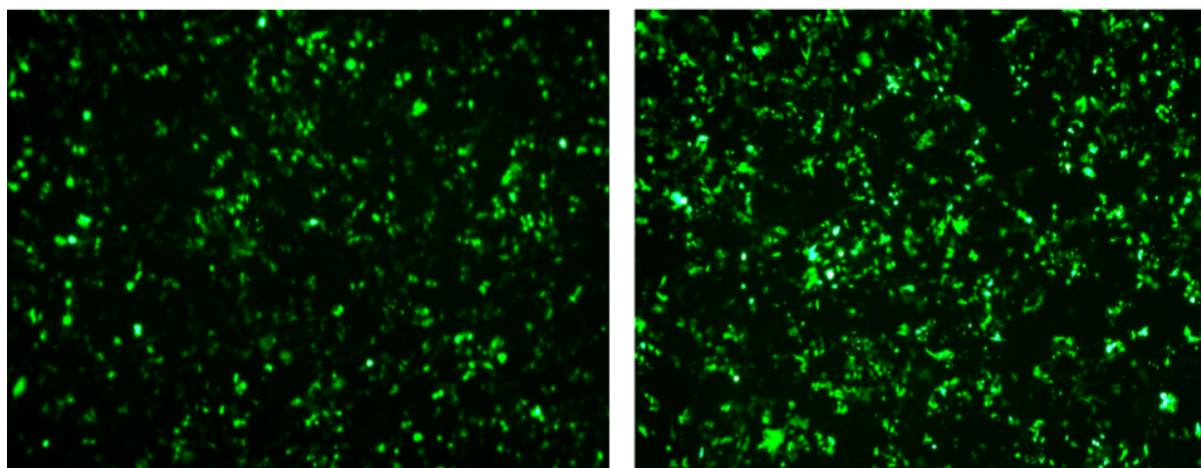




FARMAZIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE FARMACIA



EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y EFICACIA DE TRANSFECCIÓN DE VECTORES NO VIRALES BASADOS EN NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E INORGÁNICAS

Autora: Raquel Peña Soldevilla

Directora: Ana del Pozo Rodriguez

Grado de Farmacia - Trabajo de Fin de Grado 2022-2023

5º Farmacia

ÍNDICE

RESUMEN

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Terapia génica..... | 1 |
| 1.2. Sistemas de administración de material genético en terapia génica..... | 2 |
| 1.2.1. Vectores virales..... | 3 |
| 1.2.2. Vectores no virales..... | 4 |
| 1.3. Sistemas inorgánicos para la administración de ácidos nucleicos..... | 4 |
| 1.4. Sistemas lipídicos para la administración de ácidos nucleicos..... | 4 |
| 2. OBJETIVOS..... | 6 |
| 3. DESARROLLO..... | 6 |
| 3.1. Materiales y métodos..... | 6 |
| 3.1.1. Materiales..... | 6 |
| 3.1.2. Elaboración de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN)..... | 7 |
| 3.1.3. Diseño y elaboración de los vectores..... | 7 |
| 3.1.4. Tamaño, índice de polidispersión y carga superficial..... | 9 |
| 3.1.5. Gel de electroforesis..... | 10 |
| 3.1.6. Cultivo celular..... | 10 |
| 3.1.7. Transfección y viabilidad celular..... | 11 |
| 3.2. Resultados y discusión..... | 11 |
| 3.2.1. Caracterización de nanopartículas sólidas lipídicas (SLNs)..... | 11 |
| 3.2.2. Caracterización de los vectores..... | 13 |
| 3.2.2.1. Tamaño, PDI y carga superficial..... | 13 |
| 3.2.2.2. Geles de electroforesis..... | 16 |
| 3.2.3. Eficacia de transfección y viabilidad celular..... | 19 |
| 4. CONCLUSIÓN..... | 22 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA..... | 23 |

RESUMEN

La terapia génica consiste en la administración de material genético con el fin de modular la expresión de proteínas específicas. Es un área de la medicina con gran potencial para el tratamiento de enfermedades tanto hereditarias como adquiridas. Los ácidos nucleicos utilizados en terapia génica pueden estar basados en ADN o ARN, y en ambos casos es necesario un sistema de administración que facilite su acceso al compartimento intracelular donde deben actuar.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo, caracterización físico-química y evaluación de la eficacia de transfección de sistemas no virales de administración de ADN basados en nanopartículas lipídicas e inorgánicas.

Para ello, se formularon diferentes vectores basados en nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), compuestas por lípidos catiónicos e ionizables, junto con protamina, polisacáridos y nanopartículas de oro (NP-Au). Se caracterizaron en términos de tamaño, carga superficial e índice de polidispersión, y mediante electroforesis en gel de agarosa se estudió su capacidad de unión, protección y liberación de ADN. Asimismo, se evaluó su eficacia de transfección y viabilidad celular en células HEK-293.

Las formulaciones presentaron un tamaño nanométrico y carga superficial catiónica, así como capacidad para unir, proteger y liberar el ADN. Todos los vectores fueron capaces de transfectar las células sin comprometer la viabilidad celular, obteniendo resultados significativamente prometedores con los vectores formulados con SLN que contienen en su composición el lípido catiónico DOTAP y el lípido ionizable D-Lin-MC3-DMA. Estas formulaciones pueden ser buenas candidatas para continuar con su optimización y caracterización preclínica como posibles nanomedicinas para terapia génica.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

siARN: Short interfering RNA

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

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

MC3: DLin-MC3-DMA

DX: Dextrano

AH: Ácido hialurónico

EE: Emulsificación-Evaporación del solvente

PDI: Índice de Polidispersión

SLN: Nanopartículas Sólidas Lipídicas (del inglés, Solid Lipid Nanoparticles)

NP-Au: Nanopartículas de oro

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

HEK-293: Células de riñón de embrión humano

GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés, green fluorescent protein)

SLN-Au: Oro unido a Nanopartículas Sólidas Lipídicas

ADN-Au: Oro unido a ADN

SDS: Dodecilsulfatosódico

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Terapia génica

La terapia génica se define según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) como un vector o sistema de administración que emplea constructos genéticos para expresar una secuencia genética o una proteína específica para regular, reparar, añadir, eliminar o reemplazar una secuencia genética determinada (1). Muchas patologías podrían verse beneficiadas con este tipo de terapia, desde enfermedades genéticas hasta cáncer. Todas ellas presentan varios aspectos en común: producen alteraciones graves, no disponen de tratamientos eficaces y deben estar bien caracterizadas (2).

El proceso mediante el cual las secuencias genéticas son introducidas en las células se conoce como transfección. Según el tipo de transfección empleada, la terapia génica se puede clasificar en terapia *in vivo* y *ex vivo*. El método *in vivo* consiste en la directa inoculación del material genético en el paciente, por lo que le proporciona sencillez y un coste inferior al método *ex vivo*, a la vez que permite utilizar las vías de administración de medicamentos habituales (2). Por el contrario, en el método *ex vivo* la transfección ocurre fuera del organismo. En concreto, se extraen células del paciente y se cultivan y transfectan *in vitro* para finalmente ser introducidas de nuevo en el paciente. Este tipo de terapia, pese a ser más costosa y solo poder utilizarse en líneas celulares que sean capaces de mantenerse en cultivo, es más específica y eficaz en el proceso de transfección, y cuenta con un alto control del proceso.

Por otro lado, la terapia génica se puede clasificar en función del tipo de célula a transfectar como terapia germinal, en la cual la modificación va dirigida a células reproductoras y los cambios se transmiten a la descendencia, y terapia somática, la cual va dirigida a células no germinales, por lo que en este caso no se transmite a la descendencia.

Los ácidos nucleicos utilizados en terapia génica pueden estar basados en ADN o ARN, y presentan tres diferentes objetivos en función del objetivo terapéutico y de la patología que se quiere prevenir o tratar: suplementación génica, supresión génica y edición génica.

La suplementación génica consiste en expresar una secuencia nucleotídica para inducir la producción de una proteína que no se expresa o lo hace de manera defectuosa. En este tipo de terapia se pueden administrar plásmidos de ADN o ARN mensajero (ARNm). El ADN ejerce su efecto en el núcleo, por lo que debe atravesar la membrana nuclear, siendo este fenómeno uno de los

principales factores limitantes para la eficacia de estos ácidos nucleicos. Sin embargo, si las células presentan una alta tasa de división, la expresión de proteínas es más eficaz debido a que el ADN penetra en el núcleo principalmente durante la mitosis (2). Por ello, el ADN se suele emplear en terapia génica a largo plazo.

En la suplementación con ARNm no es necesario que este acceda al núcleo, por lo que la transfección es más rápida y efectiva, pero menos duradera. Al contrario que con el ADN, el ARNm no se integra en el genoma del hospedador y se puede inducir la producción de proteína tanto en células que se dividen como en aquellas que no lo hacen. De esta manera la terapia es más potente y segura, sin embargo, el ARNm presenta una menor estabilidad y puede ser inmunogénico.

