

# **Diseño y evaluación de vectores no virales para terapia génica combinada en la enfermedad de Fabry**

**Paula Fernández Muro**

**Profesora: María Ángeles Solinís Aspiazu**

**Grado en Farmacia**

**Curso 2022/2023**

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Enfermedad de Fabry.....  | 1         |
| 1.2. Tratamiento.....  | 2         |
| 1.2.1. Terapia de Sustitución Enzimática .....   | 2         |
| 1.2.2. Terapia de chaperonas .....   | 2         |
| 1.2.3. Terapia de Reducción del Sustrato .....   | 2         |
| 1.3. Terapia génica en la EF.....  | 3         |
| 1.3.1. Definición y tipos de terapia génica .....  | 3         |
| 1.3.2. Sistemas de administración de ácidos nucleicos en terapia génica.....                     | 6         |
| 1.3.3. Nanopartículas sólidas lipídicas como sistemas de administración de ácidos nucleicos..... | 7         |
| 1.3.4. Barreras para la transfección.....  | 7         |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>3. DESARROLLO: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>9</b>  |
| 3.1. Elaboración de nanopartículas sólidas lipídicas o SLN.....                                  | 9         |
| 3.2. Amplificación, extracción y purificación del plásmido pcDNA3-GFP .....                      | 11        |
| 3.3. Elaboración de vectores .....   | 11        |
| 3.4. Caracterización de SLN y vectores .....   | 12        |
| 3.5. Electroforesis en gel de agarosa.....   | 12        |
| 3.6. Evaluación de la eficacia de transfección de los vectores en cultivos celulares .....       | 13        |
| 3.6.1. Cultivo celular .....   | 13        |
| 3.6.2. Transfección.....   | 13        |
| 3.6.2.1. Microscopía de fluorescencia .....  | 13        |
| 3.6.2.2. Cuantificación de la proteína verde fluorescente (GFP) mediante citometría.....         | 13        |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>14</b> |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 4.1.      | Caracterización de las SLN y de los vectores.....                               | 14        |
| 4.2.      | Electroforesis en gel de agarosa .....  | 16        |
| 4.2.1.    | Eficacia de transfección .....  | 17        |
| 4.2.1.1.  | Microscopía de fluorescencia .....  | 17        |
| 4.2.1.2.  | Cuantificación de la proteína verde fluorescente (GFP) mediante citometría..... | 19        |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>20</b> |
| <b>6.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>20</b> |

## RESUMEN

La terapia génica supone una herramienta prometedora para el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que se encuentra la enfermedad de Fabry (EF). La EF es un trastorno producido por la deficiencia de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -gal A), conduciendo a la acumulación de globotriaosilceramida (Gb3) y liso-Gb3 principalmente en los lisosomas.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de vectores no virales basados en SLN para el tratamiento de la EF, conteniendo dos tipos de ácidos nucleicos, ADN para suplementación génica y siRNA dirigido a silenciar la enzima Gb3 sintasa (GCS). La suplementación génica con ADN consiste en incrementar la producción de la enzima  $\alpha$ -gal A, ya que su deficiencia es la que genera la patología. El silenciamiento con siRNA persigue limitar la cantidad de ceramida convertida en glicosfingolípido.

Para ello, se elaboraron nanopartículas mediante dos métodos (homogeneización en caliente y emulsificación- evaporación del solvente), y empleando diferentes lípidos: DOTAP, DODAP y D-Lin-MC3-DMA (MC3). A partir de ellas, se formularon vectores cambiando el orden de adición de los componentes. Los vectores obtenidos presentaron una carga superficial y un tamaño adecuados para la transfección de células IMFE-1 (modelo de la EF), además de capacidad para unir, proteger y liberar el ADN. Los estudios determinaron que el orden de adición condiciona la disposición del material genético y la eficacia de la transfección, siendo ésta más eficaz empleando el lípido MC3 en las nanopartículas. Estos resultados demuestran el potencial del uso de la terapia génica para el tratamiento de la EF.

## ABREVIATURAS

**EF:** enfermedad de Fabry.

**$\alpha$ -gal A:**  $\alpha$ -galactosidasa A.

**Gb3:** globotriaosilceramidas.

**HVI:** hipertrofia ventricular izquierda.

**TES:** terapia enzimática sustitutiva.

**IECAs:** inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

**ARA:** antagonistas de los receptores de angiotensina.

**TRS:** terapia de reducción de sustrato.

**GCS:** glucosilceramida sintasa.

**EMA:** Agencia Europea del Medicamento.

**CRISPR:** clustered regularly interspaced short palindromic repeats, o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas.

**ADN, DNA:** ácido desoxiribonucleico.

**ARN, RNA:** ácido ribonucleico.

**ARNm:** ARN mensajero.

**siRNA:** ARN pequeño de interferencia.

**RISC:** RNA induced silencing complex.

**PLGA:** polímeros de ácido láctico y glicólico.

**SLN:** nanopartícula sólida lipídica.

**DOPE:** dioleoilfosfatidiletanolamina.

**NPC:** complejos del poro nuclear.

**CPP:** péptidos de penetración celular.

**NLS:** señales de localización nuclear.

**GFP:** proteína verde fluorescente.

**IMFE-1:** Immortalized Fabry Endothelial cell line-1.

**EE:** evaporación-emulsificación del solvente.

**HM:** homogeneización en caliente.

**DODAP:** 1,2-Dioleoil-3-Dimetilamonio-Propano.

**DOTAP:** 1,2-Dioleoil-3-Trimetilamonio-Propano.

**MC3:** D-Lin-MC3-DMA, 1,2-dilinoleyloxy-N,N-dimethyl-3-aminopropano.

**DX:** dextrano.

**PDI:** índice de polidispersión.

**SDS:** dodecilsulfato sódico.

**PBS:** tampón fosfato salido.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedad de Fabry

La enfermedad de Fabry (EF) es una enfermedad monogénica caracterizada por un déficit o ausencia de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -gal A) (1) debida a la mutación en el gen *GLA* situado en el brazo largo del cromosoma X (Xq22.1). Como consecuencia, se produce la acumulación lisosomal progresiva de glicosfingolípidos, principalmente globotriaosilceramida (Gb3) y globotriaosilesfingosina (liso-Gb3) (2), especialmente en las células endoteliales y del músculo liso vascular. La acumulación de Gb3 en las células endoteliales provoca múltiples afecciones principalmente a nivel renal, en el corazón (hipertrofia del ventrículo izquierdo) y daños neurológicos (accidentes isquémicos, crisis comiciales) (3).

La incidencia de esta enfermedad rara oscila entre 1:117.000 y 1:476.000, siendo más frecuente en varones, con una incidencia de 1:50.000 (4, 5). Se puede distinguir la forma clásica y la forma atípica de la EF. La forma **clásica** se caracteriza por que los varones afectados tienen un déficit (menos de 1% de actividad) de la enzima  $\alpha$ -Gal. Los signos y síntomas aparecen en la infancia o la adolescencia, y da lugar a síntomas más severos sobre los 40 años de edad, entre los que se encuentran: crisis de dolor, disminución/ausencia de sudor, lesiones vasculares cutáneas, opacidad corneal, alteraciones lenticulares, afectación cardíaca (insuficiencia mitral, anomalías del ritmo del corazón, hipertrofia ventricular, cardiopatías, hipertensión, angina e infarto cardíaco) (3). Las mujeres portadoras de la EF normalmente tienen una forma clásica más leve que la que presentan los varones, y éstas tienen mejor pronóstico que los hombres.

Los varones afectados por la forma **atípica** de la EF tienen defectos enzimáticos parciales, con más de 1% de actividad de la enzima  $\alpha$ -Gal. Dentro de esta forma, se puede distinguir la variante cardíaca y la renal. La cardíaca se manifiesta en adultos de 60-80 años, que ya tienen problemas de corazón y presencia de proteinuria, generando hipertrofia ventricular izquierda (HVI). La variante renal está relacionada con insuficiencia renal terminal sin lesiones de piel y sin dolor (6, 7).

Para diagnosticar esta enfermedad, además de basarse en la clínica, en varones se recurre a un análisis genético o un ensayo fluorométrico (8). En el caso de mujeres heterocigotas se requiere un ensayo genético, ya que los niveles de la actividad enzimática pueden ser normales (9).

## 1.2. Tratamiento

El **tratamiento actual** para la EF consiste en la Terapia Enzimática Sustitutiva (TES) o la administración oral de una chaperona. También se suele aplicar un tratamiento adyuvante con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs), antagonistas de los receptores de angiotensina (ARA), antiagregantes plaquetarios y analgésicos (10, 11).

### 1.2.1. Terapia de Sustitución Enzimática

La terapia de sustitución enzimática o TES consiste en la administración periódica de la enzima cuyo déficit causa la enfermedad, restaurando así, la vía metabólica interferida. Los medicamentos basados en la **enzima recombinante** aprobados por la EMA consisten en la administración parenteral de agalsidasa  $\alpha$  (Replagal<sup>TM</sup>®) y agalsidasa  $\beta$  (Fabrazyme®) (12). Se administran cada 2 semanas, mejorando la patología renal y cardíaca y proporcionando un efecto analgésico, mejorando la calidad de vida de los y las pacientes. Sin embargo, dicho tratamiento muestra eficacia si se instaura en fases iniciales, tiene una penetración tisular limitada, no atraviesa la barrera hematoencefálica y en un elevado porcentaje de pacientes se produce la formación de anticuerpos anti- $\alpha$ -Gal A. Otras desventajas son los efectos adversos relacionados con la infusión y la formación de anticuerpos neutralizantes de la enzima (13, 14) y el elevado coste del tratamiento (el coste anual por paciente es de 210.000€ aproximadamente) (15). Además la TES no aborda el fenotipo renal (16).

