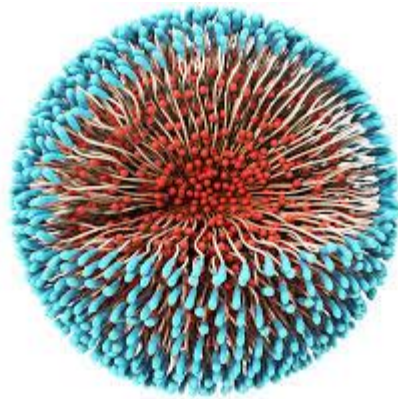




UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia



**NANOPARTÍCULAS DE PLGA EN
TERAPIA GÉNICA**

Lidia Cordón Vega



**UNIVERSIDAD DE
SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA**



**Trabajo Fin de Grado
Grado en Farmacia**

**NANOPARTÍCULAS DE PLGA EN
TERAPIA GÉNICA**

Lidia Cordón Vega

Sevilla, 20 de julio de 2021

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Tutora: Matilde Durán Lobato

Trabajo Bibliográfico

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.RESUMEN	4
2.INTRODUCCIÓN	
.....	5
3.OBJETIVOS	7
4.MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
5.1.COMPOSICIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	10
5.1.1.MATERIAL GENÉTICO	11
5.1.2.MATERIAL BASE DE LAS NANOPARTÍCULAS: POLÍMERO DE PLGA	12
5.1.2.1.CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL POLÍMERO PLGA	13
5.1.2.1.1.PROPORCIÓN LÁCTICO/GLICÓLICO (L/G)	13
5.1.2.1.2.PESO MOLECULAR Y GRUPO TERMINAL FUNCIONAL DEL POLÍMERO	14
5.1.3.PEGILACIÓN (polietilenglicoles)	14
5.1.4.EXCIPIENTES CATIONICOS.....	16
5.1.4.1.Quitosano	16
5.1.4.2.Polietilenimina (PEI)	19
5.1.4.3.DOTAP (1,2-dioleico, 3-trimetilamoniopropano).....	20
5.1.4.4.LIP (lipofectamina)	21
5.1.5.LIGANDOS APTÁMEROS	22
5.2.PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS	22
5.2.1.TAMAÑO, CARGA SUPERFICIAL Y MORFOLOGIA.....	22
5.2.2.EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN	25
5.2.3.INTEGRIDAD ESTRUCTURAL DEL MATERIAL GENÉTICO	25
6.MÉTODOS DE PRODUCCIÓN	27
7.ENFERMEDADES ESTUDIADAS PARA SU TRATAMIENTO MEDIANTE PLGA NPs COMO TERAPIA GÉNICA	31
7.1.FIBROSIS QUIÍSTICA.....	31

7.2.LESIONES PULMONARES	31
7.3.INFLAMACIÓN CRÓNICA	32
7.4.ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	33
8.CONCLUSIONES	
.....	..34
9.BIBLIOGRAFÍA	35

1. RESUMEN

En los últimos años, la terapia génica ha ido ganando cada vez más presencia en la clínica como tratamiento frente a un gran número de enfermedades, especialmente frente a aquellas que no cuentan con un tratamiento eficaz. El desarrollo de nanosistemas como vectores no virales para la administración de material genético (ADN o ARN) supuso un importante avance en este campo. Entre los nanosistemas investigados para este propósito, destacan las nanopartículas (NPs) poliméricas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (PLGA NPs), debido a su biocompatibilidad y capacidad para el transporte y transferencia de material genético hacia las células, tejidos u órganos diana. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, las PLGA NPs también presentan ciertas carencias como vectores no virales. Estos inconvenientes pueden suplirse mediante el control de sus propiedades físico-químicas, así como mediante su combinación con otros materiales. El objetivo de este trabajo de revisión ha sido el estudio del estado actual de desarrollo de las PLGA NPs como vectores no virales, con especial atención en las estrategias para la optimización de sus propiedades, los materiales incorporados en su diseño y una breve discusión de las enfermedades para las que se propone la aplicación de esta estrategia terapéutica. De los resultados obtenidos del análisis bibliográfico, destacaron: i) la selección de la estructura específica del polímero; ii) el control de diversos parámetros en los métodos de producción; iii) el empleo de polietilenglicol (PEG) para evadir el sistema inmune y prolongar el tiempo de circulación de las NPs; y iv) la incorporación de materiales catiónicos para mejorar la asociación del material genético y el escape lisosomal. Además, resultados recientes de la evaluación preclínica de esta estrategia como tratamiento para enfermedades de especial relevancia actual pusieron de manifiesto el potencial de las PLGA NPs como vector no viral de amplia aplicación.

Palabras clave: terapia génica, nanopartículas, PLGA, ADN, ARN

2. INTRODUCCIÓN

La terapia génica es el proceso por el cual se tratan enfermedades mediante transferencia de material genético a células diana, bien para modificar genes defectuosos, reemplazarlos o regular su expresión. Para ello, el material genético a transferir deberá internalizarse en la célula de interés, para posteriormente insertarse en el genoma o permanecer en el citoplasma. Uno de los objetivos principales de la terapia génica es desarrollar vehículos adecuados que transporten de manera eficiente y específica el material genético estas localizaciones (Muñoz, 2014).

Los vehículos disponibles actualmente se clasifican en sistemas virales y no virales. Aunque los sistemas virales se emplean en gran medida por su gran efectividad, presentan problemas de seguridad para uso humano, ya que pueden generar una importante respuesta inmune en el hospedador, así como oncogénesis, por lo que los sistemas no virales destacan como alternativa. (Kang et al. 2008)

En comparación con los sistemas virales, los no virales ofrecen las ventajas de presentar baja toxicidad, la respuesta inmune que inducen es reducida, y permiten un transporte específico hacia los tejidos de interés, entre otras. Sin embargo, también presentan una limitada transferencia del material genético *in vivo* en comparación a los sistemas no virales (Jagani et al. 2012).

Gran parte de los sistemas no virales se encuadrarían en el campo de la nanomedicina. La nanomedicina es el campo de la medicina que aprovecha las propiedades de los nanomateriales para superar las limitaciones de las formulaciones farmacéuticas tradicionales gracias a su pequeño tamaño, que les permite modular la interacción con las barreras biológicas del organismo, consiguiendo gracias a ello una transferencia de mayor eficacia (Soler et al. 2019). En este contexto, en el ámbito de la nanomedicina, las nanopartículas como sistemas no virales constituyen un gran campo de estudio.

Las nanopartículas son sistemas coloidales dispersos que pueden adquirir diferentes tamaños, en un rango de 1-1000 nm. Presentan diferentes propiedades en función de la naturaleza de los materiales, lo que permite modular sus características en función de su composición, principalmente su tamaño de partícula y carga superficial (Soler et al. 2019). Gracias al tamaño nanométrico que ofrecen los sistemas de transferencia, los ácidos nucleicos asociados pueden atravesar barreras fisiológicas muy restrictivas, tales

como la barrera hematoencefálica (BHE), así como escapar del sistema fagocítico mononuclear, incrementando su viabilidad.

En general, los sistemas de nanopartículas disponibles para el transporte de material genético se pueden diferenciar en dos grandes grupos: sistemas que encapsulan el material genético en su interior y sistemas que lo transportan asociado a su superficie. Estos últimos se usan en menor medida debido a que el material genético en general (ADN y ARN) es muy susceptible a la degradación enzimática y quedaría expuesto al no estar protegido en el interior del transportador (Díez, Miguéliz, Tros, 2009).

Entre las nanopartículas para la encapsulación y transferencia de material genético, destacan las nanopartículas constituidas por polímero de ácido poli (D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA). El PLGA es un material sintético hidrofóbico ampliamente usado en biomedicina como componente de nanopartículas, ya que su biocompatibilidad y biodegradabilidad ha quedado demostrada en uso clínico humano por parte de la FDA. Además, protege al material genético de la digestión enzimática por parte de las nucleasas e incrementa su vida media *in vivo* (Ding, Zhu, 2018).

El tiempo de degradación de PLGA puede variar desde días hasta años en función del peso molecular, la acidez del polímero según la proporción de los ácidos lácticos y glicólicos, y la estructura de la nanopartícula. Gracias a ello, las PLGA NPs ofrecen una liberación controlada de fármacos, incluido el material genético (Farokhzad et al, 2006). Esta liberación prolongada se traduce en una expresión sostenida de genes (Ribeiro et al, 2007), la cual cobra gran importancia como tratamiento de ciertas enfermedades.

Los polímeros de PLGA se pueden emplear como único material de síntesis de nanopartículas, pero la eficiencia de transferencia las mismas es menor que cuando se formulan en conjunto con otros materiales lipídicos (DOTAP) o poliméricos (quitosano, polietilenimina). Esto se debe a que la inclusión de estos materiales modifica características críticas de las nanopartículas y, en consecuencia, su modo de actuación en el organismo. Gracias a ello, se consiguen importantes ventajas que serán mencionadas con posterioridad.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal que se persigue en este trabajo de fin de grado es realizar un análisis del estado de la técnica de las nanopartículas de PLGA (PLGA NPs) destinadas a la terapia génica, con especial énfasis en los aspectos que han posibilitado su desarrollo y posibles estrategias de mejora para el futuro.