La supresión génica consiste en disminuir o anular la expresión de una proteína específica, y para ello se utilizan diferentes estrategias, siendo la más empleada el ARN de interferencia (ARNi). Este proceso se basa en la utilización de *short interfering RNA* (siARN), que son pequeñas moléculas de doble cadena de 21-23 nucleótidos, que se unen al ARNm complementario degradándolo o inhibiendo su traducción.

Por último, la edición génica consiste en la modificación del genoma de células eucariotas mediante el uso de nucleasas de edición génica que permiten insertar una secuencia para corregir o añadir un gen, o eliminar una secuencia específica. Algunos ejemplos de estos sistemas son los dedos de zinc (ZFN), TALEN y CRISPR/Cas9. Este último, no solo está siendo estudiado para tratar enfermedades genéticas, sino que también para la fabricación de vacunas genéticamente modificadas (3).

1.2. Sistemas de administración de material genético en terapia génica

Una de las limitaciones que presenta la terapia génica es que, una vez administrados, los ácidos nucleicos son eliminados fácilmente del organismo ya que son muy sensibles a la acción de las nucleasas. Además, el material genético debe de ser capaz de superar una serie de barreras hasta alcanzar el lugar de acción (el citoplasma en el caso del ARN, o el núcleo en el caso del ADN) (4). Algunas de las primeras barreras con las que se topan son componentes sanguíneos como las proteínas plasmáticas o los eritrocitos, los cuales interactúan y se unen con el material genético causando su rápida eliminación mediante el sistema reticuloendotelial o el hígado respectivamente (5). Asimismo, una vez que el ácido nucleico alcanza la célula diana, presenta dificultades para atravesar la propia membrana celular debido a su tamaño y carga negativa. Por ello se emplean

nanopartículas con cargas superficiales positivas, ya que facilitan e inician el proceso de internalización mediante endocitosis.

Dependiendo del tipo de célula, existen varios mecanismos de endocitosis: endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas, macropinocitosis, etc. De esta manera el material genético queda incluido en un endosoma (figura 1), el cual a su vez puede fusionarse con un lisosoma, formando así un endolisosoma. El cual posee en su interior enzimas hidrolíticas que pueden degradar los ácidos nucleicos, por lo que conviene que se favorezca el escape endosomal antes de que esto ocurra. Por ello, un aspecto fundamental en este tipo de terapia es la utilización de sistemas eficaces y seguros, que protejan el material genético, faciliten su internalización en la célula y favorezcan una correcta disposición intracelular. Estos sistemas de administración se clasifican en dos grandes grupos: vectores virales y vectores no virales.

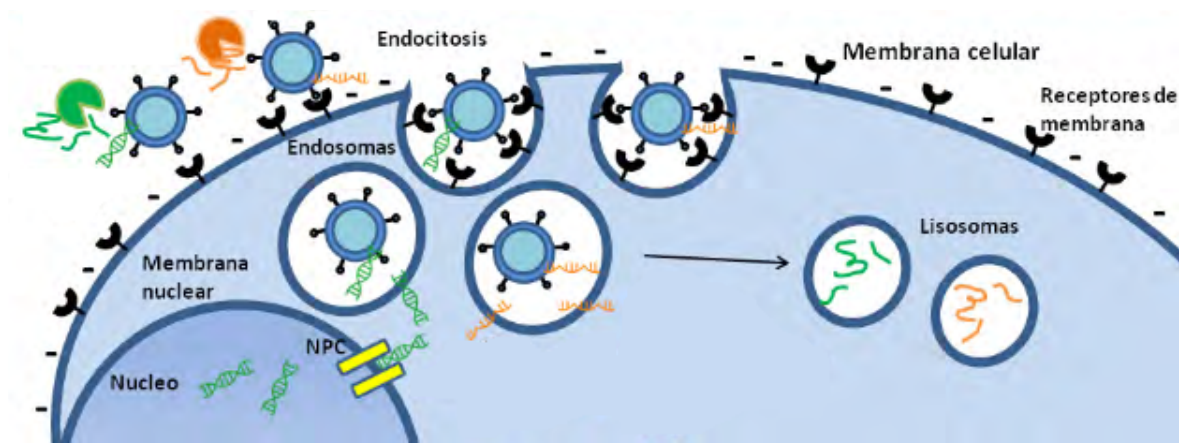


Figura 1: Principales barreras para la transfección. NPC: complejo de poros nucleares. Adaptada de (4).

1.2.1. Vectores virales

Estos vectores se preparan a partir de virus modificados mediante ingeniería genética, de esta manera permiten que se exprese el gen que portan en la célula diana, pero no son capaces de replicarse en ellas. Presentan la ventaja de alcanzar altas eficiencias de transfección; sin embargo, presentan un alto potencial oncogénico e inmunogénico y la incapacidad de incorporar ácidos nucleicos de elevado tamaño. Algunos de los sistemas virales más empleados son: virus adenoasociados, adenovirus, lentivirus y retrovirus.

1.2.2. Vectores no virales

Estos vectores son sistemas más seguros, no presentan limitaciones en cuanto al tamaño del material genético que incorporan y su fabricación es más barata, sencilla y reproducible a gran escala. Sin embargo, su eficacia de transfección es menor que la que presentan los vectores virales, aunque ha mejorado significativamente en los últimos años (6). Estos sistemas se pueden clasificar en dos categorías: métodos físicos, como electroporación o sonoporación, y los métodos químicos, compuestos por polímeros, lípidos, péptidos, materiales inorgánicos o mezclas de ellos.

1.3. Sistemas inorgánicos para la administración de ácidos nucleicos

Son sistemas con diferentes tamaños, formas y porosidades, diseñados para proteger de la degradación al material genético y evitar tras su administración la captación por el sistema reticuloendotelial. Algunos de los más utilizados son: fosfato cálcico, sílice, nanopartículas metálicas o compuestos magnéticos. En concreto, las nanopartículas metálicas como el oro han emergido recientemente como excelentes vectores para la administración de genes (7) por su baja reactividad química, gran estabilidad y biocompatibilidad.

Estas nanopartículas de oro (NP-Au) son un sistema de transfección bastante eficaz ya que presentan una gran facilidad de unión a grupos tioles, lo que puede resultar útil para fijar el material genético. Además de esta unión, el ADN interacciona con las nanopartículas de oro mediante interacciones electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas y uniones específicas entre las bases de ADN y el oro. Varias condiciones externas como el pH o la composición del tampón pueden influir en estas interacciones (8).

Por otro lado, estas nanopartículas de oro son capaces de absorber radiación infrarroja, lo que produce un *efecto fototérmico* que desnaturaliza la partícula y libera el material genético (6). Después de cada administración, estas partículas pueden ser detectadas por varios métodos como la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (7), radioterapia o tomografía computerizada (9). Esto permite utilizarlas como sistemas de administración de moléculas activas y como herramienta de diagnóstico, dando lugar a lo que se conoce como *teragnosis*.

1.4. Sistemas lipídicos para la administración de ácidos nucleicos

Se trata del tipo de sistema no viral más estudiado y utilizado a nivel clínico por su composición basada en lípidos fisiológicos muy bien tolerados. En concreto se suelen utilizar lípidos catiónicos, que son capaces de condensar y proteger el material genético, cargado negativamente,

facilitando su transporte y protección frente a la degradación enzimática. Asimismo permiten la unión a las cargas negativas de las membranas celulares favoreciendo su posterior entrada. Aunque la eficacia de estos sistemas no es tan alta como la que se consigue con los vectores virales, en los últimos años se ha conseguido un gran avance en el desarrollo y eficacia de estos sistemas lipídicos gracias a la incorporación de lípidos ionizables. Estos presentan en su estructura una amina terciaria, que a pH ácido se encuentra protonada, lo que facilita su unión con el material genético. Sin embargo, una vez que se alcanzan niveles fisiológicos de pH, esta protonación disminuye. Aumentando así su biocompatibilidad, ya que su capacidad de interacción con los componentes moleculares se ve reducida (10). Asimismo, la eficacia de transfección de los sistemas que contienen estos lípidos se ha visto aumentada debido a que, una vez en el interior de la célula, el pH ácido del endosoma hace que se protonen, interaccionando así con las cargas aniónicas de la membrana del endosoma y desestabilizando, a la vez que se libera el material genético al citoplasma (11).

Se pueden diferenciar distintos tipos de sistemas lipídicos, siendo los más conocidos los liposomas, nanoemulsiones y nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), cuyas estructuras se recogen en la figura 2.