### 1.2.2. Terapia de chaperonas

La mutación del gen *GLA* genera una proteína inestable mal plegada, dando lugar a una actividad reducida de la enzima  $\alpha$ -Gal. Estas proteínas mal plegadas serán degradadas en el retículo endoplásmico y no llegarán a los lisosomas (17). Los tratamientos con la chaperona Migalastat (Galafold®) (12) mejoran la función de la propia enzima del paciente, ya que la chaperona se une al sitio activo de  $\alpha$ -Gal A, estabilizándola y haciendo que sea transportada a la zona donde el Gb3 es metabolizado. Se utiliza un inhibidor competitivo que favorece el correcto plegamiento de enzimas mutadas. Debe administrarse en días alternos, separado 2h de alimentos, y con una posología complicada, que dificulta la adherencia del paciente al tratamiento (18). No obstante, la terapia con Migalastat sólo es eficaz en ciertos tipos de mutaciones, conocidas como mutaciones sin sentido, y por ello, la utilización de chaperonas es limitada (19).

### 1.2.3. Terapia de Reducción del Sustrato

La terapia de reducción del sustrato o TRS, no corrige el defecto genético, sino que su objetivo es disminuir la biosíntesis del sustrato generado, evitando su acumulación (16). Actualmente, hay dos

formulaciones en investigación, lucerastat y venglustat, ambos son inhibidores de la glucosilceramida sintasa (GCS), inhibiendo la acumulación de Gb3, ya que limita la cantidad de ceramida convertida en glicosfingolípido. Sin embargo, la inhibición de esta enzima, también inhibe la formación de otros productos, generando efectos secundarios (12).

### 1.3. Terapia génica en la EF

#### 1.3.1. Definición y tipos de terapia génica

La terapia génica puede definirse como la estrategia terapéutica mediante la cual se busca modificar, corregir o restaurar la función de determinados genes alterados en una patología concreta, y para su prevención y diagnóstico. Según la EMA, un fármaco basado en terapia génica consiste en un vector o un sistema de liberación, que tiene un constructo genético que expresa una secuencia concreta de un gen para la regulación, reparación, reemplazo, adición o eliminación de una secuencia genética (20). Dicha técnica se puede utilizar con diferentes aplicaciones en función del objetivo (21):

- a) *Suplementación génica*: expresión de un gen que codifica la secuencia de una proteína.
- b) *Supresión génica*: eliminación o reducción de la expresión de un gen, inhibiendo la producción de la proteína.
- c) *Edición/reparación génica*: sustitución total o parcial de un gen defectuoso por uno que funcione correctamente. Actualmente está en desarrollo la terapia CRISPR/Cas9, una herramienta que utiliza la nucleasa Caspasa 9 para cortar el ADN, es decir ésta actúa como una “tijera molecular”, reconociendo y cortando la secuencia del material genético en lugares específicos, siendo capaz de introducir cambios en la secuencia de ADN (22).

La **suplementación** génica se puede llevar a cabo con ARNm o plásmidos de ADN. Los plásmidos de ADN son hebras de doble cadena de alto peso molecular con genes que codifican proteínas específicas. Los ácidos nucleicos presentan carga negativa, además de elevado peso molecular, lo cual impide la entrada en la célula, y son susceptibles de ser degradados por enzimas como las nucleasas (21). Por tanto, la terapia de suplementación se implementa mediante el uso de sistemas de administración o vectores que permitan proteger los ácidos nucleicos. En este trabajo se ha empleado un plásmido de ADN, cuya estructura general es (23):

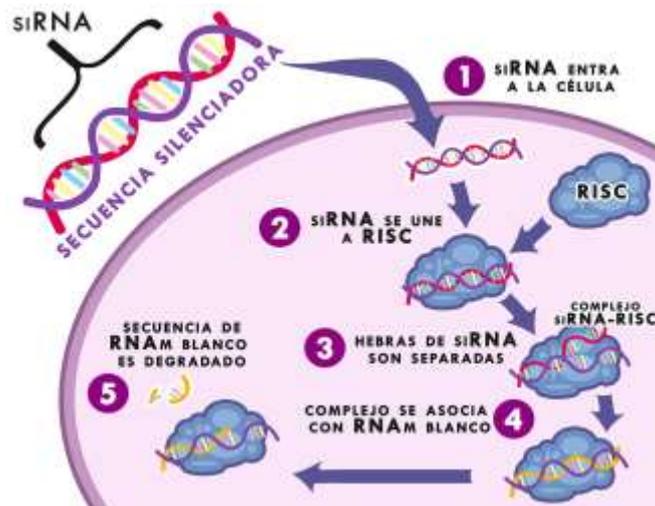
- Origen de replicación: permite la iniciación de la replicación de forma independiente al ADN cromosómico.
- Gen marcador de selección: gen de resistencia a un antibiótico para identificar las células que han integrado el plásmido.

- Sitio de multiclonación: segmento de ADN con varios sitios de restricción para una inserción fácil del ADN de interés.
- Gen de interés.
- Promotor: dirige la transcripción del gen.

En la suplementación génica con ADN, la célula expresará el gen administrado, en el caso de la EF codificará la enzima  $\alpha$ -Gal, y se lleva a cabo a través del proceso de transfección. Para ello, a partir de la transcripción del ADN en el núcleo se obtiene un pre-ARN mensajero, que dará lugar al ARN mensajero (ARNm). Éste, sale del núcleo al citoplasma, donde se producirá la síntesis de proteínas. La suplementación empleando ARNm no requiere que éste llegue al núcleo, por lo que da lugar a una transfección más rápida y efectiva, pero también menos duradera (21).

Otra de las estrategias de terapia génica es la **supresión** génica, que se puede emplear en la EF con el objetivo de disminuir la síntesis, y, por tanto, la acumulación de Gb3 y liso-Gb3. La supresión génica se puede implementar utilizando oligonucleótidos antisentido, aptámeros, ribozimas, ARN circular o ARN de interferencia, siendo este último, el estudiado en este Trabajo Fin de Grado. Los ARN pequeños de interferencia (siRNA, del inglés short interference RNA) son ARN cortos de doble cadena compuestos por 21-23 pares de bases con 2 bases fosforiladas. En el organismo, los siRNA son inestables y propensos a la degradación. Además, son lo suficientemente pequeños para sufrir aclaramiento renal, pero también son muy grandes para atravesar membranas. Por ello, para poder utilizarlos como herramienta terapéutica, hay que protegerlos y facilitar su captación por la célula diana (24).

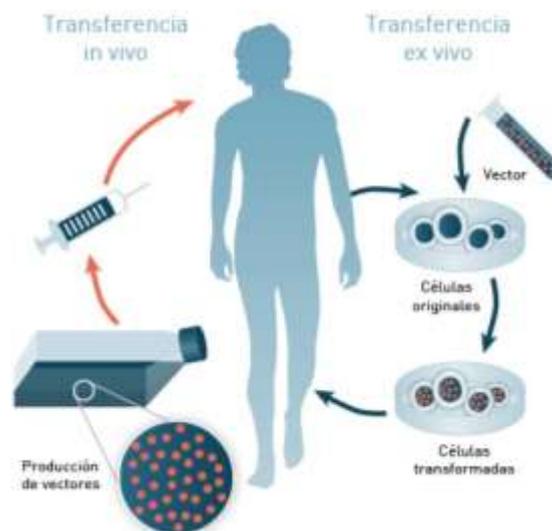
La **Figura 1** recoge el mecanismo de acción del siRNA. El siRNA, que presenta una secuencia complementaria al ARNm diana, se incorpora en el citoplasma celular al complejo enzimático RISC (del inglés, RNA induced silencing complex). El complejo RISC, tiene una actividad similar a la helicasa, y produce la separación de las 2 cadenas del siRNA, quedándose con la hebra antisentido o guía. Este complejo, reconoce a los ARNm que tienen la secuencia complementaria, produciendo un corte en el ARNm y dando lugar a la inhibición de la traducción o la destrucción del ARNm, que conlleva la supresión de la expresión del gen. Una desventaja del uso de este ácido nucleico es la posibilidad de que exista similitud del ARNm diana con otros ácidos nucleicos, dando lugar a la supresión de otros genes diferentes al gen diana. Asimismo, el siRNA también puede ser reconocido por receptores inmunológicos, dando lugar a la liberación de citoquinas y produciendo una alteración en la expresión de genes (24-27).



**Figura 1.** Mecanismo de acción del siRNA (26).

La terapia génica se puede utilizar tanto en enfermedades **hereditarias** o **adquiridas**. El cáncer supone más de la mitad (64%) de los ensayos clínicos de terapia génica, y a continuación, las enfermedades hereditarias monogénicas (10%), entre las que se encuentra la EF (21).

En función de la estrategia (**Figura 2**), la terapia génica puede clasificarse como “ex vivo” o “in vivo”.



**Figura 2.** Terapia génica *in vivo* y *ex vivo* (28).

La terapia génica “**in vivo**” consiste en introducir el material genético directamente en el organismo, por las vías habituales de administración de medicamentos (así, el ácido nucleico es incorporado a un vector). Es una técnica sencilla, pero hay un menor control de la transfección y menor eficacia. El método “**ex vivo**” implica extraer las células del paciente, aislarlas, y una vez hayan crecido en cultivo, llevar a cabo un proceso de transfección in vitro. Después, se seleccionan aquellas transfectadas con éxito y se reimplantan en el paciente (20, 21).

