

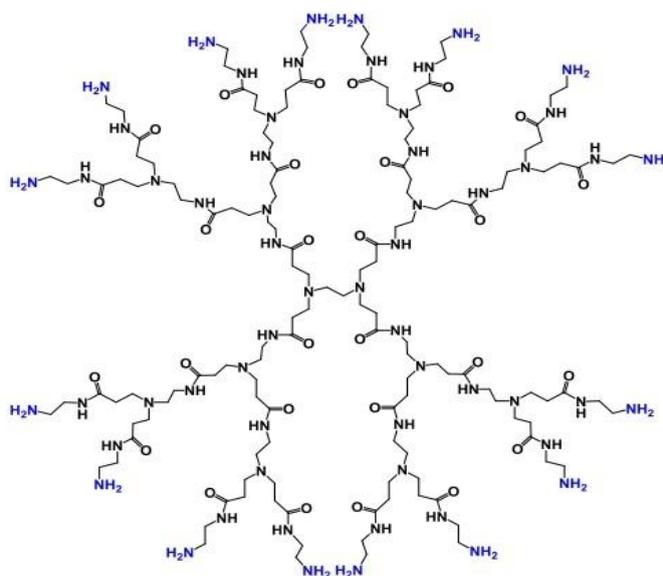


Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

TRABAJO FIN DE GRADO

NUEVAS APLICACIONES DE LOS DENDRÍMEROS EN EL CAMPO DE LA BIOMEDICINA



Macarena García Rivas



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia
Grado en Farmacia
Departamento de Química Física
Tutor: Elia María Grueso Molina

TRABAJO FIN DE GRADO
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

NUEVAS APLICACIONES DE LOS DENDRÍMEROS
EN EL CAMPO DE LA BIOMEDICINA

Macarena García Rivas
Sevilla, Febrero 2018

RESUMEN

Los dendrímeros son un tipo de macromoléculas poliméricas de tamaño nanométrico que constituyen la cuarta clase de las arquitecturas poliméricas y tienen cabida en el ámbito de la nanotecnología aplicada a la medicina. Se caracterizan por presentar una estructura muy bien definida, con baja polidispersidad y un exterior multivalente con posibilidad de funcionalización base de la interacción con multitud de especies. Sin embargo, lo más destacable es el elevado control que se posee sobre el diseño estructural, lo cual aporta versatilidad y gran potencialidad en diversos campos de aplicación. Así, en el campo de la medicina resultan prometedores agentes transportadores de fármacos y material genético para constituir nuevas formulaciones terapéuticas encaminadas a mejorar la eficacia y seguridad de moléculas activas.

De acuerdo con ello, en este trabajo se recogen las propiedades fisicoquímicas más destacadas y que suponen factores determinantes en su interacción con diferentes sustratos. Asimismo, se detalla la naturaleza de los procesos de complejación con fármacos y material genético, así como los cambios conformacionales que dichas estructuras inducen en estos últimos y los factores de los que dependen. En virtud de sus numerosas aplicaciones en terapias in vivo es importante indagar sobre su toxicidad, muy relacionada con su estructura, la cual presenta buenas perspectivas y posibilidades tangibles de mejora. Por último, se recogerán algunas de las aportaciones más relevantes de los dendrímeros como transportadores de fármacos frente a la administración clásica de moléculas activas. Finalmente, se realiza una comparativa con otros agentes alternativos, como son las nanopartículas y los liposomas, los cuales se emplean también recientemente en nuevas formulaciones para la mejora de las características farmacocinéticas y farmacológicas de principios activos.

Palabras clave: dendrímeros, biomedicina, toxicidad, transfección de ADN, transporte de fármacos

INDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Nacimiento de una nueva clase de arquitectura macromolecular: los dendrímeros	6
1.2 Tipos de dendrímeros	8
1.3 Aplicaciones de los dendrímeros.....	10
1.4 Otros vectores empleados en la actualidad: liposomas y nanopartículas	11
1.4.1 Liposomas	11
1.4.2 Nanopartículas de oro.....	12
2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN	12
3. METODOLOGÍA	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4.1 Toxicidad.....	15
4.1.1 In vitro: citotoxicidad, hemólisis y toxicidad hematológica	15
4.1.2 In vivo	19
4.1.3 Estrategias para minimizar los problemas de toxicidad	21
4.2 Dendrímeros como sistemas transportadores de fármacos.....	23
4.2.1 Estrategias del transporte de fármacos	23
4.2.2 Factores que afectan al transporte y liberación de fármacos mediados por dendrímeros.....	26
4.3 Dendrímeros como transportadores de material genético: transfección a células.....	28
4.3.1 Naturaleza de la interacción dendrímero-ADN.....	29
4.3.2 Factores determinantes en la interacción y formación del complejo dendrímero-ADN	29
4.3.3 Cambios conformacionales	31
4.3.4 Termodinámica de la complejación	33
4.4 Ventajas de los dendrímeros frente a la administración clásica de fármacos.....	34
4.5 Análisis comparativo entre dendrímeros y otros vectores.....	35
5. CONCLUSIONES	37
6. BIBLIOGRAFÍA.....	38

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AuNPs	Nanopartículas de oro
ssDNA	ADN monocatenario
dsDNA	ADN bicatenario
ARN	Ácido ribonucleico
Chol	Colesterol
DAB	Diaminobutano
DAE	Diaminoetano
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DC-Chol	3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetano) carbamoil] colesterol
EPC	Fosfatidilcolina de huevo
FDA	Food and Drug Administration
G	Generación del dendrímero
IgG	Inmunoglobulina G
i.v	Vía intravenosa
i.p	Vía intraperitoneal
LDH	Lactato deshidrogenasa
OTC	Over the counter (de venta libre)
PAMAM	Poliamidoamina
PC	Fosfatidilcolina
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PLL	Poli-L-lisina
PPI	Polipropilenimina
PS	Fosfatidilserina
RES	Sistema reticuloendotelian
siRNA	ARN pequeño de interferencia
TGA	Therapeutic Goods Administration
VHS-2	Virus del Herpes Simple tipo 2
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nacimiento de una nueva clase de arquitectura macromolecular: los dendrímeros

La primera inspiración para la síntesis de este tipo de estructuras surgió de Tomalia pero no fue hasta la década de los 70 cuando se produjo la primera síntesis exitosa de estos polímeros dendríticos. Requirió una importante disgresión de las estrategias hasta entonces conocidas de polimerización tradicional hacia nuevas perspectivas, al indagar en nuevos conceptos de síntesis (Tomalia y Fréchet, 2002).

El primer concepto que vio la luz fue el propuesto por Buhleier allá por el 1978, denominando a este tipo de estructuras moléculas "cascada" debido a su ruta de síntesis en cascada (Tomalia y Fréchet, 2002). Pero fue en 1985 cuando Tomalia publicó el primer artículo usando el término "dendrímero" al describir en gran detalle la preparación del dendrímero poli(amidoamina) (PAMAM), y cuyo término deriva del griego "dendron" que viene a expresar una similitud con las ramificaciones de un árbol (Tomalia et al., 1985). De manera paralela en el mismo año, Newkome usó el término "arborol" (Newkome et al., 1985).

En el campo de los polímeros, las estructuras dendríticas son reconocidas como la cuarta clase de las arquitecturas poliméricas, cuya mayor distinción es su gran repertorio de nuevas propiedades y aplicaciones (Tomalia, 2005).

Los dendrímeros están emergiendo como prometedores sistemas para el transporte de agentes terapéuticos ya que se trata de un tipo de moléculas de naturaleza polimérica obtenidas por síntesis química, que poseen una estructura bien definida, muy ramificada y monodispersa (Jain et al., 2010), presentando una baja polidispersidad en comparación con los polímeros clásicos (Duncan y Izzo, 2005). Además, su tamaño se engloba en la escala nanoscópica y su superficie puede funcionalizarse de forma controlada (Abbasi et al., 2014) (Liu y Fréchet, 1999).

Los dendrímeros difieren de las macromoléculas clásicas en que poseen 3 partes diferenciadas (Tomalia et al., 1985) (véase Figura 1):

- ❖ Un core o núcleo.
- ❖ Una zona intermedia que consta de unidades repetitivas de ramificación y en la que cada capa o unidad repetitiva supone una nueva generación (Tomalia y Fréchet, 2002). Esto hace aumentar el diámetro del dendrímero de manera lineal y el número de grupos superficiales de manera exponencial, proporcionando una tendencia a adoptar una estructura globular (Sato y Anzai, 2013). Esta zona presenta unos espacios internos con

potencial de complejación al tiempo que supone un microambiente de protección frente al exterior (Abbasi et al., 2014).