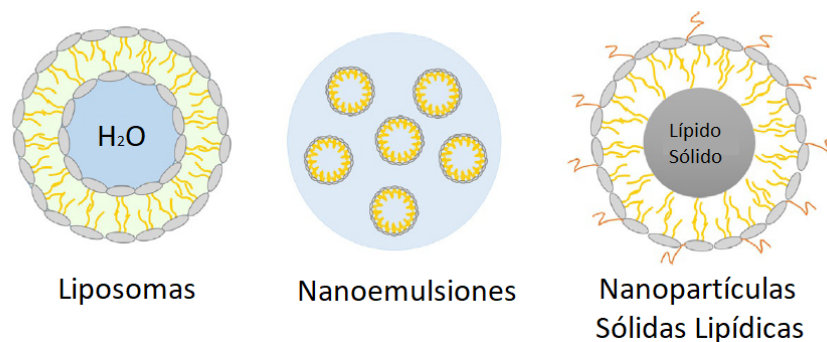


Figura 2: Esquema de los diferentes sistemas lipídicos. Adaptada de (10)

Los liposomas son vesículas esféricas que presentan un núcleo acuoso rodeado de una o varias bicapas lipídicas, lo que les permite introducirse en las células mediante fusión. Como ventaja presentan la capacidad de transportar material genético de alto tamaño y la posibilidad de incluir en su superficie ligandos para que sean dirigidos a tejidos concretos. Por otro lado, las nanoemulsiones presentan un núcleo lipídico líquido rodeado de una monocapa lipídica que actúa como tensioactivo a la vez que aporta una carga positiva. A gran escala son más sencillas de producir que los liposomas y durante el almacenamiento son muy estables.

Las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) presentan, a diferencia de las anteriores, un núcleo lipídico sólido a temperatura ambiente. Su tamaño se sitúa en el rango nanométrico y se encuentra rodeado de una capa de lípidos catiónicos que actúan como surfactantes a la vez que aportan una carga superficial positiva. Estas partículas destacan por su estabilidad, su capacidad de protección de las sustancias activas y su posibilidad de ser sometidas a procesos de esterilización y liofilización (4).

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo, caracterización físico-química y evaluación de la eficacia de transfección de vectores no virales basados en nanopartículas lipídicas e inorgánicas. Para ello se plantearon los siguientes subobjetivos:

- Diseño, elaboración y caracterización de nanopartículas lipídicas con distintos lípidos ionizables.
- Diseño, elaboración y caracterización de vectores no virales basados en nanopartículas lipídicas y nanopartículas de oro.
- Evaluación de la eficacia de transfección y viabilidad celular de los vectores no virales en cultivo celular.

3. DESARROLLO

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Materiales

El Precirol® ATO 5 fue proporcionado generosamente por Gattefossé (Madrid, España); 1,2-Dioleoil-3-Trimetilamonio-Propano (DOTAP) y 1,2-Dioleoil-3-Dimetilamonio-Propano (DODAP) fueron obtenidos de Avanti Polar-lipids, Inc. (Alabaster, AL, EEUU); el Tween 80 y el diclorometano fueron obtenidos de Panreac (Madrid, España). La protamina (P) y dextrano (DX) fueron comprados en Sigma-Aldrich (Madrid, España). El ácido hialurónico (HA) fue adquirido de Lifecore Biomedical (Chaska, MN, EEUU). El plásmido pcDNA3-EGFP fue proporcionado por el laboratorio del profesor BHF Weber (Universidad de Regensburg, Regensburg, Alemania) y CleanCap. Los materiales empleados para la electroforesis en gel de agarosa fueron adquiridos de Bio-Rad (Madrid, España). La desoxirribonucleasa I (DNase I) y el dodecilsulfatosódico (SDS) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El GelRed de Biotium (Fremont, CA, EEUU) y Ambion. Las células de riñón humano (HEK-293) fueron compradas en American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EEUU). El cultivo celular de Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) fue comprado en LGC Promochem (Barcelona, España). El marcador de viabilidad 7-aminoactinomicina D (7-AAD), fue proporcionado por Beckman Coulter (Brea, CA, EEUU).

3.1.2. Elaboración de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN)

Todas las SLNs se elaboraron mediante la técnica de emulsificación- evaporación del solvente. La fase acuosa estaba compuesta por el tensioactivo Tween 80, el lípido catiónico DOTAP (1,2-Dioleoil-3-Trimetilamonio-Propano) y un lípido ionizable (DLin-MC3-DMA (MC3) o 1,2-Dioleoil-3-Dimetilamonio-Propano (DODAP)) disueltos en agua MilliQ. Por otro lado, para cada tipo de partículas se preparó una fase oleosa, compuesta por Precirol® ATO5 disuelto en el solvente orgánico diclorometano. En la tabla 1 se recoge la composición de los diferentes tipos de SLN preparadas.

Una vez disueltas ambas fases, la fase acuosa se añadió sobre la oleosa y se emulsionó mediante sonicación por 30 segundos (Branson Sonifier 250, Output control 4; Duty cycle constant). Pasado ese tiempo, se evaporó el diclorometano mediante agitación magnética durante 1 hora y se puso la mezcla al vacío durante 45 minutos más. Finalmente, se lavaron con filtros Amicon® Ultra.

Tabla 1: Composición de las SLNs.

| | % Tween 80 | % DOTAP | % DODAP | % MC3 | Precirol ATO 5 |
|-------|------------|---------|---------|-------|----------------|
| SLN 1 | 0,2 | 0,3 | 0 | 0 | 1 |
| SLN 2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0 | 1 |
| SLN 3 | 0,1 | 0,2 | 0 | 0,2 | 1 |

3.1.3. Diseño y elaboración de los vectores

Para la elaboración de los vectores se utilizó el plásmido pcDNA3-EGFP que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), una solución de protamina, nanopartículas de oro de 5 nm y diferentes polisacáridos: dextrano (DX) y ácido hialurónico (AH).

Se prepararon diferentes tipos de vectores para cada tipo de SLN con una proporción de DX:Protamina:ADN:SLN (1:2:1:5) y AH:Protamina:ADN:SLN (0.5:2:1:5) siguiendo los siguientes esquemas, dependiendo de si se incluían NP-Au a la formulación o no (figura 2):

- Se adiciona protamina al ADN para su condensación y posteriormente se añade el polisacárido. Finalmente se incluye la solución de SLNs obteniendo así el vector.

- b) En este caso el procedimiento de preparación fue el mismo que en el caso anterior pero previamente se incubaron nanopartículas de oro con el ADN formando así un complejo ADN-AU.
- c) En estos últimos vectores fueron las SLNs las que se incubaron previamente con nanopartículas de oro, obteniendo en este caso un complejo SLN-AU.

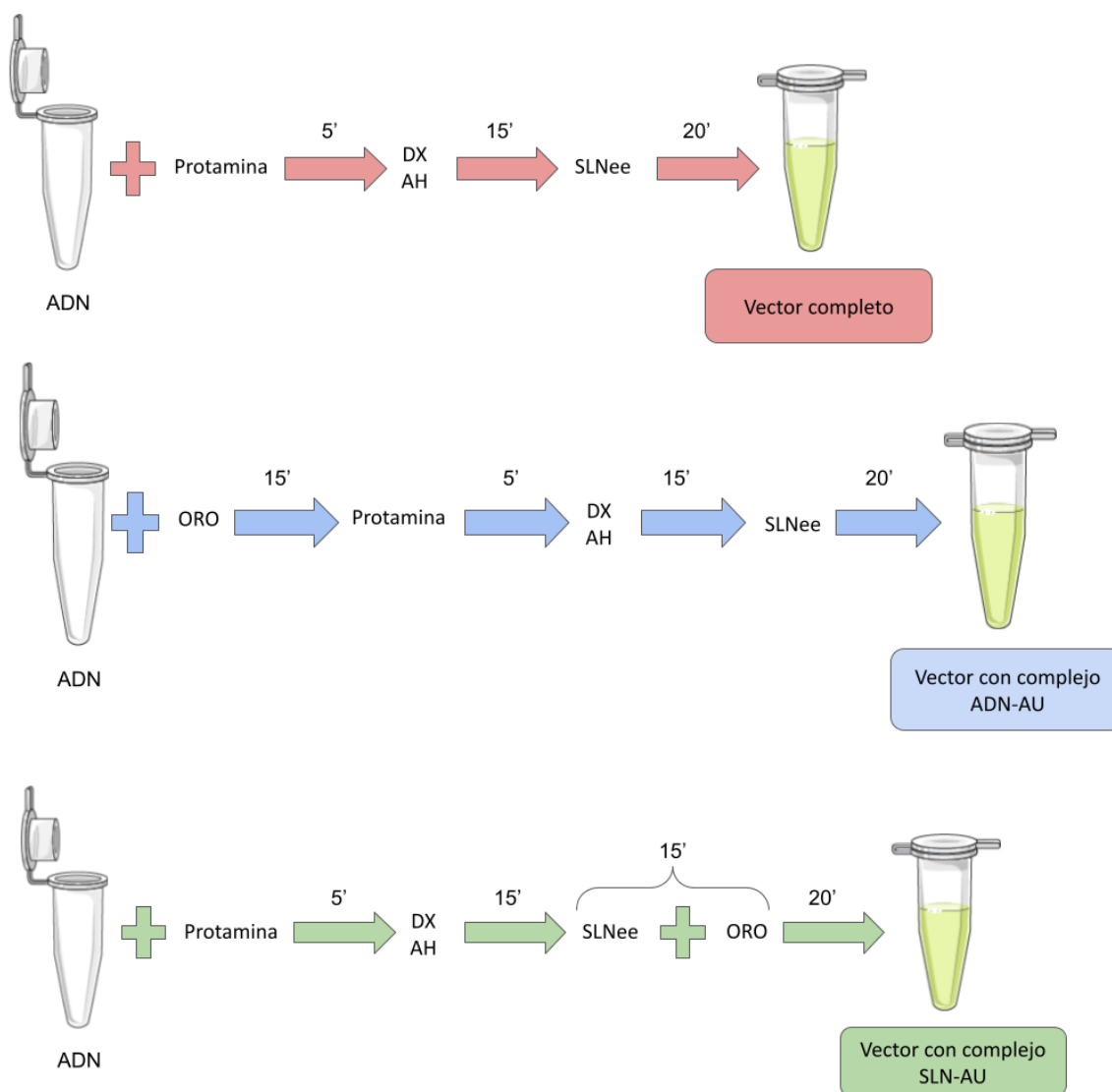


Figura 3: Esquema de la preparación de los vectores: A) En rojo, vector sin oro; B) En azul, vector con complejo ADN-AU; C) En verde, vector con un complejo SLN-AU. DX: dextrano; AH: Ácido hialurónico; SLN: nanopartículas sólidas lipídicas.