Para ello, se establecen los siguientes objetivos parciales:

1. Identificar qué tipo de material génico se emplea en las PLGA NPs destinadas a terapia génica
2. Identificar los componentes de las nanopartículas y las funciones que se les atribuyen
3. Analizar la estructura de las nanopartículas
4. Comparar los diferentes métodos de producción de las mismas
5. Identificar las enfermedades en las que se emplean estos nanosistemas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se ha llevado a cabo realizando una extensa revisión bibliográfica empleando principalmente la base de datos *Scopus*. Se ha accedido a la misma a través de los recursos electrónicos de la página web de la Universidad de Sevilla.

En esta búsqueda se emplearon las palabras clave: ‘‘PLGA AND nano* AND (RNA OR DNA)’’. La búsqueda se limitó a artículos experimentales, sin limitación temporal ni de idioma.

Del total de los artículos resultantes, se descartaron aquellos en los que, tras su lectura, se observó que no aludían a la encapsulación de material genético.

Finalmente, se dedicó especial atención a aquellos trabajos que incluían experimentos *in vivo*.

Esta búsqueda se llevó a cabo entre febrero y abril de 2021.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la búsqueda inicial anteriormente mencionada en *Scopus* se obtuvo un total de 708 artículos experimentales. Tras descartar aquellos que no aludían a la encapsulación de material genético en PLGA NPs, así como aquellos que no incluían estudios *in vivo*, se obtuvieron 67 artículos experimentales.

En general, puede observarse un auge de la aplicación de las PLGA NPs en terapia génica en los últimos años, reflejado en el aumento del número de artículos publicados anualmente, tal como se muestra en la **Figura 1**.

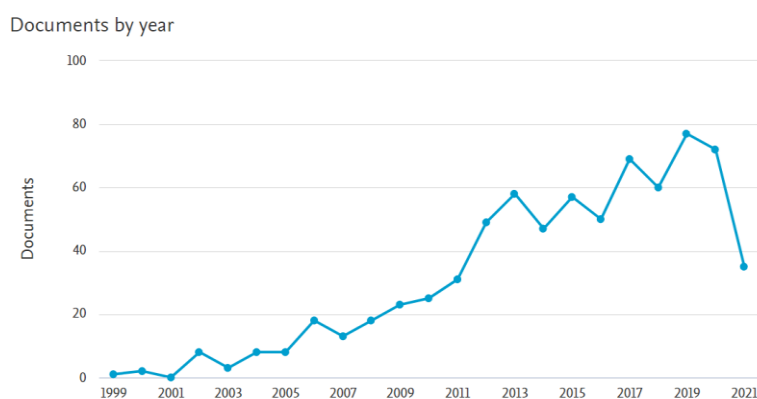


Figura 1. Evolución del número de artículos publicados que aplican PLGA NPs en terapia génica. Figura obtenida de la base de datos *Scopus*.

Del mismo modo cabe destacar que, aunque España es uno de los países que más artículos ha generado sobre este tema, el listado está encabezado por Estados Unidos junto con algunos países asiáticos.

5.1.COMPOSICIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

La encapsulación del material genético como agente terapéutico en nanosistemas de transporte tales como liposomas, nanopartículas de naturaleza polimérica o a base de materiales albuminoideos es una estrategia cada vez más empleada en terapéutica (Steinbach et al. 2012).

Un sistema de transporte ideal debe encapsular material genético con alta eficacia para minimizar la cantidad del fármaco empleado, proteger el material genético de la degradación enzimática y conseguir un transporte específico junto con una liberación sostenida (Steinbach et al. 2012).

Por otra parte, dado que uno de los requisitos fundamentales es la liberación del material genético bien en el citosol, en el caso del ARN, o bien en el núcleo, en el caso del ADN, la salida o escape del material genético de los endolisosomas es una de las barreras a superar para conseguir una transferencia genética eficiente.

En el caso concreto del ADN, debe translocarse al núcleo para ejercer su acción, y por ello se persigue que la translocación sea rápida y eficaz. Para ello, se necesita la acción de secuencias nucleares localizadoras (NLS), que constituyen una maquinaria de importación del material genético hacia el núcleo. Estas NLS, al entrar en contacto con los vectores, dan lugar a una competencia entre la tasa de disociación del complejo material genético-vector y la tasa de asociación del material genético con las NLS, que finalmente lo transportan al núcleo (Bolhassani et al, 2013).

Además, la selección de los componentes de las nanopartículas debe tener como objetivo conseguir una absorción-liberación de del material encapsulado de manera específica en las células diana, proceso conocido como *targeting*, por lo que debe perseguirse una unión específica con estas células, tejidos u órganos que desencadene la internalización del nanosistema y posterior transferencia del material genético vehiculizado (Cheng et al. 2007).

Finalmente, para conseguir uniones mediante interacciones electrostáticas entre las NPs y ligandos o estructuras biológicas de interés, se realizan modificaciones para obtener una carga superficial positiva o negativa mediante el uso de diferentes excipientes, partiendo

de la base de que las nanopartículas de PLGA presentan carga negativa en su superficie debido a los grupos ácidos del polímero (Thanki et al. 2019).

5.1.1. MATERIAL GENÉTICO

En terapia génica se emplean secuencias específicas tanto de ADN como de ARN con el fin de tratar las alteraciones genéticas de interés, conducentes a tratar múltiples afecciones tales como enfermedades infecciosas, autoinmunes, inflamatorias o cáncer, así como con el fin de incrementar la efectividad de las vacunas (Garland et al, 2019).

El principal factor a tener en cuenta en la transferencia ADN y ARN como fármacos es el hecho de que el ADN debe llegar al núcleo para cumplir con su objetivo, mientras que el ARN actúa a nivel del citoplasma.

Entre los diferentes tipos de ADN empleados destacan:

- ADN plasmídico (ADNp) de doble cadena, empleado para expresar un gen que se encuentra ausente
- ADN de cadena simple, el cual es más sensible a la degradación por las nucleasas.

Por otro lado, también se utilizan varios tipos de ARN, entre los que destacan:

- ARN mensajero (ADNm), el cual material genético de cadena simple que contiene la información necesaria para la traducción de una proteína
- ARN de interferencia (ARNi). Se trata de un ARN de doble cadena que actúa como silenciador de genes tras la transcripción (Das et al. 2014). Su uso se ha incrementado ostensiblemente en los últimos años debido a que permite inhibir genes que se expresan de manera desregulada, desencadenando determinadas enfermedades. (Domínguez 2020)
- ARNmi (micro ARN). Se trata de pequeñas moléculas de ARN no codificante capaz de modular el nivel de expresión de genes que regulan procesos celulares (Mullick et al 2016). Si el ARNmi sufre desregulación pueden producirse efectos oncogénicos (Di Ianni et al. 2019).

Los principales obstáculos a los que se enfrenta el material genético (ADN o ARN) en su transfección es la rápida degradación que sufre en la sangre al ser atacado por nucleasas,

su interacción con demás componentes de la sangre y su transporte inespecífico, entre otros (Jagan et al, 2013).

5.1.2. MATERIAL BASE DE LAS NANOPARTÍCULAS: POLÍMERO DE PLGA

Tal como se ha comentado anteriormente, el PLGA como material constitutivo de vectores no virales destaca por permitir una liberación controlada y de manera segura del material genético junto con una expresión genética sostenida.

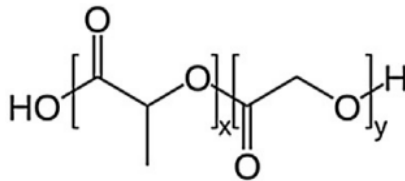


Figura 2. Fórmula química de PLGA

Este polímero ofrece ventajas adicionales tales como su alta estabilidad y biocompatibilidad y la capacidad de transferir genes (Khan et al. 2019). Además, permite su modificación química de forma relativamente fácil para unir ligandos de *targeting*, consiguiendo en consecuencia un transporte específico de genes hacia la célula, tejido u órgano diana. Además, permite el escape del material del lisosoma, paso crítico en el proceso de transfección.

En la **Figura 3**, se muestra un esquema donde NPs de PLGA modificadas con materiales adicionales son internalizadas en la célula por endocitosis, llegando al interior de los lisosomas. Posteriormente, y como consecuencia a la bajada de pH en el interior del lisosoma, la ionización de la superficie de las NPs se modifica desencadenando la rotura del lisosoma y el escape del material genético. En este caso, el material genético encapsulado, ADN, posteriormente es transportado hacia el núcleo, donde se transcribe posteriormente.

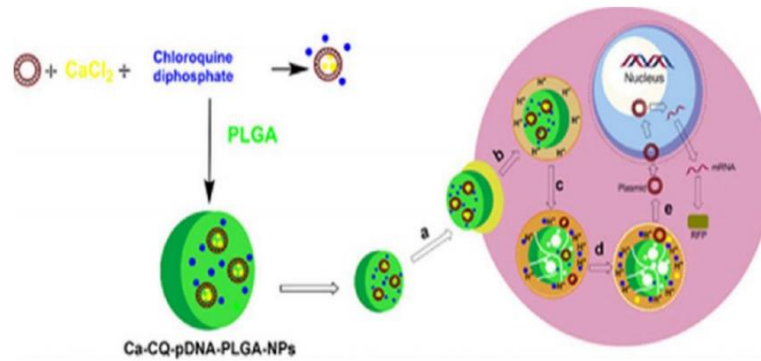


Figura 3. Esquema de formación de NPs mediante ADNp, Ca²⁺, PLGA y cloroquina y su posterior entrada en la célula, escape de lisosoma y transporte al núcleo (Yang et al. 2015).

