



ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Una disección a los Sistemas No-Virales de Liberación de Ácidos Nucleicos

### *A Dissection of the Non-viral nucleic acids Delivery Systems*

Felipe A. Escalona Rodríguez<sup>1</sup>, Yoelys Cruz-Leal<sup>2</sup>, Ada Laura Rivero<sup>1</sup>, Isbel Lopetegui-González<sup>1</sup>, Ángel Manso-Vargas<sup>3</sup>, Carlos M. Álvarez<sup>1</sup>, Belinda Sánchez Ramírez<sup>3</sup>, Leandro R.S. Barbosa<sup>4</sup>, Rosangela Itri<sup>4</sup>, María Eliana Lanio Ruiz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Toxinas y Liposomas, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana y Lab UH-CIM, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine and the Keenan Research Centre for Biomedical Science in the Li Ka Shing Knowledge Institute of St. Michael's Hospital, Toronto, Ontario, Canada.

<sup>3</sup>Laboratorio de Inmunobiología Tumoral, Centro de Inmunología Molecular (CIM), La Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Institute of Physics, University of Sao Paulo, Brazil

\*Autor para correspondencia:  
[mlanio@fbio.uh.cu](mailto:mlanio@fbio.uh.cu)

Recibido: 2018-11-08

Aceptado: 2018-12-28

#### RESUMEN

El desarrollo de sistemas de liberación de ácidos nucleicos en las células dianas con fines terapéuticos enfrenta retos importantes para evadir las barreras extracelulares e intracelulares y lograr una elevada eficacia en la transfección. Un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que median este complejo proceso es ineludible. En la presente revisión se ofrece una visión general sobre diferentes sistemas o métodos no-virales de liberación de ácidos nucleicos y las estrategias desarrolladas en ellos para superar las diferentes barreras. El compartimiento endosomal constituye una de las principales barreras a vencer por estos sistemas y por ello se analizan algunas de las hipótesis del accionar de diferentes elementos incluidos en sus formulaciones para sortear esta barrera.

**Palabras clave:** ARN, ADN, lipoplexes, polioplexes, escape endosomal, nanopartículas, péptidos penetradores de células

#### ABSTRACT

*The development of nucleic acid release systems to target cells for therapeutic purposes faces important challenges in the efforts to overcome extracellular and intracellular barriers and achieve greater efficiency in transfection. A better knowledge of the molecular mechanisms that mediate this complex process is inescapable. In this review we provide an overview of several systems or methods for non-viral nucleic acid release and the strategies developed in them to overcome the different barriers. The endosomal compartment is considered one of the crucial bottlenecks to be overcome by these systems. We analyze some of the hypotheses which describe how different elements that are included in these systems mediate the endosomal escape.*

**Keywords:** RNA, DNA, lipoplexes, polioplexes, endosomal leakage, nanoparticles, cell penetrating peptides

**Listado de abreviaturas:** ANs, ácidos nucleicos; ADN, ácido desoxirribonucleico; ARN, ácidos ribonucleicos; siRNA, del inglés *small interfering ribonucleic acid*; DEAE, dietilamino éter; DOTMA, N-[1-(2,3-Dioleiloxi) propil]N,N,N-trimetilamonio; DOTAP, 1,2-Dioleoiloxi-3-trimetilamonio-propano; DC-colesterol, 3 $\beta$ -[N-(N',N'-Dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol; DOPE, fosfatidiletalonamina; PEI, polietilenimina; PLGA, ácido poli-(láctico-co-glucólico); PLL, poli-L-lisina; LLO, listeriolisina O; CPPs, del inglés *cell-penetrating peptides*; PEG, polietilen glicol; ATPasa, adenosintrifosfatasa; HA2, subunidad de la hemaglutinina del virus influenza; PFPs, proteínas formadoras de poros; CPN, complejos del poro nuclear; NLS, del inglés *Nuclear Localization Signal*

## INTRODUCCIÓN

Las estrategias mediante las cuales se logra la transferencia de genes dentro de la célula se han convertido en herramientas experimentales invaluable para el estudio de la función y regulación de la expresión de los genes. También han permitido el desarrollo de la inmunización basada en ácidos nucleicos (ANs), la generación de modelos de enfermedades y finalmente, la exploración de posibles aplicaciones terapéuticas en enfermedades adquiridas o hereditarias (Al-Dosari y Gao, 2009, Liang y Lam, 2012).

El interés en la introducción de material genético en la célula con una finalidad terapéutica incrementó después del descubrimiento de que los ácidos ribonucleicos (ARNs) de doble cadena (ARNdc) producían una degradación selectiva de los ARNs mensajeros complementarios. Este proceso ocurre mediante el mecanismo denominado interferencia de ARN (ARNi) el cual se ha descrito en *Caenorhabditis elegans* y en células de mamíferos (Fire *et al.*, 1998, Elbashir *et al.*, 2001). Además, el componente activo de este proceso, denominado ARN pequeño de interferencia (siRNA, del inglés *small interfering RNA*), puede ser químicamente sintetizado o expresado a partir de plásmidos lo que lo hacía realmente atractivo como principio activo de una posible terapia.

El empleo de ANs como agente terapéutico sin la modificación de sus propiedades farmacocinéticas resulta virtualmente imposible. Estas moléculas no pueden atravesar eficientemente la membrana citoplasmática debido a su gran tamaño y a su naturaleza hidrofílica y, además, es susceptible al ataque enzimático de las nucleasas (Al-Dosari y Gao, 2009).

Diferentes métodos de liberación de ANs al interior celular han sido descritos los cuales se encuentran divididos en dos grandes grupos: métodos de liberación de ANs virales y no-virales (Cevher *et al.*, 2012). Los métodos no-virales emplean compuestos naturales o sintéticos tales como policationes, lípidos catiónicos

(Al-Dosari y Gao, 2009), o fuerzas físicas: sonoporción, electroporción, magnetofección, entre otras (Sugar y Neumann, 1984, Yoon *et al.*, 2008). Los virales utilizan virus modificados cuyo diseño impide su replicación y posibilita la liberación y expresión de genes de interés (Cevher *et al.*, 2012). El uso de sistemas de liberación no-virales presentan ventajas sobre los sistemas virales por cuanto los materiales que se emplean en su diseño son menos tóxicos y poco inmunogénicos y desde el punto de vista práctico su producción es sencilla y tiene la potencialidad de que se puede administrar de forma repetida (Al-Dosari y Gao, 2009).

El mayor obstáculo que tienen los sistemas no-virales para su uso clínico, particularmente aquellos basados en métodos químicos, es la baja eficiencia en la transfección y se requiere una optimización en función de las distintas barreras extracelulares e intracelulares (Cevher *et al.*, 2012). La presente revisión se centra en la descripción de aproximaciones no virales de liberación de genes con potencialidades terapéuticas debido a la mayor flexibilidad en el diseño de estos sistemas. Se analizan las estrategias empleadas para sortear las barreras extracelulares e intracelulares con el fin de incorporar el material genético de manera eficiente.

## DESARROLLO

### Sistemas de liberación de ácidos nucleicos. Obstáculos a sortear

Para lograr introducir eficientemente material genético es necesario rebasar varios obstáculos impuestos por las barreras físicas y químicas celulares. En general, los estudios en los cuales se han empleado ANs desnudos han evidenciado una baja eficiencia en la transfección *in vitro* e *in vivo* independientemente de la célula diana y el tipo de tejido. Esta condición está determinada por diferentes razones (Al-Dosari y Gao, 2009):

- i) Las moléculas de ANs desnudos son fácilmente degradadas por nucleasas presentes tanto fuera como dentro de las células.
- ii) El ANs no compactado tiene una estructura altamente hidrofílica alargada la cual es estéricamente inadecuada para ser internalizada por las células dianas por la ruta endocítica.
- iii) La membrana citoplasmática de las células eucariotas, las cuales poseen carga negativa, repele electrostáticamente el ANs, lo que imposibilita que se alcance sobre la superficie celular la concentración física necesaria para inducir su internalización.

Para evitar las situaciones descritas es necesario incluir en el sistema otros componentes con la finalidad de proteger los ANs contra la degradación, reducir o neutralizar totalmente la carga negativa y transformar estéricamente la estructura de los ANs en una forma más adecuada para ser endocitada. En la actualidad, se emplean varias estrategias basadas en sistemas virales y no virales para la introducción de material genético exógeno en las células *in vitro* e *in vivo*.

Las estrategias de transferencias de genes emplean sistemas virales: retrovirus (Miller *et al.*, 1993), adenovirus (Muzyczka, 1992), virus asociados a adenovirus (Carter, 2005), virus herpes (Fink y Mata, 2008), lentivirus (Naldini *et al.*, 1996), y virus Epstein-Barr (Harada *et al.*, 2000) muestran las más altas eficiencias de transfección *in vivo* e *in vitro*. Por el contrario, los sistemas no-virales basados en policonjugados y partículas lipídicas catiónicas (Guy-Caffey *et al.*, 1995) tienen una reducida capacidad para introducir genes en la célula, especialmente en presencia de suero y otras proteínas, lo que limita su uso *in vivo* (Al-Dosari y Gao, 2009). No obstante, los sistemas de liberación no virales han ganado notoriedad dada la seguridad que ofrecen y a causa de la potencial desventaja que tienen los sistemas de liberación virales de promover reacciones inmunológicas adversas. Además, como los virus pueden integrar el material genético dentro del genoma de la célula hospedera, se incrementa significativamente la probabilidad de producir mutagénesis por inserción pudiendo conducir a la interrupción de la expresión correcta de genes vitales para la célula así como a un crecimiento tumoral en la misma, entre otros efectos deletéreos (Al-Dosari y Gao, 2009). Igualmente, la producción industrial de sistemas virales de liberación resulta muy costosa lo que la hace inaccesible para un número de países.