- ❖ Un exterior multivalente, que puede ser diseñado para contener diversidad de grupos funcionales que hacen al dendrímero muy reactivo (Tomalia, 2005). Según los grupos funcionales que posean en la superficie, podrán ser neutros o cargados (aniónicos o catiónicos), lo que le otorgará características diversas, y condicionará su comportamiento y aplicaciones.

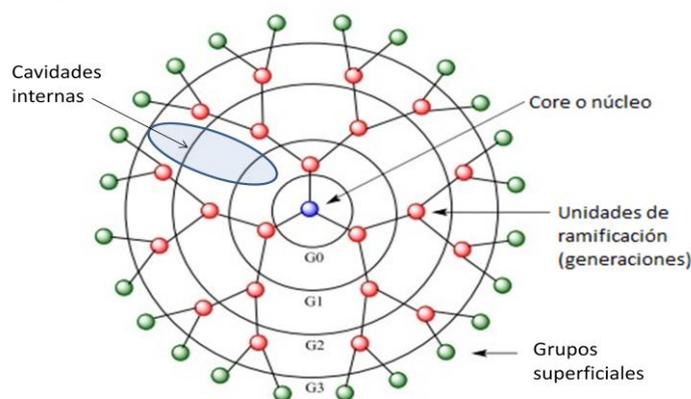


Figura 1. Representación de la estructura general de un dendrímero. Ilustración adaptada de (Garrido y Santana, 2016).

Estos 3 componentes (centro, interior y grupos superficiales) van a determinar las propiedades fisicoquímicas del dendrímero, así como su tamaño, forma y flexibilidad, y pueden ser modificados y diseñados específicamente para conseguir un propósito concreto (Tomalia, 2005). El interior puede brindar un espacio ideal para el encapsulamiento de moléculas huésped, mientras que la superficie, gracias a su multivalencia, puede interactuar con diversidad de sustratos (Svenson y Tomalia, 2005) y permitir una liberación controlada del material encapsulado (Duncan y Izzo, 2005).

El tamaño y la rigidez del dendrímero suele aumentar con su generación. Así, conforme aumenta G, los grupos terminales de la superficie soportan una mayor congestión y rigidez y tenderán a adoptar una conformación más compacta y globular (Sato y Anzai, 2013). Esto condiciona las propiedades de encapsulación de los dendrímeros (accesibilidad y salida de moléculas huésped), ya que estructuras dendríticas más empaquetadas y rígidas poseen un acceso limitado al interior (Tomalia, 2005).

Por otro lado, se ha observado que estas estructuras presentan cierto parecido con las proteínas, ya que los dendrímeros pueden adquirir una forma nativa (más compacta) o desnaturalizada (extendida), dependiendo del pH, fuerza iónica o polaridad del solvente (Esfand y Tomalia, 2001).

Varios factores son los que van a condicionar las propiedades fisicoquímicas de los dendrímeros, y van a inducir cambios conformacionales. Entre ellos cabe resaltar los efectos del crecimiento molecular, del pH, del tipo de disolvente, y el efecto salino (Dufès et al., 2005).

En cuanto a la síntesis de los dendrímeros, suele ser muy complicada y a través de muchos pasos. Tiene lugar principalmente mediante 2 métodos: síntesis divergente y síntesis convergente (véase Figura 2). En la *síntesis divergente* el dendrímero comienza a crecer radialmente desde el núcleo hasta la superficie aumentando el número de capas (Esfand y Tomalia, 2001). Cada capa supone una nueva generación y con ella el aumento del diámetro de la molécula, de peso y grupos funcionales terminales (Tomalia et al., 1985).

Con respecto a la *síntesis convergente*, se produce desde la periferia hacia un punto focal, lo cual lleva a la formación de dendrones reactivos, que posteriormente van a reaccionar para integrarse y formar el dendrímero (Esfand y Tomalia, 2001) (Duncan y Izzo, 2005) (Klajnert y Bryszewska, 2001). Sin embargo, la principal desventaja de este método es la dificultad de obtener dendrímeros de altas generaciones debido al impedimento estérico que se encuentran las ramificaciones en la unión con el punto central, estando limitado a la construcción de dendrímeros de baja generación (Svenson y Tomalia, 2005).

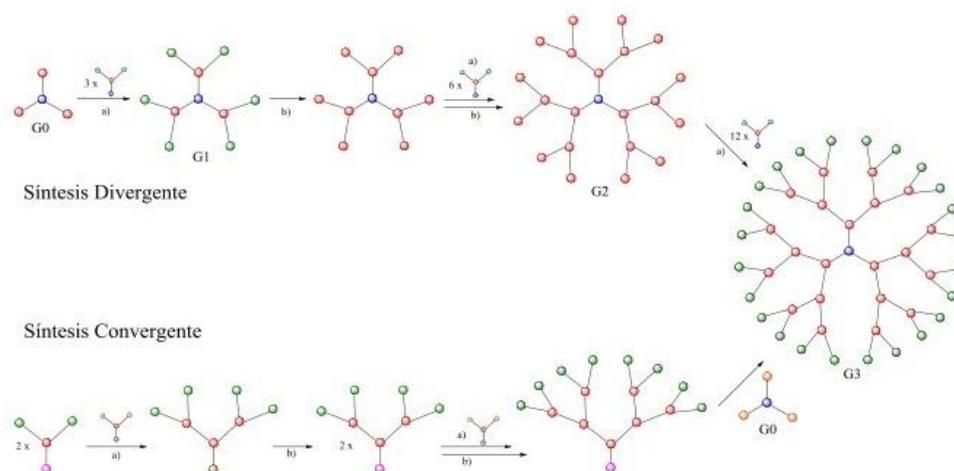


Figura 2. Métodos de síntesis divergente y convergente (Garrido y Santana, 2016).

1.2 Tipos de dendrímeros

Los dendrímeros más usados son los poliamidoamina (PAMAM), los polipropilenimina (PPI), y los poli-L-lisina (PLL), siendo los PAMAM los más ampliamente estudiados (Aillon et al., 2009).

Los dendrímeros PAMAM (véase Figura 3) presentan normalmente un núcleo central de etilendiamina, aunque se pueden sintetizar con interiores más hidrofóbicos como

diaminobutano, diaminohexano y diaminododecano; las unidades de ramificación se basan en estructuras con grupos amida. Como grupos superficiales destacan los grupos amino (dendrimeros de generación entera) o grupos carboxilato (dendrimeros de media generación) (Palmerston Mendes et al., 2017).

Los dendrimeros PPI (véase Figura 4) suelen tener núcleos de 1,4-diaminobutano (DAB) o diaminoetano (DAE) con propilenimina como unidades de ramificación por lo que el interior constará de aminas terciarias aportando mayor hidrofobicidad comparado con los PAMAM de igual generación; y grupos amino en la superficie (Kesharwani et al., 2014).

Los dendrimeros PLL son un tipo de dendrimeros peptídicos, cuyo núcleo y unidades de ramificación se basan en el aminoácido lisina, y grupos amino terminales en superficie (Palmerston Mendes et al., 2017).

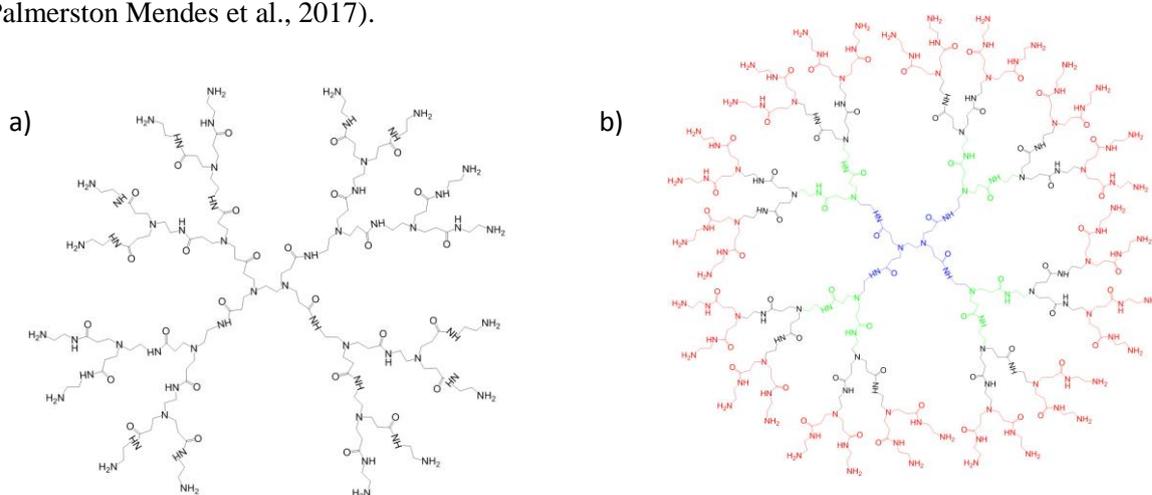


Figura 3. Estructuras de dendrimeros PAMAM: a) G2; b) G3, donde los colores vienen a diferenciar las generaciones (azul: G0, verde: G1, negro: G2, rojo: G3). Ilustraciones de elaboración propia.