A pesar de todas las ventajas descritas, las PLGA NPs presentan ciertos inconvenientes. Debido a su hidrofobicidad y a la carga negativa que presentan en medio acuoso, el paso de estas NPs a través de las membranas celulares se ve limitado, y en consecuencia también la entrada en las células de interés. Para ello, se procede a modificar sus propiedades superficiales mediante el empleo de materiales adicionales, que serán comentados en siguientes secciones. Otro aspecto negativo del empleo de PLGA NPs es que mediante opsonización pueden ser capturadas por el sistema inmunitario y ser eliminadas del organismo con relativa facilidad. Para evitarlo, se emplean asociaciones del polímero PLGA con compuestos que modifiquen sus propiedades superficiales y puedan así escapar del sistema inmune (SI). Dicho efecto se conseguiría empleando polietilenglicoles (PEG), estrategia que también será comentada en siguientes secciones.

5.1.2.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL POLÍMERO PLGA

5.1.2.1.1. PROPORCIÓN LÁCTICO/GLICÓLICO (L/G)

La composición del polímero es el factor más importante a la hora de determinar la degradación de las nanopartículas, así como la liberación del fármaco encapsulado. La composición del polímero PLGA se relaciona con su hidrofobicidad, grado de cristalinidad y de hidratación. El ácido poliglicólico es más hidrofílico que el ácido poliláctico debido a su grupo metilo. De este modo una mayor cantidad de ácido glicólico

conlleva una menor hidrofobicidad y por tanto mayor nivel de erosión y degradación en medios acuosos (Ding, Zhu, 2018).

5.1.2.1.2. PESO MOLECULAR Y GRUPO TERMINAL FUNCIONAL DEL POLÍMERO

La liberación de moléculas encapsuladas en PLGA NPs se ve influenciada por el peso molecular del sistema. Un peso molecular mayor implica cadenas poliméricas más grandes, que requieren más tiempo para degradarse que cadenas poliméricas pequeñas, dando lugar a una liberación más lenta (Ding, Zhu, 2018)

Por otro lado, la porción terminal del polímero también influye en la absorción de agua y por tanto en la degradación de las partículas, ya que grupos terminales hidrofílicos implican una degradación más rápida. Por ello, se emplean terminales carboxílicos que han sido modificados para evitar que se degraden antes de cumplir su objetivo en el organismo (Ding, Zhu, 2018).

5.1.3. PEGILACIÓN (polietilenglicoles)

Al igual que PLGA, los polietilenglicoles (PEG) están aprobados por la FDA y la EMA para su uso en clínica. La ventaja que ofrecen es que al emplear PLGA NPs con PEG en su superficie se enmascara la carga superficial negativa y la hidrofobicidad. De ese modo evitan ser reconocidas por el sistema fagocítico mononuclear, eludiendo la respuesta inmune del organismo ante su presencia. En consecuencia, aumenta su tiempo de circulación en sangre y, por tanto, la vida media de las mismas (Khan et al.2019). Al proceso de obtención de NPs con PEG se le denomina pegilación. Cuando estas NPs pegiladas vehiculizan material genético, el proceso de transporte y liberación controlada de genes es mucho más eficaz en comparación con NPs no pegiladas (Ali et al, 2019).

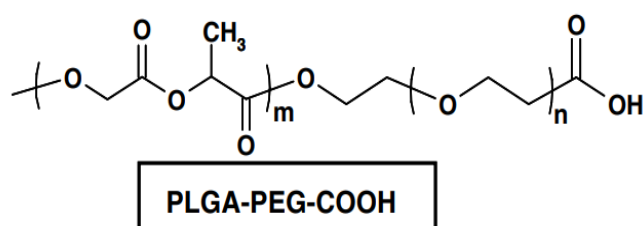


Figura 4. Polímero obtenido por la unión de PLGA y PEG (Cheng et al. 2007).

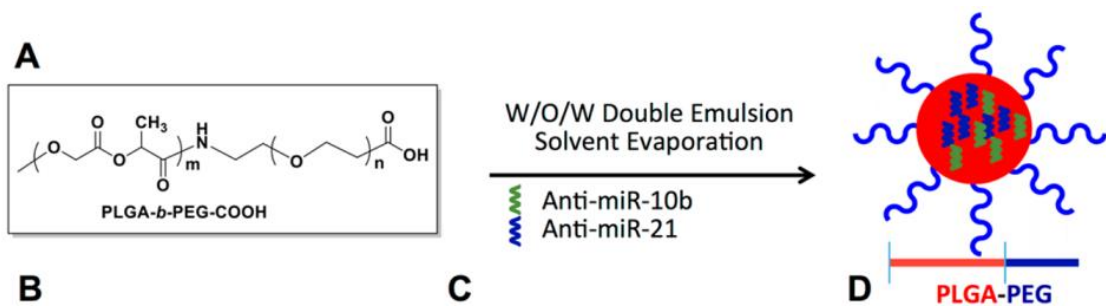


Figura 5. Resumen esquemático de la obtención de NPs de PLGA/PEG que encapsulan anti-miR. El resultado es una NP esférica compuesta del polímero PLGA que encapsula en su interior el material genético, Anti-miR, en este caso. Se recubre finalmente con PEG para modificar la carga neta de la NP (Devulapally, et al. 2015).

Devulapally et al. mostraron como NPs de PLGA/ PEG que encapsulan Anti-miR, tras su administración en células MDA-MB-231 se localizaron inicialmente en regiones periplásmicas dentro de las células y posteriormente en el citoplasma. Sin embargo, no se acumularon apenas en el núcleo.

Finalmente, comprobaron si el material genético estaba verdaderamente protegido de las nucleasas en estas formulaciones. Para ello, se incubaron las NPs con sérum de ratón y se hicieron medidas a diferentes tiempos para ver analizar la estabilidad del material genético. Los resultados obtenidos fueron favorables ya que se comprobó cómo el ARN en este caso se mantuvo protegido.

Como conclusión, se observó que el PEG contribuyó a la protección del ARN, no es tóxico y por tanto un excipiente adecuado para su uso en PLGA NPs.

5.1.4. EXCIPIENTES CATIONICOS

Son moléculas de carga positiva capaces de modificar la carga superficial negativa de las PLGA NPs mediante la formación de un complejo por interacciones electrostáticas, solucionando el inconveniente del limitado transporte de las PLGA NPs de carga negativa (Du et al, 2015).

El complejo excipientes cationicos-material genético-PLGA con carga positiva interacciona con los proteoglicanos con carga neta negativa de la superficie de las

membranas celulares, para luego traspasar las barreras fisiológicas por endocitosis. Otra propiedad relevante es que debido a la carga positiva de los excipientes catiónicos se producen interacciones electrostáticas con las cargas negativas del material genético, procedentes de los grupos fosfatos, contribuyendo a la encapsulación del mismo (Chumakova et al, 2008).

Por ultimo y no menos importante, estos materiales aportan las características idóneas para que tenga lugar el escape del endosoma y la posterior liberación del material genético en el citosol. Este efecto tiene lugar mediante la desestructuración de la membrana del endosoma ante alteraciones de pH que modifican la densidad de carga de las NPs.

Por otra parte, entre las desventajas destaca que la carga positiva que aportan a las nanopartículas induce mayor respuesta inmune (Kumar et al. 2012) y, por tanto, reducen su tiempo de vida media en el organismo.

5.1.4.1. Quitosano

Es un polímero biodegradable obtenido de la deacetilación de la quitina (polisacárido hidrofílico) que modifica la superficie de las NPs poliméricas y condensa el material genético. Con todo ello, forma complejos estables por carga electrostática útiles para la transferencia génica por su capacidad para proteger los ácidos nucleicos de las nucleasas y prevenir su eliminación de la sangre, aumentando su vida media (Bolhassani et al, 2014).

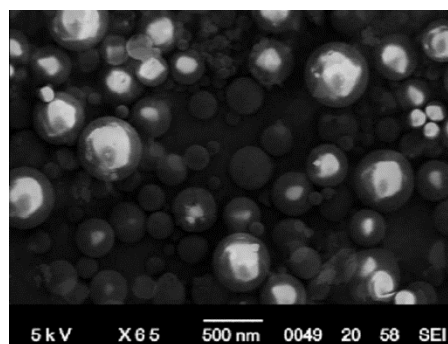


Figura 6. Imagen obtenida por microscopia electrónica de NPs de PLGA/ ARNsi/ quitosano. (Jagani et al, 2013)

Al igual que el resto de los polímeros, el complejo formado entre el material genético y el quitosano se introduce en las células mediante endocitosis. Posteriormente se disocia

el complejo en el endosoma y el material genético se libera en el citosol, que finalmente, se transloca al núcleo en el caso del ADN. La eficiencia de la transferencia genética depende de las fracciones acetiladas que presente, el grado de polimerización, la arquitectura de la cadena y las modificaciones químicas. Además, se ha comprobado que la transferencia genética es más eficiente cuando el pH es menor que 7, dado que los grupos aminos del quitosano se protonan y la interacción entre el complejo y las cargas negativas de la superficie de las células se ve favorecida (Bolhassani et al, 2014).