La mayoría de los sistemas no-virales de liberación de ANs operan sobre tres niveles generales: la formación del complejo y condensación de los ANs, la endocitosis y la direccionalización/entrada nuclear.

Las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) pueden ser previamente condensadas con reactivos de transfección catiónicos. La formación de estos complejos provoca la neutralización de las cargas o su inversión lo que facilita la interacción electrostática complejo/membrana y su internalización, usualmente a través de la vía endocítica (Rezvani Amin *et al.*, 2013). Esta ruta determina la posterior liberación del ADN, su tráfico y el tiempo de vida media en la célula (Luo y Saltzman, 2000).

Durante la endocitosis ocurren los eventos de la unión, internalización, formación de los endosomas, fusión con lisosomas y degradación del contenido endosomal. El ambiente ácido en el endosoma y las enzimas lisosomales provocan la degradación del ADN y de las moléculas asociadas. Sin embargo, los ANs en estos complejos resultan protegidos de la acción de las nucleasas (Felgner, 1990). Los compuestos catiónicos empleados en algunos casos pueden también mediar el escape endosomal, aumentando la eficiencia en la transfección y la expresión transgénica (Schillinger *et al.*, 2005, Adil *et al.*, 2014). El ADN que ha evadido tanto al procesamiento endocítico y la acción de las nucleasas citoplasmáticas, debe disociarse de los complejos condensados ya sea antes o después de entrar al núcleo. La entrada al núcleo puede ser a través de los poros nucleares o durante la división celular (Luo y Saltzman, 2000).

La baja eficiencia en la liberación del ADN que poseen los sistemas no-virales es producto del proceso de múltiples etapas que deben afrontar para transportar el material genético hasta el interior celular. Como consecuencia de la presencia de barreras en este proceso, el número de moléculas de ADN se reduce a cada paso en el trayecto hacia el núcleo. Por lo que resulta necesario identificar y vencer dichas barreras con la finalidad de lograr una alta eficiencia en la transfección.

Las investigaciones actuales están enfocadas en resolver el mayor problema de los sistemas no-virales: el ineficiente escape del ácido nucleico de los compartimientos endosomales (Selby *et al.*, 2017, Pei y Buyanova, 2019).

## Sistemas no-virales basados en métodos físicos

### Magnetofección

La magnetofección se basa en la asociación de los ANs con nanopartículas magnéticas recubiertas con polielectrolitos catiónicos (polímeros y lípidos catiónicos), que posibilitan el escape de estas partículas de los compartimientos endosomales. La totalidad de los complejos aplicados son concentrados rápidamente sobre las células *in vitro*, en un período de 5 a 30 min, debido a la acción de un campo magnético externo, lo que garantiza que el 100% de las células entran en contacto con una dosis significativa del vector (Schillinger *et al.*, 2005). La acumulación de los complejos en la superficie celular, desencadenan los procesos naturales de endocitosis y pinocitosis por inducción mecánica que permiten su internalización. La arquitectura y estructura de la membrana permanecen intacta a diferencia de otros métodos de transfección físicos que dañan la membrana celular (Schillinger *et al.*, 2005, Fouriki *et al.*, 2010). La magnetofección ha probado ser un método de transfección eficiente *in vitro* e *in vivo*. Este método puede ser empleado en la transfección de plásmidos, siRNA y oligonucleótidos antisentido (Prosen *et al.*, 2013). Mejores resultados en la transfección se han logrado cuando se emplea un campo magnético oscilante porque promueve una internalización más eficiente de las biomoléculas por las células dianas (Fouriki *et al.*, 2010)

### Electroporación

La electroporación es el método mediante el cual el ADN es introducido en el citosol celular a través de los poros originados en la membrana por la acción de la fuerza eléctrica derivada del campo eléctrico impuesto (Tomizawa *et al.*, 2013). La transfección por electroporación es aplicada con una alta eficiencia en la transfección de células eucariotas *in vitro*, especialmente en los casos en las que las células son difíciles de transfectar debido, por ejemplo, a una baja frecuencia de división (Baum *et al.*, 1994).

La aplicación de este método ha alcanzado resultados prometedores en relación con la eficacia de la transfección *in vivo* (Aihara y Miyazaki, 1998) y los pocos efectos colaterales sistémicos (Ayuni *et al.*, 2010). No obstante el método de electroporación tiene varias limitaciones que deben ser optimizados como son el daño de las células y tejidos dianas debido a

los pulsos eléctricos aplicados, el corto alcance de la transferencia de genes y la necesidad de procedimientos quirúrgicos en su aplicación (Tomizawa *et al.*, 2013).

### Sonoporación

La sonoporación se refiere a la inducción de pequeños poros en la membrana mediante ultrasonido para la transferencia de ANs (Tomizawa *et al.*, 2013). El crecimiento y colapso de las burbujas, generadas por las irradiaciones ultrasónicas, genera pequeños poros transitorios en la membrana haciéndola permeable, lo que incrementa la eficiencia en la inserción de genes y drogas directamente al citosol celular. La sonoporación se ha aplicado *in vitro* e *in vivo*, no obstante, la eficiencia de la transferencia de genes es baja *in vivo* (Tomizawa *et al.*, 2013). Las dosis de plásmidos requeridas con sonoporación para un ratón son de 38-50 µg, por lo que el escalado de tales dosis para tratar humanos dificulta la aplicación de esta técnica en la clínica (Panje *et al.*, 2012). Además, los tejidos bajo las ondas ultrasónicas son dañados ya que estas inducen cambios de la membrana de las mitocondrias y del retículo endoplasmático, que conducen a procesos apoptóticos (Miller y Dou, 2009).

### Biolística

El arma de liberación de genes, también denominado transferencia balística de ADN o bombardeo con partículas recubiertas con ADN, fue usada por primera vez en 1987 para la transferencia de genes en plantas (Klein *et al.*, 1987). Este método se basa en impactar las células con partículas compuestas de metales pesados como el oro, el tungsteno o la plata recubiertos de ADN y la liberación de esta macromolécula en el interior celular. Estas partículas son aceleradas por un gas inerte altamente presurizado, comúnmente helio. La presión del gas, el tamaño de partícula y la frecuencia de la dosis son factores críticos que determinan la eficiencia en la penetración de los tejidos, el grado del daño tisular y, fundamentalmente, los niveles de transfección de los genes (Uchida *et al.*, 2002). La transferencia balística de genes se ha empleado ampliamente en la inmunización genética intramuscular, intradérmica e intratumoral. Se ha demostrado en animales modelos y en tratamientos clínicos en humanos que el empleo de este método, aun usando bajas dosis de ADN, produce una mayor respuesta inmunológica que cuando se inyecta ADN desnudo (Al-Dosari y Gao, 2009).

### Sistemas no-virales basados en compuestos químicos

Estos sistemas se basan en la formación de complejos entre los ANs y compuestos químicos catiónicos. Los métodos químicos pueden clasificarse de manera general atendiendo a los reactivos que se emplean en la formación de dichos complejos, por ejemplo, los basados en (dietilamino)eter(DEAE)-dextrano, fosfato de calcio, lípidos artificiales, proteínas, dendrímeros y otros.

Los complejos generados con los compuestos catiónicos pueden ser eficientemente internalizados por las células debido a la interacción electrostática entre las partículas ADN/politación, cargada positivamente, y la membrana citoplasmática, cargada negativamente (Ballarin-Gonzalez y Howard, 2012). Los complejos ADN/politación son estables frente a la acción de las nucleasas, dependiendo de su grado de compactación, el cual estará determinado por la relación de cargas empleada. Por ejemplo, en el caso de las poliaminas, mientras mayor es la relación N/P (R(N/P), N: número de átomos de nitrógeno potencialmente protonados de la sustancia policitónica, P: número de átomos de fósforo en la muestra de ADN), mayor será el grado de compactación de los complejos y como consecuencia mayor la estabilidad frente a nucleasas (Dunlap *et al.*, 1997, Gebhart y Kabanov, 2001). No obstante, es necesario lograr una R(N/P) que se corresponda con un grado de compactación adecuado que mantenga la protección contra la acción de las nucleasas, pero que no dificulte la expresión de los genes en la célula diana.