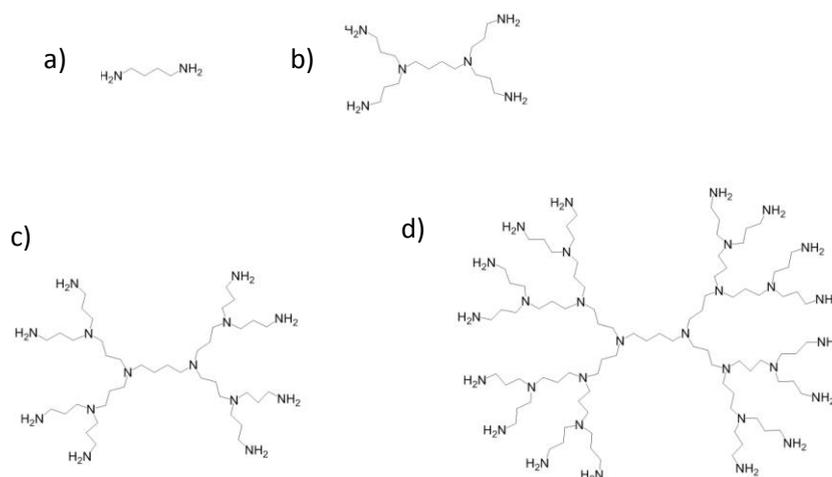


Figura 4. Estructuras de dendrimeros PPI, donde: a) core diaminobutano; b) PPI G0; c) PPI G1; d) PPI G2. Ilustraciones de elaboración propia.

1.3 Aplicaciones de los dendrímeros

La ciencia de los dendrímeros es una disciplina en auge, en la que el número de investigaciones y publicaciones aumenta por año. A pesar de esto, todavía es un tema que se encuentra en desarrollo y más aún cuando se habla de sus aplicaciones en clínica, ya sea tratamiento, prevención o diagnóstico, las cuales están sustentadas en su mayoría por ensayos *in vitro*, sin llegar a ver la luz con fines terapéuticos por el momento.

Con el objetivo de ser empleados en biomedicina, los dendrímeros deben presentar biocompatibilidad y superar unos requisitos indispensables (véase Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de biocompatibilidad de los dendrímeros.

Requisitos	Referencias
➤ Atóxicos, tanto él como sus metabolitos	(Malik et al., 2000)
➤ Biodegradables	(Fischer et al., 2003)
➤ Estables	(Duncan y Izzo, 2005)
➤ No inmunogénicos, excepto en el caso de vacunas	(McNerny et al., 2010)
➤ Capacidad de atravesar las barreras biológicas (membranas celulares, barrera hematoencefálica, las paredes del intestino)	
➤ Permanecer tiempo suficiente en circulación para tener el efecto clínico esperado	
➤ Presentar una distribución que permita dirigirse a dianas específicas	

Las aplicaciones son muy variadas, entre las que cabe citar la encapsulación y el transporte de fármacos (Jain et al., 2010). También destacan como nanofármacos, sobre todo en el caso de: a) antivirales, donde los dendrímeros son diseñados con grupos funcionales aniónicos para así imitar las superficies celulares que también son aniónicas. De esta manera, habrá una competencia entre el dendrímero y la célula por la unión al virus, que se traduce en una menor posibilidad de infección del virus a la célula; b) antibacterianos, en los que interesa que los dendrímeros posean grupos catiónicos en su superficie para poder unirse a la membrana bacteriana y dañarla produciendo su lisis, y c) antitumorales (Svenson y Tomalia, 2005). Por otro lado, están siendo ampliamente investigados para la vectorización de fármacos, concretamente para agentes anticancerosos (Duncan y Izzo, 2005), así como para la administración transdérmica de principios activos (Abbasi et al., 2014).

En terapia génica actúan como vectores no virales en la transfección de material genético a células específicas (Klajnert y Bryszewska, 2001). También se está investigando para el diseño de vacunas al constituir el soporte para elementos antigénicos que potenciará la respuesta inmune (aumentar inmunogenicidad) (Duncan y Izzo, 2005).

Otras aplicaciones a resaltar serían: (i) la catálisis a nanoescala, (ii) como sensores químicos, (iii) imitación de la función de las enzimas, (iv) reconocimiento molecular, agentes de diagnóstico terapéutico o agentes de contraste (Klajnert y Bryszewska, 2001).

La mayoría de estas aplicaciones se encuentran en etapas muy tempranas de estudio. De todos ellos, sólo una veintena de dendrímeros se encuentran en fases preclínicas (Kannan et al., 2014), y únicamente dos han entrado en fases clínicas. Uno de ellos consiste en una formulación tópica vaginal (Vivagel®) para el tratamiento y prevención de la vaginosis bacteriana, habiéndose completado ya la Fase 3. Recientemente ha sido aprobada su comercialización en Australia por la TGA y estará en farmacias en 2018 como medicamento OTC. Además, se contempla como antiviral para la prevención de la infección por VIH y VHS-2, actualmente en Fase 1. Otra formulación que ha entrado en Fase 1 es DEP® docetaxel como anticanceroso (Starpharma Pty Ltd, 2017).

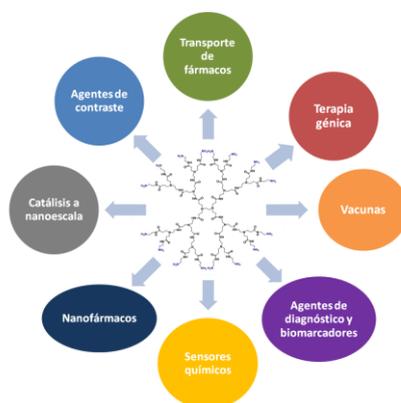


Figura 5. Esquema-resumen de las aplicaciones más destacables de los dendrímeros en biomedicina

1.4 Otros vectores empleados en la actualidad: liposomas y nanopartículas

1.4.1 Liposomas

Los liposomas son un tipo de vesículas esféricas, de un tamaño que varía entre 80-300 nm, formadas por una bicapa lipídica que va a encerrar un volumen acuoso. Están constituidas fundamentalmente por fosfolípidos, que son moléculas anfipáticas, esto es, poseen una parte polar o hidrófila y otra parte apolar o lipófila (Wilczewska et al., 2012). Las colas lipófilas de los fosfolípidos van a interaccionar formando una bicapa, mientras que las cabezas hidrófilas van a quedar proyectadas hacia el exterior y hacia el compartimento interno, en contacto con medio acuoso. Además de fosfolípidos, otro componente que hay que mencionar es el colesterol, que puede presentarse en cantidades variables en los liposomas y condiciona la permeabilidad y la fluidez de la membrana y, con ello, la estabilidad de los liposomas y la capacidad de encapsulación (Fang et al., 2001).

Gracias a su baja toxicidad y su condición vesicular, es un vector muy extendido en aplicaciones biomédicas, entre las que destaca su empleo como vehiculizadores de principios activos y como agentes transfectantes de material genético a células.

1.4.2 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas metálicas, y más concretamente las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico. Las AuNPs se pueden preparar fácilmente, obteniéndose sistemas coloidales monodispersos estables con un tamaño entre 1 nm y 150 nm y una distribución de tamaños bien controlada. Destacan especialmente sus propiedades fototérmicas, así como la capacidad de ser funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (fármacos, material genético, anticuerpos, polímeros...), que le aportará una gran variedad de propiedades. Por todo ello, las AuNPs despiertan un gran interés en el campo de la biomedicina (Al-Qadi y Remuñán-López, 2009).