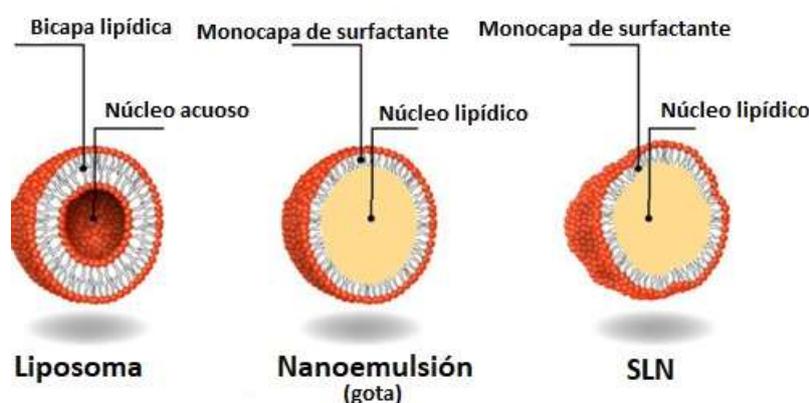
### 1.3.2. Sistemas de administración de ácidos nucleicos en terapia génica

Un aspecto clave en el desarrollo de la terapia génica es el diseño de sistemas de administración de ácidos nucleicos, ya que éstos se degradan fácilmente y presentan limitaciones importantes a la hora de acceder a la célula diana y al lugar de acción. Los sistemas de administración se dividen en dos grupos: virales y no virales. Los **virales** utilizan virus, los cuales no se replican en la célula diana, pero que producen la expresión del gen terapéutico. Los vectores virales proporcionan alta eficacia de transfección, pero presentan problemas relacionados con la seguridad (pueden presentar efectos oncogénicos e inmunogénicos por las proteínas víricas) y no pueden transportar ácidos nucleicos de gran tamaño. Entre los vectores virales más utilizados destacan los virus adenoasociados, adenovirus, retrovirus y lentivirus.

Los vectores **no virales** son más sencillos, seguros, económicos y más fáciles de producir a gran escala. Pueden transportar ácidos nucleicos de gran tamaño, sin embargo, la eficacia de la transfección es menor. Se distinguen varios tipos de sistemas no virales:

- *Sistemas no virales físicos*: electroporación, sonoporación, fotoporación, magnetofección e hidroporación.
- *Sistemas no virales químicos*: utilizan sistemas poliméricos (PLGA, polímero de ácido láctico y ácido glicólico), sistemas lipídicos (liposomas, nanoemulsiones y nanopartículas sólidas lipídicas), sistemas con partículas inorgánicas y sistemas peptídicos (21, 28, 29, 30).

Los vectores virales son los más empleados, sin embargo, los vectores no virales basados en lípidos están ganando importancia y actualmente, son los más estudiados. En la **Figura 3** se recogen las diferencias estructurales de los diferentes sistemas lipídicos, que son los liposomas, nanoemulsiones y nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) (21).



**Figura 3.** Comparación de liposomas, nanoemulsiones y SLN (31).

### 1.3.3. Nanopartículas sólidas lipídicas como sistemas de administración de ácidos nucleicos

Entre los sistemas no virales empleados en el campo de la terapia génica destacan las SLN. Se definen como partículas esféricas nanométricas, formadas por un núcleo que es un lípido sólido a temperatura ambiente y que está rodeado de una capa de tensioactivos (32). Al principio, las SLN se desarrollaron con el objetivo de contener fármacos para así protegerlos de la degradación, modular su liberación y estabilidad. El uso de las SLN ha mostrado resultados prometedores en estudios in vivo e in vitro debido a que son bien toleradas, estables en diferentes condiciones de almacenamiento y en los fluidos biológicos, su sencilla forma de preparación y la posibilidad de ser esterilizadas y liofilizadas (33, 34).

Cuando las SLN se emplean en terapia génica, se incluye en su composición lípidos catiónicos, capaces de condensar y proteger los ácidos nucleicos. Las cargas negativas de los ácidos nucleicos interactúan con las positivas del componente lipídico, favoreciendo que el material genético se adsorba en la superficie de la nanopartícula. Esta unión confiere protección al ácido nucleico, reduciendo así la degradación enzimática. Sin embargo, para que el ácido nucleico ejerza su efecto, es necesaria su liberación en la célula diana, por lo que debe haber un equilibrio entre la condensación del material genético, su protección y la liberación (32, 34).

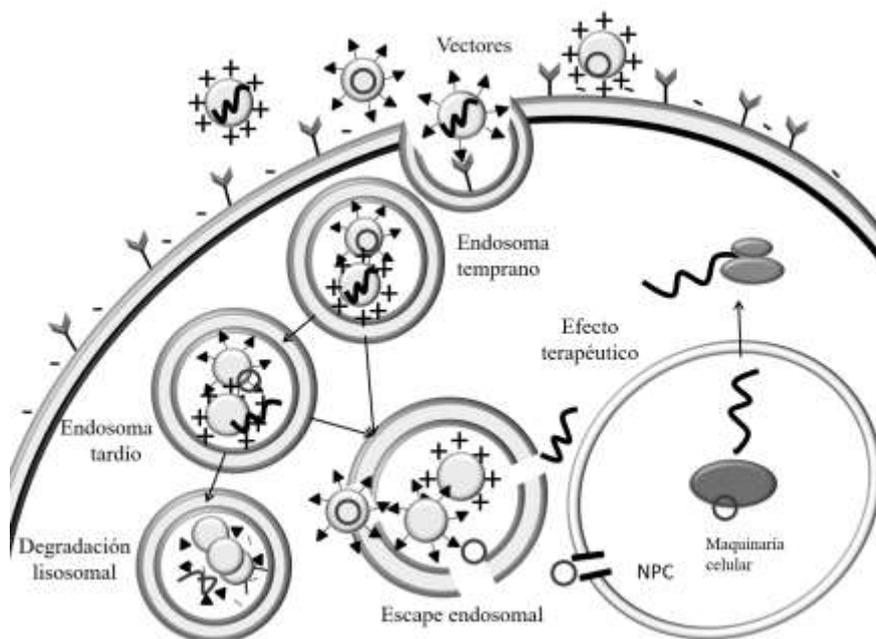
### 1.3.4. Barreras para la transfección

Los ácidos nucleicos, una vez en el organismo, tienen que llegar al núcleo (ADN), o al citoplasma (ARN), por lo que hay que tener en cuenta diversos factores como la degradación en el medio extracelular, el paso a través de las membranas, la difusión intracelular e internalización en el núcleo.

Las nucleasas pueden degradar los ácidos nucleicos, por lo que disminuye el tiempo de permanencia en el organismo. Es por ello, que son imprescindibles sistemas que protejan el material genético. Además, los ácidos nucleicos, una vez están en el organismo, pueden interactuar con componentes sanguíneos, formando agregados que son eliminados por el sistema retículo endotelial o que son retenidos en los pulmones (35, 36).

Asimismo, el material genético tiene que atravesar las membranas celulares, y si, además de la carga negativa, el tamaño es elevado, se genera un problema para ser introducido en la célula. Al utilizar SLN con carga neta superficial positiva se facilita la entrada a la célula por interacciones electrostáticas, facilitando la **endocitosis**. La **Figura 4** muestra el proceso de internalización: se produce una invaginación de la membrana, se forma el endosoma temprano (pH 5,5-6,5), en cuyo interior se

encuentra la nanopartícula. Tras una maduración, el pH disminuye hasta 5-5,5, generando los endosomas tardíos. Los lisosomas presentan enzimas hidrolíticas (lipasas, nucleasas, fosfatasas...), y al fusionarse con los endosomas tardíos se produce una acidificación del pH hasta 4,5. Este proceso puede degradar las nanopartículas y los ácidos nucleicos (21, 37, 38). De ahí que se busque favorecer el **escape endosomal** para aumentar la eficacia de la transfección, empleándose estrategias como la adición de DOPE, péptidos, colesterol (30), y para ello se pueden emplear *lípidos fusogénicos* (el pH ácido del endosoma provoca un cambio conformacional en péptidos como el KALA o el GALA, que hace que éstos puedan interactuar con los lípidos endosomales, provocando su ruptura y permitiendo la salida), *mecanismos flip-flop* (los lípidos catiónicos o lipoplexos interactúan con la membrana endosomal generando la inversión de los fosfolípidos aniónicos, favoreciendo la salida del lípido al citoplasma), *efecto esponja de protones* (la acidez del endosoma genera una entrada de agua y aniones cloruro, que a su vez genera un aumento de la presión osmótica y la consiguiente ruptura del endosoma) y *péptidos formadores de poros* (son péptidos catiónicos anfifílicos que disminuyen la tensión del endosoma, formando poros) (21).



**Figura 4.** Proceso de internalización de vectores mediante endocitosis (21). NPC: Complejos de poro nuclear.

El ADN, una vez en el citoplasma tiene que llegar al núcleo, y puede acceder al mismo durante la mitosis (momento en el que la membrana nuclear pierde su integridad) o a través de los complejos de poros nucleares (30).

Para optimizar la eficacia en la transfección mediada por vectores no virales se pueden utilizar diferentes estrategias. Para favorecer la **internalización** celular, es decir, si se busca aumentar la

entrada o dirigirla hacia un mecanismo concreto, se pueden hacer *modificaciones físico-químicas* (tamaño, forma, carga superficial), o se pueden incorporar a la formulación *péptidos de penetración celular* (CPP, estos están formados por aminoácidos, los cuales confieren carga positiva) o *ligandos específicos que interaccionen con la membrana celular* (21).

Por último se pueden utilizar señales de localización nuclear o NLS para incrementar **la internalización nuclear**. Éstos contienen en su estructura aminoácidos con cargas positivas conteniendo argininas y lisinas, las cuales favorecen el transporte al interior del núcleo (21).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado es el diseño, desarrollo y evaluación de vectores no virales basados en SLN conteniendo dos tipos de ácidos nucleicos, ADN para suplementación génica y siRNA dirigido a silenciar la enzima Gb3 sintasa, como estrategia de terapia génica combinada para el tratamiento de la EF. Mediante suplementación génica se persigue la producción de la enzima  $\alpha$ -gal A, sin embargo, en este trabajo, para el desarrollo y optimización de las formulaciones, se ha utilizado como ADN modelo un plásmido que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) que permite detectar el número de células transfectadas.

Para la consecución de este objetivo, se han establecido los siguientes subobjetivos:

- Elaboración y caracterización de SLN.
- Diseño, elaboración y caracterización de vectores no virales basados en SLN.
- Evaluación de los vectores no virales en una línea celular modelo de la EF (IMFE-1).