El principal inconveniente que presenta el uso del quitosano es su baja tasa de transferencia genética en comparación con otros compuestos de carga catiónica. Para mejorar este aspecto puede aumentarse la solubilidad del quitosano mediante modificación química, ya que este en su estructura original es insoluble a pH fisiológico. Alternativamente, pueden incorporarse ligandos (Bolhassani et al, 2014).

La incorporación de quitosano en las PLGA NPs influye igualmente en las propiedades físicoquímicas de las NPs. En estudios previos (Jagani et al, 2013) donde se estudiaron complejos de PLGA/ARNsi/quitosano se comprobó que las características físicoquímicas de las NPs varían en función de la concentración de PLGA y de quitosano.

De este modo, variando la concentración de PLGA y manteniendo las concentraciones de quitosano constantes, se llega a la conclusión de que, a mayor concentración de PLGA, mayores son el tamaño y el potencial zeta de las NPs y menor es la polidispersión.

Concentración PLGA (mg/ml)	Tamaño medio de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1	260.38 ± 12.40	0.079 ± 0.01	33.2 ± 0.72
2	272.78 ± 16.23	0.062 ± 0.01	34.9 ± 1.92
3	286.19 ± 26.62	0.076 ± 0.03	35.6 ± 0.86
4	294.26 ± 30.31	0.063 ± 0.01	33.1 ± 1.22
5	313.65 ± 19.61	0.059 ± 0.01	34.6 ± 1.81

Tabla 1. Efecto que ejerce el cambio de las concentraciones de PLGA en los parámetros físicoquímicos manteniendo constante la concentración de quitosano y demás componentes de las NPs (Jagani et al, 2013).

Del mismo modo, modificando las concentraciones de quitosano frente a concentraciones constantes de PLGA, se obtuvo la **Tabla 2**, llegando a la conclusión de que, a mayor concentración de quitosano, mayor es el tamaño de las NPs, mayor es la polidispersión e igualmente mayor es el potencial zeta.

Concentración de quitosano (mg/ml)	Tamaño medio de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
0.2	248.86 ± 22.20	0.103 ± 0.01	34.6 ± 0.91
0.4	276.66 ± 24.16	0.083 ± 0.01	36.2 ± 0.52
0.6	296.79 ± 34.32	0.146 ± 0.03	39.6 ± 1.11
0.8	322.86 ± 54.63	0.173 ± 0.01	42.9 ± 0.91
1.0	353.39 ± 25.16	0.19 ± 0.01	44.6 ± 0.91
1.5	401.33 ± 40.16	0.206 ± 0.01	45.7 ± 0.72

Tabla 2. Influencia de la concentración de quitosano en parámetros fisicoquímicos como tamaño medio, PDI y potencial zeta de las NPs. (Jagani et al, 2013).

5.1.4.2. Polietilenimina (PEI)

PEI y sus derivados son polímeros que presentan una alta densidad de carga positiva en solución acuosa. Son conocidos también como floculantes, porque interactúan muy fácilmente con moléculas cargadas negativamente como el ADN *in vivo* y lo protege de las nucleasas y otras enzimas tisulares. La PEI se encuentra disponible de forma lineal o ramificada y en una amplia variedad de pesos moleculares, y es considerada uno de los polímeros catiónicos más eficientes en transferencia de genes que (David-Naim et al 2017).

La alta eficiencia que presenta este polímero se atribuye a la presencia de una alta densidad de aminas y capacidad tamponadora, ya que la PEI a pH fisiológico se encuentra parcialmente protonada y aún más protonada a pH endosómico, causando la desestabilización del endosoma y como consecuencia un escape más rápido del endosoma (efecto de esponja de protones) (Basarkar, Singh, 2008).

Su inclusión en las PLGA NPs influye en el potencial zeta de las mismas, el cuál es indicativo de la estabilidad de la partícula y su capacidad de interacción con las membranas celulares, como anteriormente se ha comentado. Si bien el potencial zeta de los complejos PEI/ADN es muy positivo, el potencial de los complejos PEI/PLGA/ADN continua siendo positivo debido a la presencia de PEI sobre la superficie del polímero de PLGA tal y como se muestra en la **Tabla 3**(Chumakova et al, 2008).

Partícula	Potencial-Zeta (mV)
PLGA	-14.78 ± 2.54
PEI/ADN	+20.33 ± 4.52
PLGA/PEI/ADN	+13.40 ± 2.596

Tabla 3. Modificación del potencial zeta en las PLGA NPs en función de los excipientes empleados en su composición.

El inconveniente que lleva asociado su uso es su alta citotoxicidad *in vitro* e *in vivo*, debido a su naturaleza policatiónica, y a que no es biodegradable, por lo que su uso en clínica se ve restringido, si bien esta toxicidad se ve incrementada cuando se emplea como único componente. Por el contrario, cuando se incluye PEI en PLGA NPs, esta toxicidad disminuye notablemente (Jeon et al, 2012).

5.1.4.3.DOTAP (1,2-dioleico, 3-trimetilamoniopropano)

Se trata de un lípido catiónico que, al incluirlo en la matriz de PLGA, ha demostrado potenciar la transferencia genética *in vitro* (Te Boekhorst et al. 2008). Al ser un lípido catiónico tiene la capacidad de aportar carga neta positiva a la superficie de las NPs, lo que permite la interacción con las células de membrana que están cargadas negativamente.

El ADN, al presentar carga neta negativa, cuando se interpone con lípidos catiónicos como DOTAP, se une mediante interacciones electrostáticas a la nanopartícula de PLGA que contiene el lípido, la que en última instancia presenta carga neta positiva debido a su presencia. Esta carga neta neta resultante del complejo ADN-nanopartícula catiónica se ve influenciada por la ratio de ADN/ nanopartícula catiónica.

En estudios previos se prepararon complejos de ADN/ nanopartículas con carga neta negativa y otros con carga neta positiva para evaluar el efecto que tiene la carga de la superficie del complejo ADN-nanopartícula en la permeación a través de la piel *in vitro* y la respuesta inmune *in vivo* (Kumar et al, 2012). Al igual que se comentó anteriormente en relación con el quitosano, sobre la relación entre la concentración de PLGA y el tamaño de la NP, cuando se emplea como constituyente de las NPs un componente catiónico, DOTAP en este caso, se ve incrementado el tamaño y el potencial zeta de las NPs (**Figura 7**).

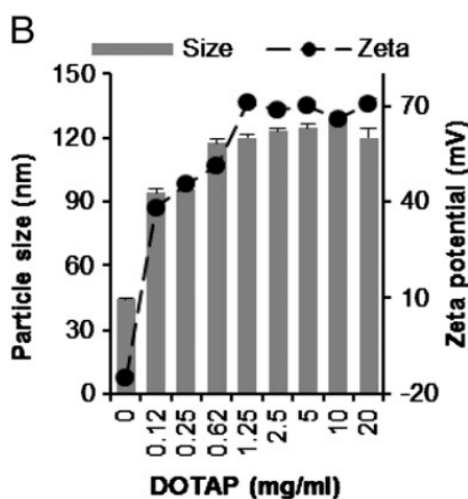


Figura 7. Relación entre la concentración de DOTAP empleado en la síntesis de NPs y el tamaño y carga que adquieren las mismas. (Kumar et al, 2012)

La **Figura 7** muestra un estudio en el que se emplearon PLGA y DOTAP como componentes de las NPs. En este caso, cuando se alcanza una concentración de DOTAP de 1 mg/ml cesa el crecimiento de las NPs, es decir, se estabiliza su tamaño. Para poder unir cantidades suficientes de ADNp a la superficie se requirió una concentración mínima de 20 mg/ml de DOTAP.

5.1.4.4.LIP (lipofectamina)

Se trata de un material en el que se alternan lípidos catiónicos y de carga neutra, que ofrecen un gran nivel de transfección de genes en comparación con las PLGA NPs que encapsulan el mismo ADNp. La LIP cambia la carga negativa de la superficie de las NPs

y esta adquiere una carga neta positiva, lo que incrementa la cantidad de material genético que asociado, además de la capacidad de permeación celular mediante el mecanismo de fusión de membrana. Además, se han conseguido mejores niveles de expresión génica al añadir LIP a la formulación de las NPs. En concreto, Kohen et al. mostraron como en estudios celulares, las PLGA NPs sin LIP presentaron una gran cantidad de ADNp fuera del núcleo, mientras que la inclusión de LIP en las mismas facilitó la salida de ADNp del endosoma y la entrada del mismo al núcleo (Kohen et al, 2000).