2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

Debido al gran potencial que tienen los dendrímeros en multitud de aplicaciones biomédicas, cada año se produce un aumento en el número de investigaciones sobre este tipo de moléculas. Por ello, el objetivo de este trabajo de revisión bibliográfica es recopilar la información más relevante del panorama de los últimos 20 años.

Como objetivos concretos se han propuesto:

- Adquirir conocimientos sobre este tipo de moléculas, sobre todo en cuanto a:
 - la relación existente entre sus características fisicoquímicas y la naturaleza de las interacciones con fármacos y material genético.
 - la relación estructura-toxicidad, y diversas metodologías para reducirla.
 - los cambios conformacionales que inducen dichas estructuras en ADN y otros polímeros.
- Los avances que suponen con respecto a la administración clásica de fármacos y de mejora en tratamiento a nivel genético.
- Realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos con los de otros agentes empleados recientemente con el mismo fin: liposomas y nanopartículas.

3. METODOLOGÍA

La metodología empleada para la realización de este trabajo ha consistido en la recopilación de artículos científicos, así como el análisis y selección de la información necesaria para satisfacer los objetivos del trabajo.

Se ha utilizado el portal FAMA perteneciente a la Universidad de Sevilla para acceder a las bases de datos bibliográficas a través del dominio de la universidad para aprovechar el acceso libre y gratuito.

Entre las bases de datos empleadas para recoger el material bibliográfico cabe citar PubMed, Web of Science y ScienceDirect, siendo el grosor de los artículos encontrados los pertenecientes a PubMed.

Para encauzar la búsqueda se combinaron una serie de descriptores tanto en español como inglés, haciendo uso de tesauros como DeCS (Descriptores en Ciencias de la Salud) para obtener estos descriptores en lenguaje apropiado y/o traducidos al inglés científico.

Como palabras clave se han empleado los términos "dendrimer", "PAMAM", "toxicity", "drug delivery", "DNA", "gene", "transfection", y se han combinado para obtener búsquedas más específicas usando operadores como 'AND', 'OR' o '*' para relacionar o excluir términos.

A la hora de realizar las búsquedas se ha establecido una serie de criterios y filtros para acotar la lista de publicaciones. Así, la búsqueda definitiva se ha centrado en publicaciones de tipo revisión bibliográfica, de los últimos 20 años, y de textos completos de libre acceso y descarga gratuita (véase Tabla 2, filtros).

También se ha hecho uso del gestor bibliográfico Mendeley como herramienta para organizar de manera más eficiente la bibliografía y facilitar la gestión y redacción de las referencias bibliográficas de acuerdo con las pautas exigidas para este trabajo.

En cuanto a las figuras empleadas, algunas son de elaboración propia mediante el programa informático "ChemDraw" y otras han sido obtenidas y adaptadas de los artículos con los que se ha trabajado. Asimismo, todas las tablas son de elaboración propia.

Tabla 2. Número de resultados obtenidos en la búsqueda a través de dos bases de datos principalmente, como son PubMed y Web of Science, poniendo de manifiesto la diferencia en la cantidad de resultados tras el filtrado de la búsqueda.

Términos	Resultados PubMed	Resultados PubMed (filtros)	Resultados Web of Science	Resultados Web of Science (filtros)
"Dendrimer*"	7588	242	24427	93
"PAMAM*"	2302	24	5419	27
"Dendrimer*AND PAMAM*"	2166	22	4537	26
"Dendrimer* AND Toxicity*"	980	58	992	13
"Dendrimer*AND Gene*"	882	42	9368	36
"Dendrimer*AND DNA*"	836	20	1938	15
"Dendrimer*AND Transfection*"	569	8	980	1
"Dendrimer*AND Drug*"	3070	167	4104	53

Además, se ha creído conveniente plasmar la evolución histórica de la producción científica sobre dendrímeros a lo largo de estos últimos 20 años en la base de datos PubMed, ya que es un tema actualmente en auge y sobre el que se ha observado un aumento progresivo en el número de investigaciones, como se puede observar en la Figura 6, en la que se representa el número de publicaciones por año, desde el año 1997 hasta el 2017.



Figura 6. Representación del número de publicaciones por año sobre dendrímeros en la base de datos PubMed durante los últimos 20 años.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Toxicidad

Indiscutiblemente, los dendrímeros han supuesto una nueva perspectiva en el avance hacia nuevos sistemas de transporte de compuestos terapéuticos. Sin embargo, debido a su tamaño nanométrico, surgen problemas derivados de su capacidad de interacción con las células y sus componentes, apareciendo problemas de toxicidad. Esto hace que se ponga sobre la mesa la preocupación e interés sobre su seguridad.

Por tanto, surge la necesidad de evaluar e investigar sobre una de las características más importantes que deben poseer para ser empleados en aplicaciones clínicas, su biocompatibilidad, que es condicionada por aspectos como la citotoxicidad, la hemólisis, toxicidad hematológica, biodistribución e inmunogenicidad (Duncan y Izzo, 2005).

4.1.1 In vitro: citotoxicidad, hemólisis y toxicidad hematológica

Citotoxicidad

Aún no se conoce completamente el mecanismo por el cual se produce la citotoxicidad, pero se basa principalmente en la interacción de macromoléculas de naturaleza catiónica con las membranas celulares cargadas negativamente (Fischer et al., 2003). Al hablar de macromoléculas ya no solo estamos hablando de dendrímeros sino de cualquier especie policationica. Esta interacción con las membranas suele ser de tipo electrostática o dipolo-dipolo, causando la desestabilización de la misma e induciendo la lisis celular (Jain et al., 2010). Se produce una disrupción de la membrana a través de la formación de nano agujeros, adelgazamiento de la membrana o erosión (McNerny et al., 2010). Durante el proceso de desestabilización de la membrana va a tener lugar la fuga de parte del contenido citoplasmático, y suele ir seguido de una reducción de la actividad metabólica (Fischer et al., 2003).

Además, se ha observado que el aumento de la permeabilidad y la fuga del contenido citoplasmático inducida por los dendrímeros no es permanente y retorna a la normalidad con la retirada de los éstos (Jain et al., 2010). Asimismo, se ha podido comprobar que en la lisis celular inducida por policationes no participa ningún proceso apoptótico, ya que el núcleo mantiene su tamaño y la cromatina está homogéneamente distribuida (Jain et al., 2010).

Para cuantificar y comparar la citotoxicidad se emplean parámetros como la viabilidad celular (%) o el IC_{50} . La viabilidad celular hace referencia a la proporción de células que sobreviven tras la exposición a una solución con dendrímeros. Por otro lado, IC_{50} se define como la concentración de polímero a la que se midió el 50% de inhibición de la actividad deshidrogenasa mitocondrial (Jevprasesphant, 2003) o concentración que inhibe el crecimiento del 50% de las células incubadas (Fischer et al., 2003).

La magnitud de los efectos citotóxicos va a depender de una serie de factores (Malik et al., 2000):

- *El peso molecular o generación del dendrímero.* Esto dos términos están relacionados ya que el aumento en el peso molecular es función de la generación. Los dendrímeros PAMAM, al igual que los PPI y PLL, poseen grupos amino en superficie. Estos grupos amino se encontrarán protonados a pH fisiológico, aportando al dendrímero una densidad de carga positiva creciente con la generación del dendrímero, y que será la responsable de la interacción con las membranas celulares y componentes de la sangre. Como se puede observar a partir de los datos recogidos en la Tabla 3, los dendrímeros de mayor generación, al poseer un número más elevado de grupos amino y, en consecuencia, mayor densidad de carga positiva, presentan unos niveles de toxicidad superiores (valores de IC_{50} más bajos).
- *La densidad de carga del dendrímero.* Como ya se ha comentado anteriormente, es la carga positiva global del dendrímero la responsable de los problemas de toxicidad. En el caso de dendrímeros de media generación (G1.5, G2.5, G3.5), que son aquellos que presentan grupos aniónicos en superficie (p.e $-COO^-$), la densidad de carga negativa no interacciona de la misma manera con las membranas biológicas, suponiendo un menor grado de desestabilización. Esto se traduce en un nivel de toxicidad mucho menor, representado con valores más altos de IC_{50} (véase Tabla 3).
- *La concentración del dendrímero.* Concentraciones crecientes de dendrímero suponen un mayor grado de toxicidad. Así, en la tabla 4 se refleja cómo la viabilidad celular decrece al aumentar la concentración de dendrímero.
- *El tiempo de exposición.* De manera similar, la tabla 4 muestra la existencia de un descenso en la viabilidad celular con el tiempo.
- *El tipo de célula expuesta.* La susceptibilidad varía según el tipo de célula ensayada (véase tabla 4).