En la tabla 2 se recogen los diferentes vectores preparados y su composición.

Tabla 2: Vectores preparados y su composición.

| Vector | Tipo de SLN | Polisacárido | Oro |
|--------|-------------|-------------------|--------|
| 1 | DOTAP | Dextrano | No |
| 2 | DOTAP/DODAP | Dextrano | No |
| 3 | DOTAP/MC3 | Dextrano | No |
| 4 | DOTAP | Dextrano | SLN-AU |
| 5 | DOTAP/DODAP | Dextrano | SLN-AU |
| 6 | DOTAP/MC3 | Dextrano | SLN-AU |
| 7 | DOTAP | Dextrano | ADN-AU |
| 8 | DOTAP/DODAP | Dextrano | ADN-AU |
| 9 | DOTAP/MC3 | Dextrano | ADN-AU |
| 10 | DOTAP | Ácido hialurónico | No |
| 11 | DOTAP/DODAP | Ácido hialurónico | No |
| 12 | DOTAP/MC3 | Ácido hialurónico | No |
| 13 | DOTAP | Ácido hialurónico | SLN-AU |
| 14 | DOTAP/DODAP | Ácido hialurónico | SLN-AU |
| 15 | DOTAP/MC3 | Ácido hialurónico | SLN-AU |
| 16 | DOTAP | Ácido hialurónico | ADN-AU |
| 17 | DOTAP/DODAP | Ácido hialurónico | ADN-AU |
| 18 | DOTAP/MC3 | Ácido hialurónico | ADN-AU |

3.1.4. Tamaño, índice de polidispersión y carga superficial

Para caracterizar las SLN y los vectores, se utilizó un Zetasizer Nano serie-Nano ZS. Este dispositivo mide el índice de polidispersión y el tamaño midiendo el movimiento browniano a través

de un análisis de dispersión dinámica de la luz. Por otro lado, el potencial Zeta se obtiene mediante velocimetría de láser Doppler. De esta manera en los resultados aparecen el tamaño de la partícula o Z average, la carga superficial o potencial Z y el índice de polidispersión (PDI). Este último es la medida de la distribución de los tamaños presentes en la muestra (12), en este caso se consideró un tamaño homogéneo cuando el valor del PDI fue menor de 0,4.

Para llevar a cabo las mediciones de las partículas y de los vectores, se tomó una muestra y se diluyó (1:10) en agua Milli-Q®. Posteriormente, se inyectó por medio de una jeringa en una celda de inmersión y se introdujo en el Zetasizer para su medición.

3.1.5. Gel de electroforesis

Para estudiar la capacidad de las formulaciones para unir, proteger y liberar el material genético se utilizó el proceso de electroforesis en gel de agarosa (30 minutos a 120V). Para ello, se elaboraron geles al 0,7% de agarosa junto con el reactivo Gel Red®, el cual sirve para teñir el material genético y poder visualizar las bandas resultantes del proceso en un transiluminador (Uvitec Uvidoc D55-LCD-20M auto).

Para llevar a cabo el estudio de protección de los vectores se añadió DNasa I (1 U.I DNasa I/ 2.5 µg DNA), una enzima que desnatura el material genético, y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se añadió dodecilsulfatosódico (SDS), un tensioactivo aniónico que induce la liberación del material genético de las SLNs. Por otro lado, para el estudio de liberación del material genético se añadió a las formulaciones SDS. En el gel, además de las formulaciones a estudiar, se incluyeron un marcador de peso molecular, ADN libre, ADN libre tratado con DNasa I y ADN tratado con SDS como controles.

3.1.6. Cultivo celular

En los ensayos se utilizaron células HEK-293, cuya línea celular proviene de células de riñón de embrión humano. Estas, se incubaron a 37°C y 5% CO₂ en Eagle's Minimal Essential Medium suplementado con un 10% de suero fetal bovino y 5 mL de penicilina/estreptomicina (100 U/mL:100µg/mL). Cada 2 o 3 días, en función de la confluencia celular, se renovó el medio de cultivo, y una vez por semana se realizó un pase de un frasco a dos.

3.1.7. Transfección y viabilidad celular

Los estudios de transfección de los vectores se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos con una densidad celular de 150.000 células por pocillo. Para ello se añadieron los vectores al cultivo celular, en una dosis de 2,5 µg de ADN por pocillo. Pasadas 4 horas, se retiró el medio con los vectores y se añadió medio de cultivo nuevo.

La eficacia de transfección se evaluó cualitativamente mediante microscopía de fluorescencia (Leica DM IL LED Fluo inverted microscope) 24 y 48 horas después de la transfección, y cuantitativamente, mediante citometría de flujo a las 48 horas en el equipo CytoFLEX (Beckman Coulter). Las células se recuperaron con tripsina y se centrifugaron (1000 rpm, 5 minutos). Posteriormente se desechó el sobrenadante, se resuspendieron en PBS y se llevaron al citómetro de flujo. Se analizaron 10.000 eventos por cada muestra utilizando el canal FITC.

Por otro lado, en las mismas muestras se estudió la viabilidad celular, para lo que se añadió 7-aminoactinomicina D (7-AAD) a las células resuspendidas en PBS antes de introducir las en el citómetro de flujo. Esta sustancia es un colorante de viabilidad celular que se intercala entre las bases del ADN y permite discriminar entre células viables de las no viables mediante citometría de flujo.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Caracterización de nanopartículas sólidas lipídicas (SLNs)

Los resultados del tamaño, índice de polidispersión y carga superficial de los tres tipos de SLN se recogen en la Tabla 3. Las SLN presentaron tamaño nanométrico (211-236 nm) con índices de polidispersión por debajo de 0,35 en los tres casos. En cuanto a la carga superficial, fue catiónica en todos los casos; las SLN preparadas solo con DOTAP, o con la mezcla DOTAP/DODAP presentaron valores similares, +53 mV y +51 mV respectivamente, mientras que las que contenían MC3 en lugar de DODAP presentaron un valor más elevado de +61 mV.

Tabla 3: Tamaño, índice de polidispersión (Pdl) y carga superficial de las SLN.

| SLN | Z-Average (d.nm) | Pdl | Zeta Potential (mV) |
|-------------|------------------|-------------|---------------------|
| DOTAP | 211.2 ± 4.1 | 0.27 ± 0.01 | 53.2 ± 1.9 |
| DOTAP/DODAP | 236.1 ± 2.8 | 0.35 ± 0.03 | 51.2 ± 1.0 |
| DOTAP/MC3 | 230.0 ± 1.4 | 0.30 ± 0.01 | 60.7 ± 1.1 |

Las características físico-químicas de las SLN están condicionadas por su composición. Para la formulación de estas SLN se utilizó el lípido sólido Precirol® ATO 5, que forma el núcleo lipídico de la nanopartícula. En la composición de las SLN se incluye también el tensioactivo Tween 80, que presenta en su estructura cadenas de polietilenglicol que reducen la agregación de las nanopartículas disminuyendo su toxicidad, por ello es uno de los tensioactivos más utilizados en la industria farmacéutica. A su vez se emplearon el lípido catiónico DOTAP y los lípidos ionizables, DODAP o MC3 (figura 4).

El DOTAP presenta una naturaleza catiónica debido a la presencia de un amonio cuaternario en su estructura. A su vez, al igual que el Tween 80, posee cierta capacidad tensioactiva que favorece la estabilidad de emulsiones a partir de las cuales se obtienen las SLN. En estudios anteriores, se ha demostrado que las SLNs que contenían un 0,4% de DOTAP en su formulación han sido capaces de transfectar diferentes tipos de líneas celulares (13), (14). En este trabajo se ha reducido la concentración de este lípido con el objetivo de reducir en cierta medida la carga superficial de los vectores y estudiar su eficacia de transfección.