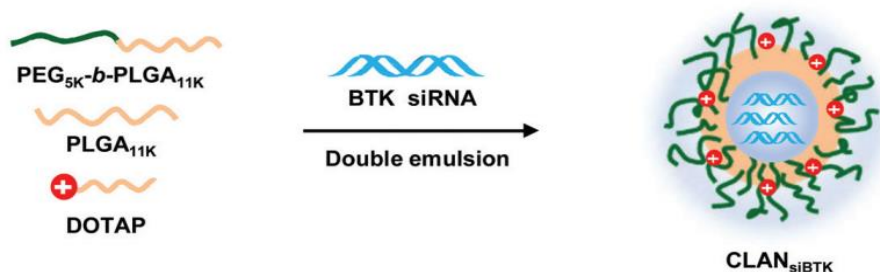


Figura 8. Ejemplo de NPs de PLGA y DOTAP y su estructura, donde se encapsula material genético en el interior de la nanopartícula (Zhao et al, 2019).

5.1.5. LIGANDOS APTÁMEROS

Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN que, mediante interacciones intramoleculares, dan lugar a una configuración terciaria capaz de unirse a las NPs de PLGA en su superficie. Como consecuencia, las NPs decoradas con aptámeros pueden conducirse hacia el órgano, tejido o célula de interés con alta afinidad y especificidad, gracias a las interacciones específicas del aptámero con su célula diana. El motivo por el que se usan estos oligonucleótidos preferentemente en comparación con otras proteínas o anticuerpos con función de *targeting* es que carecen de inmunogenicidad y son muy estables en un amplio rango de pH, temperatura y ante la presencia de disolventes orgánicos (Farokhzad et al. 2006).

5.2. PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS

5.2.1. TAMAÑO, CARGA SUPERFICIAL Y MORFOLOGIA

Las nanopartículas se caracterizan en función del tamaño de partícula, el índice de polidispersión y el potencial zeta (Menon et al, 2014), los cuáles determinan su comportamiento en el organismo.

El tamaño ideal de las PLGA NPs destinadas a terapia génica se encuadra dentro del margen de 100-150 nm (Mullick et al. 2016).

Los parámetros a controlar en la producción de las NPs, que influyen en el tamaño de partícula a obtener incluyen:

- **Concentración del polímero.** La concentración de polímero utilizado en la producción de las PLGA NPs afecta de forma notable el tamaño a obtener, de modo a menor concentración del polímero menor es el tamaño de las NPs obtenidas. Esto puede observarse en la **Figura 9**, donde se compara el tamaño de las PLGA NPs obtenidas en función de la concentración de PLGA empleada en su preparación (Kumar et al, 2012).

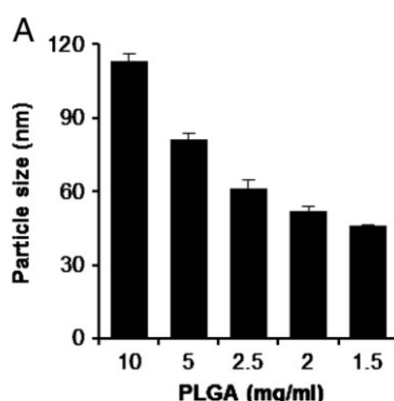


Figura 9. Relación entre la concentración de PLGA empleada en la producción de las NPs y el tamaño obtenido (Kumar et al, 2012).

- **Encapsulación del fármaco**, en este caso, material genético. A mayor cantidad de material encapsulado, mayor tamaño de nanopartícula se obtiene. Dado que tanto una encapsulación alta como un tamaño de partícula pequeño son características deseables, debe establecerse un equilibrio entre ambos parámetros a la hora de diseñar las NPs.

- **Miscibilidad acuosa del disolvente.** La elección de un disolvente miscible o no con el agua viene determinada por el método de obtención que se va a aplicar. En el caso de la nanoprecipitación, que será comentada en secciones posteriores, donde se emplea un disolvente miscible con el agua, a mayor miscibilidad menor será el tamaño de partícula obtenido. En este caso, la acetona suele ser el solvente de elección. Por el contrario, en el caso de la emulsión-evaporación de solvente, que igualmente será comentada en secciones posteriores, debe emplearse un solvente no miscible con el agua. En este caso, el diclorometano suele ser el solvente de elección, y las NPs resultantes suelen presentar tamaños mayores que las obtenidas por nanoprecipitación.

En relación con el potencial zeta, las PLGA NPs presentan un potencial zeta negativo debido a los grupos ácidos de la estructura del polímero. Esta carga potencial, tal como se ha comentado anteriormente, supone ciertas limitaciones para el comportamiento de las NPs. Por ello, se han desarrollado estrategias para su modificación, principalmente la inclusión de materiales de carga catiónica o neutra, que serán comentados en secciones posteriores. (Chumakova et al. 2008).

En cuanto a la morfología de estas NPs, los métodos que se utilizan para su producción conducen a la obtención de nanopartículas esféricas tal y como se muestran en la **figura 10** y **figura 11**.

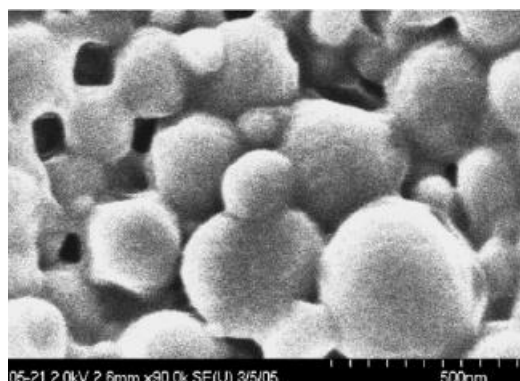


Figura 10. Imagen de PLGA NPs esféricas obtenidas por microscopía electrónica (SEM) (Chumakova et al. 2008).

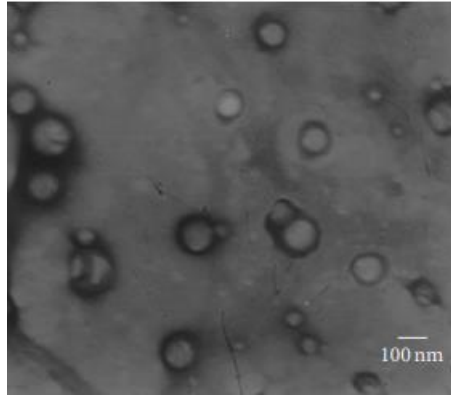


Figura 11. Imagen de PLGA NPs que encapsulan ADN obtenida por microscopía electrónica de transmisión (Kong et al. 2011).

5.2.2. EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

La eficacia de la encapsulación (EE%) es un parámetro que cuantifica la cantidad de material genético encapsulado en las NPs con respecto a la cantidad total de material genético inicialmente empleado en su elaboración (Menon et al. 2014).

Conseguir una buena eficiencia de encapsulación es crítico para así llevar hasta la diana terapéutica la máxima cantidad de fármaco posible. Para ello se ha investigado cómo mejorar este parámetro y cómo varía en función de los excipientes que se emplean en la formulación de las NPs.

El estudio llevado a cabo por Cohen et al., en el que las nanopartículas de PLGA encapsulan ADNp, se demostró que al añadir calcio a la superficie externa se consigue una eficacia de encapsulación del 70% mientras que, en su ausencia, la eficacia solo es del 28% (Cohen et al, 2000). Esto es debido a que el calcio, al presentar carga positiva, establece interacciones electrostáticas con las cargas negativas de los grupos fosfatos del material genético.

Esta observación resalta que la eficacia de encapsulación difiere según los excipientes empleados, principalmente debido a la modificación de la carga negativa de las PLGA NPs, mejorando la capacidad para asociar ácidos nucleicos. Tal y como se ha comprobado, a mayor carga positiva presente en las NPs debido al uso de excipientes catiónicos, mayor será la capacidad de encapsulación.

También es importante destacar que el método de obtención interfiere en este parámetro, y, aunque existan varios métodos que prometan características mejoradas, sigue siendo el método *double emulsion solvent evaporation technique* (DESE) el más empleado, el cuál será comentado más adelante.

5.2.3. INTEGRIDAD ESTRUCTURAL DEL MATERIAL GENÉTICO

El material genético que es encapsulado en nanopartículas puede sufrir alteraciones durante el proceso de producción de las mismas. Para determinar la pureza y la integridad estructural del material encapsulado, el material genético se analiza por electroforesis en gel antes y después de la encapsulación.

Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Kumar et al. donde se extrajo ADNp de las PLGA NPs tras incubación en presencia de enzimas, y se analizó posteriormente por electroforesis en gel de agarosa tal y como se ha comentado con anterioridad. Los resultados pueden observarse en la **Figura 12**:

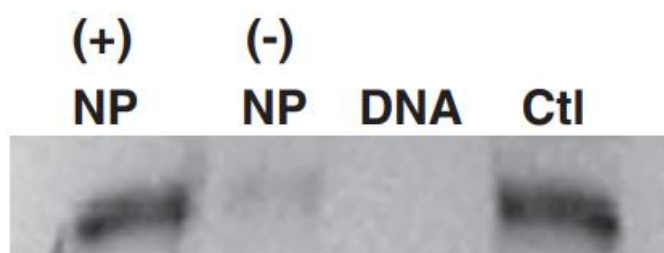


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la digestión enzimática que sufre ADNp libre y encapsulado en NPs (Kumar et al, 2012).