Tabla 3. Características de dendrímeros PAMAM de varias generaciones y su citotoxicidad expresada en valores de IC₅₀. Existe una relación inversa entre toxicidad e IC₅₀, ya que valores altos de IC₅₀ son indicativos de una menor toxicidad.

Dendrímero	Peso molecular (Da)	Nº grupos terminales	Grupos terminales	IC ₅₀ (mM)	Referencias
PAMAM G1	1430	8	-NH ₂	> 2,00	(Malik et al., 2000)
PAMAM G2	3256	16	-NH ₂	> 1,00	(Malik et al., 2000)
PAMAM G3	6909	32	-NH ₂	0,14	(Malik et al., 2000)
PAMAM G4	14215	64	-NH ₂	0.13	(Malik et al., 2000)
PAMAM G1.5	2935	16	-COO ⁻ Na ⁺	> 2,00	(Malik et al., 2000)
PAMAM G2.5	6267	32	-COO ⁻ Na ⁺	> 1,00	(Malik et al., 2000)
PAMAM G3.5	12931	64	-COO ⁻ Na ⁺	> 1,00	(Malik et al., 2000)

Tabla 4. Citotoxicidad de dendrímeros PPI G5, en función de la concentración, tipo de célula y tiempo de exposición, expresada en términos de viabilidad celular (%).

Concentración de PPI G5 (mg/ml)	Tipo celular	Tiempo de incubación (h)	Viabilidad celular (%)	Referencias
0,001	HepG2	24	66,8	(Jain et al., 2010)
0,001	COS-7	24	71,5	(Jain et al., 2010)
0,001	HepG2	72	16,8	(Jain et al., 2010)
0,001	COS-7	72	23,1	(Jain et al., 2010)
1,0	HepG2	24	7,6	(Jain et al., 2010)
1,0	COS-7	24	11,7	(Jain et al., 2010)
1,0	HepG2	72	1,7	(Jain et al., 2010)
1,0	COS-7	72	2,3	(Jain et al., 2010)

Hemólisis

En cuanto a la toxicidad hemolítica, varios estudios han determinado que la exposición de polímeros dendríticos catiónicos a soluciones de hematíes de rata induce cambios morfológicos en los eritrocitos, cierto daño a sus membranas y lisis celular. Este comportamiento se evidencia con la medida del porcentaje de liberación de hemoglobina (Fischer et al., 2003).

La capacidad de hemólisis depende de los mismos factores que la citotoxicidad, los cuales ya han sido comentados (Jain et al., 2010)(Duncan y Izzo, 2005).

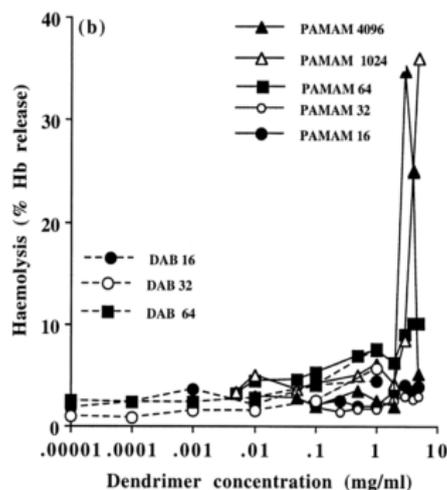


Figura 7. Actividad hemolítica inducida por dendrímeros PAMAM y PPI tipo DAB de diferente generación (indicado mediante el número de grupos terminales) a distintas concentraciones. La hemólisis viene expresada en porcentaje de hemoglobina liberada (Malik et al., 2000).

También se ha observado que el tipo de amina va a afectar a la toxicidad, presentando una menor toxicidad las aminas terciarias con respecto a las primarias o secundarias (Fischer et al., 2003). Esta afirmación es consistente con los datos de la Tabla 5, y de la que se deduce la siguiente tendencia a nivel de toxicidad: PLL≈PEI > PAMAM.

Tabla 5. Relación entre el tipo de dendrímero, el tipo de amina que posee y su toxicidad

Tipo de dendrímero	Tipo de amina	IC ₅₀ (mg/ml)	Viabilidad celular (%)	% Hemólisis	Referencias
PAMAM	1 ^a , 3 ^a	>10	~ 100	2,95	(Fischer et al., 2003)
PLL	1 ^a	0,040	73,2	7,88	(Fischer et al., 2003)
PEI	1 ^a , 2 ^a y 3 ^a	0,022	72,3	6,09	(Fischer et al., 2003)

Con todo esto se puede resumir que la citotoxicidad y hemólisis es superior para los dendrímeros catiónicos que para los aniónicos, y que la toxicidad en general es dependiente del peso molecular (generación), carga superficial dada por los grupos terminales de la periferia y de la concentración (Jevprasesphant, 2003), así como también del tiempo de exposición y del tipo de célula sometida a ensayo (Duncan y Izzo, 2005).

Toxicidad hematológica

Los dendrímeros también son capaces de alterar los parámetros hematológicos debido a su naturaleza de policationes, entre ellos, el recuento de leucocitos, de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito y hemoglobina corpuscular media. Se ha observado que los

catiónicos producen un descenso del recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito y hemoglobina corpuscular media, mientras que por otro lado hay un incremento significativo del recuento de leucocitos (Jain et al., 2010).

A pesar de todo esto, los estudios *in vitro* no llegan a ser del todo concluyentes debido a que la toxicidad depende de muchos factores, y cada ensayo sólo establece unas pocas variables, por lo que es difícil generalizar. Estos estudios *in vitro* se consideran prácticamente la antesala para determinar si estaría justificada una evaluación *in vivo* preliminar (Duncan y Izzo, 2005).

4.1.2 *In vivo*

Los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* solo pueden proporcionar un idea relativa de la toxicidad potencial de un nuevo transportador polimérico. Por ello, es importante conocer el comportamiento *in vivo*, siendo necesario hablar de inmunogenicidad y biodistribución, con la posible acumulación en distintos órganos (Duncan y Izzo, 2005). Además, la administración *in vivo* de dendrímeros parece ser más optimista que la sugerida por las evaluaciones *in vitro*, ya que se da una menor citotoxicidad que la que se espera en ensayos *in vitro* (Kannan et al., 2014).

Inmunogenicidad

Los estudios existentes sobre inmunogenicidad son muy escasos, pero gran parte de ellos afirma que los dendrímeros no inducen inmunogenicidad o lo hacen de forma muy débil (Aillon et al., 2009) (Jain et al., 2010). Aún así, la mayoría se han realizado a corto plazo, por lo que se necesita más evidencia sobre el tema.

Biodistribución

Los conjugados dendríticos considerados para aplicaciones biomédicas deben presentar bajos perfiles de toxicidad con tiempos de circulación lo suficientemente largos para alcanzar la eficacia terapéutica y permitir la acumulación en los sitios de acción, como por ejemplo en las células tumorales. También deben ser fácilmente eliminados para evitar en la medida de lo posible la acumulación inespecífica a largo plazo (Liu y Fréchet, 1999).

Los factores más determinantes en la eliminación o excreción de los dendrímeros (aclaramiento renal y/o aclaramiento hepático) y acumulación en órganos se detallarán a continuación:

- *El tamaño del dendrímero*, que viene dado por la generación. Se considera que las nanopartículas con diámetros en el rango de 10-100nm tienen unas propiedades óptimas para aplicaciones *in vivo*. Tamaños inferiores a 10nm suponen extravasación a tejidos y un rápido aclaramiento renal, mientras que partículas de tamaños superiores a 100nm

sufren una rápida opsonización y eliminación de la circulación por parte de macrófagos del sistema reticuloendotelial (RES) (Wilczewska et al., 2012). Los dendrímeros son excretados mayormente por vía renal y su tasa de aclaramiento renal disminuye con el incremento de tamaño (generación). Así, los dendrímeros de mayor G presentarán una excreción renal más lenta y, en consecuencia, resultará en una retención prolongada en sangre (Kannan et al., 2014). Se ha observado que la excreción renal es mínima cuando el tamaño de PAMAM excede de los 10 nm (Aillon et al., 2009). La acumulación en hígado y riñón también es dependiente de la generación (Duncan y Izzo, 2005).