Los primeros sistemas químicos para la liberación de ADN fueron informados en la década del 1950, empleando altas concentraciones de sales y proteínas catiónicas para incrementar la entrada de ANs en la célula (Felgner, 1990). A partir de la década de 1960 se introdujeron estrategias basadas en el empleo de DEAE-dextrano y fosfato de calcio (Luo y Saltzman, 2000), las cuales han sido muy efectivas y simples en su proceder, y por eso aún continúan siendo ampliamente utilizadas en los laboratorios para estudios *in vitro*. No obstante, se caracterizan por su alta citotoxicidad y la dificultad para aplicarlos *in vivo*. Los resultados con el fosfato de calcio son muy variables debido al disímil tamaño de los complejos fosfato de calcio/ADN (Luo y Saltzman, 2000).

Desde la década de 1970 otros compuestos químicos han sido empleados para incrementar la internalización del ADN por las células. Los más notables han sido los sistemas de liberación basados en lípidos sintéticos, polímeros catiónicos y péptidos o proteínas (Luo y Saltzman, 2000).

### Empleo de lípidos catiónicos

En la actualidad hay cientos de lípidos catiónicos que están siendo desarrollados y probados para la transferencia de genes (Al-Dosari y Gao, 2009). Ellos comparten características estructurales comunes: una cabeza hidrofílica cargada positivamente y una cola hidrofóbica que se encuentran unidos a través de diferentes enlazadores (por ejemplo, glicerol). Los grupos de cabeza hidrofílica usuales son aminas primarias, secundarias y terciarias y sales de amonio cuaternarias. No obstante han sido desarrolladas otras cabezas polares derivadas de los grupos guanidino, imidazol, piridina, fósforo y arsénico (Al-Dosari y Gao, 2009).

La presencia de estas cabezas cargadas positivamente permite la interacción de los lípidos con las moléculas de ADN, generando complejos que son denominados frecuentemente "lipoplexes". Las colas hidrofóbicas pueden estar constituidas por dos tipos de estructuras: cadenas alifáticas o el colesterol u otros tipos de anillos esteroideos. La mayoría de los enlaces entre la región hidrofílica e hidrofóbica son éteres, ésteres, carbamatos o enlaces amidas que pueden afectar el grado de biodegradabilidad del lípido (Al-Dosari y Gao, 2009). Algunos de los lípidos catiónicos usados en transfección son el cloruro de N-[1-(2,3-Dioleiloxi)propil]N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), 1,2-Dioleoiloxi-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 3β-[N-(N',N'-Dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol (DC-colesterol), entre otros (Al-Dosari y Gao, 2009).

La transferencia de genes mediada por liposomas catiónicos representa uno de los métodos de liberación de genes *in vitro* más comúnmente utilizado y extensivamente investigado. La eficiencia en la transfección depende de la estructura del lípido catiónico (su forma geométrica, la naturaleza del ancla lipídica y el número de grupos cargados por moléculas), la razón de carga usada para formar el lipoplex y las propiedades de los lípidos acompañantes (Wasungu y Hoekstra, 2006).

### Empleo de polímeros y péptidos catiónicos

Polímeros con diferentes propiedades se han utilizado como componentes de los sistemas de transferencia de genes. Los polímeros catiónicos han devenido como unos de los componentes esenciales en dichos sistemas ya que, al ser mezclados con ADN, forman complejos de escala nanométrica denominados "polioplexes" los cuales, de manera general, son más estables que los lipoplexes (Al-Dosari y Gao, 2009).

Los clásicos y más prometedores vectores policationicos incluyen a la polietilenimina (PEI) (Gebhart y Kabanov, 2001), al ácido poli-(láctico-co-glucólico) (PLGA) (Blum y Saltzman, 2008) y la poli-L-lisina (PLL) (Al-Dosari y Gao, 2009). El peso molecular de estas moléculas catiónicas oscila entre 5 y 50 KDa y en cuanto a su estructura puede ser ramificadas y lineales. Los polímeros catiónicos ramificados condensan el ADN más eficientemente que los lineales, pero son menos potentes transfectando células eucariotas (Dunlap *et al.*, 1997, Mannisto *et al.*, 2002). Estas macromoléculas catiónicas ramificadas han mostrado también ser más tóxicas que las lineales (Al-Dosari y Gao, 2009), aspecto que ha sido determinante para su aplicación *in vivo*.

Péptidos catiónicos o proteínas quiméricas han sido diseñados para unificar en ellos diversos motivos estructurales que le permitan interactuar con las moléculas de ADN, reconocer específicamente un tipo celular o tejido, lisar los endosomas y favorecer la translocación hacia al núcleo del material genético. Los péptidos comúnmente empleados para la transfección se han denominado péptidos penetradores de células (CPPs, del inglés *cell-penetrating peptides*) y fueron desarrollados a partir de proteínas que son capaces de penetrar la membrana plasmática (Heitz *et al.*, 2009). Los CPPs son generalmente péptidos menores de 30 aminoácidos, derivados de proteínas naturales o recombinantes y pueden ser subdivididos en dos clases fundamentales, la primera son aquellos que requieren la unión química con el vector y la segunda involucra la formación de complejos estables no covalentes (Heitz *et al.*, 2009).

Estos péptidos pueden ser policationicos o exhibir un carácter anfipático con agrupaciones de aminoácidos catiónicos en su secuencia primaria. Los péptidos más estudiados han sido TAT (YGRKKRRQRRR), la penetratina (RQIKIYFQNRMMKWKK), octaarginina (Arg8) y el transportan (GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL) (Kang *et al.*, 2019). El transportan es un péptido quimérico derivado del fragmento N-terminal del neuropéptido galanina unido al mastoparan, un péptido del veneno de avispa. Esta construcción y sus análogos han mostrado su eficacia *in vivo* (Lehto *et al.*, 2011).

Un ejemplo de proteína quimera conteniendo un péptido catiónico fue publicado por Kim *et al.* en el 2015. Estos autores demostraron que la incorporación a los complejos protamina/ADN de pequeñas cantidades de una proteína de fusión, que contenía a la protamina como dominio de unión al ADN y a la listeriolisina

O (LLO) como mediador del escape endosomal, mejora significativamente la eficiencia en la liberación de los genes (Kim *et al.*, 2015).

En general, los complejos de polímeros o péptidos catiónicos/ADN pueden exhibir comportamientos y características diferentes (variación en los rasgos estructurales, la citotoxicidad, la internalización y la liberación del ADN), al modificar el tamaño, la estructura y la relación molecular del ADN y el vector policationico, y finalmente, por las modificaciones químicas y estructurales adicionales (Hsu y Uludag, 2008).

### **Impedimentos extracelulares e intracelulares para la transfección: Alternativas para vencerlos**

#### ***El arribo a la membrana citoplasmática de la célula diana***

Tanto los lipoplexes como los poliplexes, al ser administrados de forma sistémica, experimentan agregación debido a la interacción con proteínas del suero o componentes celulares cargados negativamente, fundamentalmente eritrocitos y plaquetas. Estos agregados son capturados y acumulados por las células del sistema retículo endotelial en el hígado y el pulmón. Otras modificaciones químicas han sido introducidas a estos complejos con la finalidad de mejorar su biodistribución al ser administrados de forma sistémica.

Entre las alternativas utilizadas se encuentra la modificación del vector catiónico con un polímero inerte hidrofílico, por ejemplo el polietileno glicol (PEG). Sin embargo, esta modificación voluminosa tiende a evitar la interacción efectiva que debe producirse entre la membrana celular y las nanopartículas afectándose la transfección (El-Sayed *et al.*, 2009).

Diversas estrategias se han usado para condicionar la protección ofrecida por el PEG. En los lipoplexes se han empleado ácidos grasos de cadena corta como anclas lipídicas para el PEG. Esto permite que las moléculas de PEG difundan con el tiempo generando zonas desprotegidas en la nanopartícula que pueden interactuar con la membrana (Al-Dosari y Gao, 2009). La introducción de enlaces químicos sensibles al pH o reducibles en el ambiente endosomal ha posibilitado la separación de las moléculas de PEG de las nanopartículas en el interior de este compartimiento subcelular (Al-Dosari y Gao, 2009).

En el caso de los poliplexes se han empleado tam-

bién el polímero plurónico de tres bloques o el dextrano para reducir las interacciones inespecíficas (Al-Dosari y Gao, 2009). Los poliplexes recubiertos con polímeros biodegradables aniónicos tales como la albúmina o el sulfato de dextrano constituyen otra idea interesante para disminuir la citotoxicidad y la unión inespecífica a los tejidos (Al-Dosari y Gao, 2009). Otra importante modificación introducida a estos sistemas de liberación de ADN es la unión de elementos direccionalizadores en su superficie. Es posible la direccionalización de ADN y siRNA de manera exitosa a células tumorales usando vectores catiónicos recubierto con anticuerpos monoclonales (Xu *et al.*, 2002), fragmentos de anticuerpos monoclonales (Messerschmidt *et al.*, 2008, Rothdiener *et al.*, 2010), ligandos como la transferrina (Maruyama, 2011), el péptido cíclico RGD (Arg-Gly-Asp) de unión a integrinas (Kibria *et al.*, 2011) o el folato (Shmeeda *et al.*, 2006)

La encapsulación de los poliplexes en diferentes sistemas tales como nanopartículas biodegradables sólidas, hidrogeles basados en polímeros y liposomas neutros o aniónicos ha potenciado la eficiencia de la transfección o reducido la citotoxicidad de los poliplexes (Al-Dosari y Gao, 2009). Sobre estos sistemas de encapsulación se han adicionado las modificaciones químicas descritas anteriormente para prolongar el tiempo de vida media en circulación y direccionalizar las nanopartículas.

