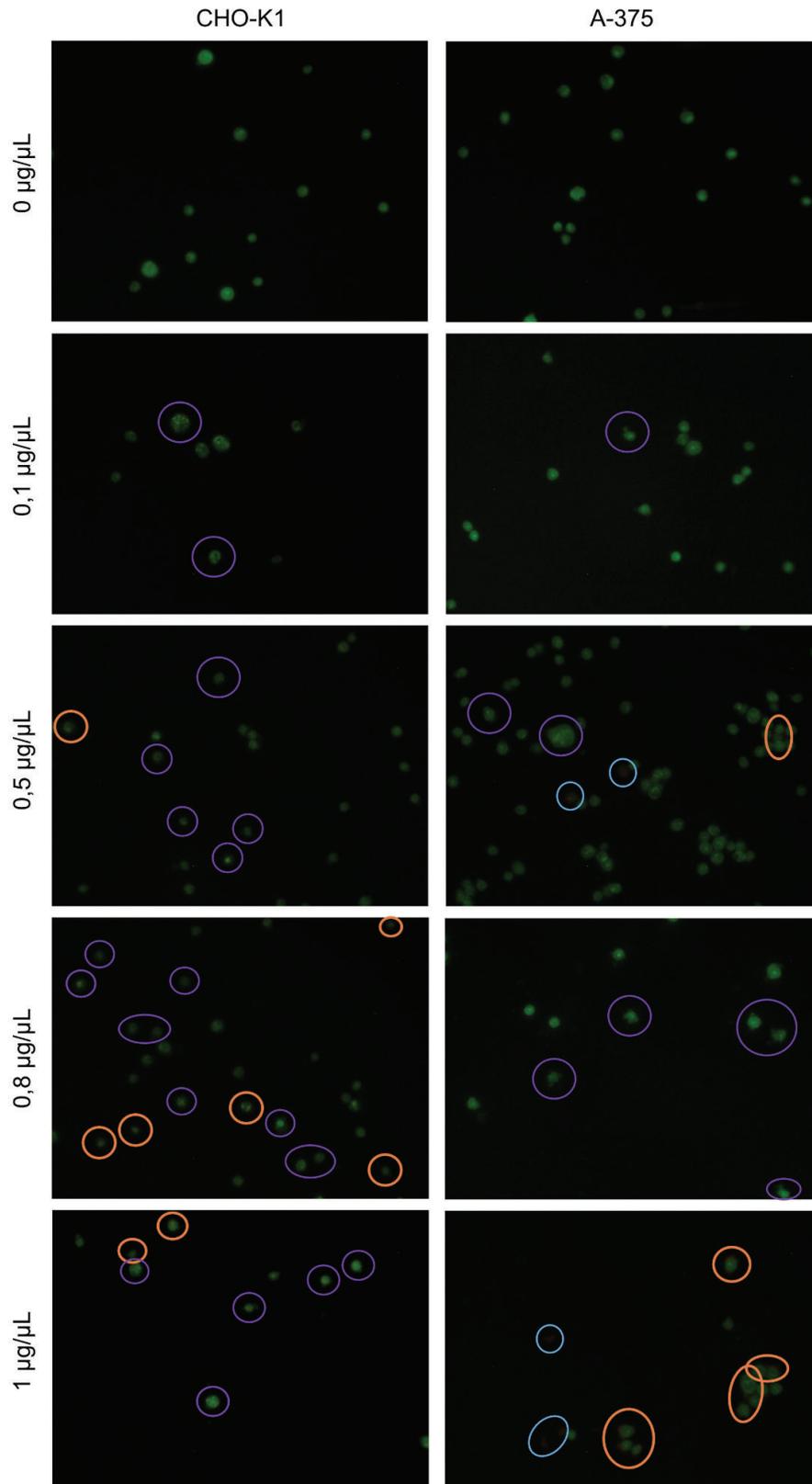


Figura 35. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células CHO-K1 y A-375 teñidas con AO/EtBr; representativas de los tratamientos con diferentes concentraciones de LDH de 0 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se tomaron tres fotos de distintos campos en cada uno de los preparados con un aumento de 20X. Las células apoptóticas tempranas se señalan en violeta, las células apoptóticas tardías en naranja y las células necróticas en celeste.

La viabilidad de las células CHO-K1 y A-375 en presencia de MgAl-Cl LDH en diversas concentraciones se muestra en la **Figura 36**. Las células control mostraron un 100% de viabilidad para ambas líneas celulares pasadas las 24 horas desde el tratamiento. Como era de esperar, el aumento de la concentración de LDH provocó una mayor muerte celular, reflejado por el aumento del número de células apoptóticas y la disminución del número de células viables. En ambos casos, el 50% de la viabilidad celular se produjo entre una concentración de 0.8 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, generando una mayor muerte celular en la línea CHO-K1.

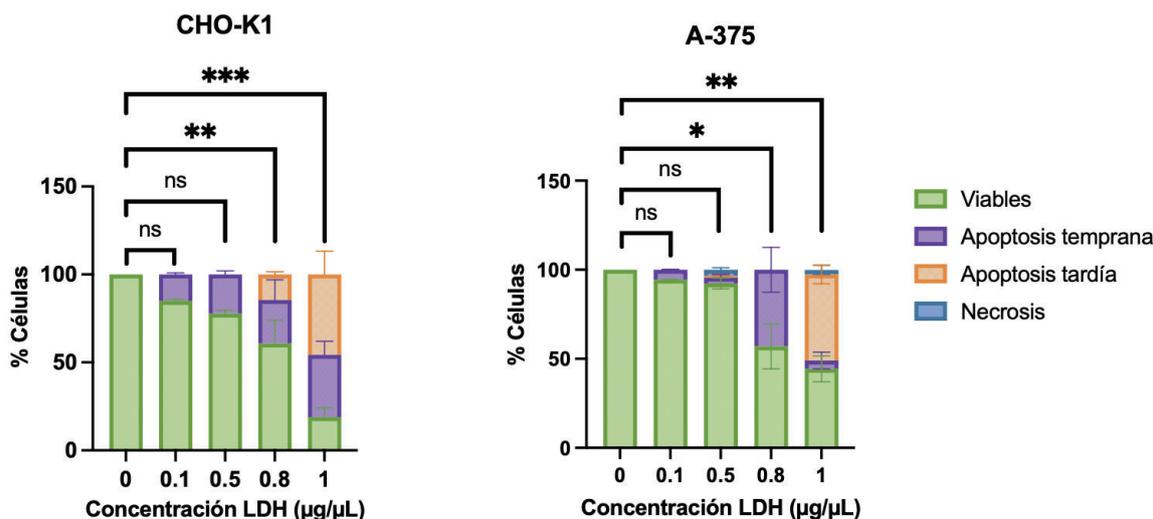


Figura 36. Gráficos de columna apilada al 100 % del porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas y tardías y necróticas, según lo revelado por la tinción con AO/EtBr seguida de un recuento manual, para las líneas celulares CHO-K1 y A-375 a las 24 horas post tratamiento. Se efectuaron comparaciones de los valores del porcentaje medio de células viables únicamente para cada concentración ensayada mediante un ANOVA de una vía (Test de Dunnett) respecto al control no tratado, con un nivel de significación $\alpha=0.05$. Las barras representan la media \pm SD. *, **, *** indican diferencias significativas ($P<0.05$, $P<0.01$ y $P<0.001$ respectivamente); ns: no significativo.

IV.4.b. Transfección de LDH:ADN en líneas celulares de mamífero

La **Figura 37** presenta los resultados de la eficiencia de transfección *in vitro* de MgAl-Cl LDH NPs en células CHO-K1 y A-375, en comparación con la transfección de ADNp desnudo y el reactivo de transfección polimérico PEI. Debido a que el plásmido pFastBac Dual-CMV/EGFP contiene un gen que codifica para la proteína reportera GFP, la expresión exitosa del gen (que indica una transfección eficiente con ingreso al núcleo celular) puede deducirse por la fluorescencia verde emitida. Como era de esperar, la transfección de células solo con pFastBac Dual-CMV/EGFP no produjo fluorescencia, mientras que el uso de PEI como vehículo (grupo experimental considerado como control positivo) demostró una alta eficiencia, aunque se observó un compromiso en la viabilidad celular. En contraste, las células tratadas con el ADNp utilizando las NPs sintetizadas como agentes de transfección no mostraron fluorescencia en ninguna de las relaciones ensayadas, y se observó un cambio en la morfología de las células a medida que se aumentaba la cantidad de LDH.