- *La densidad de carga de la superficie.* Algunos autores evidencian que los dendrímeros catiónicos son rápidamente eliminados de la circulación y que se acumulan en cantidad significativa en el hígado; mientras que los aniónicos presentan mayor tiempo de circulación en sangre, y también se acumulaban en hígado pero en menor grado que los catiónicos (Malik et al., 2000). Los dendrímeros con superficies cargadas (catiónicos o aniónicos) o hidrofóbicas son eliminados rápidamente de la circulación, normalmente por el hígado; los dendrímeros con superficies hidrófilas, con grupos hidroxilo o PEG, evitan la rápida eliminación por lo que tienen mayores tiempos de circulación (McNerny et al., 2010). Los dendrímeros pegilados muestran un tiempo de residencia en sangre mayor y una menor acumulación en el hígado, bazo o riñón, pero se ha observado una mayor acumulación en tejido tumoral (Kannan et al., 2014).
- *Naturaleza hidrófila/lipófila del interior dendrímérico.* Al comparar dendrímeros de generación y superficie equivalentes pero con interiores de carácter hidrófilo/lipófilo diverso se observó que aquellos con un interior más hidrofóbico se eliminaron más rápidamente de la circulación con 2 veces más acumulación en el hígado comparado con los de interiores más hidrofílicos (Kannan et al., 2014). Por ello, la estructura del núcleo del dendrímero debe ser biodegradable y fácilmente eliminado por vía renal o hepática. De lo contrario es difícil de predecir la toxicidad a largo plazo (Aillon et al., 2009). El núcleo tipo amida que poseen los dendrímeros tipo PAMAM y PPI no pueden sufrir hidrólisis o degradación enzimática, por lo que se está investigando sobre estructuras basadas en aminoácidos, oligonucleótidos o poliésteres que se sobrepongan a esa toxicidad (Aillon et al., 2009).

Por tanto, es importante diseñar los dendrímeros para que, por un lado, se consigan aumentar los tiempos de circulación en sangre (aumentar vida media y por tanto efecto), al tiempo que se produzca una excreción significativa para evitar la acumulación a largo plazo en órganos (Kannan et al., 2014). Así, el transporte dirigido combinado con una eliminación rápida intrínseca de dendrímeros de baja y media generación pueden ayudar a minimizar la toxicidad (Kannan et al., 2014).

4.1.3 Estrategias para minimizar los problemas de toxicidad

Poco a poco van surgiendo nuevas estrategias en la síntesis de los dendrímeros con el objetivo de atenuar la toxicidad y convertir los dendrímeros en compuestos más biocompatibles. Van encaminadas sobre todo a: i) la modificación de la superficie para reducir o enmascarar la carga global positiva responsable de dicha toxicidad (al neutralizar, reducir, proteger grupos aminos, o mediante la introducción de grupos aniónicos) (Palmerston Mendes et al., 2017); ii) el diseño de dendrímeros con una estructura biodegradable, cuyos monómeros en los que se divide tras la degradación puedan servir como sustratos para diversas rutas metabólicas y se impida así su acumulación y toxicidad (Jain et al., 2010).

La idea es crear dendrímeros que favorezcan la retención en tejidos o células dianas al tiempo que minimizar la entrada o toxicidad en células sanas y reducir los efectos adversos.

Entre las modificaciones de la superficie encaminadas a dicho fin cabe destacar: i) la pegilación, que además de disminuir la citotoxicidad y hemólisis (Jeyprasesphant, 2003), aumenta la solubilidad, los tiempos de circulación y la acumulación selectiva en tumores (Palmerston Mendes et al., 2017); ii) la acetilación e hidroxilación de los grupos aminos para neutralizar la carga (Duncan y Izzo, 2005) iii) conjugados con carbohidratos, aminoácidos o péptidos.

Como esqueletos dendríticos biodegradables destacar los dendrímeros poliéter, poliéster, triazina o melamina (Jain et al., 2010). Todas estas estrategias quedan recogidas en la Tabla 6, donde valores bajos de IC_{50} y hemólisis junto con valores altos de viabilidad celular demuestran esa minimización de la toxicidad.

Tabla 6. Recopilación de algunas de las técnicas empleadas para reducir la toxicidad.

	Estrategia	Tipo de dendrímero	Citotoxicidad	Hemólisis	Referencias
Superficie	Pegilación	PAMAM G4	IC ₅₀ = 0,79 ± 0,001	< 5 %	(Jevprasesphant, 2003)
		PPI G5	No toxicidad	-----	(Jain et al., 2010)
	Hidroxilación		baja	baja	(Agashe et al., 2006)
	Acetilación		baja	baja	(Agashe et al., 2006)
	Carbohidratos:				
	- Galactosa	PLL G4 PPI G4 PPI G5	----- ----- -----	7,3 ± 2,8 % 7,1 % 10 %	(Jain et al., 2010)
	- Manosa	PPI G5	Viabilidad celular 95,2% (C = 1mg/ml)	2,9 ± 0,6 %	(Agashe et al., 2006)
	- Lactosa	PPI G5	Viabilidad celular 94,7 % (C = 1mg/ml)	2,2 ± 0,3 %	(Agashe et al., 2006)
	Aminoácidos:				
	- Glicina	PPI G5	Viabilidad celular 95,37% (C = 1mg/ml)	4,9 ± 0,2 % (C = 1 mg/ml tras 4h)	(Agashe et al., 2006)
	- Fenilalanina	PPI G5	Viabilidad celular 96,2% (C = 1mg/ml)	3,3 ± 0,4 % (C = 1 mg/ml tras 4h)	(Agashe et al., 2006)
	Media generación (aniónicos, grupos COO ⁻)	PAMAM G3.5	No citotoxicidad hasta una C = 2 mg/ml	Despreciable	(Jain et al., 2010)
Esqueleto dendrítico		Poliéter	Viabilidad celular > 98% hasta una C = 100 mg/ml	-----	(Jain et al., 2010)
		Poliéster	No toxicidad hasta 250µg/ml	-----	(Jain et al., 2010)
		Triazina	No toxicidad hasta 10 mg/Kg	-----	(Jain et al., 2010)
		Melamina	No toxicidad hasta 10 mg/Kg	-----	(Jain et al., 2010)

Los resultados recogidos en la tabla 6 son bastante similares de unas estructuras a otras, destacando los dendrímeros con esqueleto de poliéter por tener una viabilidad celular superior al 98% y los dendrímeros PPI G5 por su baja hemólisis. Además, cabe destacar que dentro de los dendrímeros funcionalizados con aminoácidos, la fenilalanina posee parámetros de toxicidad más ventajosos.

Para concluir este apartado es importante remarcar que la experiencia clínica con dendrímeros aún es muy limitada, por lo que todavía es pronto para realizar generalizaciones sobre su seguridad. Sólo se puede hablar de dendrímeros seguros en relación con una aplicación

específica que haya sido estudiada en profundidad. Aún quedan años de investigación para comprender a fondo su comportamiento, los mecanismos subyacentes, así como poder predecir posibles reacciones adversas.

4.2 Dendrímeros como sistemas transportadores de fármacos

El alto nivel de control posible sobre el diseño de los dendrímeros hace que sean muy atractivos como sistemas de transporte y liberación controlada de fármacos (Palmerston Mendes et al., 2017) (Onoue et al., 2014).

4.2.1 Estrategias del transporte de fármacos

Los fármacos pueden ser transportados por los dendrímeros usando estrategias diferentes, ya sea atrapados en las cavidades internas de su estructura o conjugados con los grupos superficiales, mediante interacciones físicas o químicas (Safari y Zarnegar, 2014).