#### **La barrera impuesta por la membrana citoplasmática**

Los complejos generados a las relaciones R(N/P) empleadas comúnmente en los experimentos de transfección, tienen una carga neta positiva (Bieber *et al.*, 2002). La internalización es mediada por la interacción electrostática entre las partículas ADN/vector catiónico y la membrana citoplasmática, lo que induce los procesos endocíticos (Ballarin-Gonzalez y Howard, 2012). Existen evidencias de que la internalización de los poliplexes generados con PEI también puede ocurrir a través de la endocitosis mediada por el receptor syndecan-1, un proteoglicano de sulfato de heparano asociado a las membranas celulares que juega un papel importante en varios aspectos de la fisiología celular (ur Rehman *et al.*, 2013). Es importante destacar que el mecanismo endocítico por el cual son internalizados los complejos es fuertemente dependiente de la célula y que la vía de entrada determina el destino intracelular del complejo (Remy-Kristensen *et al.*, 2001).

Los CPPs pueden mediar el movimiento de los vectores no-virales a través de la membrana hacia el citosol. Aunque aún resulta difícil establecer un esquema general para el mecanismo de inserción de los CPPs, hay un consenso en que el primer contacto entre las CPPs y la superficie celular ocurre a través de interacciones electrostáticas con los proteoglicanos (como los glucosaminoglucanos y los sindecanos) y que la vía de internalización celular dependerá de varios factores tales como: (i) la naturaleza y tipo de estructura secundaria de los CPPs; (ii) su habilidad para interactuar con la superficie celular y los componentes lipídicos de la membrana; (iii) la naturaleza, tipo y concentración activa del cargamento al que se encuentra asociado; (iv) el tipo de célula y la composición de la membrana (Heitz *et al.*, 2009). El escape endosomal continúa siendo la mayor limitación de los sistemas de liberación que emplean estos péptidos. Solo unos pocos CPPs son capaces de mediar el escape hacia el citosol de los sistemas no-virales, debido a sus propiedades desestabilizadoras de los compartimientos endocítico o como consecuencia de la integridad reducida de las vesículas formadas en la macropinocitosis (Nakase *et al.*, 2007, Heitz *et al.*, 2009).

#### **Escape endosomal de los vectores no-virales**

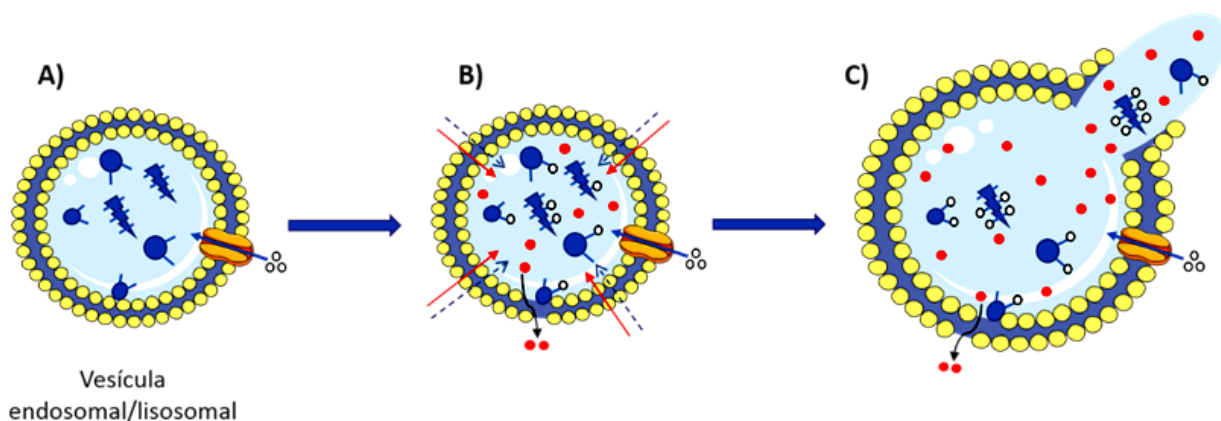
Después de que los sistemas de liberación no-virales entran a la célula vía endocitosis, son inicialmente atrapados en los endosomas tempranos donde el pH disminuye desde un pH neutro a un pH de 6 (Liang y Lam, 2012). Los endosomas tempranos pueden fusionarse con otros endosomas en los cuales el contenido internalizado puede ser reciclado de regreso a la membrana citoplasmática y transportado fuera de la célula por exocitosis (Liang y Lam, 2012). Más frecuentemente, los sistemas de liberación se localizan los endosomas tardíos los cuales se acidifican muy rápidamente a un pH entre 5 y 6 por la acción de una adenosintrifosfatasa (ATPasa) que actúa como una bomba de protones. Los endosomas tardíos pueden fusionarse con los lisosomas los cuales contienen enzimas degradativas y se produce, además, otra reducción del pH hasta aproximadamente 4,5 (Liang y Lam, 2012). Los ANs que son liberados en estas vesículas ácidas serán degradados (Pack *et al.*, 2005), limitando la eficiencia de liberación de estas moléculas al citosol (Whitehead *et al.*, 2009). Un vector ideal debe asegurar que su contenido sea liberado en una etapa temprana de estos compartimientos acidificados con el fin de prevenir la destrucción de las moléculas de los ANs.

### La hipótesis de la esponja de protones (efecto tamponante del pH)

La internalización de las partículas PEI/ADN hacia los endosomas en las células ocurren entre 10-20 min (Vermeulen *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha demostrado que la liberación al citosol constituye la etapa limitante en el mecanismo de transfección con los complejos PEI/ADN (Bieber *et al.*, 2002).

En relación a los polímeros catiónicos se ha postulado la “hipótesis de la esponja de protones”, a partir de resultados obtenidos con PEI o dendrímeros de poli-amidoaminas como transportador del ADN (Neuberg y Kichler, 2014). El rango efectivo de amortiguamiento del pH de un tampón dependerá de su constante de equilibrio del ácido o base ( $pK_a$  o  $pK_b$  respectivamente). El efecto amortiguador del tampón será mayor cuando su valor de  $pK_a$  este próximo al pH del medio.

A diferencia del PLL cuyas aminas primarias a pH fisiológico están protonadas (el  $pK_a$  de la cadena lateral de la lisina es 10,58 (Nelson y Cox, 2012)), PEI posee la capacidad de tamponar el pH ácido endosomal debido a que contiene aminas secundarias y/o terciarias con un  $pK_a$  cercano al pH endosomal/lisosomal (Liang y Lam, 2012). Durante la maduración de los endosomas, una ATPasa localizada en la membrana endosomal actúa como bomba de protones translocándolos desde el citosol hacia el interior endosomal (Neuberg y Kichler, 2014). La presencia de los poliplexes previene la acidificación del endosoma como consecuencia de su protonación (Fig. 1). Ello induce un continuo bombeo de protones hacia el endosoma, acompañado por la entrada pasiva de iones  $Cl^-$ , lo que incrementa la concentración de iones y consecuentemente ocurre un influjo de agua por la fuerza osmótica originada. Eventualmente, la presión osmótica causa el hinchamiento y ruptura de los endosomas liberando su contenido al citosol (Wojnilowicz *et al.*, 2019).



**Figura 1. Mecanismo basado en la esponja de protones (efecto tamponante del pH).** (A) Los poliplexes entran en la célula vía endocitosis quedando atrapados en los endosomas. (B) Las ATPasas unidas a la membrana endosomal que actúan como bombas de protones, translocan activamente protones hacia los endosomas. Los polímeros en su interior se protonan tamponando consecuentemente el pH endosomal. Como resultado, continuamente serán bombeados más protones hacia el interior de los endosomas para su acidificación. La acción de las bombas de protones es seguida por la entrada pasiva de iones cloruros,  $Cl^-$ , incrementando la concentración iónica y por tanto el influjo de agua. La unión de los complejos a la monocapa interna de la membrana endosomal puede alterar su permeabilidad. Se produce entonces un efecto de “aliviadero” que puede dificultar la generación de la presión osmótica necesaria para producir el estallido endosomal. (C) La alta presión osmótica causa la ruptura transiente de los endosomas, y la consiguiente liberación de sus contenidos al citosol.



**Figure 1. Mechanism based on proton sponge (pH buffering effect).** (A) The polyplexes enter the cell via endocytosis, being trapped in the endosomes. (B) ATPases bound to the endosomal membrane that act as proton pumps, actively translocate protons to the endosomes. The polymers inside are protonated, thereby buffering the endosomal pH. As a result, more protons will be continuously pumped into the endosomes for acidification. The action of the proton pumps is followed by the passive entry of chloride ions,  $Cl^-$ , increasing the ionic concentration and therefore the influx of water. The binding of the complexes to the internal monolayer of the endosomal membrane alters its permeability. There is a “spillway” effect that can hinder the generation of the osmotic pressure necessary to produce the endosomal burst. (C) The high osmotic pressure causes the transient rupture of the endosomes and the consequent release of their contents to the cytosol.