## **3. DESARROLLO: MATERIALES Y MÉTODOS**

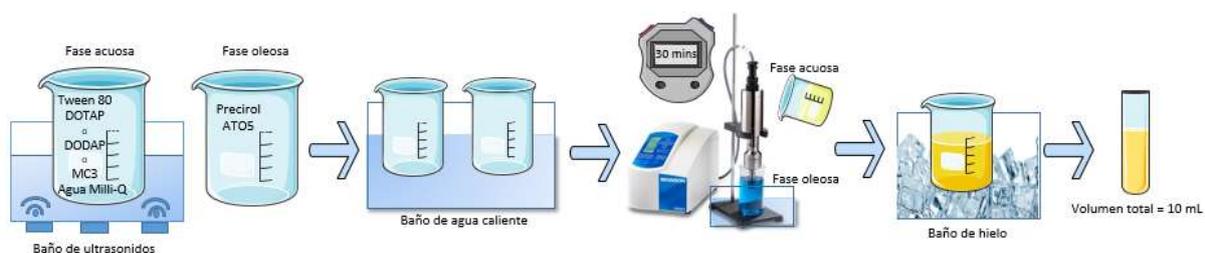
### **3.1. Elaboración de nanopartículas sólidas lipídicas o SLN**

Las SLN se prepararon por dos métodos recogidos en las **Figuras 5 y 6**: emulsificación- evaporación del solvente (EE) (39) y homogeneización en caliente (HM) (40). En ambos casos, como se recoge en la **Tabla 1** se utilizó una fase acuosa formada por Tween 80, DOTAP (lípido catiónico) o DODAP o D-Lin-MC3-DMA (MC3) (ambos son lípidos ionizables) y agua Milli-Q, y una fase oleosa compuesta por Precirol ATO5 (disuelto en diclorometano en las SLN elaboradas por EE). Por lo tanto, se obtuvieron 5 tipos de SLN en función del lípido empleado en la fase acuosa y el método de elaboración: SLN EE DOTAP, SLN HM DOTAP, SLN EE DODAP, SLN HM DODAP y SLN EE MC3.

**Tabla 1.** Composición de las SLN elaboradas por los dos métodos utilizados: EE y HM.

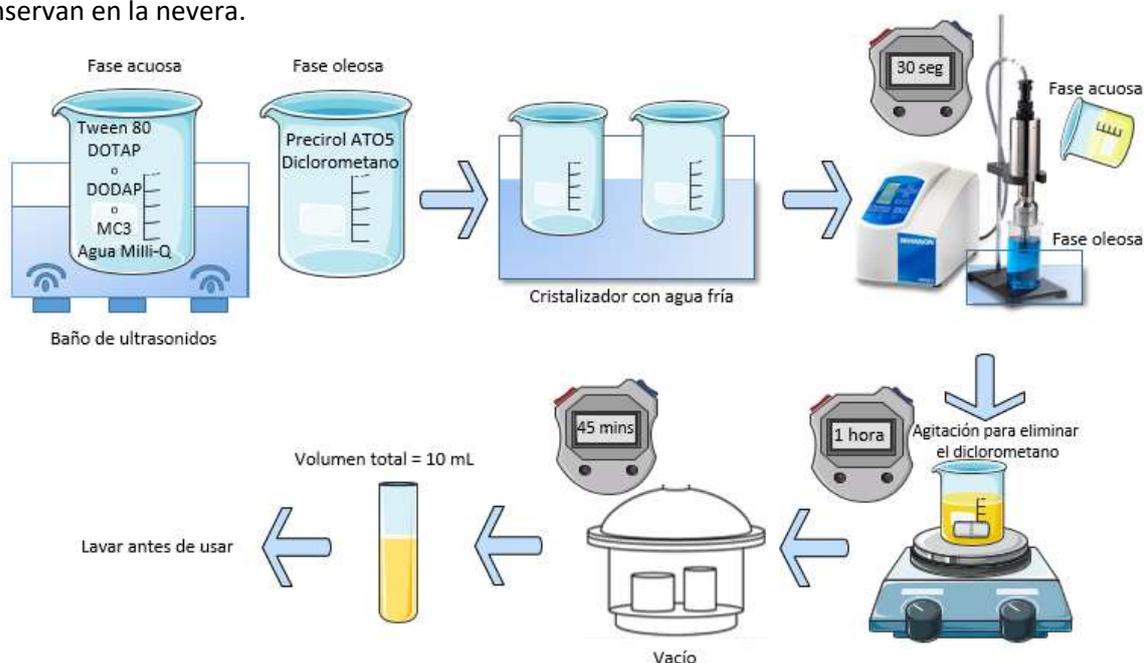
| Nombre de la SLN | Fase acuosa |       |       |       | Fase oleosa   |
|------------------|-------------|-------|-------|-------|---------------|
|                  | Tween 80    | DOTAP | DODAP | MC3   | Precirol ATO5 |
| SLN EE/HM DOTAP  | 10 mg       | 40 mg |       |       | 100 mg        |
| SLN EE/HM DODAP  | 10 mg       | 20 mg | 20 mg |       | 100 mg        |
| SLN EE MC3       | 10 mg       | 30 mg |       | 20 mg | 100 mg        |

Para la obtención de las SLN HM se sigue el esquema de la **Figura 5**, la fase acuosa se disuelve en el baño de ultrasonidos durante 5 minutos. A continuación, se calientan las dos fases, la fase acuosa se añade sobre la oleosa y se prepara la emulsión por sonicación (Output control 4; Duty cycle constant), durante 30 minutos. Se deja reposar en hielo para que solidifiquen las partículas. Finalmente, el contenido se pasa a un tubo, se ajusta el volumen a 10 mL y se almacenan a 4°C en la nevera.



**Figura 5.** Elaboración de SLN por el método de homogeneización en caliente (HM).

Como se observa en la **Figura 6**, para la elaboración de las SLN EE se añade un disolvente: diclorometano (2 mL) a la fase oleosa. La fase acuosa se disuelve de nuevo en el baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Antes de juntar las dos fases, se atemperan en un cristizador con agua fría. Cuando estén las dos fases a la misma temperatura, se añade la fase acuosa sobre la oleosa y se sonica durante 30 segundos. Seguidamente, se evapora el diclorometano, tras ello, se enrasa a 10 mL y se conservan en la nevera.



**Figura 6.** Elaboración de SLN por el método de evaporación - emulsificación del solvente (EE).

### 3.2. Amplificación, extracción y purificación del plásmido pcDNA3-GFP

El plásmido pcDNA3-GFP se amplificó con bacterias transformadas por choque térmico, y cuyo antibiótico de resistencia es la ampicilina.

Para llevar a cabo la extracción y purificación del plásmido, se utilizó el kit ZymoPURE Plasmid Maxiprep®.

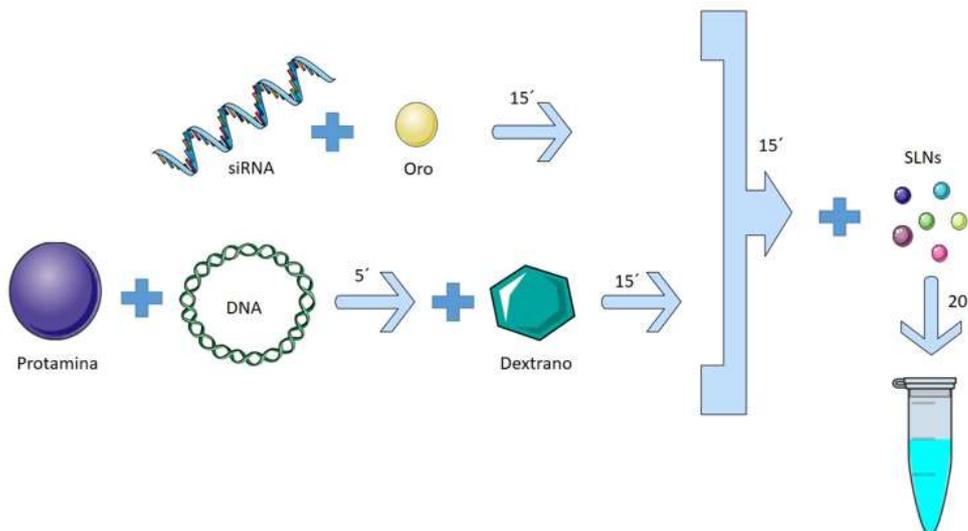
### 3.3. Elaboración de vectores

Los vectores se elaboraron a partir de los 5 tipos de SLN (1 mg/mL), y además una solución de protamina (1 mg/mL), dextrano (Dx, 1 mg/mL), nanopartículas de oro 5nm, y los ácidos nucleicos pcDNA3-GFP y siRNA. Los diferentes vectores se prepararon combinando los componentes seleccionados en diferente orden (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Composición y proporción de los vectores elaborados. Teniendo en cuenta las 5 tipos de SLN elaboradas, y los 4 órdenes de adición, dan un total de 20 vectores a estudiar, que se comparan con 5 vectores control.

|                    | siRNA | Oro | Dx | Protamina | pcDNA3-GFP | SLN | Agua Milli-Q |
|--------------------|-------|-----|----|-----------|------------|-----|--------------|
| Proporción en peso | 1,5   | 0,5 | 1  | 2         | 5          | 5   | 15           |

A modo de ejemplo, el vector 1 se preparó siguiendo el esquema que se puede ver en la **Figura 7**, se mezcló por un lado el siRNA con el oro, y por otro lado la protamina + ADN + DX. A continuación se mezclaron ambas partes y finalmente se añadieron las partículas.



**Figura 7.** Forma de elaboración del Vector 1.

El resto de vectores se elaboraron siguiendo el mismo esquema que la **Figura 7**, pero variando el orden de adición de los componentes. En el vector 2, se adiciona por un lado (siRNA + oro) y por otro (protamina + ADN), se mezclan, se añade dextrano y finalmente se agregan las SLN. Al vector 3 se le añade protamina a la solución de (siRNA + oro), luego se incorpora el ADN, a continuación el dextrano y finalmente las SLN. En el vector 4 se adicionan las SLN a la mezcla de (siRNA + oro), y por otra parte se añade el dextrano a la solución de (protamina + ADN). Se mezclan ambas soluciones y se obtiene el vector.