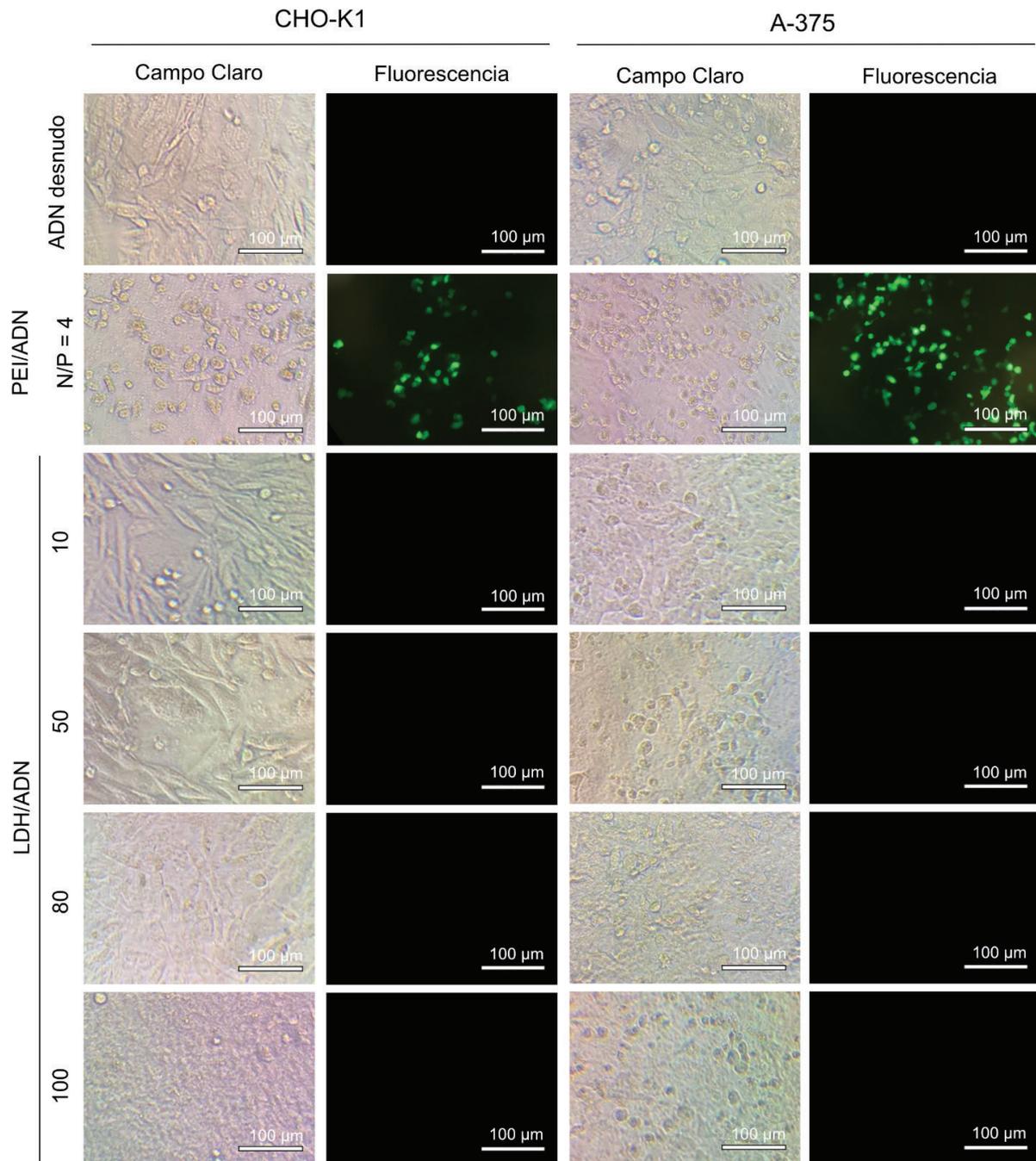


Figura 37. Imágenes de fluorescencia y campo claro (magnificación de 20x) tomadas 48 horas después de la transfección de células CHO-K1 y A-375 con pFastBac Dual-CMV/EGFP (2 μg/pocillo) desnudo o utilizando PEI y LDH como agentes de transfección.

CAPÍTULO V

Discusión, Conclusiones y Perspectivas a Futuro

V. 1 DISCUSIÓN

En este trabajo hemos propuesto sintetizar y caracterizar NPs inorgánicas capaces de cargar ADN, y evaluar su capacidad de transportarlo dentro de células de mamíferos. Para lograr esto, encargamos la síntesis del vector plasmídico pFastBac Dual-CMV/EGFP, portador de un *cassette* de expresión de una proteína reportera, y elegimos a las LDH como vehículo de transporte debido a sus propiedades únicas y ventajas adicionales que las destacan como sistemas no virales de administración de genes.

En general, se obtuvieron suspensiones transparentes y homogéneas de MgAl-Cl LDH NPs con una concentración aproximada de 6,4 mg/mL (rendimiento: 60%) mediante el método de coprecipitación a pH variable generado *ad-hoc*. Las suspensiones obtenidas exhibieron la forma característica hexaédrica bien definida de las MgAl-Cl LDH NPs, con dimensiones laterales controlables en el rango de 50 a 300 nm, valores comparables con datos reportados en la bibliografía (Karmakar et al., 2022; Kura et al., 2014; Kuthati et al., 2015). Es relevante destacar que el valor de *Z-Average* obtenido mediante DLS fue ligeramente mayor que el tamaño determinado por TEM. La medición del tamaño de las NPs por DLS representa su tamaño hidrodinámico, mientras que la medición por TEM corresponde al tamaño real. La distribución de tamaños obtenida por microscopía electrónica suele ser numéricamente más pequeña en comparación con las distribuciones de intensidad medidas por DLS, debido a la forma en que se realiza la medición y cómo se interpretan los resultados.

La distribución del tamaño de partículas en las suspensiones de LDH está fuertemente influenciada por las condiciones de síntesis, especialmente por la temperatura durante la etapa de coprecipitación, y por la duración y la temperatura del tratamiento hidrotermal. Según un estudio realizado por Ladewig et al. (2010b), la síntesis de $\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6\text{NO}_3$ LDH NPs a temperaturas más bajas (0 a 25 °C) durante la co-precipitación resulta en partículas más pequeñas, mientras que un aumento a 60 °C conduce a partículas más grandes. Este fenómeno se explica por la mayor solubilidad de los materiales LDH a temperaturas más bajas, lo que aumenta la sobresaturación favoreciendo una nucleación más rápida y formación de más núcleos cristalinos, reduciendo así el tamaño de partícula. Además, la difusión más lenta del soluto a temperaturas más bajas limita la cantidad de iones que pueden alcanzar los centros de nucleación, contribuyendo a núcleos cristalinos más pequeños. En el tratamiento hidrotermal, un aumento de temperatura mejora el movimiento browniano de las partículas, facilitando que los cristales pequeños en la superficie de los agregados superen las interacciones intra partículas y se separen del mismo (Xu et al., 2006). Debido a la repulsión electrostática de sus cargas superficiales positivas (potencial zeta 30-40 mV), los pequeños cristales pueden permanecer suspendidos de manera estable en la suspensión de LDH. Un incremento en el tiempo de este proceso también aumenta el tamaño máximo de las partículas debido al efecto de maduración de Ostwald (Yamashita et al., 2017), donde cristales pequeños se disuelven y vuelven a depositarse formando cristales más grandes con el tiempo. Este fenómeno se observa comúnmente en soluciones sólidas o líquidas y describe la evolución de una estructura no homogénea a lo largo del tiempo.