Es importante destacar que la ruptura solo se produce en un número reducido de las vesículas endosomales formadas al ser internalizados los complejos PEI/ADN (Bus *et al.*, 2018), y solo en una reducida fracción de las células que los endocitan (Adil *et al.*, 2014). Según Adil *et al.*, (2014) (Adil *et al.*, 2014), la ocurrencia del fenómeno de la esponja de protones cuando se emplea la PEI ramificada, depende de la vía de internalización de las nanopartículas y del tipo de célula. La reclusión y degradación de los complejos en los lisosomas de las células dianas limita enormemente la eficiencia en la liberación de los genes y conduce a una significativa reducción del número de células que expresan el gen liberado. Además, la unión de los complejos basados en PEI a la membrana del endosoma altera su permeabilidad permitiendo el escape de moléculas de pequeño tamaño, por ejemplo la calceína (Vermeulen *et al.*, 2018). La salida de compuestos osmóticamente activos de la vesícula produce un efecto de "aliviadero", es decir, disipa la presión osmótica en el interior del endosoma, lo que atenta contra la ruptura transiente o estallido endosomal que pudiera inducir este pollicación. Por este motivo, se promueve la búsqueda de otros componentes que potencien el escape endosomal.

#### *Mecanismo de flip-flop*

Los lípidos y los liposomas, ya sean aniónicos, catiónicos, neutros o sensibles al pH, representan otra categoría de transportadores no-virales que han sido extensamente investigados para la liberación de ANs en el interior de las células de los mamíferos.

La vía de internalización de estos vectores continúa siendo controversial, aunque hay cierto consenso en que la vía principal es la endocitosis.

Zabner *et al.*, (1995) (Zabner *et al.*, 1995) estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión el destino intracelular de los lipoplexes endocitados. Estos autores observaron que después de la captura celular, los lipoplexes eran liberados a compartimientos vesiculares perinucleares los cuales se fusionan con endosomas tempranos y confirmaron que la disociación de los ANs de los lipoplexes y su escape de los endosomas eran barreras cruciales para la transfección exitosa.

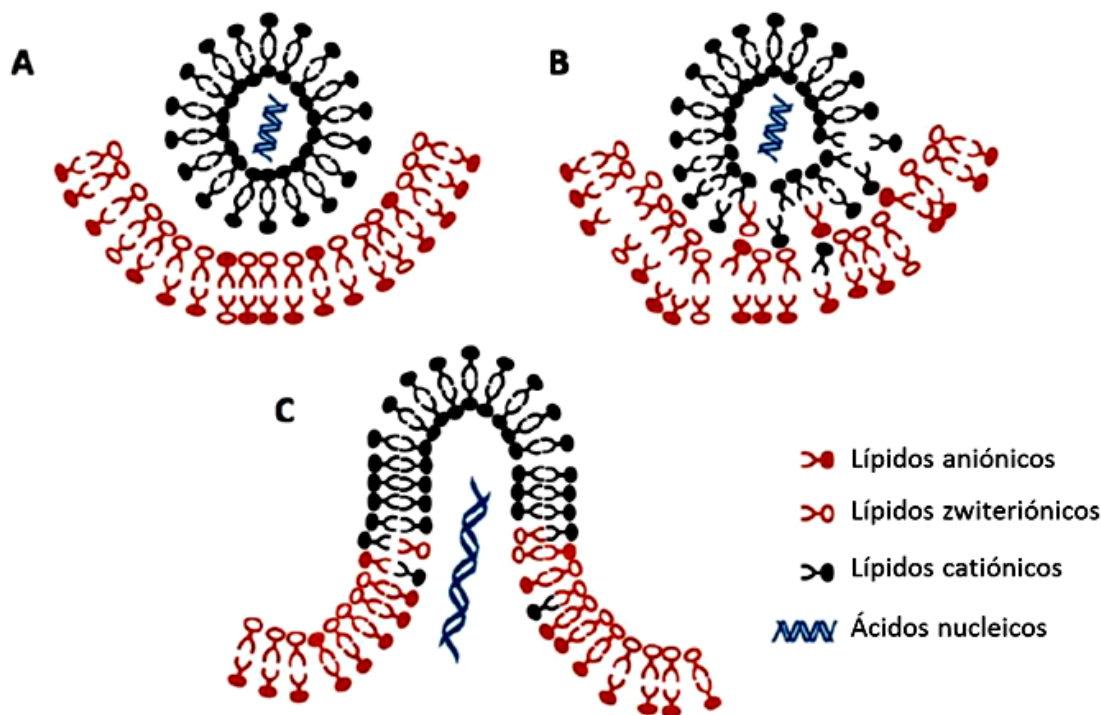
En el estudio del mecanismo de escape endosomal del ADN mediado por los liposomas catiónicos, Zelphati *et al.*, (1996) (Zelphati y Szoka, 1996b, 1996a) identificaron las biomoléculas responsables de la disociación

de los ANs de los lipoplexes y su liberación al citosol. Estos investigadores encontraron que liposomas aniónicos con una composición que mimetiza la monocapa interna de la membrana citoplasmática, eran capaces de inducir una rápida liberación de los ANs de los lipoplexes. Sobre la base de este resultado, estos autores propusieron el mecanismo "flip-flop" para explicar cómo los ANs son liberados de los lipoplexes y escapan de los endosomas (Fig.2). La interacción electrostática entre los lipoplexes y los lípidos cargados negativamente de la membrana endosomal favorece que estos lípidos difundan lateralmente y se concentren formando un par iónico neutro con los lípidos catiónicos de los lipoplexes con la ocurrencia de eventos de fusión entre membranas. Como resultado, los ANs son desplazados de los lipoplexes permitiendo su salida hacia el citosol. (Xu y Szoka, 1996, Zelphati y Szoka, 1996b).

Los lípidos neutros han sido empleados como facilitadores de la transfección en combinación con los liposomas catiónicos. La inclusión de fosfatidiletanolamina (DOPE) en lipoplexes puede incrementar significativamente su actividad transfectante (Falsini y Ristori, 2016). Zuhorn *et al.*, (2005) hipotetizaron que la formación de la fase hexagonal invertida inducida por DOPE en los lipoplexes tiene un papel esencial en la disociación de los ANs y en la eficiente desestabilización de la membrana endosomal.

#### *Mecanismos de fusión o desestabilización de la membrana endosomal*

Resultados obtenidos por diferentes grupos han demostrado que una variedad de CPPs entran a la célula por la vía endosomal (Kang *et al.*, 2019). Dichas investigaciones han también demostrado que los CPPs una vez internalizados por la célula, poseen actividad endosomolítica. La mayoría de estos péptidos desestabilizadores de membranas mimetizan secuencias fusogénicas de las proteínas de fusión de virus. No obstante, el desafío siempre ha sido la generación de péptidos con la capacidad de romper el endosoma sin que afecten la membrana citoplasmática o las membranas de los organelos. Una de las proteínas empleadas como molde para el diseño de estos péptidos es la subunidad HA2 de la hemaglutinina del virus influenza la cual en el N-terminal contiene un péptido de fusión anfílico y aniónico (Huang *et al.*, 2015). HA2 se incluyó como componente endosomolítico en poliplexes que contenían transferrina/PLL/ADN obteniendo un considerable aumento en la eficiencia de liberación (Wagner *et al.*, 1992).



**Figura 2.** Mecanismo de flip-flop. (A) Los lipoplexes son endocitados quedando atrapados en el interior de endosomas tempranos. (B) Se produce una interacción electrostática entre los lipoplexes cationicos y los lípidos aniónicos de la membrana endosomal. Estos lípidos difunden lateralmente y forman un par iónico neutro con los lípidos cationicos de los lipoplexes. (C) Los ANs son desplazados de los lipoplexes, facilitándose la liberación de los ANs al citosol. Tomado de Liang y Lam (2012).

**Figure 2.** Flip-flop mechanism. (A) Lipoplexes are endocytosed being trapped inside early endosomes. (B) An electrostatic interaction occurs between the cationic lipoplexes and the anionic lipids of the endosomal membrane. These lipids diffuse laterally and form a neutral ion pair with the cationic lipids of the lipoplexes. (C) The ANs are displaced from the lipoplexes, facilitating the release of the ANs to the cytosol. Taken from Liang and Lam (2012).

Debido a que la estructura en hélice- $\alpha$  de HA2 parece jugar un papel importante en la desestabilización de la membrana endosomal (Oehlke *et al.*, 1998), se desarrollaron una serie de péptidos anfipáticos sensibles al pH con este motivo estructural. GALA es un péptido sintético de 30 aminoácidos diseñado para interactuar con bicapas lipídicas a pH ácido. Este contiene una histidina y un residuo triptófano, así como varias repeticiones de la secuencia ácido glutámico-alanina-leucina-alanina (EALA, pero que comúnmente se le denomina GALA). Este péptido sufre un cambio conformacional pasando de una estructura al azar a una de hélice- $\alpha$  cuando el pH se reduce de 7 a 5 (Loughran Stephen *et al.*, 2015), favoreciéndose su interacción con membrana y la desestabilización de esta estructura. El efecto desestabilizador de la membrana por este péptido sensible al pH en un ambiente ácido ofrece la posibilidad de incrementar la libera-

ción de los ANs desde el compartimiento endosomal. Luo *et al.* demostraron que la introducción de GALA en polyplexes de ARNm potencia significativamente la liberación a citosol del ANs en células dendríticas posibilitando la maduración de estas células y el incremento de la respuesta de las células T (Lou *et al.*, 2019).