Los vectores denominados control se prepararon sin siRNA, se mezcló el plásmido pcDNA3-GFP con la protamina, a continuación se añadió dextrano y finalmente se añadieron las SLN. Estudios previos han mostrado que las formulaciones con siRNA y oro eran capaces de silenciar la enzima. Asimismo, también se ha visto que las formulaciones con  $\alpha$ -Gal, eran capaces de producir la enzima. Por ello, en este trabajo, se estudia la terapia génica combinada aplicada a la EF.

### **3.4. Caracterización de SLN y vectores**

El tamaño e índice de polidispersión (PDI) de las SLN y los diferentes vectores se evaluaron mediante espectroscopía de correlación fotónica y el potencial Zeta mediante velocimetría de láser Doppler, en el equipo Zetasizer Nano ZS.

### **3.5. Electroforesis en gel de agarosa**

Se estudió la capacidad de las distintas formulaciones para unir, proteger y liberar el material genético (ADN y siRNA) mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se elaboró el gel con agarosa al 0,7% con unas condiciones de 110V y 30 minutos. Se utilizó el reactivo Gel Red<sup>®</sup> para poder teñir los ácidos nucleicos y visualizar las bandas en el transiluminador (Uvitec Uvidoc D55-LCD-20M auto).

Para estudiar la protección, se adicionó a los vectores la enzima DNAsa I, a una concentración de 1U por 2,5  $\mu$ g de ADN, y se introdujeron en agitación en la estufa (37°C) durante 30 minutos. Una vez pasado ese tiempo, se añadió dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%, un tensioactivo que favorece la liberación del material genético de las nanopartículas, y se mantuvo en contacto con los vectores durante 5 minutos. Para evaluar la liberación, únicamente se pusieron en contacto las formulaciones con SDS.

Para comprobar que el gel se realizó correctamente, se pusieron diferentes controles con ADN y siRNA libre, así como con DNAsa y SDS. También se incluyeron marcadores de peso molecular de ambas moléculas (ADN, siRNA).

### **3.6. Evaluación de la eficacia de transfección de los vectores en cultivos celulares de células IMFE-1**

#### **3.6.1. Cultivo celular**

Los ensayos se realizaron en células IMFE-1, que son células endoteliales microvasculares inmortalizadas de un paciente con la EF. Éstas se conservan en incubación a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> en el medio EGM<sup>®</sup>-2 BulleKit<sup>®</sup>. El medio de cultivo está constituido por: suero bovino fetal, factor de crecimiento epidérmico (hEGF), suplemento de crecimiento de células endoteliales, factor de crecimiento de fibroblastos humanos (hbFGF), factor de crecimiento vascular endotelial (hVEFG), factor de crecimiento insulínico (R3 IGF-1), ácido ascórbico, heparina e hidrocortisona.

Una vez sembradas las células, el medio de cultivo se renueva aproximadamente cada 2 días, y se realiza pase según la confluencia observada al microscopio.

#### **3.6.2. Transfección**

La transfección se llevó a cabo en placas de 24 pocillos, con una densidad celular de 30.000 células por pocillo. Una vez pasadas 48h tras la realización de los pocillos, los vectores se añadieron a cada pocillo diluidos en glucosa, a una dosis de ADN por pocillo de 2,5 µg y a una dosis de siRNA por pocillo de 125 ng. Pasadas 4 horas, se retiró el medio y se repuso con nuevo medio de cultivo.

Se evaluó la eficacia de transfección a lo largo del tiempo mediante microscopía de fluorescencia y a las 72 horas mediante citometría de flujo.

##### **3.6.2.1. Microscopía de fluorescencia**

Una vez realizada la transfección, se observaron las células y su estado en el microscopio de fluorescencia (Leica DM IL LED Fluo inverted microscope) a las 24, 48 y 72 horas. Se detectaron las células que expresaban GFP, y por tanto habían sido transfectadas, evaluándose cualitativamente la eficacia de la transfección de los vectores elaborados.

##### **3.6.2.2. Cuantificación de la proteína verde fluorescente (GFP) mediante citometría**

La cuantificación del % de células transfectadas se llevó a cabo mediante citometría de flujo a las 72 horas tras la transfección. Para ello, se quitó el medio, se procedió a lavar con PBS y se incubó con tripsina. Después, se añadió medio a cada pocillo y se pipeteó cada pocillo, y su contenido se transfirió a un tubo diferente para centrifugar (100 rpm, 5 minutos). El pellet se resuspendió en PBS, y se

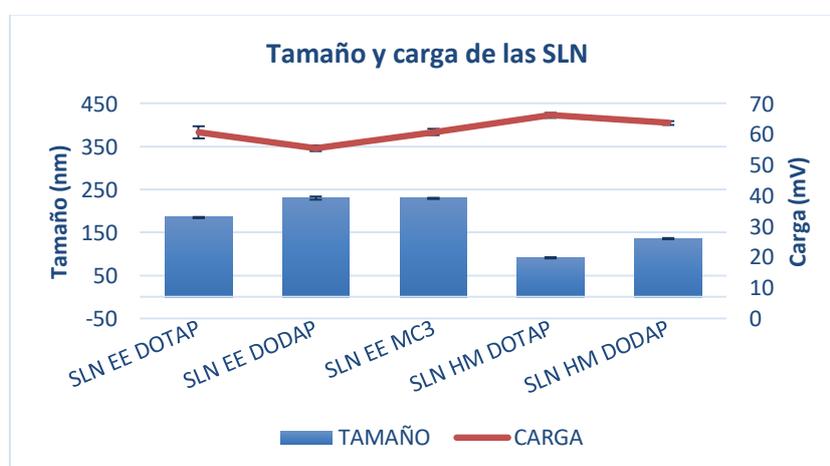
cargaron 200 uL en las placas para después introducir las en el equipo CytoFLEX (Beckman Coulter). Se analizaron 10.000 eventos por cada muestra utilizando el canal FITC para la lectura de la emisión de fluorescencia.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de las SLN y de los vectores

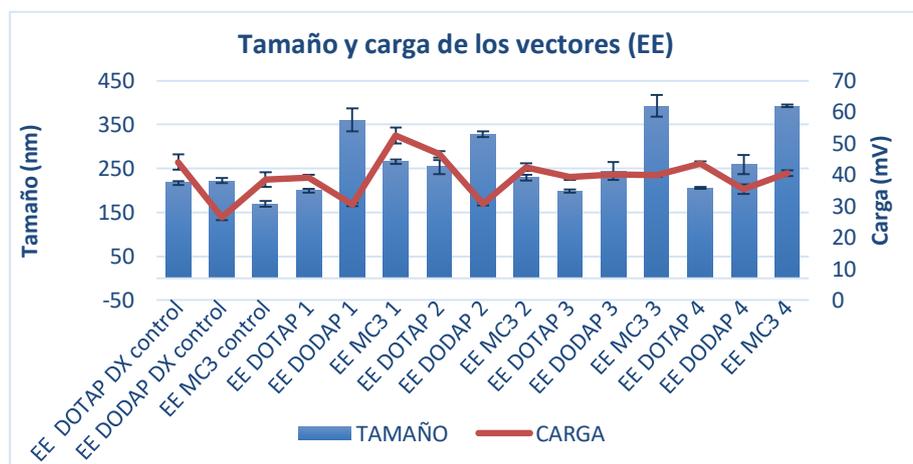
Las SLN preparadas en este trabajo contenían como lípido sólido precirol ATO5, y el lípido catiónico utilizado es el DOTAP, que posee también actividad tensioactiva, favoreciendo la formación de las SLN. Se utilizaron también lípidos ionizables, como el DODAP y el MC3, neutros a pH fisiológico que, debido al pH ácido de los endosomas, se produce la protonación del grupo amino del lípido, facilitando la liberación del endosoma mediante el efecto esponja de protones (21, 35-37). También se utilizó Tween 80, cuyas cadenas de polietilenglicol disminuyen la formación de agregados, reduciendo su toxicidad y aumentando el tiempo de circulación in vivo (21).

En la **Figura 8** se puede observar el tamaño y carga de las SLN; el tamaño de las SLN HM es menor que el de las SLN EE. Esta diferencia en el tamaño puede deberse al método de preparación de las SLN, ya que las preparadas por homogeneización se someten a una sonicación de 30 minutos, a diferencia de las SLN EE que se sonicen durante 30 segundos. El PDI indica la variedad del tamaño de las partículas contenidas en la muestra, es decir, hace referencia a la homogeneidad de la muestra. Todas las SLN presentan un PDI inferior a 0,45 y una carga superficial positiva (oscilan entre + 50 y + 67 mV), siendo las SLN HM las que tienen mayor carga superficial. Asimismo, se observan diferencias en el tamaño de partícula dependiendo de la composición, las SLN que contienen lípidos ionizables (DODAP, MC3), presentan un mayor tamaño que las preparadas únicamente con DOTAP.