Dentro de las condiciones de síntesis evaluadas en este trabajo (co-precipitación a temperatura ambiente y tratamiento hidrotermal a 80 °C durante cuatro horas), la realización de cuatro lavados del precipitado permitió obtener NPs de menor tamaño y mayor monodispersidad. El espectro UV-Visible exhibió el perfil típico de absorbancia de las MgAl-Cl LDH NPs, destacando un pico a 230 nm, lo que confirma la correcta formación de las mismas.

Las MgAl-Cl LDH NPs sintetizadas se formularon con ADNp mediante una reacción de intercambio aniónico con los iones cloruro de la capa intermedia. Durante este proceso, el ADN puede intercalarse parcial o completamente entre las capas de LDH, o adsorberse a la superficie de las mismas. La interacción electrostática entre las NPs y el material genético se estudió a nivel molecular mediante un ensayo de retardo electroforético en gel de agarosa, el cual permitió establecer la capacidad de carga y el tiempo mínimo necesario para la formación de los complejos LDH:ADN. Determinamos que los complejos se forman en una relación de masa LDH/ADN de 100 a 1, mediante una reacción de intercambio iónico a 37 °C durante 5 minutos. Es importante destacar que estos parámetros de incubación difieren de los informados en la literatura. Se han reportado tiempos de incubación de 10 minutos a 37 °C (Dong et al., 2014), 45 minutos a temperatura ambiente (Rabiee et al., 2020), dos horas a 60 °C (Balcomb et al., 2015), cuatro horas a 37 °C (A. Li et al., 2011; Xu et al., 2007) o 48 horas a temperatura ambiente (Senapati et al., 2019), entre otros.

En lugar de intercalarse en los espacios de intercapa de las LDH mediante intercambio aniónico, las imágenes de microscopía electrónica indicaron que las moléculas de ADNp fueron atraídas a la superficie cargada positivamente de las NPs debido a interacciones electrostáticas que interconectan múltiples partículas. Este fenómeno condujo a la formación de aglomerados de complejos LDH:ADN, con un tamaño promedio de 500 nm según las mediciones realizadas por DLS. Parece que biomoléculas más grandes y estéricamente impedidas, como el ADNp que tiende a adoptar una estructura superenrollada en solución, encuentran limitaciones para su completa intercalación en las galerías intercapa mediante intercambio de aniones. Aunque muchos investigadores han informado sobre la exitosa intercalación de nucleótidos pequeños, como el ARNi, se han registrado pocos intentos exitosos con moléculas más grandes. No obstante, Desigaux et al. (2006) informaron sobre la formación de complejos ADN:LDH utilizando un método de coprecipitación (donde las moléculas de ADN tenían hasta 8 kpb de longitud), mediante la formación *in situ* de capas de LDH alrededor del ADN.

La agregación de los complejos LDH:ADN, ocasionada por la adsorción del ADN a las LDH, puede resultar tamaños significativamente más grandes (de alrededor de 500 nm) que las propias LDH NPs, que tienen un tamaño de alrededor de 100 nm. Esta agregación tiene un efecto negativo en la eficacia de la captación celular, ya que los agregados tienden a sedimentar rápidamente en el medio de cultivo. En consecuencia, algunas células en los pocillos tendrán menos exposición a los complejos, y dependiendo del tamaño de estos agregados, podrían estar involucradas vías de captación más lentas (como la fagocitosis o la macropinocitosis), lo que reduce su posibilidad de ser transfectadas eficazmente. De hecho, un estudio realizado (Ladewig et al., 2010b) demostró que la transfección de células adherentes tenía una eficiencia relativamente baja, en el rango del 20-30%; mientras que la transfección de células en suspensión no tuvo éxito. La agitación constante de los cultivos en suspensión impide que los agregados de partículas se depositen en la superficie celular, lo que resulta en una transfección insignificante en estas células.

A pesar de que la posible agregación de los complejos LDH:ADN podría presentar desafíos en cuanto a la transfección, nos planteamos investigar la viabilidad de la transfección con nuestras MgAl-Cl LDH NPs. En vista de este objetivo, logramos simular las condiciones a las que se enfrentan los sistemas de administración *in vitro*, incluyendo la exposición a nucleasas extracelulares e intracelulares, así como la evaluación del escape endosomal mediado por el efecto de esponja de protones. A pesar de que las LDH demostraron proporcionar protección al ADN complejo frente a la degradación enzimática, no mostraron la capacidad de disolverse al pH ácido de los endosomas. Estudios previos, como el de Choy et al. (1999), han demostrado que la liberación de moléculas de ADN de menor tamaño (500-1000 pares de bases) sólo ocurre a pH por debajo de 3 después de una

incubación con HCl durante 1 hora a 37 °C. En contraste, Senapati et al. (2019) lograron un escape endosomal a un pH de 5 utilizando un plásmido que expresaba GFP. Estos resultados indican una posible limitación en los ensayos de transfección, donde el escape endosomal es un paso crítico para la llegada del ADN al núcleo.

Antes de realizar los experimentos de transfección, investigamos la citotoxicidad de las MgAl-Cl LDH NPs en las líneas celulares CHO-K1 y A-375, para determinar un régimen de concentración seguro a utilizar. En comparación con los agentes de transfección de polímeros comúnmente utilizados como el PEI, las NPs sintetizadas presentaron una citotoxicidad mucho menor. Fischer et al. (2003) informaron que la exposición a HMW-PEI (PEI de alto peso molecular) provocó una pérdida rápida y completa de la viabilidad de células L929 (tejido conectivo murino) a una IC₅₀ mayor a 35 µg/mL, independientemente del tiempo de incubación. En cambio, las LDH sintetizadas afectaron en un 50% la viabilidad celular a una concentración de 800-1000 µg/mL luego de 24 horas de incubación.

A pesar de que varios equipos de investigación han reportado una citotoxicidad relativamente baja o insignificante de las LDH NPs en las células de mamíferos, los resultados publicados aún no han establecido un rango de concentración seguro para su aplicación. Esto se puede atribuir a las variaciones en los materiales de LDH utilizados (como los basados en nitrato frente a cloruro), diferencias en la densidad de carga y tamaño de partícula, la variabilidad en la respuesta de líneas celulares específicas a las alteraciones inducidas por la introducción de LDH al medio de cultivo (como cambios en el pH y la fuerza iónica), y las distintas condiciones de cultivo celular (por ejemplo, 10% de suero fetal bovino o medio sin suero). Kriven et al. (2004) informaron que las MgAl-NO₃ LDH no tuvieron ningún efecto citotóxico discernible sobre la viabilidad de las células HL-60 (leucemia promielocítica humana) cuando se administraron a niveles inferiores a 1000 µg/mL durante un máximo de 4 días. En tanto, Xu et al. (2006) demostraron que la viabilidad de las células HEK 293T (riñón embrionario humano) puede ser superior al 50 % tras la exposición a 200-300 µg/mL de MgAl-Cl LDH durante 3 días. Por otra parte, los ensayos de citotoxicidad realizados por otro grupo (Choi et al., 2009) revelaron que las MgAl-CO₃ LDH en una concentración de 250 µg/mL tuvieron pocos efectos tóxicos sobre la proliferación o viabilidad de las células de cuatro líneas celulares analizadas (A549 -células epiteliales de carcinoma pulmonar humano-, L-132 -células epiteliales humanas-, HeLa -células de carcinoma uterino humano- y HOS -células mezcla de tipo epitelial y fibroblastos de un osteosarcoma humano-) durante un máximo de 3 días.

La muerte celular programada es un proceso complejo regulado por diversas vías efectoras y de señalización, vinculadas a la despolarización mitocondrial, la activación de caspasas, la fragmentación del ADN y la formación de protrusiones de membrana y degradación celular. Por lo tanto, confiar únicamente en cambios morfológicos para determinar el efecto de las NPs de LDH en las células de mamíferos resulta tan insuficiente como depender exclusivamente de otros ensayos individuales, como el ensayo de MTT para medir la actividad mitocondrial, el ensayo TUNEL para detectar fragmentación del ADN, la inmunohistoquímica o ELISA para evaluar la actividad enzimática de las caspasas, o el ensayo de Anexina-V para analizar la permeabilidad de la membrana celular (Kari et al., 2022). Esta limitación puede dar lugar a una considerable variabilidad en los niveles de citotoxicidad informados en la literatura, por lo que se recomienda adoptar un enfoque más completo que implique la evaluación de la viabilidad y proliferación celular a través de dos o más ensayos independientes.