Debido a la carga negativa de GALA, este no puede unirse directamente a los ANs a través de interacciones electrostáticas y solo constituye un componente funcional adicional en los polioplexes y lipoplexes. A fin de obtener un sistema de liberación más eficaz se han desarrollado nuevos péptidos con capacidad de unirse directamente a los ANs y que conserven la habilidad de desestabilizar las membranas lipídicas. Mediante la sustitución parcial del ácido glutámico de GALA por la lisina (KALA) (Liang y Lam, 2012) se mostró que, a diferencia de GALA, este péptido era

capaz de unirse al ADN, de desestabilizar la membrana endosomal y de potenciar el tráfico hacia el núcleo del material genético (Wyman *et al.*, 1997).

Otros péptidos con estructuras en hélices- $\alpha$  y con la capacidad de favorecer el escape de los endosomas son: la serie de péptidos Hel (Niidome *et al.*, 1999), INF (Plank *et al.*, 1994), HGP (Kwon *et al.*, 2008), JTS-1 (Gottschalk *et al.*, 1996), EB1 (Orellana *et al.*, 2018), ppTG1 (Lundberg *et al.*, 2007) y CADY (Bohmova *et al.*, 2018, McClorey y Banerjee, 2018). También se ha empleado la oligomerización de CPPs como otra estrategia para mediar la liberación endosomal. Mediante la adición de un residuo de cisteína en el C-terminal de la penetratina y sus análogos se logró incrementar la capacidad de transfección en las células HEK293T (Pei y Buyanova, 2019).

#### *Liberación mediada por proteínas o péptidos formadores de poros (PFPs)*

El uso de proteínas o péptidos formadores de poros es otro mecanismo empleado para mediar el escape de los ANs al citosol celular. El péptido melitina (Chen *et al.*, 2006, Baumhover *et al.*, Schellinger *et al.*, 2013) y la proteína LLO (Kim *et al.*, 2015, Mann y Kullberg, 2016) se han incorporado en los sistemas de liberación no-virales para incrementar significativamente la eficiencia de la transfección *in vitro*.

La melitina es un péptido de 26 aminoácidos aislado del veneno de la abeja *Apis mellifera* con actividad citolítica. Este péptido tiene un carácter anfipático en el cual su extremo amino es predominantemente hidrofóbico mientras su extremo carboxilo es hidrofílico (Schellinger *et al.*, 2013). La melitina es relativamente soluble en agua y adopta una conformación en hélice- $\alpha$  cuando entra en contacto con las membranas. Este péptido y sus derivados han sido unidos covalentemente a los poliplexes (Schellinger *et al.*, 2013) o se han introducido residuos lisinas y cisteínas en sus extremos para generar polímeros básicos y reducibles, capaces de unirse directamente al ADN (Chen *et al.*, 2006).

Esta última estrategia permitió aunar en una sola macromolécula la capacidad compactadora de los polímeros catiónicos; la habilidad controlada por el ambiente reductor endosomal de descompactar el ADN; así como la capacidad, también controlada por el

ambiente reductor, de liberar el ADN hacia el citosol celular debido a la actividad formadora de poros de la melitina derivatizada en estado monomérico (Chen *et al.*, 2006).

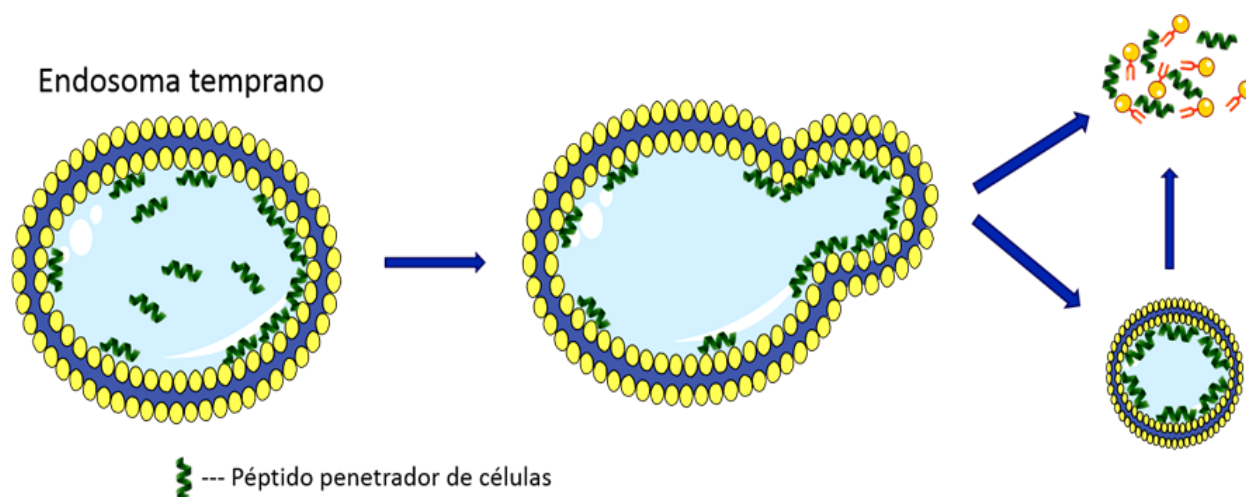
Estos resultados también demostraron la posibilidad de emplear péptidos con actividad formadora de poros para la transferencia de genes cuando se enmascara temporalmente su actividad lítica.

LLO es otra PFPs que media el escape del patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* desde el endosoma hacia el citosol (Radoshevich y Cossart, 2017). Esta proteína se ha empleado ampliamente en la liberación de antígenos hacia el citosol de las células presentadoras de antígenos con el objetivo de promover la inmunidad mediada por célula (Mandal, 2017). Además, también se ha empleado en la liberación de drogas o de proteínas tóxicas para la erradicación de tumores (Provoda *et al.*, 2003). Más recientemente, LLO fue fusionada con la protamina, un polipéptido básico de 22 aminoácidos, para generar una proteína quimérica con la capacidad de compactar al ADN, mediada por la protamina, y de facilitar el escape endosomal del ADN mediante la acción de la LLO sobre la membrana endosomal (Kim *et al.*, 2015). La inclusión de pequeñas cantidades de esta proteína quimérica en los complejos de protamina/ADN resultó en un incremento significativo de la transfección *in vitro*.

#### *Brote y colapso de vesículas*

Recientemente, se ha propuesto el mecanismo de brote y colapso de vesículas (Fig. 3) para explicar el escape endosomal de los CPPs y las cargas biológicas asociadas a los mismos (Qian *et al.*, 2016, Pei y Buyanova, 2019). Este mecanismo fue estudiado empleando liposomas gigantes y recientemente, en células. Este grupo de investigadores propuso que la unión de los CPPs a la monocapa interna de la membrana endosomal induce curvaturas y el brote de dominios lipídicos enriquecidos en CPPs en forma de pequeñas vesículas.

Estas vesículas se desintegran en forma de agregados de péptido/lípidos justo antes de desprenderse de las membranas endosomal o poco después de hacerlo, resultando en la liberación del contenido vesicular en el citosol.



**Figura 3.** Mecanismo de brote y colapso de vesículas. Los péptidos penetradores de células se unen a la membrana endosomal provocando que la misma se curve hacia fuera generando brotes de pequeñas vesículas. Estas vesículas se desintegran en forma de agregados de péptido/lípido.

**Figure 3.** Mechanism of bud and collapse of vesicles. The cell penetrating peptides bind to the endosomal membrane, causing it to bend outwards, generating outbreaks of small vesicles. These vesicles disintegrate in the form of peptide / lipid aggregates.

Un importante aspecto de este mecanismo es que el endosoma permanece intacto durante los eventos de brote y colapso. Pueden ocurrir varios eventos de brote y colapso en el mismo endosoma, secuencialmente o simultáneamente, hasta que el contenido de CPPs endosomal sea insuficiente (Qian *et al.*, 2016, Pei y Buyanova, 2019). El brote y colapso de vesículas explica cómo es posible que los CPPs liberen al citosol cargas biológicas asociadas a ellas en su estado nativo o plegado, ya que dichas cargas no deben cruzar físicamente la membrana endosomal. Si bien es cierto que este mecanismo solo ha sido probado para los CPPs, puede ser posible que otros compuestos tales como las PFPs transiten por el mismo para la liberación de biomoléculas al citosol celular

#### **Incorporación del material genético al núcleo celular**

La envoltura nuclear representa una importante barrera para la entrada de ADN exógeno. Esta envoltura de doble membrana está interrumpida por los complejos del poro nuclear (CPN) los cuales regulan el transporte a través de la envoltura nuclear. Los poros generados por los CPN tienen un diámetro de aproximadamente 9 nm y permiten la difusión libre de iones y moléculas de tamaño pequeño y medio ( $\approx 40$  nm)

tales como proteínas de 40-60 kDa o ANs de hasta 300 pb, pero restringe la libre difusión de macromoléculas de gran tamaño (Kim *et al.*, 2018). Para células en estado de reposo, la internalización nuclear de proteínas de gran talla es un proceso de transporte activo mediado por proteínas importinas que reconocen específicamente la secuencia del péptido señal de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*) en estas proteínas de gran talla. Los complejos proteínas-NLS/importina se acoplan al CPN para permitir la entrada al núcleo (Soniati y Chook, 2015).