4.2.1.1 Conjugados dendrímero-fármaco. Ventajas de la superficie

Las superficies de los dendrímeros pueden ser funcionalizadas con una gran variedad de fármacos u otros agentes, los cuales se obtienen por unión covalente o coordinación mediante interacciones electrostáticas de los fármacos con los grupos funcionales de la superficie del dendrímero (Onoue et al., 2014). De esta manera se formarían profármacos dendriméricos, que en condiciones fisiológicas liberarían el fármaco (Kumari et al., 2014). Así, una misma molécula de dendrímero es capaz de transportar múltiples moléculas de fármaco conjugadas directamente con sus grupos superficiales o a través de "linkers" o espaciadores. Estos "linkers" consisten en grupos lábiles que van a facilitar la escisión del complejo y modular la tasa de liberación del fármaco. Como ejemplos de estos "linkers" cabría mencionar los grupos amida, grupos éster, enlaces disulfuro (S-S), hidrazona o cisaconitil, los cuales son lábiles a pH ácido o susceptibles de la acción de ciertas enzimas (Wu et al., 2015).

Además de portar sobre la superficie moléculas de fármaco, también es posible la conjugación con otras especies tales como agentes de diagnóstico (agentes de contraste), grupos con el objetivo de mejorar la solubilidad (p.e PEG), así como diferentes ligandos (p.e. ácido fólico, anticuerpos) para dirigir el transporte y aumentar la especificidad. Todo ello es posible en la misma molécula dendrítica (véase Figura 8).

Por tanto, seleccionando estratégicamente la superficie del dendrímero es posible construir conjugados dendrímero-fármaco con estructuras muy definidas y propiedades específicas, como dotarlos de selectividad o mejorar sus condiciones de solubilidad.

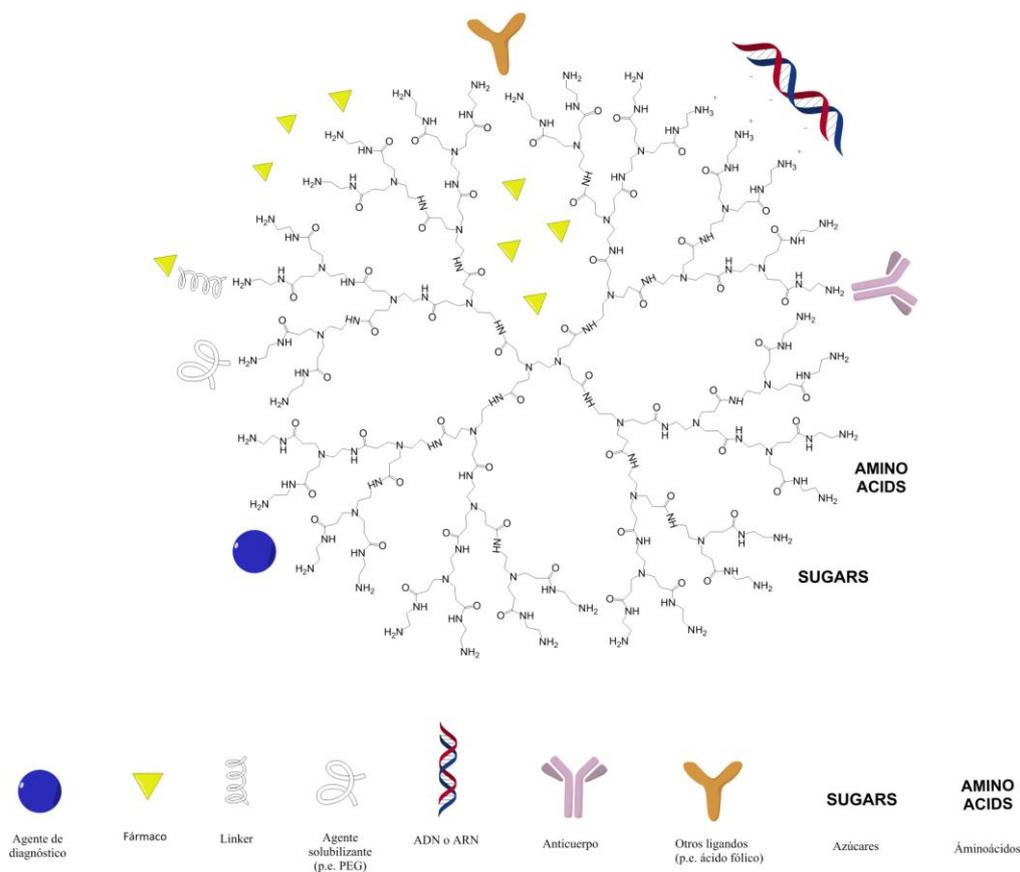


Figura 8. Representación esquemática de un dendrímero PAMAM G3 y la variedad de agentes que pueden interactuar con él: fármacos (encapsulación o conjugación a la superficie), agentes de contraste, material genético (interacción electrostática), otros tipos de ligandos como agentes solubilizantes y aquellos destinados a aumentar la especificidad (ácido fólico, anticuerpos, etc.). Ilustración de elaboración propia.

4.2.1.2 *Receptáculos nanoscópicos: capacidad de encapsulación*

Los dendrímeros poseen cavidades internas que suponen un nano ambiente protegido del exterior por la superficie del dendrímero, e ideales para la encapsulación de moléculas y su posterior liberación controlada (Kesharwani et al., 2014). Esta encapsulación del fármaco en el interior del dendrímero se debe a una asociación no covalente, que se puede producir por simple atrapamiento físico, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas o hidrofóbicas (Onoue et al., 2014). Se ha observado que se produce la formación de puentes de hidrógeno entre los fármacos y los grupos amino del interior del dendrímero, así como puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas con los grupos amino de la superficie (Palmerston Mendes et al., 2017).

Además, en el caso de dendrímeros con interiores hidrofóbicos y una periferia con cierto carácter hidrófilo se puede apreciar un comportamiento parecido al de las micelas, que se

aprovecha para atrapar fármacos de baja solubilidad (Esfand y Tomalia, 2001). Así, las moléculas activas hidrofóbicas se asocian con el núcleo dendrimérico de la misma naturaleza (Svenson y Tomalia, 2005) (Ambade et al., 2005).

Este fenómeno de encapsulación fue denominado por Meijer como "caja dendrítica" o por Tomalia como "encapsulación unimolecular" (Svenson y Tomalia, 2005). Las cajas dendríticas, por tanto, se caracterizan por una cubierta superficial muy densa constituida por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales adyacentes del dendrímero, y unos espacios internos que albergarán las moléculas huésped (Kesharwani et al., 2014).

La cantidad máxima de moléculas huésped que un dendrímero es capaz de albergar es directamente proporcional a la forma y tamaño de estas moléculas, así como de la cantidad, forma y tamaño de las cavidades internas disponibles en el dendrímero (Esfand y Tomalia, 2001). De esta manera, los dendrímeros de mayor G van a presentar un mayor número de cavidades internas, permitiéndole albergar una cantidad más elevada de moléculas. Sin embargo, el aumento en la generación trae consigo el incremento en la densidad de grupos superficiales, que dará lugar a una gran congestión estérica. Esto último permite proteger el interior dendrimérico del medio externo y favorecer una conformación del dendrímero más compacta (Wu et al., 2015). Este fenómeno se denomina como "deGennes dense packing" (empaquetamiento denso de deGennes) y suele ocurrir alrededor de la G7-10 (Choudhary et al., 2017). Los dendrímeros de menor generación (G0-3) tienen una estructura más abierta y flexible, y conforme aumenta G pasan por estructuras semirígidas con cierta permeabilidad (G4-6) hasta estructuras de limitado acceso debido a una superficie más congestionada (G7-10) (Esfand y Tomalia, 2001). Este hecho, por tanto, va a condicionar el grado de accesibilidad y liberación de moléculas de fármacos, como puede observarse en la Figura 9.

La estructura dendrítica, la fuerza de las interacciones intramoleculares entre los grupos funcionales adyacentes en el dendrímero y las condiciones del medio (pH, polaridad, fuerza iónica) juegan un papel importante en el fenómeno de empaquetamiento denso de de Gennes (Svenson y Tomalia, 2005). Estos factores se pueden modificar para modular la encapsulación y la tasa de liberación de las moléculas de fármaco (Choudhary et al., 2017), como se discutirá más adelante.