Si bien las LDH NPs podrían ser buenas candidatas para la entrega de genes debido a su baja citotoxicidad, en las condiciones ensayadas no lograron transfectar las células adherentes CHO-K1 y A-375. La limitada eficiencia de transfección observada en esta experimentación sugiere que las

barreras para la entrega de ácidos nucleicos, como la captación celular mediante endocitosis mediada por clatrina, el escape endosomal, la disociación del ADN plasmídico y el tráfico nuclear, no fueron superadas de manera efectiva.

V. 2 CONCLUSIONES

La síntesis se llevó a cabo mediante el método de coprecipitación a pH variable, seguido de un envejecimiento hidrotérmico, obteniendo suspensiones transparentes y homogéneas de MgAl-Cl LDH NPs con una concentración de aproximadamente 6,4 mg/mL y dimensiones controlables en el rango de 100 a 200 nm.

La formulación exitosa de complejos LDH:ADN se logró mediante una reacción de intercambio aniónico, y se estableció como óptima una relación de masa LDH/ADN de 100 a 1, con un tiempo de incubación de 5 minutos a 37 °C.

A nivel microscópico, las imágenes de microscopía electrónica revelaron que las moléculas de ADNp fueron atraídas a la superficie cargada positivamente de las NPs debido a interacciones electrostáticas, formando aglomerados de complejos LDH:ADN con un tamaño promedio de 500 nm según las mediciones por DLS.

A pesar de la protección proporcionada al ADN frente a la degradación enzimática, las LDH no demostraron la capacidad de disolverse en condiciones ácidas similares a las del endosoma, al menos en las condiciones ensayadas.

La citotoxicidad de las MgAl-Cl LDH NPs fue significativamente menor en comparación con agentes de transfección poliméricos comunes. Las LDH sintetizadas afectaron en un 50% la viabilidad celular a una concentración de 800-1000 µg/mL luego de 24 horas de incubación.

Los experimentos de transfección indicaron una eficiencia limitada en las células CHO-K1 y A-375, sugiriendo que las barreras para la entrega de ácidos nucleicos no fueron superadas efectivamente bajo las condiciones ensayadas.

En conclusión, aunque las LDH NPs presentan características prometedoras, su aplicación como vectores de entrega de genes enfrenta desafíos significativos que requieren una comprensión más profunda y estrategias mejoradas para superar las barreras intracelulares y mejorar la eficiencia de transfección.

V. 3 PERSPECTIVAS A FUTURO

En vista de las dificultades presentadas en este trabajo, se plantea como perspectiva a futuro la evaluación de recubrimientos alternativos que permitan alcanzar niveles de transfección aceptables.

Las estrategias comunes para prevenir la agregación de LDH NPs son aumentar las repulsiones electrostáticas entre las partículas dispersas, aumentar su afinidad por el medio de dispersión o inducir impedimento estérico (Vasti et al., 2019). Por lo tanto, la estabilidad coloidal de

LDH se ve mejorada por la adsorción de polímeros (especialmente polielectrolitos con carga opuesta, grupos carboxilato, sulfonato o fosfonato) que modifiquen las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las LDH, tales como su carga, reactividad y toxicidad (Vasti et al., 2017). El fenómeno de adsorción física se ve influenciado por sus propias propiedades (peso molecular, estructura, grupos funcionales y concentración), las condiciones de la solución (pH y fuerza iónica) y las propiedades de las NPs (carga superficial y tamaño). Un estudio realizado por D. Li et al. (2011) demostró que los nanocompuestos de PEG:LDH exhibieron una notable mejora en estabilidad y dispersión, debido al impedimento estérico del PEG y al rechazo electrostático. Otro enfoque frecuentemente empleado es el recubrimiento de las NPs con albúmina, la principal proteína del plasma sanguíneo, que exhibe propiedades estabilizadoras en soluciones fisiológicas (Gu et al., 2015).

Sería interesante investigar a su vez estrategias de mejora del escape endosomal, que permitan una liberación más eficiente en el entorno ácido de los endosomas. Un resto amortiguador ampliamente utilizado es el anillo de imidazol de la histidina, una base débil con un pKa 6, capaz de amortiguar pH endosomal (Sunshine et al., 2011). El poli[2-(dietilamino)etil metacrilato] (PDEA) y poli[2-(diisopropilamino)etil metacrilato] (PDPA) son parte de una familia de polímeros sensibles al pH que contienen aminas terciarias, empleados cada vez más para su uso en sistemas inorgánicos (Mollé et al., 2022). Un enfoque alternativo es la conjugación de péptidos de penetración celular (CPP) en la superficie de las nanopartículas para facilitar la entrega en el citosol. Los CPP ricos en arginina, derivados de proteínas virales o bacterianas, se emplean comúnmente para facilitar el escape endosomal, aprovechando la interacción del grupo funcional guanidinio de la arginina con los grupos fosfato de los fosfolípidos de la membrana. Un ejemplo relevante es la melitina, que gracias a su secuencia catiónica C-terminal lisina-arginina-lisina-arginina, ha demostrado ser eficaz en la mejora tanto del escape endosomal como del transporte nuclear (Torres-Vanegas et al., 2021).

En relación a la entrada nuclear, en las células en división, este proceso se ve facilitado por el desmontaje de la envoltura nuclear durante la mitosis. Sin embargo, muchas células objetivo de la terapia génica no se dividen durante la transferencia genética, lo que significa que se requieren mecanismos de transporte activo. Planteamos la posibilidad de incluir una secuencia de direccionamiento nuclear de ADN (DNNTS) en el ADN_p, para favorecer su reconocimiento por factores de transcripción expresados en las células diana; que al contener secuencias de localización nuclear (NLS) pueden iniciar el transporte de todo el complejo a través del complejo de poro nuclear (NPC) mediado por importinas citoplasmáticas (Lu et al., 2021).

CAPÍTULO VI

Bibliografía

Referencias bibliográficas

- Alnasser, S. M. (2021). Review on mechanistic strategy of gene therapy in the treatment of disease. *Gene*, 769, 145246. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145246>
- Anguela, X. M., & High, K. A. (2019). Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annual Review of Medicine*, 70(1), 273-288. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>
- Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2015). A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles. *The AAPS Journal*, 17(5), 1041-1054. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9780-2>
- Arabi, F., Mansouri, V., & Ahmadbeigi, N. (2022). Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113324. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113324>
- Augustine, R., Hasan, A., Primavera, R., Wilson, R. J., Thakor, A. S., & Kevadiya, B. D. (2020). Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. *Materials Today Communications*, 25, 101692. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101692>
- Balcomb, B., Singh, M., & Singh, S. (2015). Synthesis and Characterization of Layered Double Hydroxides and Their Potential as Nonviral Gene Delivery Vehicles. *ChemistryOpen*, 4(2), 137-145. <https://doi.org/10.1002/open.201402074>
- Bayda, S., Hadla, M., Palazzolo, S., Riello, P., Corona, G., Toffoli, G., & Rizzolio, F. (2018). Inorganic Nanoparticles for Cancer Therapy: A Transition from Lab to Clinic. *Current Medicinal Chemistry*, 25(34), 4269-4303. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171229141156>
- Bian, Y., Cai, X., Lv, Z., Xu, Y., Wang, H., Tan, C., Liang, R., & Weng, X. (2023). Layered Double Hydroxides: A Novel Promising 2D Nanomaterial for Bone Diseases Treatment. *Advanced Science*, 2301806. <https://doi.org/10.1002/advs.202301806>
- Braga, L. A. M., Filho, C. G. C., & Mota, F. B. (2022). Future of genetic therapies for rare genetic diseases: What to expect for the next 15 years? *Therapeutic Advances in Rare Disease*, 3, 1-16. <https://doi.org/10.1177/2633004022110084>
- Brooks, I. R., Sheriff, A., Moran, D., Wang, J., & Jacków, J. (2023). Challenges of Gene Editing Therapies for Genodermatoses. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2298. <https://doi.org/10.3390/ijms24032298>
- Bukhtiyarova, M. V. (2019). A review on effect of synthesis conditions on the formation of layered double hydroxides. *Journal of Solid State Chemistry*, 269, 494-506. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2018.10.018>
- Bullo, S., & Hussein, M. Z. (2015). Inorganic nanolayers: Structure, preparation, and biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 5609. <https://doi.org/10.2147/IJN.S72330>
- Chen, L., Zhou, X., & He, C. (2019). Mesoporous silica nanoparticles for tissue-engineering applications. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 11(6). <https://doi.org/10.1002/wnan.1573>
- Choi, S.-J., & Choy, J.-H. (2011). Layered double hydroxide nanoparticles as target-specific delivery carriers: Uptake mechanism and toxicity. *Nanomedicine*, 6(5), 803-814. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.86>