La entrada al núcleo celular del material genético se logra indirectamente por el reconocimiento de las secuencias NLS de los factores de transcripción que se asocian a las moléculas del ADN en el citosol (Al-Dosari y Gao, 2009). Para aprovechar el efecto de este mecanismo natural en la transfección celular, se han conjugado NLS sintéticos a los vectores no-virales mediante diferentes estrategias, lográndose un incremento en la expresión de los genes incorporados (El-Sayed *et al.*, 2009). Para las células en constante división, la mayoría de las moléculas de ADN entran al núcleo a través del proceso de desintegración y reorganización de la envoltura nuclear durante la mitosis (El-Sayed *et al.*, 2009).

## Conclusiones

En la última década se han hecho avances significativos en la generación de sistemas de liberación con el objetivo de desafiar las barreras extracelulares e intracelulares a la incorporación de material genético al interior celular. No obstante, a pesar de que rápidamente se crean nuevos sistemas de liberación de genes, nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en los diferentes procesos que median la liberación es aún ineficiente. Esto resulta más evidente cuando los prometedoros resultados *in vitro* no se traducen en elevadas eficiencias de liberación *in vivo*. Por tanto, es necesario un conocimiento más completo sobre cómo estos sistemas interactúan con las células y su entorno para diseñarlos de manera tal que sean más eficientes en un escenario mucho más complejo como el que deben enfrentar *in vivo*.

En los últimos años la barrera endosomal ha constituido el foco de atención en el desarrollo de vehículos más eficientes. Existen numerosas hipótesis sobre cómo los diferentes elementos activos empleados para sortear esta barrera ejercen su acción. Aunque se tiene una comprensión más clara sobre estos mecanismos aún quedan muchas interrogantes. ¿Qué características físicas y químicas tales como la carga, la forma o el tamaño, son necesarias para promover el escape endosomal? ¿La vía de internalización tiene algún efecto sobre el escape endosomal? ¿Cuál mecanismo de liberación endosomal resulta más eficiente para la liberación de ANs? Es importante destacar que el reto consiste en buscar o desarrollar componentes que puedan ejercer su acción sobre la membrana endosomal sin que se vean afectadas las otras membranas celulares.

Los vectores no-virales son sistemas prometedores para la liberación de ANs. Por la facilidad y bajo costo en su elaboración, su baja toxicidad y la posibilidad de su escalado, resultan sistemas muy ventajosos con respecto a los de liberación viral. No obstante, queda un largo camino a transitar para que finalmente lleguen estas prometedoras variantes al campo de la clínica. La próxima generación de tratamientos de enfermedades con la terapia génica dependerá de sistemas de liberación que rebasen eficientemente cada una de las barreras extracelulares e intracelulares. Este cambio en la forma de tratar las enfermedades estará indisolublemente ligado a una mayor comprensión de cómo dichos sistemas interactúan con las células y su entorno.

## LITERATURA CITADA

- Adil, M. M., Z. S. Erdman y E. Kokkoli (2014) Transfection mechanisms of polyplexes, lipoplexes, and stealth liposomes in alpha (5)beta(1) integrin bearing DLD-1 colorectal cancer cells. *Langmuir* 30(13): 3802-3810.
- Aihara, H. y J. Miyazaki (1998) Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nature Biotechnology* 16(9): 867-870.
- Al-Dosari, M. S. y X. Gao (2009) Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J* 11(4): 671-681.
- Ayuni, E. L., A. Gazdhar, M. N. Giraud, A. Kadner, *et al.* (2010) *In vivo* electroporation mediated gene delivery to the beating heart. *PLoS One* 5(12): e14467.
- Ballarin-Gonzalez, B. y K. A. Howard (2012) Polycation-based nanoparticle delivery of RNAi therapeutics: adverse effects and solutions. *Adv Drug Deliv Rev* 64(15): 1717-1729.
- Baum, C., P. Forster, S. Hegewisch-Becker y K. Harbers (1994) An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques* 17(6): 1058-1062.
- Baumhover, N. J., K. Anderson, C. A. Fernandez y K. G. Rice (2010) Synthesis and *in vitro* testing of new potent polyacridine-melittin gene delivery peptides. *Bioconjug Chem* 21(1): 74-83.
- Bieber, T., W. Meissner, S. Kostin, A. Niemann, *et al.* (2002) Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release* 82(2-3): 441-454.
- Blum, J. S. y W. M. Saltzman (2008) High loading efficiency and tunable release of plasmid DNA encapsulated in submicron particles fabricated from PLGA conjugated with poly-L-lysine. *J Control Release* 129(1): 66-72.
- Bohmova, E., D. Machova, M. Pechar, R. Pola, *et al.* (2018) Cell-penetrating peptides: a useful tool for the delivery of various cargoes into cells. *Physiol Res* 67(Supplementum 2): S267-s279.
- Bus, T., A. Traeger y U. S. Schubert (2018) The great escape: how cationic polyplexes overcome the endosomal barrier. *Journal of Materials Chemistry B* 6(43): 6904-6918.
- Carter, B. J. (2005) Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* 16(5): 541-550.
- Cevher, E., E. Ş. Çağlar y A. D. Sezer (2012): Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy. En: A. D. Sezer (Ed): *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. pp: 437-470. IntechOpen. London.
- Chen, C. P., J. S. Kim, E. Steenblock, D. Liu, *et al.* (2006) Gene transfer with poly-melittin peptides. *Bioconjug Chem* 17(4): 1057-1062.
- Dunlap, D. D., A. Maggi, M. R. Soria y L. Monaco (1997) Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res* 25(15): 3095-3101.
- El-Sayed, A., S. Futaki y H. Harashima (2009) Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J* 11(1): 13-22.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, *et al.* (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836): 494-498.

- Falsini, S. y S. Ristori (2016): Lipoplexes from Non-viral Cationic Vectors: DOTAP-DOPE Liposomes and Gemini Micelles. En: G. Candiani (Ed): Non-Viral Gene Delivery Vectors: Methods and Protocols. pp: 33-43. Springer New York. New York, NY.
- Felgner, P. L. (1990) Particulate systems and polymers for *in vitro* and *in vivo* delivery of polynucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 5(3): 163-187.
- Fink, D. J. y M. Mata (2008) HSV gene transfer in the treatment of chronic pain. *Sheng Li Xue Bao* 60(5): 610-616.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, *et al.* (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-811.
- Fouriki, A., N. Farrow, M. A. Clements y J. Dobson (2010) Evaluation of the magnetic field requirements for nanomagnetic gene transfection. *Nano Rev* 1(5167).
- Gebhart, C. L. y A. V. Kabanov (2001) Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release* 73(2-3): 401-416.
- Gottschalk, S., J. T. Sparrow, J. Hauer, M. P. Mims, *et al.* (1996) A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther* 3(5): 448-457.
- Guy-Caffey, J. K., V. Bodepudi, J. S. Bishop, K. Jayaraman, *et al.* (1995) Novel polyaminolipids enhance the cellular uptake of oligonucleotides. *J Biol Chem* 270(52): 31391-31396.
- Harada, Y., M. Iwai, S. Tanaka, T. Okanoue, *et al.* (2000) Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by epstein-barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendrimer. *Cancer Gene Ther* 7(1): 27-36.
- Heitz, F., M. C. Morris y G. Divita (2009) Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* 157(2): 195-206.
- Hsu, C. Y. y H. Uludag (2008) Effects of size and topology of DNA molecules on intracellular delivery with non-viral gene carriers. *BMC Biotechnol* 8: 23.
- Huang, Y. W., H. J. Lee, L. M. Tolliver y R. S. Aronstam (2015) Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: opportunities and challenges. *Biomed Res Int* 2015: 834079.
- Kang, Z., Q. Meng y K. Liu (2019) Peptide-based gene delivery vectors. *Journal of Materials Chemistry B*.
- Kibria, G., H. Hatakeyama, N. Ohga, K. Hida, *et al.* (2011) Dual-ligand modification of PEGylated liposomes shows better cell selectivity and efficient gene delivery. *J Control Release* 153(2): 141-148.
- Kim, N. H., C. Provoda y K. D. Lee (2015) Design and characterization of novel recombinant listeriolysin O-protamine fusion proteins for enhanced gene delivery. *Mol Pharm* 12(2): 342-350.
- Kim, S. J., J. Fernandez-Martinez, I. Nudelman, Y. Shi, *et al.* (2018) Integrative structure and functional anatomy of a nuclear pore complex. *Nature* 555(7697): 475-482.
- Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu y J. C. Sanford (1987) High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic-Acids into Living Cells. *Nature* 327(6117): 70-73.
- Kwon, E. J., J. M. Bergen y S. H. Pun (2008) Application of an HIV gp41-derived peptide for enhanced intracellular trafficking of synthetic gene and siRNA delivery vehicles. *Bioconjug Chem* 19(4): 920-927.
- Lehto, T., O. E. Simonson, I. Mager, K. Ezzat, *et al.* (2011) A peptide-based vector for efficient gene transfer *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther* 19(8): 1457-1467.
- Liang, W. y J. K. Lam (2012): Endosomal escape pathways for non-viral nucleic acid delivery systems. En: B. Ceresa (Ed): *Molecular Regulation of Endocytosis*. pp: 429-456. INTECHOpen. London.
- Lou, B., S. De Koker, C. Y. J. Lau, W. E. Hennink, *et al.* (2019) mRNA Polyplexes with Post-Conjugated GALA Peptides Efficiently Target, Transfect, and Activate Antigen Presenting Cells. *Bioconjugate Chemistry* 30(2): 461-475.
- Loughran Stephen, P., M. McCrudden Cian y O. McCarthy Helen (2015) Designer peptide delivery systems for gene therapy. *European Journal of Nanomedicine*. 7: 85.
- Lundberg, P., S. El-Andaloussi, T. Sutlu, H. Johansson, *et al.* (2007) Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J* 21(11): 2664-2671.
- Luo, D. y W. M. Saltzman (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 18(1): 33-37.
- Mandal, M. (2017): Bacterial Pore-Forming Toxin in Macromolecule Delivery: Lessons Learned from Listeriolysin O. En: P. Gopalakrishnakone, B. Stiles, A. Alape-Girón, J. D. Dubreuil and M. Mandal (Eds): *Microbial Toxins*. pp: 1-13. Springer Netherlands. Dordrecht.
- Mann, K. y M. Kullberg (2016) Trastuzumab-targeted gene delivery to Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 23(7): 221-228.
- Mannisto, M., S. Vanderkerken, V. Toncheva, M. Elomaa, *et al.* (2002) Structure-activity relationships of poly(L-lysines): effects of pegylation and molecular shape on physicochemical and biological properties in gene delivery. *J Control Release* 83(1): 169-182.
- Maruyama, K. (2011) Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev* 63(3): 161-169.
- McCloy, G. y S. Banerjee (2018) Cell-Penetrating Peptides to Enhance Delivery of Oligonucleotide-Based Therapeutics. *Biomedicines* 6(2).
- Messerschmidt, S. K., A. Kolbe, D. Muller, M. Knoll, *et al.* (2008) Novel single-chain Fv' formats for the generation of immunoliposomes by site-directed coupling. *Bioconjug Chem* 19(1): 362-369.
- Miller, A. D., D. G. Miller, J. V. Garcia y C. M. Lynch (1993) Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol* 217: 581-599.
- Miller, D. L. y C. Dou (2009) Induction of apoptosis in sonoporation and ultrasonic gene transfer. *Ultrasound Med Biol* 35(1): 144-154.
- Muzyczka, N. (1992) Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 97-129.