Como hemos comentado, este lípido presenta una naturaleza catiónica, lo cual aporta una carga positiva a la superficie de las SLN, mediante la cual es capaz de interactuar con los ácidos nucleicos y las membranas celulares (15). Sin embargo, esta misma carga puede dar lugar a efectos no deseados como la unión inespecífica a componentes celulares cargados negativamente (16) y el daño en el hígado de los ratones estudiados (17). Es por ello que hoy en día tal y como se ha comentado en la introducción, se están estudiando lípidos ionizables que por su estructura aumentan su biocompatibilidad y a la vez favorecen el escape endosomal. En este trabajo se han preparado SLN con los lípidos ionizables DODAP o MC3.

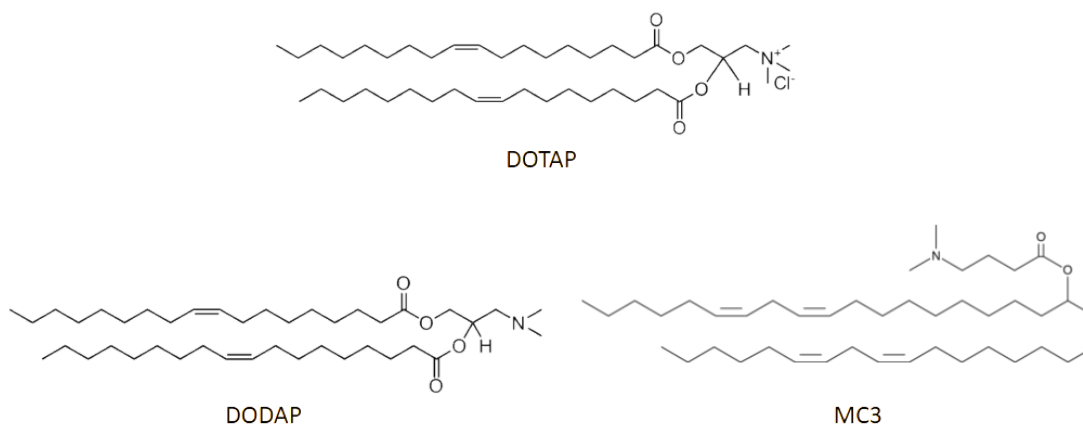


Figura 4: Estructura de los lípidos. Imágenes adaptadas de (18), (19) y (20).

Una de las ventajas de las SLN es su estabilidad a lo largo del tiempo. De hecho, la caracterización físico-química de las SLN tras su conservación durante un mes en nevera (4°C) (tabla 4) muestra que tanto los tamaños como las cargas superficiales se mantuvieron sin grandes cambios durante ese tiempo.

Tabla 4: Tamaño, carga superficial y PDI de las SLN tras un mes en nevera.

| SLN | Z-Average (d.nm) | Pdi | Zeta Potential (mV) |
|-------------|------------------|-------------|---------------------|
| DOTAP | 198.1 ± 3.2 | 0.27 ± 0.02 | 59.2 ± 2.4 |
| DOTAP/DODAP | 240.4 ± 5.4 | 0.39 ± 0.02 | 55.4 ± 2.3 |
| DOTAP/MC3 | 179.8 ± 2.2 | 0.25 ± 0.01 | 60.5 ± 2.3 |

3.2.2. Caracterización de los vectores

3.2.2.1. Tamaño, PDI y carga superficial

Otra característica interesante de los vectores basados en SLN es su versatilidad para ser formulados dependiendo del tipo de material genético que se quiere administrar o de la célula diana. Esto se consigue gracias a que se pueden incorporar a estos sistemas varios componentes para optimizar su capacidad de transfección. En este trabajo, el ADN se unió inicialmente a la protamina, que es un péptido de naturaleza catiónica rico en arginina, capaz de condensar el material genético contribuyendo a su protección ante la acción de las DNAsas y facilitando su transporte y entrada al núcleo (21). Posteriormente, se le adicionó un polisacárido, DX o AH, que pueden influir en el

mecanismo de entrada a la célula y en la disposición intracelular del material genético. Finalmente, se añadieron estos complejos a las SLN.

Por otro lado, también se incorporó a los vectores NP-Au. De esta manera se estudió si su interacción directamente con el ADN o con las SLN influía en las características físico-químicas y eficacia de las formulaciones.

En la tabla 5 quedan recogidos los tamaños, Pdl y carga superficial de los vectores preparados con DX. Como se puede apreciar, el tamaño de los vectores osciló entre entre 155 y 240 nm, considerándose un tamaño adecuado para la internalización celular. Por otro lado, el Pdl fue inferior a 0,4 en todas las formulaciones, indicando que presentan una distribución homogénea del tamaño. Los vectores con los tamaños más pequeños se obtuvieron con las SLN DOTAP/MC3; estos mostraron tamaños entre 151 y 169 nm, siendo menores aquellos formulados con SLN-Au. El tamaño de estos vectores se ha visto reducido con respecto a las SLN de partida a pesar de incluir más componentes en el producto final. Esto se pudo apreciar también en estudios previos (21), en los cuales los vectores presentaban una reducción o mantenimiento del tamaño con respecto a las SLN de partida. Esto, puede deberse a la condensación que ejercen el resto de compuestos sobre el ADN y su posterior disposición sobre la superficie de las SLN.

En cuanto a la carga superficial, en todos los casos se observó una disminución respecto a la de las correspondientes SLN. Esto es debido a que el complejo Prot-ADN-DX (con o sin NP-Au) se une a la superficie de las SLN mediante interacciones electrostáticas. No obstante, todos los valores son positivos, lo cual resulta un aspecto favorable para la transfección, ya que favorece la interacción con las cargas negativas de la membrana celular y la internalización de los vectores.

Tabla 5: Tamaño, carga superficial y PDI de los vectores preparados con dextrano

| | Composición | Z-Average (d.nm) | Pdi | Zeta Potential (mV) |
|----------|---------------------|-------------------------|-------------|----------------------------|
| Vector 1 | DOTAP sin oro | 205.4 ± 3.7 | 0.37 ± 0.02 | 38.9 ± 1.1 |
| Vector 2 | DOTAP/DODAP sin oro | 181.3 ± 5.2 | 0.39 ± 0.07 | 35.0 ± 0.4 |
| Vector 3 | DOTAP/MC3 sin oro | 169.2 ± 6.1 | 0.37 ± 0.03 | 38.5 ± 2.4 |
| Vector 4 | DOTAP SLN-AU | 216.1 ± 4.2 | 0.40 ± 0.02 | 37.2 ± 0.8 |
| Vector 5 | DOTAP/DODAP SLN-AU | 170.9 ± 13.3 | 0.35 ± 0.03 | 33.9 ± 0.9 |
| Vector 6 | DOTAP/MC3 SLN-AU | 151.3 ± 4.0 | 0.34 ± 0.03 | 38.1 ± 1.0 |
| Vector 7 | DOTAP ADN-AU | 199.3 ± 4.1 | 0.30 ± 0.02 | 37.7 ± 0.8 |
| Vector 8 | DOTAP/DODAP ADN-AU | 239.1 ± 7.3 | 0.31 ± 0.03 | 35.3 ± 0.5 |
| Vector 9 | DOTAP/MC3 ADN-AU | 155.2 ± 2.7 | 0.44 ± 0.02 | 38.1 ± 0.8 |

La tabla 6 recoge los tamaños, PDI y carga superficial de los vectores preparados con AH. Al igual que en el caso anterior, la distribución de los tamaños de los vectores también fue homogénea (PDI < 0,5). Además, los tamaños de todos los vectores fueron similares entre sí (191-246 nm), destacando que los vectores con ADN-Au presentaron un tamaño menor al obtenido con la misma composición sin oro. De nuevo, la carga superficial se vio reducida en comparación a las SLN de partida, debido a la incorporación de los complejos a su superficie.

Tabla 6: Tamaño, carga superficial y PDI de los vectores preparados con ácido hialurónico

| | Composición | Z-Average (d.nm) | Pdl | Zeta Potential (mV) |
|-----------|---------------------|-------------------------|-------------|----------------------------|
| Vector 10 | DOTAP sin oro | 202.3 ± 1.8 | 0.21 ± 0.0 | 37.3 ± 1.2 |
| Vector 11 | DOTAP/DODAP sin oro | 232.9 ± 3.4 | 0.34 ± 0.03 | 30.5 ± 1.1 |
| Vector 12 | DOTAP/MC3 sin oro | 246.5 ± 4.5 | 0.27 ± 0.01 | 39.8 ± 0.6 |
| Vector 13 | DOTAP SLN-AU | 237.5 ± 3.6 | 0.26 ± 0.02 | 34.1 ± 0.6 |
| Vector 14 | DOTAP/DODAP SLN-AU | 205.0 ± 5.9 | 0.24 ± 0.01 | 34.0 ± 1.9 |
| Vector 15 | DOTAP/MC3 SLN-AU | 222.1 ± 5.4 | 0.34 ± 0.04 | 30.2 ± 1.0 |
| Vector 16 | DOTAP ADN-AU | 191.4 ± 7.3 | 0.26 ± 0.03 | 27.3 ± 0.8 |
| Vector 17 | DOTAP/DODAP ADN-AU | 216.4 ± 1.5 | 0.35 ± 0.02 | 34.1 ± 0.5 |
| Vector 18 | DOTAP/MC3 ADN-AU | 213.6 ± 5.3 | 0.45 ± 0.02 | 28.6 ± 0.5 |

3.2.2.2. Geles de electroforesis

Para desarrollar un sistema de administración eficaz para terapia génica es importante que exista un equilibrio entre la capacidad de unión y protección del material genético y su liberación una vez que se accede al interior de la célula. Por ello, se evaluó la capacidad de unión, protección frente a DNasa I y liberación del ADN de los vectores que contenían SLN DOTAP/MC3 con DX y AH, incluyendo como control la formulación con DOTAP. Las formulaciones preparadas con las SLN DOTAP/DODAP ya habían sido evaluadas en estudios previos, y han demostrado ser capaces de unir, proteger y liberar el ADN (22).