- Choi, S.-J., Oh, J.-M., & Choy, J.-H. (2009). Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *103*(3), 463-471. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.017>
- Choi, S.-J., Oh, J.-M., & Choy, J.-H. (2010). Biocompatible Nanoparticles Intercalated with Anticancer Drug for Target Delivery: Pharmacokinetic and Biodistribution Study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *10*(4), 2913-2916. <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.1415>
- Chou, L. Y. T., Ming, K., & Chan, W. C. W. (2011). Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.*, *40*(1), 233-245. <https://doi.org/10.1039/C0CS00003E>
- Choy, J.-H., Kwak, S.-Y., Park, J.-S., Jeong, Y.-J., & Portier, J. (1999). Intercalative Nanohybrids of Nucleoside Monophosphates and DNA in Layered Metal Hydroxide. *Journal of the American Chemical Society*, *121*(6), 1399-1400. <https://doi.org/10.1021/ja981823f>
- Cupic, K. I., Rennick, J. J., Johnston, A. P., & Such, G. K. (2019). Controlling endosomal escape using nanoparticle composition: Current progress and future perspectives. *Nanomedicine*, *14*(2), 215-223. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0326>
- Danaeifar, M. (2022). Recent advances in gene therapy: Genetic bullets to the root of the problem. *Clinical and Experimental Medicine*, *23*(4), 1107-1121. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00925-x>
- Desigaux, L., Belkacem, M. B., Richard, P., Cellier, J., Léone, P., Cario, L., Leroux, F., Taviot-Guého, C., & Pitard, B. (2006). Self-Assembly and Characterization of Layered Double Hydroxide/DNA Hybrids. *Nano Letters*, *6*(2), 199-204. <https://doi.org/10.1021/nl052020a>
- Dong, H., Chen, M., Rahman, S., Parekh, H. S., Cooper, H. M., & Xu, Z. P. (2014). Engineering small MgAl-layered double hydroxide nanoparticles for enhanced gene delivery. *Applied Clay Science*, *100*, 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.04.028>
- Elsaesser, A., & Howard, C. V. (2012). Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(2), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.001>
- Fahami, A., Al-Hazmi, F. S., Al-Ghamdi, A. A., Mahmoud, W. E., & Beall, G. W. (2016). Structural characterization of chlorine intercalated Mg-Al layered double hydroxides: A comparative study between mechanochemistry and hydrothermal methods. *Journal of Alloys and Compounds*, *683*, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.05.032>
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., & Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, *24*(7), 1121-1131. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00445-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00445-3)
- Gessner, I., & Neundorff, I. (2020). Nanoparticles Modified with Cell-Penetrating Peptides: Conjugation Mechanisms, Physicochemical Properties, and Application in Cancer Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2536. <https://doi.org/10.3390/ijms21072536>
- Gicquel, T., Cortial, L., Lutsyk, K., Forget, S., Braun, S., Boyer, P.-O., Laugel, V., & Blin, O. (2023). 2017-2023: State of the art of gene therapies in rare diseases in Europe: the dynamics of clinical R&D, new approved treatments and expected therapies in the pipelines. *Rare Disease and Orphan Drugs Journal*, *2*(4). <https://doi.org/10.20517/rdodj.2023.29>
- Gonçalves, G. A. R., & Paiva, R. de M. A. (2017). Gene therapy: Advances, challenges and perspectives. *Einstein (São Paulo)*, *15*(3), 369-375.

<https://doi.org/10.1590/s1679-45082017rb4024>

- González-Lamuño, D., & García Fuentes, M. (2008). Enfermedades de base genética. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272008000400008>
- Goodarzi, S., Da Ros, T., Conde, J., Sefat, F., & Mozafari, M. (2017). Fullerene: Biomedical engineers get to revisit an old friend. *Materials Today*, 20(8), 460-480. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.03.017>
- Goswami, R., Subramanian, G., Silayeva, L., Newkirk, I., Doctor, D., Chawla, K., Chattopadhyay, S., Chandra, D., Chilukuri, N., & Betapudi, V. (2019). Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Frontiers in Oncology*, 9, 297. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00297>
- Green, M. and Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Gu, Z., Zuo, H., Li, L., Wu, A., & Xu, Z. P. (2015). Pre-coating layered double hydroxide nanoparticles with albumin to improve colloidal stability and cellular uptake. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(16), 3331-3339. <https://doi.org/10.1039/C5TB00248F>
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>
- Han, S., Mahato, R. I., Sung, Y. K., & Kim, S. W. (2000). Development of Biomaterials for Gene Therapy. *Molecular Therapy*, 2(4), 302-317. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0142>
- Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, 2(8), 1849-1861. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>
- Herd, H., Daum, N., Jones, A. T., Huwer, H., Ghandehari, H., & Lehr, C.-M. (2013). Nanoparticle Geometry and Surface Orientation Influence Mode of Cellular Uptake. *ACS Nano*, 7(3), 1961-1973. <https://doi.org/10.1021/nn304439f>
- High, K. A., & Roncarolo, M. G. (2019). Gene Therapy. *New England Journal of Medicine*, 381(5), 455-464. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1706910>
- Jin, W., Ha, S., Myung, J.-H., Kim, B. C., & Park, D.-H. (2020). Ceramic layered double hydroxide nanohybrids for therapeutic applications. *Journal of the Korean Ceramic Society*, 57(6), 597-607. <https://doi.org/10.1007/s43207-020-00090-5>
- Ju, Y., Guo, H., Edman, M., & Hamm-Alvarez, S. F. (2020). Application of advances in endocytosis and membrane trafficking to drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 157, 118-141. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.026>
- Kameliya, J., Verma, A., Dutta, P., Arora, C., Vyas, S., & Varma, R. S. (2023). Layered Double Hydroxide Materials: A Review on Their Preparation, Characterization, and Applications. *Inorganics*, 11(3), 121. <https://doi.org/10.3390/inorganics11030121>
- Kari, S., Subramanian, K., Altomonte, I. A., Murugesan, A., Yli-Harja, O., & Kandhavelu, M. (2022). Programmed cell death detection methods: A systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*, 27(7-8), 482-508. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01735-y>
- Karmakar, A. K., Hasan, Md. S., Sreemani, A., Das Jayanta, A., Hasan, Md. M., Tithe, N. A., & Biswas, P. (2022). A review on the current progress of layered double hydroxide application in