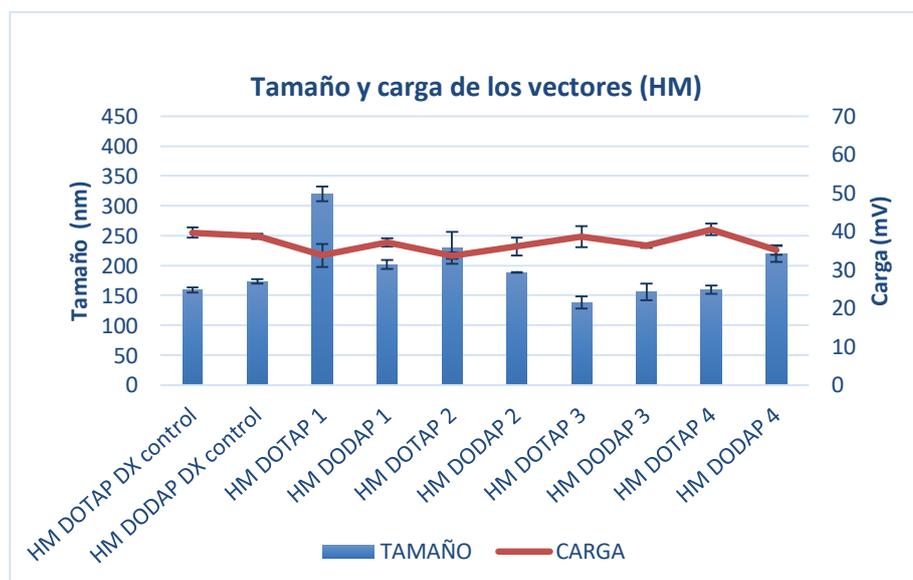


**Figura 8.** Tamaño y carga superficial de las SLN.

Las partículas lipídicas se pueden combinar con otros ligandos como oro, péptidos o polisacáridos que ayuden a mejorar el proceso de transfección (21, 33). Al añadirse el resto de componentes a las SLN, se observa que los vectores resultantes presentan un aumento del tamaño de partícula y una disminución de la carga superficial (**Figuras 9 y 10**). Sin embargo, todos los vectores presentan un tamaño inferior a 400 nm. Como se observa en las **Figuras 9 y 10**, el tamaño de los vectores elaborados con las partículas preparadas por el método EE es mayor que el de las preparadas por HM. El potencial Z indica la carga superficial de los vectores, que en todos los casos es positiva, oscilando entre + 25 y + 52 mV, valores que resultan adecuados para la transfección, ya que la carga positiva facilita la internalización celular al interactuar con la membrana celular cargada negativamente (30). Se asume una distribución homogénea del tamaño de los vectores, ya que el PDI, es en todos los casos inferior a 0,45.



**Figura 9.** Tamaño y carga de los vectores elaborados por el método EE.



**Figura 10.** Tamaño y carga de los vectores elaborados por el método (HM).

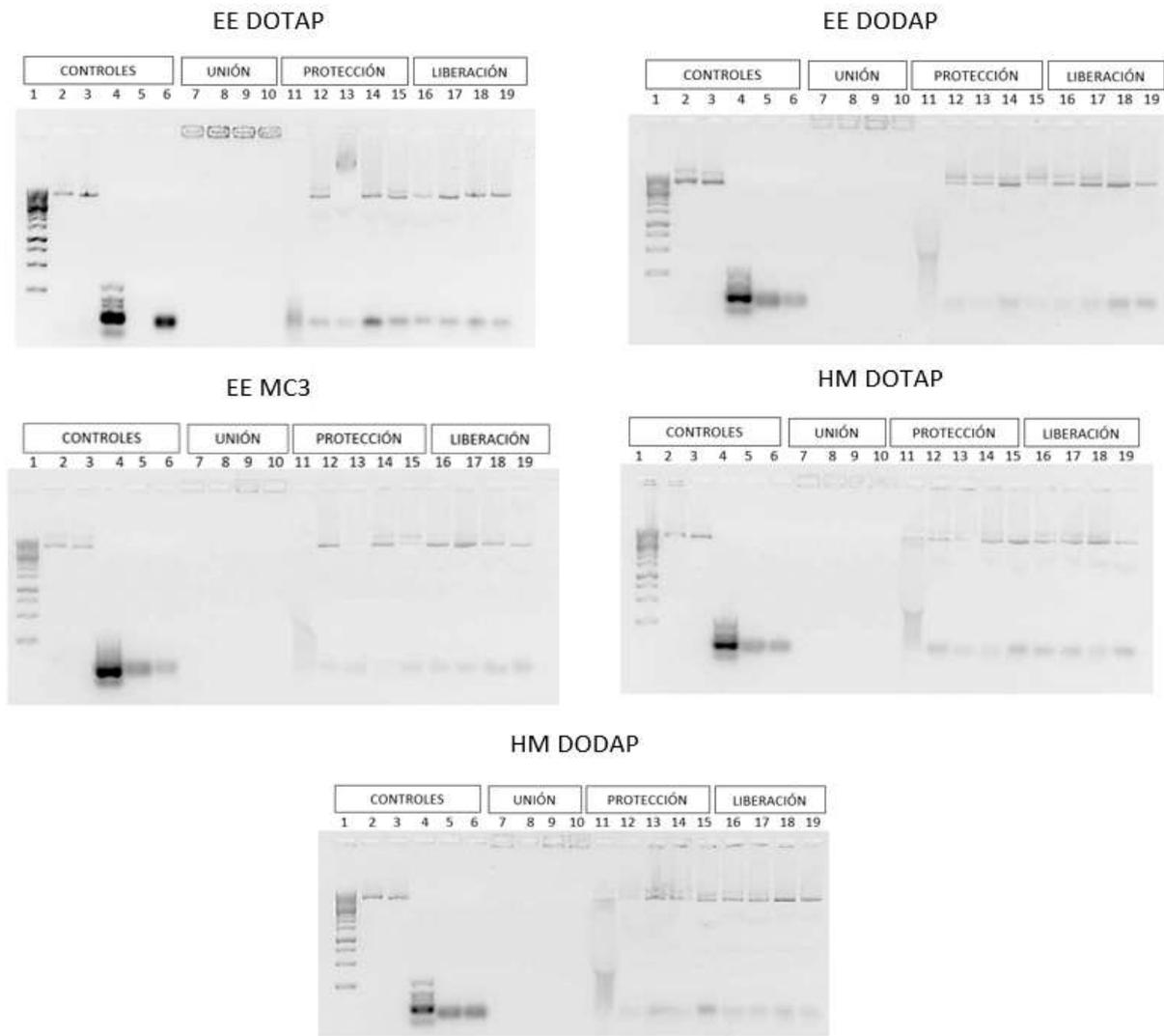
## 4.2. Electroforesis en gel de agarosa

Se estudió además la capacidad de unión y protección frente a la acción de la enzima DNAsa y liberación del plásmido desde los vectores. Se ha demostrado previamente, que las SLN cargadas positivamente, con oro y protamina son capaces de condensar y proteger el material genético, evitando así la degradación enzimática. El oro se introduce entre las cadenas de las bases nucleotídicas, se une principalmente a la adenina por una interacción física y fomenta la condensación del ADN. Sin embargo, es importante que haya un equilibrio entre la unión y protección con la liberación del material genético en el citoplasma para ejercer su efecto (21, 30).

La **Figura 11** muestra las imágenes de los resultados de los geles de electroforesis llevados a cabo con los vectores preparados con cada tipo de SLN, adicionando los componentes en diferente orden. Todas las formulaciones fueron capaces de unir el ADN, viéndose una ligera banda en la parte superior del gel (lugar donde se cargan las muestras), lo que indica que el material genético ha quedado unido a todos los vectores, y éste no ha sido capaz de migrar a través del gel una vez aplicado el voltaje.

Al tratar los vectores con SDS, se observan bandas que indican la liberación los dos ácidos nucleicos de la formulación a partir de todos los vectores. Se puede observar una banda correspondiente al siRNA, por lo que éste se libera totalmente de los vectores. Dicha banda tiene una intensidad menor que la del siRNA control, pero a pesar de ello, en trabajos anteriores se ha visto que comportamientos similares a estos geles realizados, dan lugar a niveles altos de silenciamiento.

En el estudio de protección, se observan bandas de diferente intensidad indicativas de cambios en la conformación del ADN. Se detectan diferencias entre los vectores en la capacidad de protección del ADN frente a la acción enzimática de la DNAsa; en general, los vectores tipo 3 y 4 muestran una mayor capacidad de protección. Por lo tanto, la composición y el orden de adición de los componentes influyen de manera importante en la protección del ADN.



**Figura 11.** Geles de electroforesis realizados para estudiar la unión, protección y liberación del material genético. Carril 1: marcador de peso molecular ADN. Carril 2: pcDNA3-GFP. Carril 3: pcDNA3-GFP + SDS. Carril 4: marcador de peso molecular siRNA. Carril 5: siRNA. Carril 6: siRNA + SDS. Carril 7: vector forma 1. Carril 8: vector forma 2. Carril 9: vector forma 3. Carril 10: vector forma 4. Carril 11: pcDNA3-GFP + DNAsa + SDS. Carril 12: vector forma 1 + DNAsa + SDS. Carril 13: vector forma 2 + DNAsa + SDS. Carril 14: vector forma 3 + DNAsa + SDS. Carril 15: vector forma 4 + DNAsa + SDS. Carril 16: vector EE forma 1 + SDS. Carril 17: vector forma 2 + SDS. Carril 18: vector forma 3 + SDS. Carril 19: vector forma 4 + SDS. Cada gel está realizado con una de las cinco tipos de SLN elaboradas.

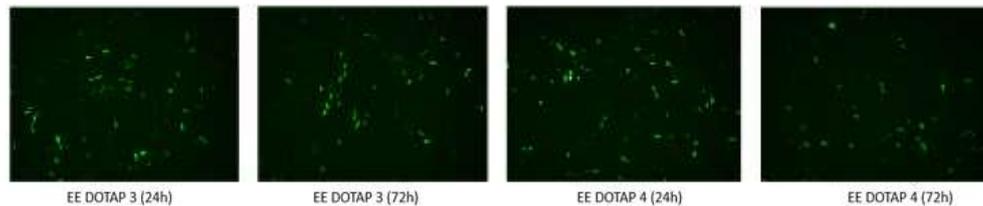
#### 4.2.1. Eficacia de transfección

##### 4.2.1.1. Microscopía de fluorescencia

La evaluación de la eficacia de la transfección se evaluó cualitativamente a las 24, 48 y 72 h mediante microscopía de fluorescencia.