En la figura 5 se recogen los resultados de los vectores que contenían SLN DOTAP/MC3 con DX. El carril número 1 se corresponde con el marcador de peso molecular, utilizado como control. Por otro lado, como control para el estudio de liberación, se añadió en el carril 3 el plásmido junto con SDS.

El ensayo de unión se llevó a cabo en los carriles 4-7. La presencia de una banda marcada en la zona superior o zona de depósito, indica que el material genético se encuentra unido a los vectores, siendo incapaz de migrar a través del gel. Por lo tanto, todas las formulaciones fueron

capaces de unir el ADN. La banda de la formulación del carril 7 (SLN DOTAP/MC3 SLN-AU), se encuentra menos marcada, lo que puede significar que el ADN está más condensado y por lo tanto menos disponible para interaccionar con el Gel Red[®].

En el estudio de la protección frente a DNasa I (carriles 8-12), se incluyó un control de ADN libre (ADN + DNasa I + SDS) presente en el carril 8. Este, al entrar en contacto con la DNasa I se degrada dando lugar a fragmentos de menor peso molecular. Como consecuencia, esos fragmentos son capaces de migrar mayor distancia, observándose una banda difusa en la parte inferior del gel. El ADN incluido en las formulaciones no presenta esta banda, y la que se aprecia corresponde con la banda de ADN libre sin tratar, implicando que el material genético no ha sido degradado. Sin embargo, las formulaciones 10-12 presentan, a diferencia del carril 3, una banda superior adicional, lo que indica que el material genético ha podido sufrir un cambio conformacional por efecto de la DNasa I. La DNasa I ha transformado parte de la forma con más capacidad de transfección del ADN (forma superenrollada, banda inferior), a la forma abierta circular (banda superior) mediante un corte a una de las dos cadenas del ADN (23).

Por último, en los carriles 13-16, correspondientes con el estudio de liberación, las formulaciones presentan unas bandas intensas a la altura de la banda del control de ADN libre, indicando así que el material genético ha sido liberado.



Figura 5: Gel de electroforesis de las formulaciones de SLN DOTAP/MC3 con dextrano: 1) Marcador de peso molecular; 2) 3 GFP; 3) 3 GFP + SDS; 4) Control DOTAP; 5) Vector 3 (SLN DOTAP/MC3 sin oro); 6) Vector 9 (SLN DOTAP/MC3 ADN-AU); 7) Vector 6 (SLN DOTAP/MC3 SLN-AU); 8) 3 GFP + DNasa + SDS; 9) Control DOTAP + DNasa + SDS; 10) Vector 3 + DNasa + SDS; 11) Vector 9 + DNasa + SDS; 12) Vector 6 + DNasa + SDS; 13) Control DOTAP + SDS; 14) Vector 3 + SDS; 15) Vector 9 + SDS; 16) Vector 6 + SDS

En la figura 6 se recogen el gel correspondiente a las formulaciones preparadas con AH, presentando los mismos carriles controles que en el caso anterior. En esta ocasión, en el ensayo de unión, las formulaciones también fueron capaces de unir el material genético (carriles 4-7).

Por otro lado, en el ensayo de protección se puede apreciar que las formulaciones preparadas con SLNs DOTAP/MC3 (carriles 10-12) protegieron en mayor medida al material genético de la acción de la Dnasa I que la formulación que contenía SLNs DOTAP (carril 9), ya que la banda correspondiente al ADN no se encuentra tan marcada en comparación con el resto. Al contrario de lo que ocurría en el caso anterior, este ensayo solo presenta una banda, indicativo de que el material genético no ha sufrido un cambio de conformación y las formulaciones compuestas por SLN DOTAP/MC3 junto con el polisacárido HA aportan una mayor protección que aquellas formulaciones que contienen DX como polisacárido. Por último, como se observa en los carriles 13-16, las

formulaciones fueron capaces de liberar el material genético ya que las bandas presentes coinciden con el control de ADN libre (carril 2).

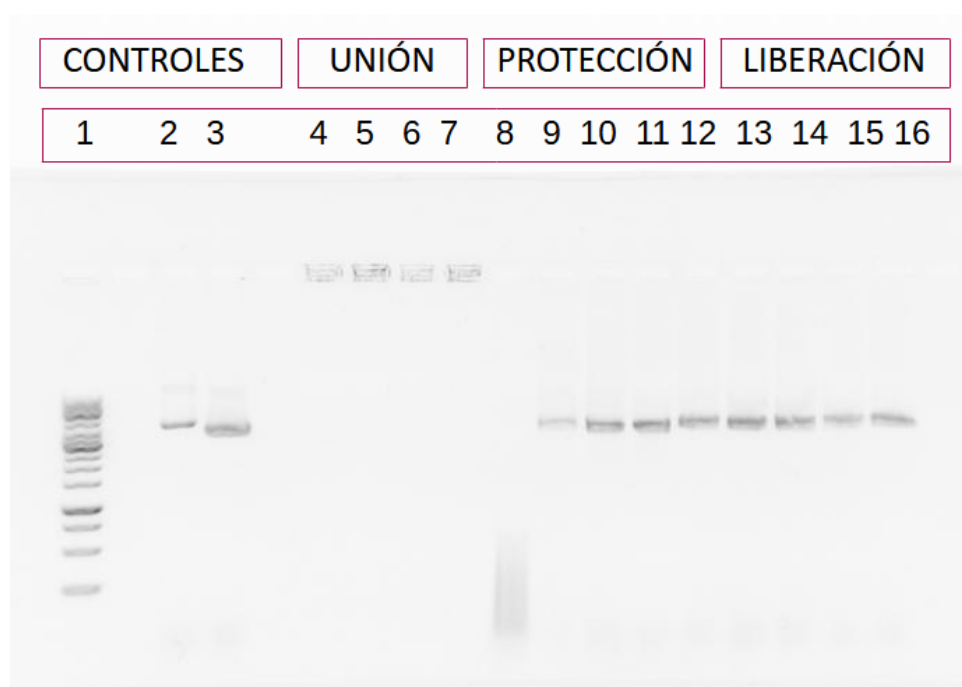


Figura 6: Gel de electroforesis de las formulaciones de SLN DOTAP/MC3 con ácido hialurónico: 1) Marcador de peso molecular; 2) 3 GFP; 3) 3 GFP + SDS; 4) Control DOTAP; 5) Vector 12 (SLN DOTAP/MC3 sin oro); 6) Vector 18 (SLN DOTAP/MC3 ADN-AU); 7) Vector 15 (SLN DOTAP/MC3 SLN-AU); 8) 3 GFP + DNasa + SDS; 9) Control DOTAP + DNasa + SDS; 10) Vector 12 + DNasa + SDS; 11) Vector 18 + DNasa + SDS; 12) Vector 15 + DNasa + SDS; 13) Control DOTAP + SDS; 14) Vector 12 + SDS; 15) Vector 18 + SDS; 16) Vector 15 + SDS

3.2.3. Eficacia de transfección y viabilidad celular

En la figura 7, se presentan los resultados de los vectores preparados con DX. Como se puede apreciar, los vectores con SLN DOTAP y SLN DOTAP/DODAP dieron lugar a un 4% o menos de eficacia de transfección, mientras que los vectores con SLN DOTAP/MC3 dieron lugar a eficacias de entre un 45% y 56%. La baja eficacia de transfección obtenida con vectores con DX también fue observada en estudios previos realizados en células HEK-293 (21), condicionado por el mecanismo de entrada de estos vectores en las células. En el caso de las células HEK-293, la endocitosis mediada por caveolas es cuantitativamente mucho más activa que la endocitosis mediada por clatrin (21). Lo que implica una mayor contribución en la captación de complejos por parte de las caveolas. Este tipo de endocitosis tiene la capacidad de evitar la unión a lisosomas, pero esta actividad lisosomal parece ser necesaria para ayudar en la descondensación y liberación del material genético de las SLN. Por ello,

cuando los vectores contienen MC3, es el propio mecanismo de este lípido el que desestabiliza la membrana lisosomal y a la vez libera el ADN favoreciendo la transfección. Sin embargo, en el caso del DODAP, pese a también ser un lípido ionizable, la eficiencia de liberación del material genético no resulta suficiente.