- biomedical sectors. *The European Physical Journal Plus*, 137(7), 801.
<https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-022-02993-0>
- Kasibhatla S., Amarante-Mendes G.P., Finucane D., Brunner T., Bossy-Wetzel E., et al. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis; CSH Proton (2006); 2006(3).
- Kasina, V., Mowwn, R. J., Bahal, R., & Sartor, G. C. (2022). Nanoparticle delivery systems for substance use disorder. *Neuropsychopharmacology*, 47(8), 1431-1439.
<https://doi.org/10.1038/s41386-022-01311-7>
- Kaufmann, P., Pariser, A. R., & Austin, C. (2018). From scientific discovery to treatments for rare diseases – the view from the National Center for Advancing Translational Sciences – Office of Rare Diseases Research. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), 196.
<https://doi.org/10.1186/s13023-018-0936-x>
- Kawabata, K., Takakura, Y. & Hashida, M. (1995). The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharmaceutical Research* 12, 825–830. <https://doi.org/10.1023/A:1016248701505>
- Khan, A., Khan, I., Suleman, S., Zahid, K., & Nabi, G. (2015). A Comprehensive Review on Various Aspects of Genetic Disorders. *Journal of Biology and Life Science*, 6(2), 110.
<https://doi.org/10.5296/jbls.v6i2.7342>
- Kotterman, M. A., Chalberg, T. W., & Schaffer, D. V. (2015). Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 17(1), 63-89.
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-104938>
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., & He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>
- Kratzer, K., Getz, L. J., Peterlini, T., Masson, J.-Y., & Delleire, G. (2022). Addressing the dark matter of gene therapy: Technical and ethical barriers to clinical application. *Human Genetics*, 141(6), 1175-1193. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02272-5>
- Kriven, W. M., Kwak, S.-Y., Wallig, M. A., & Choy, J.-H. (2004). Bio-Resorbable Nanoceramics for Gene and Drug Delivery. *MRS Bulletin*, 29(1), 33-37. <https://doi.org/10.1557/mrs2004.14>
- Kuijper, E. C., Bergsma, A. J., Pijnappel, W. W. M. P., & Aartsma-Rus, A. (2021). Opportunities and challenges for antisense oligonucleotide therapies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44(1), 72-87. <https://doi.org/10.1002/jimd.12251>
- Kura, A. U., Hussein, M. Z., Fakurazi, S., & Arulselvan, P. (2014). Layered double hydroxide nanocomposite for drug delivery systems; bio-distribution, toxicity and drug activity enhancement. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 47.
<https://doi.org/10.1186/s13065-014-0047-2>
- Kuthati, Y., Kankala, R. K., & Lee, C.-H. (2015). Layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications: Current status and recent prospects. *Applied Clay Science*, 112-113, 100-116. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.04.018>
- Kwak, S.-Y., Kriven, W. M., Wallig, M. A., & Choy, J.-H. (2004). Inorganic delivery vector for intravenous injection. *Biomaterials*, 25(28), 5995-6001.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.056>

- Ladewig, K., Niebert, M., Xu, Z. P., Gray, P. P., & Lu, G. Q. M. (2010a). Efficient siRNA delivery to mammalian cells using layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials*, *31*(7), 1821-1829. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.058>
- Ladewig, K., Niebert, M., Xu, Z. P., Gray, P. P., & Lu, G. Q. (Max). (2010b). Controlled preparation of layered double hydroxide nanoparticles and their application as gene delivery vehicles. *Applied Clay Science*, *48*(1-2), 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.11.032>
- Ladewig, K., Xu, Z. P., & Lu, G. Q. (Max). (2009). Layered double hydroxide nanoparticles in gene and drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *6*(9), 907-922. <https://doi.org/10.1517/17425240903130585>
- Lanigan, T. M., Kopera, H. C., & Saunders, T. L. (2020). Principles of Genetic Engineering. *Genes*, *11*(3), 291. <https://doi.org/10.3390/genes11030291>
- Lanza R., Langer R. & Vacanti J.P. Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition), 2013; ISBN: 978-0-12-398358-9
- Li, A., Qin, L., Wang, W., Zhu, R., Yu, Y., Liu, H., & Wang, S. (2011). The use of layered double hydroxides as DNA vaccine delivery vector for enhancement of anti-melanoma immune response. *Biomaterials*, *32*(2), 469-477. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.107>
- Li, D., Xu, X., Xu, J., & Hou, W. (2011). Poly(ethylene glycol) haired layered double hydroxides as biocompatible nanovehicles: Morphology and dispersity study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *384*(1-3), 585-591. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.05.012>
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: Mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>
- Lim, E.-K., Jang, E., Lee, K., Haam, S., & Huh, Y.-M. (2013). Delivery of Cancer Therapeutics Using Nanotechnology. *Pharmaceutics*, *5*(4), 294-317. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5020294>
- Lisik, K., & Krokosz, A. (2021). Application of Carbon Nanoparticles in Oncology and Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15), 8341. <https://doi.org/10.3390/ijms22158341>
- Liu, Y., Wu, Y., Zhang, R., Lam, J., Ng, J. C., Xu, Z. P., Li, L., & Ta, H. T. (2019). Investigating the Use of Layered Double Hydroxide Nanoparticles as Carriers of Metal Oxides for Theranostics of ROS-Related Diseases. *ACS Applied Bio Materials*, *2*(12), 5930-5940. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00852>
- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., & Ruan, H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Communication and Signaling*, *19*(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y>
- Mallakpour, S., Hatami, M., & Hussain, C. M. (2020). Recent innovations in functionalized layered double hydroxides: Fabrication, characterization, and industrial applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, *283*, 102216. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102216>
- Manfredsson, F. P., & Benskey, M. J. (Eds.). (2019). *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols* (Vol. 1937). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9065-8>

- Masarudin, M. J., Yusoff, K., Rahim, R. A., & Hussein, M. Z. (2009). Successful transfer of plasmid DNA into *in vitro* cells transfected with an inorganic plasmid–Mg/Al-LDH nanobiocomposite material as a vector for gene expression. *Nanotechnology*, *20*(4), 045602. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/4/045602>
- McErlean, E. M., McCrudden, C. M., & McCarthy, H. O. (2016). Delivery of nucleic acids for cancer gene therapy: Overcoming extra- and intra-cellular barriers. *Therapeutic Delivery*, *7*(9), 619-637. <https://doi.org/10.4155/tde-2016-0049>
- Medina, C., Santos-Martinez, M. J., Radomski, A., Corrigan, O. I., & Radomski, M. W. (2007). Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance: Nanoparticles. *British Journal of Pharmacology*, *150*(5), 552-558. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707130>
- Min, Y., Caster, J. M., Eblan, M. J., & Wang, A. Z. (2015). Clinical Translation of Nanomedicine. *Chemical Reviews*, *115*(19), 11147-11190. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00116>
- Mirón-Barroso, S., Domènech, E. B., & Trigueros, S. (2021). Nanotechnology-Based Strategies to Overcome Current Barriers in Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8537. <https://doi.org/10.3390/ijms22168537>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(2), 101-124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Mittal, J. (2021). Recent progress in the synthesis of Layered Double Hydroxides and their application for the adsorptive removal of dyes: A review. *Journal of Environmental Management*, *295*, 113017. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113017>
- Mollé, L. M., Smyth, C. H., Yuen, D., & Johnston, A. P. R. (2022). Nanoparticles for vaccine and gene therapy: Overcoming the barriers to nucleic acid delivery. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *14*(6). <https://doi.org/10.1002/wnan.1809>
- Nagaraj, V. J., Sun, X., Mehta, J., Martin, M., Ngo, T., & Dey, S. K. (2015). Synthesis, Characterization, and *In Vitro* Drug Delivery Capabilities of (Zn, Al)-Based Layered Double Hydroxide Nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*, *2015*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2015/350370>
- Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2020). Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 385. <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>
- Naldini, L. (2011). Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nature Reviews Genetics*, *12*(5), 301-315. <https://doi.org/10.1038/nrg2985>
- Negri, V., Pacheco-Torres, J., Calle, D., & López-Larrubia, P. (2020). Carbon Nanotubes in Biomedicine. *Topics in Current Chemistry*, *378*(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0278-8>
- Nguengang Wakap, S., Lambert, D. M., Olry, A., Rodwell, C., Gueydan, C., Lanneau, V., Murphy, D., Le Cam, Y., & Rath, A. (2020). Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: Analysis of the Orphanet database. *European Journal of Human Genetics*, *28*(2), 165-173. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>
- Nishiyama, T., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2021). Toward CRISPR Therapies for Cardiomyopathies. *Circulation*, *144*(19), 1525-1527.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057203>