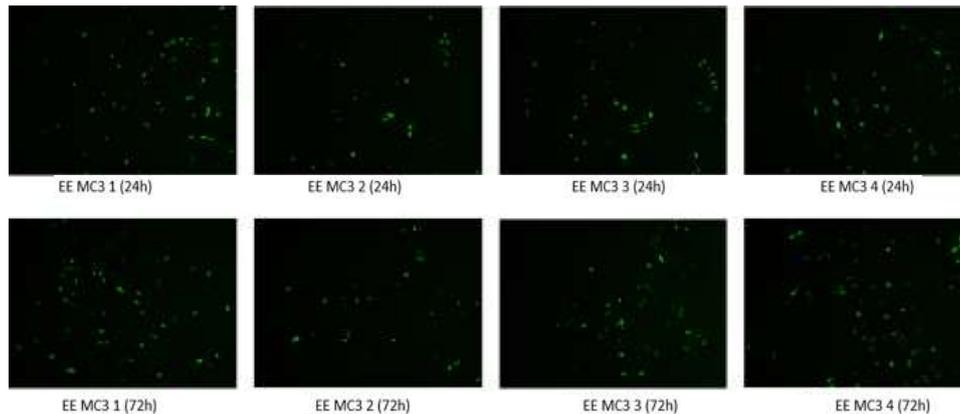
Las formulaciones HM que contenían tanto DOTAP, como DOTAP y DODAP, mostraron niveles bajos de fluorescencia a los tiempos evaluados.

Las formulaciones en las cuales ha habido fluorescencia a las 24h indican que ha habido una liberación más rápida del material genético (**Figura 12**). Esto indica, que la velocidad de la transfección está condicionada por el orden de adición y la composición de los vectores. Las formulaciones EE con DOTAP 3 y 4 son un ejemplo de ello, ya que se observa la producción de GFP desde las 24h.



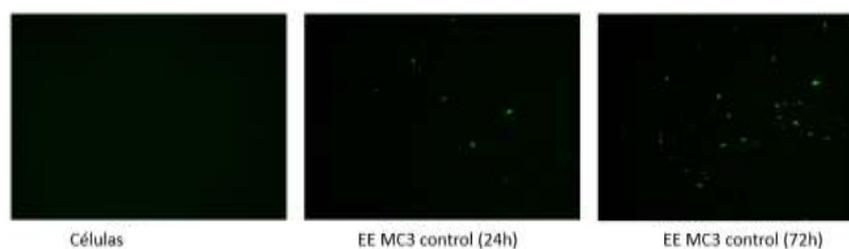
**Figura 12.** Imágenes obtenidas mediante el microscopio de fluorescencia en cultivos de células IMFE-1, con vectores que contienen DOTAP, a las 24 h y 72 h de los vectores tipo 3 y 4.

La **Figura 13** muestra los resultados de los vectores preparados con el lípido MC3; las formulaciones 1, 3 y 4 presentan cualitativamente mayor fluorescencia que la formulación 2, por lo que se confirma la influencia del orden de adición de los componentes sobre la eficacia de transfección.



**Figura 13.** Imágenes obtenidas mediante el microscopio de fluorescencia en cultivos de células IMFE-1, con vectores que contienen MC3, a las 24 h (primera fila) y 72 h (segunda fila).

De igual forma, también se observa una mayor producción de GFP de los vectores EE MC3 (1-4) en comparación con el vector control (EE MC3 control) (**Figura 14**). En la maduración endosomal, los lípidos ionizables, como el MC3 adquieren carga positiva, y se unen a los lípidos cargados negativamente de la membrana endosomal. Esto provoca la fusión de las membranas y la ruptura endosomal, favoreciendo la liberación del ácido nucleico al citoplasma (20, 36, 38).

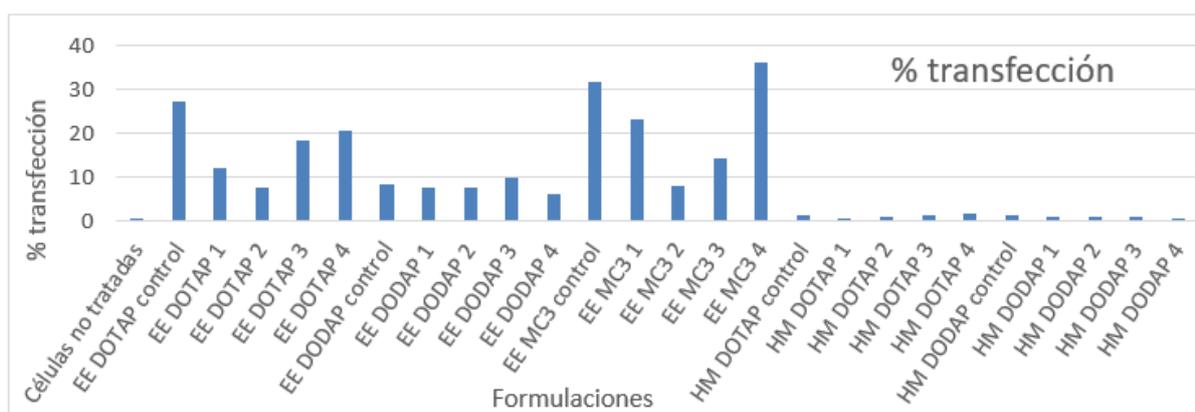


**Figura 14.** Imágenes obtenidas mediante el microscopio de fluorescencia en cultivos de células IMFE-1. Se observan los controles de células sin tratar y el vector control (a las 24 y 72 h).

#### 4.2.1.2. Cuantificación de la proteína verde fluorescente (GFP) mediante citometría

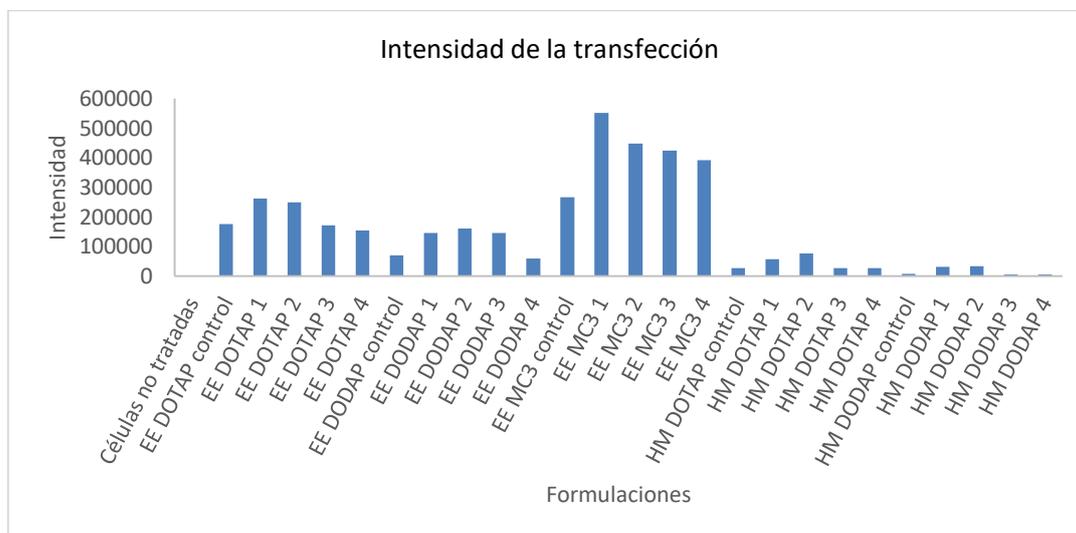
Una vez realizado el análisis cualitativo, se procedió a la cuantificación de la proteína verde fluorescente (**Figura 15**). Las formulaciones HM fueron capaces de transfectar, pero presentaron un porcentaje de células transfectadas considerablemente inferior al de las SLN EE, es decir, las formulaciones elaboradas por homogeneización, a pesar de tener la misma composición, y emplear un método que da lugar a partículas más pequeñas presenta menor eficacia, lo que podría ser debido a un exceso de condensación del ADN.

En el caso de las formulaciones preparadas únicamente con DOTAP, la inclusión de siRNA resultó en formulaciones con menor eficacia de transfección, es decir, presentaron menor capacidad de producir GFP en comparación con el control (vectores sin siRNA). Las SLN que contenían DODAP fueron las menos efectivas, pudiendo ser debido a que este lípido tiene menor carga superficial, generando una menor condensación del material genético y una menor protección del mismo. Sin embargo, en las SLN con DODAP, la inclusión de siRNA no afectó a la producción de la proteína. En el caso del MC3, el orden de adición es el que condiciona la eficacia. Este lípido ionizable tiene menor capacidad tensioactiva, pero el hecho de que los vectores sean formulados con SLN que contienen el MC3 junto con DOTAP hace que la eficacia aumente, e incluso supera la capacidad de transfección del control.



**Figura 15.** Porcentaje de células IMFE-1 con las diferentes formulaciones.

En la **Figura 16** se recogen las intensidades medias de fluorescencia de los estudios de transfección, lo que es indicativo de la cantidad de GFP expresada por célula. Los resultados muestran que los vectores con MC3 dieron lugar a una mayor intensidad de fluorescencia, y, por tanto, a la expresión de mayor cantidad de proteína por célula.



**Figura 16.** Intensidad en la transfección por célula de las formulaciones.

## 5. CONCLUSIONES

Se han diseñado vectores no virales basados en SLN formuladas con siRNA, pcDNA3-GFP, dextrano, protamina y oro con tamaños de partícula nanométricos, entre 100 y 400 nm y carga superficial positiva, capaces de transfectar células IMFE-1.

La composición de la SLN y el orden de adición de los componentes empleados en el vector final condicionan la disposición del material genético en la formulación y su eficacia de la transfección; los vectores preparados con SLN EE y el lípido ionizable MC3, dieron lugar a una mayor eficacia de transfección. Asimismo, aquellas formulaciones que presentan mayor grado de protección del ADN, en general también tienen mayor eficacia de transfección.