En ella se muestra como el ADNp encapsulado en NPs permaneció estable tras la encapsulación en las NPs, así como tras la digestión enzimática, mientras que el mismo material genético sin encapsular se degrada completamente.

6. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

El principal método de obtención de NPs de PLGA cargadas con material genético es el método de evaporación *double emulsion solvent evaporation technique* (DESE) (Ben et al. 2017).

Mediante este proceso, el material genético correspondiente, que se encuentra en disolución con agua desionizada, se mezcla gota a gota con una solución al 3% p/v de PLGA que previamente ha sido disuelto en diclorometano (DCM). La mezcla resultante se sonificada en un baño de hielo para así obtener la primera emulsión.

Posteriormente se le añade una solución acuosa de alcohol polivinílico al 5% p/v para dar lugar a una segunda emulsión a temperatura ambiente que después permita la evaporación del disolvente a bajas presiones.

Para finalizar el proceso, las nanopartículas se purifican y recuperan mediante ultracentrifugación, y se lavan 3 veces con agua desionizada para quitar los restos de PVA. El material genético queda atrapado en las nanopartículas, que se suelen resuspender en manitol al 2% p/v y liofilizarse para conservarlas hasta su uso (Ben et al, 2017).

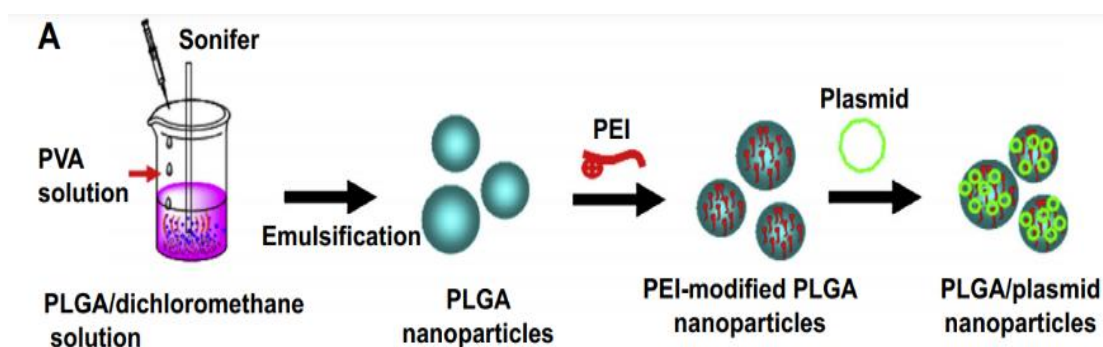


Figura 13. Representación gráfica de la obtención de PLGA NPs que encapsulan plásmidos como material genético. (Zhou et al, 2013).

Como alternativa al método tradicional, se desarrolló una modificación del mismo, el método *double solution solvent diffusion* (DESD) (Ben et al. 2017). El proceso sigue las mismas etapas que el DESE, pero se diferencia en que en el método DESDE el disolvente orgánico en el que se disuelve el polímero es miscible o parcialmente miscible con la solución acuosa, lo que permite su difusión en lugar de emulsificación. Gracias a ello se

pueden obtener NPs de un tamaño menor de 200 nm. Debido a su menor tamaño, para finalizar el proceso, las NPs en este caso se purifican y recuperan mediante ultrafiltración.

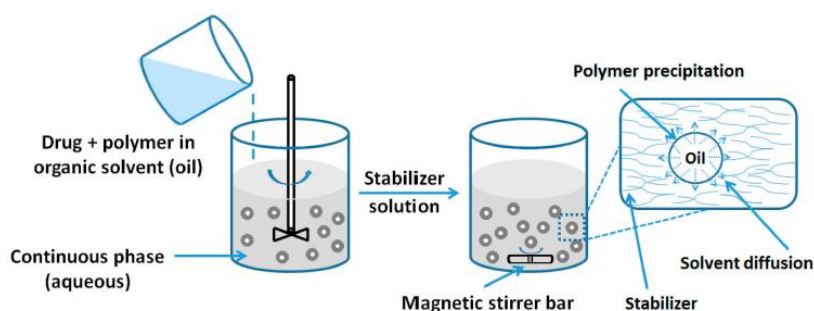


Figura 14. Representación del método de obtención de PLGA NPs por el método DESD. En este caso se emplea un solvente orgánico que es parcialmente miscible en agua para disolver el fármaco (material genético en este caso). Tras mezclarlo con la fase acuosa se le añade una solución estabilizadora y finalmente se alcanza la difusión del solvente y la precipitación del polímero (Wang et al.2016).

Las características fisicoquímicas de las NP obtenidas por ambos métodos difieren entre sí. Para ilustrarlo, se presenta la **Tabla 4** con los valores de varios parámetros.

Método	Tamaño (nm)		Carga superficial (mV)	
	DESD	DESE	DESD	DESE
NPs vacías	186.4 ± 6.2	358.1 ± 32.6	-1.28 ± 0.3	2.0 ± 0,1
NPs siOPN	167.7 ± 2.2	320.6 ± 66.9	-1.26 ± 0.4	-2.8 ± 0.1
NPs siNSO	165.3 ± 18.8	295.7 ± 71.8	-1.3 ± 0.1	-2.8 ± 0.2

Tabla 4. Comparación de valores de varios parámetros fisicoquímicos de NPs de PLGA obtenidas por los métodos DESE y DESD. NPs siOPN son NPs que encapsulan ARNsi contra osteopontina. Contienen un ligando, OPN, que se une a glicoproteínas que dan lugar a proliferación celular cancerosa. NPs siNSO son NPs que encapsulan una secuencia de oligonucleótidos sin sentido (siNSO) (Ben et al. 2017)

Entre los resultados, cabe destacar la diferencia de tamaño, mucho menor en las NPs obtenidas por el método DESD en comparación con el método DESE, lo que las hace más adecuadas para su uso sistémico. Los valores de potencial zeta rondan entorno a la neutralidad y son similares entre sí.

Por último, cabe mencionar que las NPs obtenidas por ambos métodos permanecen estables durante un largo periodo de tiempo, manteniendo intactas las características esenciales como su forma, tamaño o la integridad tanto de la NP en si como del material genético. Esto las hace favorables para su uso en terapéutica (Ben et al. 2017). Sin embargo, es el método DESE sigue siendo más empleado para la síntesis de NPs.

Con el fin de solventar otras deficiencias del método DESE, se desarrolló la técnica de nanoprecipitación, en la cual no se requiere tanta energía para conseguir un tamaño de partícula pequeño (Niu et al. 2009) Debe tenerse en cuenta que esta técnica está más indicada para fármacos hidrofóbicos que son solubles en etanol o acetona y por tanto tienen baja solubilidad en agua, estando más limitada en el caso de fármacos hidrofílicos como es el material genético.

Para elaborar PLGA NPs por nanoprecipitación, se disuelve PLGA en dimetilsulfóxido (DMSO). A continuación, la solución resultante se inyecta poco a poco en una solución acuosa de Pluronic F127 bajo y se mantiene de este modo durante 5 horas a temperatura ambiente. Las PLGA NPs se forman de forma inmediata, cargadas con el material genético. Posteriormente se someten a un centrifugado durante 30 minutos y se resuspenden en una solución tampón salina. Por último, y al igual que se procedía con la DESD, las NPs se purifican y recuperan mediante ultrafiltración haciéndolas pasar por una membrana con un tamaño de poro determinado. También al igual que en el método DESD, se emplea la ultrafiltración porque se consigue un tamaño de NPs muy reducido no recuperable por centrifugación.

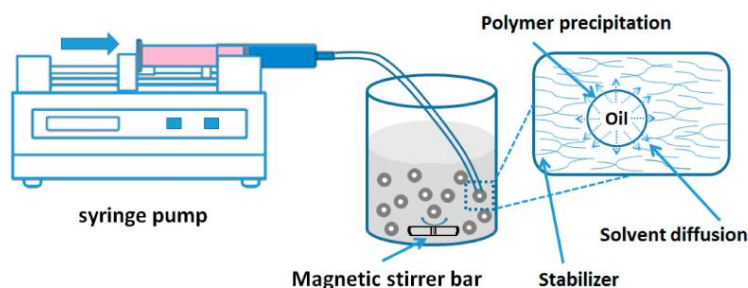


Figura 15. Método de obtención de PLGA NPs mediante nanoprecipitación (Wang et al. 2016). En este caso mediante una bomba de jeringa (syringe pump) se inyecta el fármaco en la solución acuosa y se obtienen las PLGA NPs por nanoprecipitación, y por tanto, no se da una emulsión.

Como comparación, cabe comentar que hay ciertos parámetros que se mejoran al aplicar la técnica de nanoprecipitación. En la **Tabla 5** se aprecian las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de PLGA NPs cuando se obtienen por ambos métodos. Las NPs obtenidas por nanoprecipitación presentan menor tamaño de partícula y una eficiencia de encapsulación del material genético mayor que aquellas sintetizadas por DESD. La polidispersión es relativamente baja para las NPs obtenidas por ambos métodos.

En cuanto a la carga superficial, ambas presentan una carga negativa, debido a la carga negativa que proporciona el polímero PLGA (Niu et al, 2019).