- Nóbrega, C., Mendonça, L., & Matos, C. A. (2020). *A Handbook of Gene and Cell Therapy*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-41333-0>
- Núñez, C., Estévez, S. V., & Del Pilar Chantada, M. (2018). Inorganic nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(3), 331-345. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1542-z>
- Nyamay'Antu, A., Dumont, M., Kedinger, V., & Erbacher, P. (2019). Non-Viral Vector Mediated Gene Delivery: The Outsider to Watch Out For in Gene Therapy. *Cell and Gene Therapy Insights*, 5(S1), 51-57. <https://doi.org/10.18609/cgti.2019.007>
- Oh, J., Choi, S., Lee, G., Kim, J., & Choy, J. (2009). Inorganic Metal Hydroxide Nanoparticles for Targeted Cellular Uptake Through Clathrin-Mediated Endocytosis. *Chemistry – An Asian Journal*, 4(1), 67-73. <https://doi.org/10.1002/asia.200800290>
- Oh, J.-M., Choi, S.-J., Kim, S.-T., & Choy, J.-H. (2006). Cellular Uptake Mechanism of an Inorganic Nanovehicle and Its Drug Conjugates: Enhanced Efficacy Due To Clathrin-Mediated Endocytosis. *Bioconjugate Chemistry*, 17(6), 1411-1417. <https://doi.org/10.1021/bc0601323>
- Patel, S., & Lee, K. (2015). Probing stem cell behavior using nanoparticle-based approaches. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(6), 759-778. <https://doi.org/10.1002/wnan.1346>
- Patil, Gao, Lin, Li, Dang, Tian, Zhang, Jiang, Qadir, & Qian. (2019). The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5491. <https://doi.org/10.3390/ijms20215491>
- Pavlovic, M., Szerlauth, A., Muráth, S., Varga, G., & Szilagyi, I. (2022). Surface modification of two-dimensional layered double hydroxide nanoparticles with biopolymers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 191, 114590. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114590>
- Plaza-Oliver, M., Santander-Ortega, M. J., & Lozano, M. Victoria. (2021). Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(2), 471-497. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00908-7>
- Pogue, R. E., Cavalcanti, D. P., Shanker, S., Andrade, R. V., Aguiar, L. R., de Carvalho, J. L., & Costa, F. F. (2018). Rare genetic diseases: Update on diagnosis, treatment and online resources. *Drug Discovery Today*, 23(1), 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.002>
- Posey, J. E. (2019). Genome sequencing and implications for rare disorders. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1127-0>
- Rabiee, N., Bagherzadeh, M., Ghadiri, A. M., Salehi, G., Fatahi, Y., & Dinarvand, R. (2020). ZnAl nano layered double hydroxides for dual functional CRISPR/Cas9 delivery and enhanced green fluorescence protein biosensor. *Scientific Reports*, 10(1), 20672. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77809-1>
- Ramírez-Bello, J. (2019). Papel de la variabilidad genética en las enfermedades mendelianas y multifactoriales. *Gaceta de México*, 155(5), 1705. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004156>
- Rawat, R. S. (2015). Dense Plasma Focus—From Alternative Fusion Source to Versatile High Energy Density Plasma Source for Plasma Nanotechnology. *Journal of Physics: Conference Series*, 591, 012021. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/591/1/012021>

- Roessler, H. I., Knoers, N. V. A. M., Van Haelst, M. M., & Van Haaften, G. (2021). Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(4), 255-267. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.01.003>
- Sainz-Ramos, M.; Gallego, I.; Villate-Beitia, I.; Zarate, J.; Maldonado, I.; Puras, G.; Pedraz, J.L. (2021). How Far Are Non-Viral Vectors to Come of Age and Reach Clinical Translation in Gene Therapy? *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 14: 7545. <https://doi.org/10.3390/ijms22147545>
- Sajid, M. I., Jamshaid, U., Jamshaid, T., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2016). Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 501(1-2), 278-299. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.064>
- Salsman, J., & Dellaire, G. (2017). Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(2), 187-201. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0137>
- Sarkar, S., Panikker, P., D'Souza, S., Shetty, R., Mohan, R. R., & Ghosh, A. (2023). Corneal Regeneration Using Gene Therapy Approaches. *Cells*, 12(9), 1280. <https://doi.org/10.3390/cells12091280>
- Sayed, N., Allawadhi, P., Khurana, A., Singh, V., Navik, U., Pasumarthi, S. K., Khurana, I., Banothu, A. K., Weiskirchen, R., & Bharani, K. K. (2022). Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sciences*, 294, 120375. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120375>
- Seimetz, D., Heller, K., & Richter, J. (2019). Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs? *Cell Medicine*, 11, 215517901882278. <https://doi.org/10.1177/2155179018822781>
- Senapati, S., Sarkar, T., Das, P., & Maiti, P. (2019). Layered Double Hydroxide Nanoparticles for Efficient Gene Delivery for Cancer Treatment. *Bioconjugate Chemistry*, 30(10), 2544-2554. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00434>
- Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Laird Forrest, M., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.*, 41(6), 2323-2343. <https://doi.org/10.1039/C1CS15188F>
- Sharma, V. K., Filip, J., Zboril, R., & Varma, R. S. (2015). Natural inorganic nanoparticles – formation, fate, and toxicity in the environment. *Chemical Society Reviews*, 44(23), 8410-8423. <https://doi.org/10.1039/C5CS00236B>
- Sibbald B. Death but one unintended consequence of gene-therapy trial. *CMAJ*. 2001;164(11):1612.
- Silva, G. E. (2022). Avances en terapia génica en humanos: Algunos conceptos básicos y un recorrido histórico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 33(2), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2022.03.001>
- Smith, C. I. E., Bergman, P., & Hagey, D. W. (2022). Estimating the number of diseases – the concept of rare, ultra-rare, and hyper-rare. *iScience*, 25(8), 104698. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104698>
- Sokolova, V., & Epple, M. (2008). Inorganic Nanoparticles as Carriers of Nucleic Acids into Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(8), 1382-1395. <https://doi.org/10.1002/anie.200703039>
- Spirescu, V. A., Chircov, C., Grumezescu, A. M., Vasile, B. Ștefan, & Andronescu, E. (2021). Inorganic Nanoparticles and Composite Films for Antimicrobial Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4595. <https://doi.org/10.3390/ijms22094595>

- Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *99*, 28-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
- Sum, C., Wettig, S., & Slavcev, R. (2014). Impact of DNA Vector Topology on Non-Viral Gene Therapeutic Safety and Efficacy. *Current Gene Therapy*, *14*(4), 309-329. <https://doi.org/10.2174/1566523214666140612154929>
- Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M., & Xia, Y. (2014). Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/anie.201403036>
- Sun, Y. (2015). Interfaced heterogeneous nanodimers. *National Science Review*, *2*(3), 329-348. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwv037>
- Sunshine, J. C., Bishop, C. J., & Green, J. J. (2011). Advances in polymeric and inorganic vectors for nonviral nucleic acid delivery. *Therapeutic Delivery*, *2*(4), 493-521. <https://doi.org/10.4155/tde.11.14>
- Tang, R., & Xu, Z. (2020). Gene therapy: A double-edged sword with great powers. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *474*(1-2), 73-81. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03834-3>
- Taviot-Guého, C., Prévot, V., Forano, C., Renaudin, G., Mousty, C., & Leroux, F. (2018). Tailoring Hybrid Layered Double Hydroxides for the Development of Innovative Applications. *Advanced Functional Materials*, *28*(27), 1703868. <https://doi.org/10.1002/adfm.201703868>
- Tiffon, C. (2018). The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11), 3425. <https://doi.org/10.3390/ijms19113425>
- Torres-Vanegas, J. D., Cruz, J. C., & Reyes, L. H. (2021). Delivery Systems for Nucleic Acids and Proteins: Barriers, Cell Capture Pathways and Nanocarriers. *Pharmaceutics*, *13*(3), 428. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030428>
- Traber, G. M., & Yu, A.-M. (2023). RNAi-Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *384*(1), 133-154. <https://doi.org/10.1124/jpet.122.001234>
- Tripathy, K., & Nanda, T. (2011). The Influence of Environmental and Genetic Factors on Various Disorders and Diseases. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, *2*(1). <https://doi.org/10.4172/2157-7412.S11-001>
- Vasti, C., Ambroggio, E., Rojas, R., & Giacomelli, C. E. (2020). A closer look into the physical interactions between lipid membranes and layered double hydroxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *191*, 110998. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110998>
- Vasti, C., Bedoya, D. A., Rojas, R., & Giacomelli, C. E. (2016). Effect of the protein corona on the colloidal stability and reactivity of LDH-based nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry B*, *4*(11), 2008-2016. <https://doi.org/10.1039/C5TB02698A>
- Vasti, C., Borgiallo, A., Giacomelli, C. E., & Rojas, R. (2017). Layered double hydroxide nanoparticles customization by polyelectrolyte adsorption: Mechanism and effect on particle aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *533*, 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.09.002>
- Vasti, C., Giacomelli, C. E., & Rojas, R. (2019). Pros and cons of coating layered double hydroxide