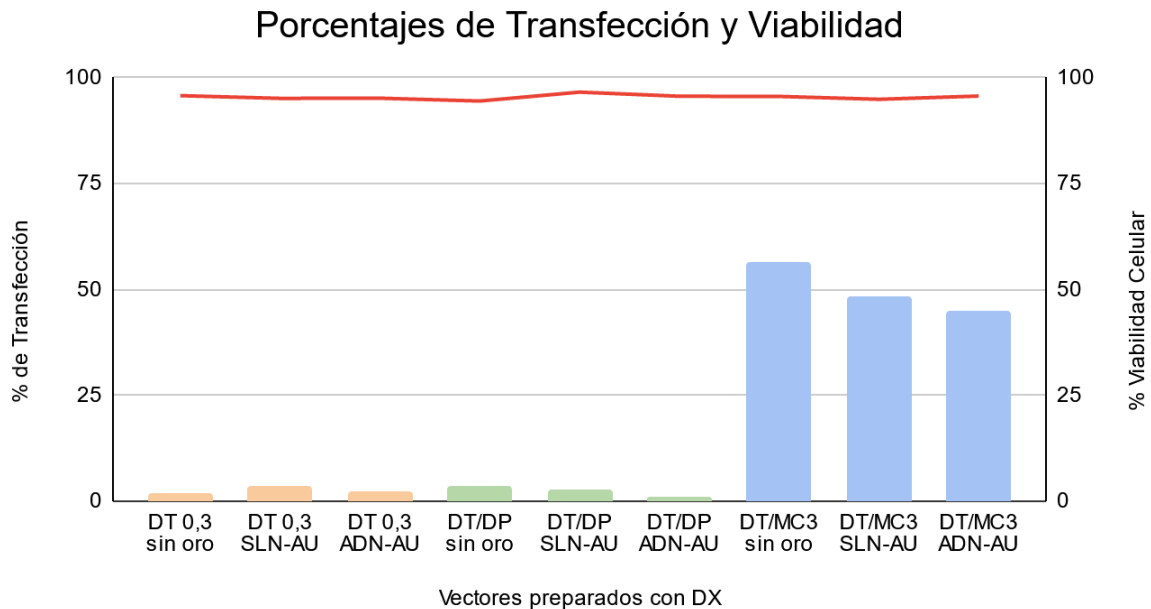


Figura 7: Porcentaje de transfección celular (barras) y viabilidad celular (línea roja) obtenidos en células HEK-293 con las formulaciones que presentaban dextrano.

Finalmente, en la figura 8, se recogen los resultados de los vectores preparados con AH. En este caso los valores de transfección de los vectores de DOTAP/MC3 se encuentran entre el 52% y 69%, mientras que los vectores de DOTAP y DOTAP/DODAP se encuentran entre un 5% y 6%. La eficacia de transfección con estos últimos vectores es algo más elevada que en el caso anterior porque el propio AH ayuda a descondensar y liberar el material genético en ausencia de las enzimas lisosomales (24). En cualquier caso, la eficacia más alta se encuentra de nuevo en los vectores que contienen SLN DOTAP/MC3. La formulación con la mayor eficacia de transfección (69%) se trata de aquella que lleva oro unido a las SLNs, y como hemos comentado anteriormente también fue eficaz a la hora de proteger el ADN, por lo que puede ser una buena candidata para futuros estudios in vivo.

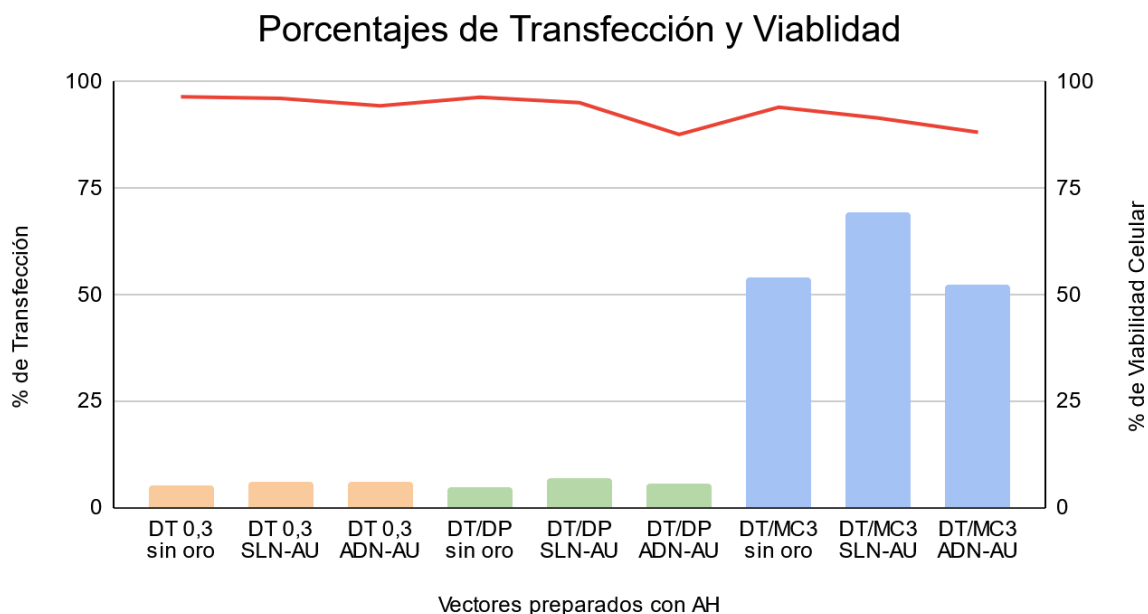


Figura 8: Porcentaje de transfección celular (barras) y viabilidad celular (línea roja) obtenidos en células HEK-293 s con las formulaciones que presentaban ácido hialurónico.

La eficacia de las formulaciones más eficaces, aquellas preparadas con SLN DOTAP/MC3 se evaluó también cualitativamente mediante microscopía de fluorescencia a las 24 y 48 horas (figura 9 y figura 10). La GFP se detectó a partir de las 24h, siendo su expresión mucho mayor a las 48h. Se observó una mayor fluorescencia en aquellas formulaciones que contenían AH (figura 10), correlacionándose así con los resultados obtenidos por citometría.

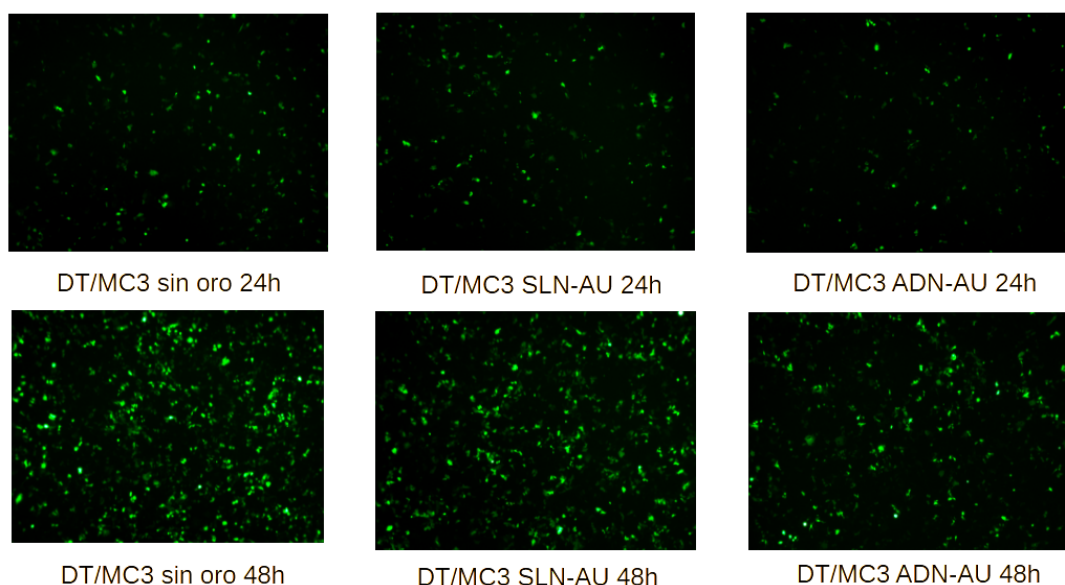


Figura 9: Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia en cultivos de células HEK-293 a las 24 y 48 horas tras la transfección con los vectores con SLN DOTAP/MC3 y dextrano.