Nanopartículas preparadas por diferentes métodos	Tamaño medio de partícula (nm)	Índice de polidispersión	Potencial Zeta (mV)	Eficacia de encapsulación (%)
Método de nanoprecipitación	197 ± 4,2	0,003 ± 0,002	-12,6 ± 0,9	97,6 ± 0,7
Método DESD	260,5 ± 6,3	0,07 ± 0,003	-10,8 ± 0,9	65,3 ± 0,8

Tabla 5. Diferencias existentes entre las características fisicoquímicas de las nanopartículas obtenidas por el método de nanoprecipitación y el método DESD.

7. ENFERMEDADES ESTUDIADAS PARA SU TRATAMIENTO MEDIANTE PLGA NPs COMO TERAPIA GÉNICA

7.1. FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica-recesiva causada por mutaciones que afectan a más de 80000 personas en el mundo. Las mutaciones se dan en los genes que codifican el mecanismo que regula la conductancia transmembrana (CFTR), causando alteraciones de las secreciones aniónicas junto con una hiperabsorción de sodio a través del epitelio (Ashiqul et al. 2018).

La terapia génica resulta prometedora como tratamiento para esta enfermedad. En este caso, las investigaciones se han enfocado en el desarrollo de vectores que transporten el gen CFTR funcional para su transfección. Debido a la potencial toxicidad de los vectores virales, anteriormente comentada, estudios recientes se han enfocado en el desarrollo de vectores no virales para este propósito.

Estos vectores consisten en complejos formados entre el polímero PLGA y quitosano que encapsulan el material genético, ARNm modificado (ARNcm) del gen CFTR. Ashiqul et al. analizaron los efectos resultantes de administrar las NPs resultantes, tanto por vía intravenosa como por vía intratraqueal, en ratones cuyos pulmones carecían del mecanismo regulador (CFTR).

Los resultados obtenidos tras cuantificar la expresión de hCFTR mediante la técnica ELISA fueron varios. Entre ellos destacaron la reducción de los niveles de secreción clorhídrica, el restablecimiento de los parámetros de funcionamiento pulmonar y, lo más importante, la reducción de la morbimortalidad de los animales al mejorar la tasa de volumen espiratorio forzado (FEV) (Ashiqul et al. 2018).

7.2. LESIONES PULMONARES

La lesión pulmonar aguda es una patología que puede estar causada por inflamación o por fumar, que de no ser tratada puede desembocar en un síndrome con alta tasas de morbilidad y mortalidad. En 2016, según Menon et al. Las NPs poliméricas ya se consideraban buenos vectores para el transporte de agentes biológicos a los pulmones

debido a la facilidad de modificar su superficie y a que evitaban una acción sistémica. En 2019, se emplearon específicamente como tratamiento de la lesión pulmonar aguda. (Menon et al. 2014).

Se estableció la hipótesis de que al aumentar la expresión controlada de los receptores de eritropoyetina pulmonares (EpoR) se protegerían a los pulmones de sufrir lesiones. Por ello, se diseñaron PLGA NPs para transportar EpoR ADNc hasta los pulmones por vía inhalatoria. Fueron obtenidas por el método DESE.

Los resultados de la administración de estas NPs en un modelo de daño pulmonar en ratas, 21 días después tras su aplicación, fueron un aumento de la expresión de EpoR pulmonar y, en consecuencia, la disminución del daño pulmonar. Además, dicho aumento de EpoR activó la vía convencional de señalización de EpoR, disminuyendo la hiperoxia que induce a apoptosis, así como el daño por estrés oxidativo del ADN, proteínas y lípidos, mejorando el edema tisular y manteniendo la morfología alveolar. En conclusión, esta propuesta de PLGA NPs para la expresión de EpoR se podría considerar una estrategia prometedora para tratar lesiones pulmonares (Ravikumar et al. 2016).

7.3. INFLAMACIÓN CRÓNICA

La inflamación aparece como un acto de defensa del organismo frente a situaciones adversas como un daño tisular, una infección o una respuesta autoinmune, con el fin de eliminar los estímulos que causan daños al organismo. Si no se logra controlar la inflamación aguda, puede dar paso a situaciones de inflamación crónica (Aldayel et al. 2016).

La inflamación crónica cursa con la fabricación y liberación constante de mediadores de la inflamación, como son TNF-alfa, IL-1, IL-2. De todos los mediadores implicados, el TNF-alfa juega un papel clave en el proceso, por lo que el uso anticuerpos anti-TNFalfa se ha mostrado eficaz como tratamiento frente procesos de inflamación crónica.

Basándose en ello, se diseñaron PLGA NPs encapsulando TNFalfa ARNsi por el método habitual de la doble emulsión, empleando PEG como agente emulsificante, y consiguiendo así la obtención de NPs pegiladas (Aldayel et al. 2016). Debe destacarse que, en este caso, el PEG se desprende de las NPs ante valores de pH bajos, en concreto

aquellas zonas del organismo que presentan inflamación crónica. Como consecuencia, el TNF-alfa ARNsi encapsulado en las NPs es transportado con rapidez al lugar que sufre la inflamación crónica evadiendo la opsonización de las nanopartículas por parte del sistema inmune.

Estudios realizados en pie de conejo inflamado mostraron esta acumulación selectiva de PLGA NPs con TNFalfa-ARNsi en la zona inflamada y la disminución de mediadores proinflamatorios en la misma, siendo esto un resultado de gran interés para el desarrollo de estrategias basadas en la actividad del TNF-alfa en procesos de inflamación crónica (Aldayel et al. 2016).

7.4. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La enfermedad inflamatoria intestinal (*Intestinal Bowel Disease*, IBD) es una patología que cursa con la inflamación crónica e inespecífica del tracto gastrointestinal debido a un desequilibrio en la mucosa intestinal. En ella se incluye tanto la colitis ulcerosa (UC) como la enfermedad de Crohn (CD). A pesar de todos los fármacos que están en investigación, la única cura completa de la colitis ulcerosa es la extirpación del colon (Bao et al. 2021).

Se ha demostrado la relación de esta enfermedad con el gen SNX10, que interviene en numerosos procesos fisiológicos, ya que en ratones que presentan inhibido dicho gen, la evolución de la enfermedad se ve inhibida igualmente (Bao et al. 2021). Por ello, una estrategia terapéutica interesante sería conseguir la delección del mismo.

Por otra parte, sería conveniente un tratamiento vía oral, lo que conlleva tener en cuenta la gran susceptibilidad de los ácidos nucleicos frente a nucleasas, debido a lo cual pocos tratamientos basados en terapia génica emplean esta ruta de administración.

Estas limitaciones pueden solventarse con NPs. En concreto, Bao et al. propusieron PLGA NPs para la encapsulación de ARN SNX10, con intención proteger el material genético de la degradación enzimática y posibilitar su transfección. Tras testarlas en un modelo animal de la enfermedad, en ratones, consiguieron disminuir los síntomas, concluyendo que las NPs diseñadas podrían ser una opción prometedora para el tratamiento de la IBD (Bao et al. 2021).

8. CONCLUSIONES

Tras el análisis bibliográfico presentado, se llegó a las siguientes conclusiones:

-Los vectores no virales son los más empleados actualmente en terapia génica debido a que los vectores virales presentan mayor toxicidad.

-Entre los sistemas no virales, destacan las PLGA NPs por estar constituidas por un material biocompatible y biodegradable aprobado por la FDA, además de por sus propiedades ventajosas para transfectar material genético.

-Las propiedades físicoquímicas de estas NPs pueden modularse para conseguir las características deseadas, mediante la selección de la estructura química específica del polímero, el método de producción, y la modificación de varios parámetros en el mismo.

-Además, la inclusión de otros materiales que modifiquen las propiedades de estas nanopartículas permite mejorar varios aspectos de especial relevancia para la liberación y transfección del material encapsulado.

-Entre estas modificaciones, el empleo de PEG o pegilación permite modificar la superficie de las NPs, que pasa a adquirir carga neutra y carácter hidrofílico, con el fin de escapar al SI y permanecer más tiempo en el organismo.

-Por otro lado, la inclusión de excipientes catiónicos, tales como quitosano, DOTAP y LIP, permiten aumentar la encapsulación del material genético y facilitar la entrada de las NPs en las células y el escape de los lisosomas.

-Finalmente, la unión de aptámeros en la superficie de estas NPs permite un transporte específico de las mismas hasta las células diana.

-Por todo ello, en los últimos años se han propuesto estrategias de tratamiento basadas en terapia génica con PLGA NPs frente a diversas enfermedades de especial relevancia y sin tratamiento eficaz disponible a día de hoy.