- nanoparticles with polyacrylate. *Applied Clay Science*, 172, 11-18.
<https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.02.016>
- Vaughan, E., DeGiulio, J., & Dean, D. (2006). Intracellular Trafficking of Plasmids for Gene Therapy: Mechanisms of Cytoplasmic Movement and Nuclear Import. *Current Gene Therapy*, 6(6), 671-681. <https://doi.org/10.2174/156652306779010688>
- Vermeulen, L. M. P., Brans, T., De Smedt, S. C., Remaut, K., & Braeckmans, K. (2018). Methodologies to investigate intracellular barriers for nucleic acid delivery in non-viral gene therapy. *Nano Today*, 21, 74-90. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.06.007>
- Vermeulen, L. M. P., De Smedt, S. C., Remaut, K., & Braeckmans, K. (2018). The proton sponge hypothesis: Fable or fact? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 129, 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.034>
- Wang, Y., Zhao, Q., Han, N., Bai, L., Li, J., Liu, J., Che, E., Hu, L., Zhang, Q., Jiang, T., & Wang, S. (2015). Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(2), 313-327.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.09.014>
- Weber, J., Singhal, R., Zekri, S., & Kumar, A. (2008). One-dimensional nanostructures: Fabrication, characterisation and applications. *International Materials Reviews*, 53(4), 235-255.
<https://doi.org/10.1179/174328008X348183>
- Weng, Y., Huang, Q., Li, C., Yang, Y., Wang, X., Yu, J., Huang, Y., & Liang, X.-J. (2020). Improved Nucleic Acid Therapy with Advanced Nanoscale Biotechnology. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 19, 581-601. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.004>
- Wijitwongwan, R. (Ploy), Intasa-ard, S. (Grace), & Ogawa, M. (2019). Preparation of Layered Double Hydroxides toward Precisely Designed Hierarchical Organization. *ChemEngineering*, 3(3), 68. <https://doi.org/10.3390/chemengineering3030068>
- Wirth, T., Parker, N., & Ylä-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*, 525(2), 162-169.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
- Wu, T., & Tang, M. (2018). Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs. *Journal of Applied Toxicology*, 38(1), 25-40. <https://doi.org/10.1002/jat.3499>
- Wu, Y., Gu, W., Chen, C., Do, S. T., & Xu, Z. P. (2018). Optimization of Formulations Consisting of Layered Double Hydroxide Nanoparticles and Small Interfering RNA for Efficient Knockdown of the Target Gene. *ACS Omega*, 3(5), 4871-4877.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00397>
- Wu, Z., Yang, S., & Wu, W. (2016). Shape control of inorganic nanoparticles from solution. *Nanoscale*, 8(3), 1237-1259. <https://doi.org/10.1039/C5NR07681A>
- Xu, Z. P., & Lu, G. Q. (Max). (2006). Layered double hydroxide nanomaterials as potential cellular drug delivery agents. *Pure and Applied Chemistry*, 78(9), 1771-1779.
<https://doi.org/10.1351/pac200678091771>
- Xu, Z. P., Stevenson, G. S., Lu, C.-Q., Lu, G. Q. (Max), Bartlett, P. F., & Gray, P. P. (2006). Stable Suspension of Layered Double Hydroxide Nanoparticles in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 36-37. <https://doi.org/10.1021/ja056652a>
- Xu, Z. P., Walker, T. L., Liu, K., Cooper, H. M., Lu, G. M., & Bartlett, P. F. (2007). Layered double hydroxide nanoparticles as cellular delivery vectors of supercoiled plasmid DNA.

- Yamashita, Y., Miyahara, R., & Sakamoto, K. (2017). Emulsion and Emulsification Technology. En *Cosmetic Science and Technology* (pp. 489-506). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00028-8>
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, *15*(8), 541-555.
<https://doi.org/10.1038/nrg3763>
- You, H., & Fang, J. (2016). Particle-mediated nucleation and growth of solution-synthesized metal nanocrystals: A new story beyond the LaMer curve. *Nano Today*, *11*(2), 145-167.
<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.04.003>
- Yuan, Y., Tan, J., Wang, Y., Qian, C., & Zhang, M. (2009). Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vehicles based on atomic force microscopy study. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *41*(6), 515-526. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp038>
- Zhang, S., Pang, S., Pei, W., Zhu, H., Shi, Y., Liu, Z., Mao, L., Shi, X., Tao, S., Geng, C., Chen, S., Yang, L., Chen, C., Yang, Q., & Wang, W. (2023). Layered Double Hydroxide-Loaded miR-30a for the Treatment of Breast Cancer In Vitro and In Vivo. *ACS Omega*, *8*(21), 18435-18448. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07866>
- Zhang, Y., Yang, J., Fan, F., Qing, B., Zhu, C., Shi, Y., Fan, J., & Deng, X. (2019). Effect of Divalent Metals on the UV-Shielding Properties of M^{II}/MgAl Layered Double Hydroxides. *ACS Omega*, *4*(6), 10151-10159. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00721>
- Zhao, Z., Shang, P., Mohanraju, P., & Geijsen, N. (2023). Prime editing: Advances and therapeutic applications. *Trends in Biotechnology*, *41*(8), 1000-1012.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.03.004>
- Zhou, Q., Zhang, L., & Wu, H. (2017). Nanomaterials for cancer therapies. *Nanotechnology Reviews*, *6*(5), 473-496. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0102>
- Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS Journal*, *23*(4), 78. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00608-7>

Recursos

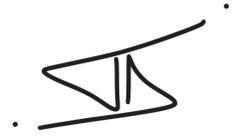
- i. European Commission. Rare diseases. Disponible en:
https://research-and-innovation.ec.europa.eu/research-area/health/rare-diseases_en
[Consultado por última vez el 9 de noviembre de 2023].
- ii. US Food & Drug Administration. Rare Diseases at FDA. Disponible en:
<https://www.fda.gov/patients/rare-diseases-fda> [Consultado por última vez el 9 de noviembre de 2023].
- iii. Poder Legislativo Nacional. Ley 26689.
<https://e-legis-ar.msal.gov.ar/hdocs/legisalud/migration/pdf/18173.pdf>
- iv. Gene therapies for rare diseases market size, share & trends analysis report by product, by disease type, region and segment forecasts, 2023-2031. Disponible en:
<https://www.insightanalytics.com/report/global-gene-therapies-for-rare-diseases-market-10>

91 [Consultado por última vez el 9 de noviembre de 2023].

- v. Pediatría Integral - Órgano de expresión de la Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria (SEPEAP). Disponible en:
<https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2014-10/una-vision-general-sobre-las-enfermedades-raras/> [Consultado por última vez el 11 de noviembre de 2023].
- vi. Orphanet. Portal de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos. Rare Disease Registries-Abril 2023. Disponible en:
https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Rare_Disease_Registries_2023.pdf
[Consultado por última vez el 12 de noviembre de 2023].



Valentina Hjelt



Martin Williams