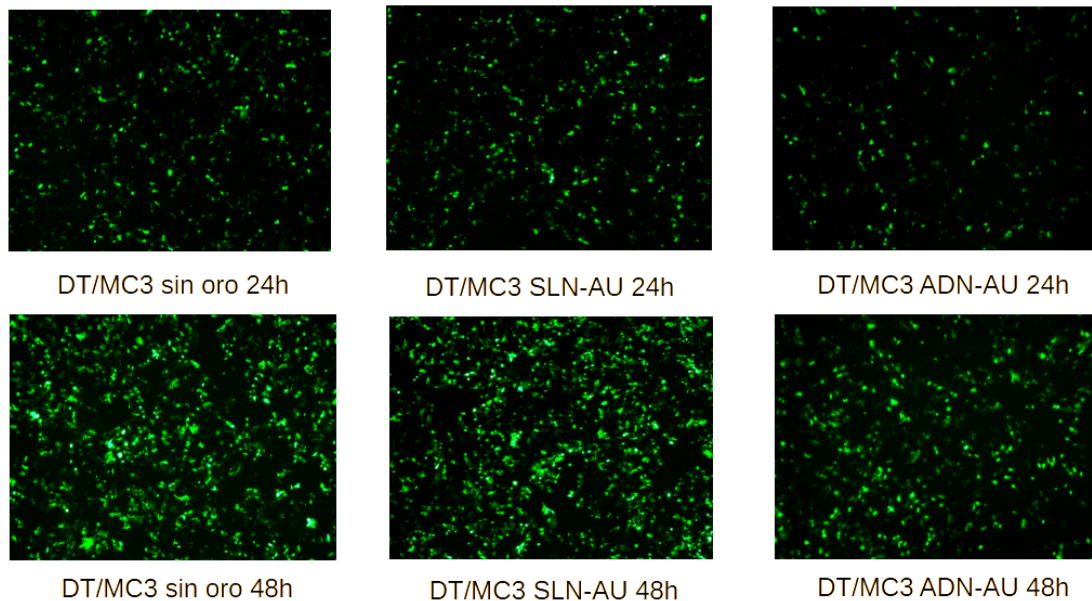


Figura 10: Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia en cultivos de células HEK-293 a las 24 y 48 horas tras la transfección con los vectores con SLN DOTAP/MC3 y ácido hialurónico.

Finalmente, como se observa también en las figuras 6 y 7, la viabilidad celular en todos los casos fue superior al 85%.

4. CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que la incorporación del lípido catiónico DLin-MC3-DMA a las SLN mejora su eficacia de transfección, obteniendo porcentajes de transfección superiores al 50%. La mejora en la transfección se relaciona con el papel de este lípido en el escape endosomal y liberación del material genético de los sistemas de administración, aunque son necesarios estudios adicionales para conocer el comportamiento intracelular de las nuevas SLN. La eficacia de transfección también depende de otros componentes de las formulaciones como el tipo de polisacárido o la presencia de compuestos inorgánicos como las NP-Au. Los mejores resultados se obtuvieron con las formulaciones que presentaban oro unido a las SLN DOTAP/MC3, y que además contenían como polisacárido ácido hialurónico. Además, estos vectores no comprometieron la viabilidad celular, demostrando así su potencial como sistemas de administración de ADN con aplicaciones terapéuticas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products [Internet]. Europa.eu. [citado el 18 de abril de 2023]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf
- (2) del Pozo Rodríguez A, Rodríguez Gascón A, Solinis Aspiazu MA. Concepto de terapia génica. En: Benito Jimenez C, coordinador. Terapia génica. Vallehermoso: Editorial síntesis; 2018. p. 15-27.
- (3) Teng M, Yao Y, Nair V, Luo J. Latest advances of virology research using CRISPR/Cas9-based gene-editing technology and its application to vaccine development. Viruses [Internet]. 2021 [citado el 1 de mayo de 2023];13(5):779. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/5/779>
- (4) Rodríguez Gascón A, Solinís Á, Pozo Rodríguez AD. Solid lipid nanoparticles for gene therapy [Internet]. Analesranf.com. [citado el 18 de abril de 2023]. Disponible en: https://analesranf.com/wp-content/uploads/2016/82_04/8204_03.pdf
- (5) F. L, A. D. Extracellular and Intracellular Barriers to Non-Viral Gene Transfer [Internet]. Novel Gene Therapy Approaches. InTech; 2013. [citado el 1 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/54699>
- (6) del Pozo Rodríguez A, Rodríguez Gascón A, Solinis Aspiazu MA. Sistemas de administración en terapia génica: sistemas no virales. En: Benito Jimenez C, coordinador. Terapia génica. Vallehermoso: Editorial síntesis; 2018. p. 107-126.
- (7) Butt MH, Zaman M, Ahmad A, Khan R, Mallhi TH, Hasan MM, et al. Appraisal for the potential of viral and nonviral vectors in gene therapy: A review. Genes (Basel) [Internet]. 2022 [citado el 18 de abril de 2023];13(8):1370. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4425/13/8/1370>
- (8) Koo KM, Sina AAI, Carrascosa LG, Shiddiky MJA, Trau M. DNA–bare gold affinity interactions: mechanism and applications in biosensing. Anal Methods [Internet]. 2015 [citado el 18 de abril de 2023];7(17):7042–54. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/AY/C5AY01479D>
- (9) López-Valverde JA, Jiménez-Ortega E, Leal A. Clinical feasibility study of gold nanoparticles as theragnostic agents for precision radiotherapy. Biomedicines [Internet]. 2022;10(5):1214. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10051214>
- (10) Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Beraza-Millor M, Rodríguez-Gascón A, Del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ. mRNA delivery technologies: Toward clinical translation.

- Aranda F, Berraondo P, Galluzzi L, editores. *Int Rev Cell Mol Biol* [Internet]. 2022;372:207–93. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644822000557>
- (11) Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, Del Pozo-Rodríguez A. Nanomedicines to deliver mRNA: State of the art and future perspectives. *Nanomaterials* (Basel) [Internet]. 2020 [citado el 30 de mayo de 2023];10(2):364. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/2/364>
- (12) Martha SH, Carlos BD. EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN Y CAPACIDAD DE CARGA DE ANTOCIANINAS DE *Vaccinium floribundum* Kunt EN NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA. *infoANALÍTICA* [Internet]. [citado el 1 de mayo de 2023];8(1):83–97. Disponible en: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/157/1571051002/html/>
- (13) Ruiz de Garibay AP, Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Shen JS, Rodríguez-Gascón A. Solid lipid nanoparticles as non-viral vectors for gene transfection in a cell model of Fabry disease. *J Biomed Nanotechnol* [Internet]. [citado 30 de mayo de 2023]; 2015;11(3):500–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2015.1968>
- (14) Vicente-Pascual M, Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Rodríguez-Gascón A, Muntoni E, Battaglia L, et al. Topical administration of SLN-based gene therapy for the treatment of corneal inflammation by DE Novo IL-10 production. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 [citado el 30 de mayo de 2023];12(6):584. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12060584>
- (15) Mihalescu M, Worcester DL, Carroll CL, Chamberlin AR, White SH. DOTAP: Structure, hydration, and the counterion effect. *Biophys J* [Internet]. [citado 28 de mayo de 2023]; 2023;122(6):1086–93. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349523000474>
- (16) Ibba ML, Ciccone G, Esposito CL, Catuogno S, Giangrande PH. Advances in mRNA non-viral delivery approaches. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. [citado 28 de mayo de 2023]; 2021;177(113930):113930. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X21003239>
- (17) Ma Z, Li J, He F, Wilson A, Pitt B, Li S. Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. [citado 28 de mayo de 2023]; 2005;330(3):755–9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X05005371>
- (18) 18:1 tap (dotap) [Internet]. *Avanti Polar Lipids* (en-US). [citado el 1 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://avantilipids.com/product/890890>

- (19) 18:1 DAP [Internet]. Avanti Polar Lipids (en-US). [citado el 1 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://avantilipids.com/product/890850>
- (20) DLin-MC3-DMA (CAS 1224606-06-7) [Internet]. Caymanchem.com. [citado el 1 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.caymanchem.com/product/34364/dlin-mc3-dma>
- (21) Delgado D, Gascón AR, Del Pozo-Rodríguez A, Echevarría E, Ruiz de Garibay AP, Rodríguez JM, et al. Dextran-protamine-solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: in vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice. *Int J Pharm* [Internet]. 2012;425(1–2):35–43. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311011823>
- (22) Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, Rodríguez-Gascón A, Pozo-Rodríguez AD, Solinís Aspiazu MÁ. Nucleic acid delivery by solid lipid nanoparticles containing switchable lipids: Plasmid DNA vs. Messenger RNA. *Molecules* [Internet]. 2020 [citado el 30 de mayo de 2023];25(24):5995. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/24/5995>
- (23) del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Solid lipid nanoparticles: formulation factors affecting cell transfection capacity. *Int J Pharm* [Internet]. [citado el 28 de mayo de 2023];2007;339(1–2):261–8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517307002359>
- (24) Apaolaza PS, Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Gascón AR, Solinís MÁ. A novel gene therapy vector based on hyaluronic acid and solid lipid nanoparticles for ocular diseases. *Int J Pharm* [Internet]. [citado el 28 de mayo de 2023];2014;465(1–2):413–26. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517314001318>