Como conclusión final, la terapia génica con PLGA NPs supone una estrategia prometedora para el tratamiento de enfermedades con necesidad de alternativas terapéuticas, y un campo de investigación en activo y de creciente interés del que pueden esperarse importantes avances.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aldayel AM, Naguib YW, O'Mary HL, Li X, Niu M, Ruwona TB, et al. Acid-Sensitive Sheddable PEGylated PLGA Nanoparticles Increase the Delivery of TNF- α siRNA in Chronic Inflammation Sites. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2016;5(May):340.
- Ali A, Alanazi AM, Jabeen M, Chauhan A, Azam M. Therapeutic potential of functionalized siRNA nanoparticles on regression of liver cancer in experimental mice. *Scientific reports*. 2019; 9:15825.
- Bao WL, Wu Q, Hu B, Sun D, Zhao S, Shen X, et al. Oral nanoparticles of snx10-shrna plasmids ameliorate mouse colitis. *Int J Nanomedicine*. 2021; 16:345–7.
- Basarkar A, Singh J. Poly (lactide-co-glycolide)-polymethacrylate nanoparticles for intramuscular delivery of plasmid encoding interleukin-10 to prevent autoimmune diabetes in mice. *Pharm Res*. 2009;26(1):72–81.
- Ben David-Naim M, Grad E, Aizik G, Nordling-David MM, Moshel O, Granot Z, et al. Polymeric nanoparticles of siRNA prepared by a double-emulsion solvent-diffusion technique: Physicochemical properties, toxicity, biodistribution and efficacy in a mammary carcinoma mice model. *Biomaterials* [Internet]. 2017;145: 154–67.
- Ben-David-Naim M, Dagan A, Grad E, Aizik G, Nordling-David MM, Clyne AM, et al. Targeted siRNA nanoparticles for mammary carcinoma therapy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4):1–18.
- Bolhassani A, Javanzad S, Saleh T, Hashemi M, Reza Aghasadegh M, Mehdi Sadat S. Polymeric nanoparticles Potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014; 10 (2): 321–332; Landes Bioscience
- Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2007;28(5):869–76.

- Chumakova O V., Liopo A V., Andreev VG, Cicenaitė I, Evers BM, Chakrabarty S, et al. Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasound-mediated gene delivery in solid tumors in vivo. *Cancer Lett.* 2008;261(2):215–25.
- Cohen H, Levy RJ, Gao J, Fishbein I, Kousaev V, Sosnowski S, et al. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther.* 2000;7(22):1896–905.
- Das J, Das S, Paul A, Samadder A, Bhattacharyya SS, Khuda-Bukhsh AR. Assessment of drug delivery and anticancer potentials of nanoparticles-loaded siRNA targeting STAT3 in lung cancer, in vitro and in vivo. *Toxicol Lett* [Internet]. 2014;225(3):454–66.
- Devulapally R, Sekar NM, Sekar T V., Foygel K, Massoud TF, Willmann JK, et al. Polymer nanoparticles mediated codelivery of AntimiR-10b and AntimiR-21 for achieving triple negative breast cancer therapy. *ACS Nano.* 2015;9(3):2290–302.
- Díez S, Miguélez I, De Ilarduya CT. Targeted cationic poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for gene delivery to cultured cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2009;14(2):347–62
- Di Ianni T, Bose RJC, Sukumar UK, Bachawal S, Wang H, Telichko A, et al. Ultrasound/microbubble-mediated targeted delivery of anticancer microRNA-loaded nanoparticles to deep tissues in pigs. *J Control Release.* 2019;309(February):1–10.
- Domínguez García R. Director TFG: Matilde Durán Lobato. Defendido en Sevilla, 16 de septiembre de 2020. Facultad de Farmacia; Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
- Ding D, Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2018;92(December 2017):1041–60.
- Du L, Li B, Xu X, Sun B, Pang F, Wen L, et al. Adsorption of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus DNA vaccine candidate onto biodegradable nanoparticles improves immunogenicity in mice. *Arch Virol.* 2015;160(6):1543–7.

- Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(16):6315–20.
- Garland KM, Sevimli S, Kilchrist K V., Duvall CL, Cook RS, Wilson JT. Microparticle Depots for Controlled and Sustained Release of Endosomolytic Nanoparticles. *Cell Mol Bioeng*. 2019;12(5):429–42.
- Jagani HV, Josyula VR, Palanimuthu VR, Hariharapura RC, Gang SS. Improvement of therapeutic efficacy of PLGA nanoformulation of siRNA targeting anti-apoptotic Bcl-2 through chitosan coating. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2013;48(4–5):611–8.
- Jeon SY, Park JS, Yang HN, Woo DG, Park KH. Co-delivery of SOX9 genes and anti-Cbfa-1 siRNA coated onto PLGA nanoparticles for chondrogenesis of human MSCs. *Biomaterials* [Internet]. 2012;33(17):4413–23.
- Kang SW, Lim HW, Seo SW, Jeon O, Lee M, Kim BS. Nanosphere-mediated delivery of vascular endothelial growth factor gene for therapeutic angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Biomaterials*. 2008;29(8):1109–17.
- Khan AA, Alanazi AM, Jabeen M, Chauhan A, Ansari MA. Therapeutic potential of functionalized siRNA nanoparticles on regression of liver cancer in experimental mice. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–16.
- Kumar A, Wonganan P, Sandoval MA, Li X, Zhu S, Cui Z. Microneedle-mediated transcutaneous immunization with plasmid DNA coated on cationic PLGA nanoparticles. *J Control Release* [Internet]. 2012;163(2):230–9.
- Kong F, Ge L, Liu X, Huang N, Zhou F. Mannan-Modified PLGA Nanoparticles for Targeted Gene Delivery. *International Journal of Photoenergy*. 2011; vol 2012. Article ID 926754, 7 pages
- Menon JU, Ravikumar P, Pise A, Gyawali D, Hsia CCW, Nguyen KT. Polymeric nanoparticles for pulmonary protein and DNA delivery. *Acta Biomater* [Internet]. 2014;10(6):2643–52.
- Mullick Chowdhury S, Wang TY, Bachawal S, Devulapally R, Choe JW, Abou Elkacem L, et al. Ultrasound-guided therapeutic modulation of hepatocellular

- carcinoma using complementary microRNAs. *J Control Release*. 2016;238:272–80.
- Niu X, Zou W, Liu C, Zhang N, Fu C. Modified nanoprecipitation method to fabricate DNA-loaded PLGA nanoparticles modified nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm*. 2009;35(11):1375–83.
 - Ravikumar P, Menon JU, Punnakitikashem P, Gyawali D, Togao O, Takahashi M, et al. Nanoparticle facilitated inhalational delivery of erythropoietin receptor cDNA protects against hyperoxic lung injury. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med [Internet]*. 2016;12(3):811–21.
 - Ribeiro S, Rijpkema SG, Durrani Z, Florence AT. PLGA-dendron nanoparticles enhance immunogenicity but not lethal antibody production of a DNA vaccine against anthrax in mice. *Int J Pharm*. 2007;331(2):228–32.
 - Shen X, Li T, Chen Z, Geng Y, Xie X, Li S, et al. Luminescent/magnetic PLGA-based hybrid nanocomposites: a smart nanocarrier system for targeted codelivery and dual-modality imaging in cancer theranostics. *Int J Nanomedicine [Internet]*. 2017 Jun 6 [cited 2021 Mar 29]; Volume 12:4299–322.
 - Soler Besumbes E, Fornaguera C, Monge M, García-Celma MJ, Carrión J, Solans C, et al. PLGA cationic nanoparticles, obtained from nano-emulsion templating, as potential DNA vaccines. *Eur Polym J [Internet]*. 2019;120(June):109229.
 - Steinbach JM, Weller CE, Booth CJ, Saltzman WM. Polymer nanoparticles encapsulating siRNA for treatment of HSV-2 genital infection. *J Control Release [Internet]*. 2012;162(1):102–10.
 - Te Boekhorst BCM, Jensen LB, Colombo S, Varkouhi AK, Schiffelers RM, Lammers T, et al. MRI-assessed therapeutic effects of locally administered PLGA nanoparticles loaded with anti-inflammatory siRNA in a murine arthritis model. *J Control Release [Internet]*. 2012;161(3):772–80.
 - Thanki K, van Eetvelde D, Geyer A, Fraire J, Hendrix R, Van Eygen H, et al. Mechanistic profiling of the release kinetics of siRNA from lipidoid-polymer hybrid nanoparticles in vitro and in vivo after pulmonary administration. *J Control Release [Internet]*. 2019;310(April):82–93.

- Wang, Y., Li, P., Truong-Dinh Tran, T., Zhang, J., & Kong, L. (2016). Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. *Nanomaterials*, 6(2), 26.). A review of recent progress in drug and protein encapsulation: Approaches, applications and challenges. *Materials Science and Engineering: C*, 83, 233-246
- Yang C, Hu T, Cao H, Zhang L, Zhou P, He G, et al. Facile construction of chloroquine containing PLGA-based pDNA delivery system for efficient tumor and pancreatitis targeting in vitro and in vivo. *Mol Pharm*. 2015;12(6):2167–79.
- Yi F, Wu H, Jia GL. Formulation and characterization of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle containing vascular endothelial growth factor for gene delivery. *J Clin Pharm Ther*. 2006;31(1):43–8.
- Zhao G, Liu A, Zhang Y, Zuo ZQ, Cao ZT, Zhang HB, et al. Nanoparticle-delivered siRNA targeting Bruton's tyrosine kinase for rheumatoid arthritis therapy. *Biomater Sci*. 2019;7(11):4698–707.
- Zhou Y, Zhang L, Zhao W, Wu Y, Zhu C, Yang Y. Nanoparticle-mediated delivery of TGF- β 1 miRNA plasmid for preventing flexor tendon adhesion formation. *Biomaterials* [Internet]. 2013;34(33):8269–78.