- Nakase, I., A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, *et al.* (2007) Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* 46(2): 492-501.
- Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, *et al.* (1996) *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272(5259): 263-267.
- Nelson, D. L. y M. M. Cox (2012) *Lehninger Principles of Biochemistry*: 6th Edition. Macmillan Learning. 1198 pp.
- Neuberg, P. y A. Kichler (2014) Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines. *Adv Genet* 88: 263-288.
- Niidome, T., K. Takaji, M. Urakawa, N. Ohmori, *et al.* (1999) Chain length of cationic alpha-helical peptide sufficient for gene delivery into cells. *Bioconjug Chem* 10(5): 773-780.
- Oehlke, J., A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, *et al.* (1998) Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta* 1414(1-2): 127-139.
- Orellana, E. A., L. Rangasamy, S. Tenneti, A. M. Abdelaal, *et al.* (2018) Enhancing microRNA activity through increased endosomal release mediated by nigericin. *bioRxiv*: 367672.
- Pack, D. W., A. S. Hoffman, S. Pun y P. S. Stayton (2005) Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* 4(7): 581-593.
- Panje, C. M., D. S. Wang, M. A. Pysz, R. Paulmurugan, *et al.* (2012) Ultrasound-mediated gene delivery with cationic versus neutral microbubbles: effect of DNA and microbubble dose on *in vivo* transfection efficiency. *Theranostics* 2(11): 1078-1091.
- Pei, D. y M. Buyanova (2019) Overcoming Endosomal Entrapment in Drug Delivery. *Bioconjug Chem* 30(2): 273-283.
- Plank, C., B. Oberhauser, K. Mechtler, C. Koch, *et al.* (1994) The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem* 269(17): 12918-12924.
- Prosen, L., S. Prijic, B. Music, J. Lavrencak, *et al.* (2013) Magnetofection: a reproducible method for gene delivery to melanoma cells. *Biomed Res Int* 2013: 209452.
- Provoda, C. J., E. M. Stier y K. D. Lee (2003) Tumor cell killing enabled by listeriolysin O-liposome-mediated delivery of the protein toxin gelonin. *J Biol Chem* 278(37): 35102-35108.
- Qian, Z., A. Martyna, R. L. Hard, J. Wang, *et al.* (2016) Discovery and Mechanism of Highly Efficient Cyclic Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry* 55(18): 2601-2612.
- Radoshevich, L. y P. Cossart (2017) *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 16: 32.
- Remy-Kristensen, A., J. P. Clamme, C. Vuilleumier, J. G. Kuhry, *et al.* (2001) Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1514(1): 21-32.
- Rothdiener, M., D. Muller, P. G. Castro, A. Scholz, *et al.* (2010) Targeted delivery of siRNA to CD33-positive tumor cells with liposomal carrier systems. *J Control Release* 144(2): 251-258.
- Schellinger, J. G., J. A. Pahang, R. N. Johnson, D. S. Chu, *et al.* (2013) Melittin-grafted HPMA-oligolysine based copolymers for gene delivery. *Biomaterials* 34(9): 2318-2326.
- Schillinger, U., T. Brill, C. Rudolph, S. Huth, *et al.* (2005) Advances in magnetofection - magnetically guided nucleic acid delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1): 501-508.
- Selby, L. I., C. M. Cortez-Jugo, G. K. Such y A. P. R. Johnston (2017) Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 9(5).
- Shmeeda, H., L. Mak, D. Tzemach, P. Astrahan, *et al.* (2006) Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Mol Cancer Ther* 5(4): 818-824.
- Soniati, M. y Y. M. Chook (2015) Nuclear localization signals for four distinct karyopherin-beta nuclear import systems. *Biochem J* 468(3): 353-362.
- Sugar, I. P. y E. Neumann (1984) Stochastic model for electric field-induced membrane pores. *Electroporation. Biophys Chem* 19(3): 211-225.
- Tomizawa, M., F. Shinozaki, Y. Motoyoshi, T. Sugiyama, *et al.* (2013) Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World J Methodol* 3(4): 39-44.
- Uchida, M., H. Natsume, D. Kobayashi, K. Sugibayashi, *et al.* (2002) Effects of particle size, helium gas pressure and microparticle dose on the plasma concentration of indomethacin after bombardment of indomethacin-loaded poly-L-lactic acid microspheres using a Helios gun system. *Biol Pharm Bull* 25(5): 690-693.
- ur Rehman, Z., D. Hoekstra y I. S. Zuhorn (2013) Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. *ACS Nano* 7(5): 3767-3777.
- Vermeulen, L. M. P., T. Brans, S. K. Samal, P. Dubruel, *et al.* (2018) Endosomal Size and Membrane Leakiness Influence Proton Sponge-Based Rupture of Endosomal Vesicles. *ACS Nano* 12(3): 2332-2345.
- Wagner, E., C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotten, *et al.* (1992) Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17): 7934-7938.
- Wasungu, L. y D. Hoekstra (2006) Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* 116(2): 255-264.
- Whitehead, K. A., R. Langer y D. G. Anderson (2009) Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 8(2): 129-138.
- Wojnilowicz, M., A. Glab, A. Bertucci, F. Caruso, *et al.* (2019) Super-resolution Imaging of Proton Sponge-Triggered Rupture of Endosomes and Cytosolic Release of Small Interfering RNA. *ACS Nano* 13(1): 187-202.
- Wyman, T. B., F. Nicol, O. Zelphati, P. V. Scaria, *et al.* (1997) Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry* 36(10): 3008-3017.

- Xu, L., C. C. Huang, W. Huang, W. H. Tang, *et al.* (2002) Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol Cancer Ther* 1(5): 337-346.
- Xu, Y. y F. C. Szoka, Jr. (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 35(18): 5616-5623.
- Yoon, C. S., H. S. Jung, T. K. Kim, M. J. Kwon, *et al.* (2008) Comparison of the efficiency and toxicity of sonoporation with branched polyethylenimine-mediated gene transfection in various cultured cell lines. *J Drug Target* 16(10): 773-779.
- Zabner, J., A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger, *et al.* (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 270(32): 18997-19007.
- Zelphati, O. y F. C. Szoka, Jr. (1996a) Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm Res* 13(9): 1367-1372.
- Zelphati, O. y F. C. Szoka, Jr. (1996b) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11493-11498.



**Editor para correspondencia:** Dra. Ise Pascual