Teniendo en cuenta los prometedores resultados obtenidos con las SLN EE MC3, se selecciona este tipo de vector para posteriores estudios con el plásmido terapéutico  $\alpha$ -Gal, para confirmar los resultados logrados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Arends, M.; Wanner, C.; Hughes, D.; Mehta, A.; Oder, D.; Watkinson, O. T.; Elliott, P. M.; Linthorst, G. E.; Wijburg, F. A.; Biegstraaten, M.; Hollak, C. E. Characterization of Classical and Nonclassical

- Fabry Disease: A Multicenter Study. *J. A. Soc. Nephrol.* **2017**, 28 (5),1631–1641. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016090964>.
2. Tuttolomondo, A.; Simonetta, I.; Riolo, R.; Todaro, F.; Di Chiara, T.; Miceli, S.; Pinto, A. Pathogenesis and Molecular Mechanisms of Anderson–Fabry Disease and Possible New Molecular Addressed Therapeutic Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms221810088>.
  3. Bernardes, T.P.; Foresto, R.D.; Kirsztajn, G.M. Fabry disease: Genetics, pathology, and treatment. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **2020**, 66, 10–16. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.S1.10>.
  4. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukel T, Thiagarajan G et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**; 79(1): 31-40. <https://doi.org/10.1086/504601>.
  5. Hwu WL, Chien YH, Lee NC, et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum. Mutat.* **2009**; 30(10):1397–405. <https://doi.org/10.1002/humu.21074>.
  6. Schiffmann R. Fabry disease. *Handbook of clinical neurology* **2015**, 132,231–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62702-5.00017-2>.
  7. Germain, D.P. Fabry disease. *Orphanet. J. Rare Dis.* **2010** 5, 30 (2010). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-30>.
  8. Olea T, Peces R. Enfermedad de Fabry: diagnóstico clínico y enzimático de homocigotos y heterocigotos. Nuevas perspectivas terapéuticas. *Nefrología* [Internet]. **2002** [citado el 14 de mayo de 2023]; 22(6):540–6. ISSN (Online): 1989-2284. Disponible en: <https://www.revistanefrologia.com/es-enfermedad-fabry-diagnostico-clinico-enzimatico-articulo-X0211699502015468>.
  9. Rozenfeld Paula Adriana. Enfermedad de Fabry en Argentina. *Acta bioquím. clín. latinoam.* [Internet]. **2016** [citado 2023 Mayo 13]; 50(1):17-25. ISSN (Online): 1851-6114. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572016000100005&lng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572016000100005&lng=es).
  10. Rodríguez-Castejón, J.; Alarcía-Lacalle, A.; Gómez-Aguado, I.; Vicente-Pascual, M.; Solinís Aspiazu, M.Á.; del Pozo-Rodríguez, A.; Rodríguez-Gascón, A.  $\alpha$ -Galactosidase A Augmentation by Non-Viral Gene Therapy: Evaluation in Fabry Disease Mice. *Pharmaceutics* **2021**,13,771. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060771>.
  11. Rodríguez-Castejón, J.; Gómez-Aguado, I.; Beraza-Millor, M.; Solinís, M.Á.; del Pozo-Rodríguez, A.; Rodríguez-Gascón, A. Galactomannan-Decorated Lipidic Nanocarrier for Gene Supplementation Therapy in Fabry Disease. *Nanomaterials* **2022**, 12,2339. <https://doi.org/10.3390/nano12142339>.
  12. Veen, S.J.; Hollak, C.E.M.; Kuilenburg, A.B.P.; Langeveld, M. Developments in the treatment of Fabry disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2020**, 43,908–921. <https://doi.org/10.1002/jimd.12228>.

13. Hendriksz CJ, Harmatz P, Giugliani R, Roberts J, Arul GS. Risks of long-term port use in enzyme replacement therapy for lysosomal storage disorders. *Mol. Genet. Metab. Reports*. **2018**, 71-73. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.02.007>.
14. Azevedo, O.; Gago, M. F.; Miltenberger-Miltenyi, G.; Sousa, N.; Cunha, D. Fabry Disease Therapy: State-of-the-Art and Current Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22 (1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22010206>.
15. Vedder, A. C., Linthorst, G. E., Houge, G., Groener, J. E., Ormel, E. E., Bouma, B. J., Aerts, J. M., Hirth, A., & Hollak, C. E. Treatment of Fabry disease: outcome of a comparative trial with agalsidase alfa or beta at a dose of 0.2 mg/kg. *PloS one* **2007**, 2(7),e598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000598>.
16. Coutinho, M. F., Santos, J. I., & Alves, S. Less Is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *International journal of molecular sciences* **2016**, 17(7),1065. <https://doi.org/10.3390/ijms17071065>.
17. Lenders M, Brand E. Precision medicine in Fabry disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2021**; 36(Supplement\_2):II14-II23. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab038>.
18. McCafferty, E.H.; Scott, L.J. Migalastat: A Review in Fabry Disease. *Drugs* **2019**, 79, 543–554. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01090-4>.
19. Müntze J, Lau K, Cybulla M, et al. Patient reported quality of life and medication adherence in Fabry disease patients treated with migalastat: A prospective, multicenter study. *Mol. Genet. Metab.* **2023**; 138(2). <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2022.106981>.
20. EMA (European Medicine Agency). Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal product. **2018**. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf).
21. del Pozo Rodriguez A, Rodriguez Gascos A, Solinís Aspiazu M.Á. Terapia génica. 6th ed. Sintesis. **2018**.
22. Anguela XM, High KA. Entering the modern era of gene therapy. *Annu. Rev. Med.* **2019**; 70:273–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>.
23. Papadakis ED, Nicklin SA, Baker AH, White SJ. Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy. *Curr. Gene. Ther.* **2004**; 4:89–113. <https://doi.org/10.2174/1566523044578077>.
24. Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **2009**, 136(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>.
25. Correa de Adjounian, M.F.; Adjounian H; Adjounian S.H. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia: Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Arch. Venez.*

- Farmacol. Ter.* **2008**, 27(1):22-5. ISSN (impreso): 0798-0264. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-02642008000100006](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642008000100006).
26. Cruz Nieves RP, Ruíz Hernandez A. siRNA: el papel del silenciamiento génico en la terapéutica [Internet]. [Consultado 25 Abril 2023]. Disponible en <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/sirna-el-papel-del-silenciamiento-genico-en-la-terapeutica/>.
  27. Lares, M. R., Rossi, J. J., Ouellet, D. L. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends in biotechnology* **2010**; 28(11),570–579. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.009>.
  28. C. L. Ronchera-OMS, J. M<sup>a</sup>. González. (2002). *Terapia génica. Capítulo 6*. <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP06.pdf>.
  29. Rozalén, J.; Valentín, C. Jordán, J. Terapia génica. Vectores de expresión. *Offarm* **2009** vol.22. Núm. 8. 102-108. ISSN 0212-047X. <https://www.elsevier.es/en-revista-offarm-4-articulo-terapia-genica-vectores-expresion-13051502>.
  30. Rodríguez Gascón A, Solinís Aspiazu M<sup>Á</sup>, del Pozo Rodríguez A. Solid lipid nanoparticles for gene therapy. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* **2016**; 82(4):408-423. ISSN (Online) 1697-4298.
  31. Balamurugan, K.; Chintamani, P. Lipid nano particulate drug delivery: An overview of the emerging trend. *Pharma. Innov. J.* **2018**, 7, 779-789. ISSN (Online): 2277- 7695. Disponible en: <https://www.thepharmajournal.com/archives/2018/vol7issue7/PartM/7-6-166-872.pdf>.
  32. Vicente-Pascual, M., Albano, A., Solinís, M. Á., Serpe, L., Rodríguez-Gascón, A., Foglietta, F., Muntoni, E., Torrecilla, J., Pozo-Rodríguez, A. D., & Battaglia, L. (2018). Gene delivery in the cornea: in vitro & ex vivo evaluation of solid lipid nanoparticle-based vectors. *Nanomedicine (London, England)*, 13(15): 1847–1854. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0112>.
  33. Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA. Development of nucleic acid vaccines: use of self-amplifying RNA in lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2014**; 9:1833-43. <https://doi.org/10.2147/IJN.S39810>.
  34. Phua, K. K., Nair, S. K., & Leong, K. W. Messenger RNA (mRNA) nanoparticle tumour vaccination. *Nanoscale* **2014**, 6(14): 7715–7729. <https://doi.org/10.1039/c4nr01346h>.
  35. Swathi,G; Prasanthi, N. L.; Manikiran S.S.; Ramarao, N.Solid Lipid nanoparticles: colloidal carriers systems for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2010**, Vol. 1 (12): 01-16. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.1\(12\).1-16](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.1(12).1-16).
  36. Gottfried, L.F.; Dean, D.A. Extracellular and intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Novel Gene Therapy Approaches* **2013**; pp. 75–88. <https://doi.org/10.5772/54699>.

37. Schlich, M.; Palomba, R.; Costabile, G.; Mizrahy, S.; Pannuzzo, M.; Peer, D.; Decuzzi, P. Cytosolic delivery of nucleic acids: The case of ionizable lipid nanoparticles. *Bioeng. Transl. Med.* **2021**; 6(2):e10213. <https://doi.org/10.1002/btm2.10213>.
38. Varkouhi, A.K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H.J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release* **2011**; 151(3):220-8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.004>.
39. I. Gómez-Aguado, J. Rodríguez-Castejón, M. Beraza-Millor, M. Vicente-Pascual, A. Rodríguez-Gascón, S. Garelli, L. Battaglia, A. Del Pozo-Rodríguez, M.Á. Solinís, Mrna-based nanomedicinal products to address corneal inflammation by interleukin-10 supplementation, *Pharmaceutics*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091472>.
40. A. del Pozo-Rodríguez, D. Delgado, M.A. Solinís, A.R. Gascón, J.L. Pedraz, Solid lipid nanoparticles: Formulation factors affecting cell transfection capacity, *Int. J. Pharm.* 339 (2007) 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.03.015>.