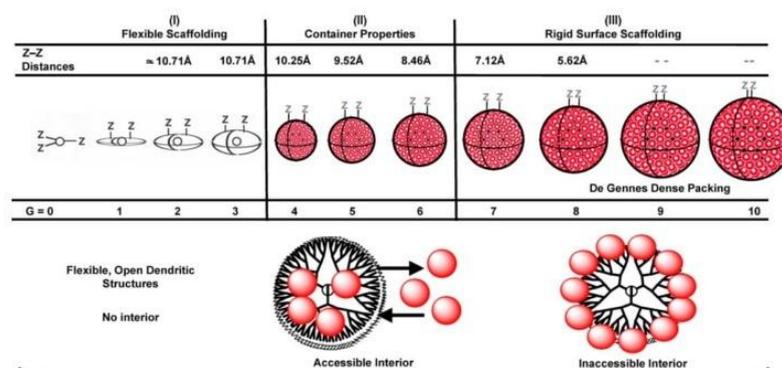


Figura 9. Flexibilidad/congestión función de la generación del dendrímero (Tomalia, 2005)

La liberación de las moléculas huésped en el caso de la encapsulación supone la hidrólisis de los puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de la superficie para permitir su salida (Esfand y Tomalia, 2001). La liberación está mediada por las condiciones del medio de reacción, como el pH, la fuerza iónica o la polaridad (Kumari et al., 2014).

A pesar de que la encapsulación es el método de elección para el transporte de moléculas terapéuticas, es importante mencionar que presenta una limitación (Choudhary et al., 2017). Esta limitación consiste en la liberación prematura del fármaco en condiciones fisiológicas antes de que el transportador llegue al sitio de acción, y puede ser atribuida a la fuerza de interacción entre el fármaco y el dendrímero. El factor desencadenante es la debilidad de la interacción que impide que el complejo se mantenga estable una vez que entra en contacto con los fluidos fisiológicos (Wu et al., 2015) (Choudhary et al., 2017). En cambio, la conjugación de moléculas de fármaco a la superficie del dendrímero mediante una asociación covalente ofrece una tasa de liberación mucho más lenta, al tratarse de una interacción más estable (Safari y Zarnegar, 2014).

4.2.2 Factores que afectan al transporte y liberación de fármacos mediados por dendrímeros

La capacidad de transporte de los dendrímeros está íntimamente relacionada con: a) la capacidad de carga del dendrímero, esto es, el número de cavidades internas que están disponibles para interactuar con las moléculas de fármaco, y b) con los grupos funcionales de la superficie del dendrímero (Yiyun y Tongwen, 2005). A esto hay que añadir que los dendrímeros, dependiendo de su estructura, tamaño y las condiciones del medio (pH, polaridad, fuerza iónica), pueden adoptar diferentes conformaciones y densidad (Svenson y Tomalia, 2005). Esa conformación va a determinar el grado de acceso de las moléculas a encapsular y su tasa de liberación. A continuación se van a discutir algunos de los factores que van a modular los cambios conformacionales en el dendrímero y, en definitiva, la capacidad de carga y liberación de moléculas huésped:

- *El pH.* Según el pH, los grupos funcionales del dendrímero podrán encontrarse protonados o desprotonados. Este hecho puede conducir a repulsiones electrostáticas entre las ramificaciones, adoptando una conformación más extendida, donde el acceso y liberación de las moléculas huésped estará favorecido. También puede ocurrir un plegamiento como consecuencia de puentes de hidrógeno entre grupos funcionales protonados del interior y grupos de la superficie, resultando en una estructura más densa y compacta, que va a dificultar la entrada de moléculas al interior y supone una liberación más prolongada (Svenson y Tomalia, 2005).

- *La generación del dendrímero.* Conforme aumenta la generación del dendrímero es posible una mayor carga de fármaco debido al incremento en la cantidad de cavidades internas y de grupos funcionales en la superficie, que se traduce en un mayor número de conjugaciones posibles con las moléculas de fármaco (Yiyun y Tongwen, 2005). En contraposición, y como ya se ha comentado, con el aumento en G se produce una mayor rigidez y congestión de la estructura dendrímica. Este hecho va a condicionar la accesibilidad y liberación de las moléculas huésped (Figura 9). También es importante tener en cuenta el equilibrio entre la eficacia del transporte de los dendrímeros de mayor G y su toxicidad asociada (Palmerston Mendes et al., 2017). La tendencia actual es la de seleccionar dendrímeros de $G \leq 4$, ya que son más biocompatibles y presentan características óptimas de encapsulación, además de que apenas existen experimentos sobre dendrímeros de $G \geq 5$ (Gupta et al., 2006).
- *La polaridad del disolvente.* Dendrímeros polares en presencia de disolventes apolares favorecen las interacciones intramoleculares (puentes de hidrógeno), resultando en el plegamiento del dendrímero hacia el interior. En cambio, disolventes polares competirán y debilitarán esas uniones intramoleculares produciendo la extensión de la conformación (Svenson y Tomalia, 2005).
- *La concentración salina o presencia de contraiones.* Cuando la concentración salina es baja, la repulsión entre los grupos ionizados del dendrímero lleva a la extensión de la estructura dendrítica, mientras que una concentración salina alta favorece la contracción o empaquetamiento de ésta (Choudhary et al., 2017).
- *La concentración del dendrímero.* Se produce un incremento en la capacidad de transporte de manera lineal con el aumento en la concentración del dendrímero (Yiyun y Tongwen, 2005). Pero es importante seleccionar adecuadamente la concentración del dendrímero teniendo en cuenta la toxicidad y los problemas de biocompatibilidad asociados a ellos (Choudhary et al., 2017).

4.3 Dendrímeros como transportadores de material genético: transfección a células

La interacción de ácidos nucleicos con macromoléculas transportadoras como los dendrímeros es de gran interés por su potencial aplicación en el campo de la terapia génica (Nandy et al., 2012).

Las terapias basadas en ácidos nucleicos siguen dos caminos: a) el transporte de ADN plasmídico tanto monocatenario (ss-DNA) como bicatenario (ds-DNA) con el fin de expresar genes de interés (Dufès et al., 2005); b) el transporte de oligonucleótidos antisentido (siRNA) o ARN interferentes, con el objetivo de minimizar la expresión o silenciar genes patogénicos, impidiendo la traducción de proteínas responsables de algún proceso patológico (Nandy et al., 2012).

En terapia génica se han venido utilizando de manera clásica los vectores de tipo viral. Sin embargo, a pesar de su alta eficacia de transfección, se ha observado que inducen una fuerte respuesta inmunogénica y efectos adversos que disminuyen sus aplicaciones clínicas. Es por esto que cada vez es mayor el interés por obtener nuevos vectores no virales (Jain et al., 2010), que generen una menor respuesta inmune, sean fácilmente fabricados con estructuras muy definidas y puedan ser modificados para dirigir su transporte (Palmerston Mendes et al., 2017).

Muchos polímeros policationicos como los dendrímeros PAMAM, gracias a su densidad de carga positiva superficial, tienen la habilidad de condensar el ADN seguido de su transfección. Este mecanismo se basa en la formación de un complejo estable con el ADN que puede penetrar a través de las membranas celulares y liberar el material genético al interior de las células. Además, su superficie puede ser modificada para mejorar la eficacia de transfección y la especificidad por las células diana (Jain et al., 2010).

Para conseguir con éxito el transporte del material genético es necesario: a) una alta densidad de carga positiva del agente compactante para lograr la condensación del ADN; b) una toxicidad sistémica e inmunogenicidad poco significativas; c) facilidad de entrada a las células diana y de liberación endosomal para poder alcanzar el núcleo; d) protección frente a la degradación enzimática sobre todo por nucleasas, ya que constituye una de las mayores preocupaciones; e) transporte o selectividad por un tipo de célula o tejido específico y evitar el transporte no específico (Kesharwani et al., 2015).

En cuanto al mecanismo de transfección, se inicia con la entrada del complejo dendrímero-ADN en la célula mediante un proceso de endocitosis mediada por la interacción entre la carga neta positiva del dendrímero y la carga negativa que presenta la membrana de la célula, y tras el cual se forma una vesícula llamada endosoma que es la que contiene el complejo y cuya membrana separa el complejo del citosol (Dufès et al., 2005). Para poder liberarse el contenido y evitar la degradación lisosomal es necesario la ruptura de este endosoma, que se produce mediante el llamado "efecto esponja de protones", en el que el complejo tiene una

capacidad de tamponamiento del pH del endosoma, se produce la captación de protones por parte de las aminas del dendrímero, acompañado de un flujo de iones cloruro hacia el interior del endosoma (Eliyahu et al., 2005). Este aumento en la concentración de iones trae consigo la entrada de agua al compartimento y con ella el hinchamiento del endosoma y su final ruptura, liberando así el contenido al citoplasma (Eliyahu et al., 2005). A continuación se separa el ADN del dendrímero y entra en el núcleo donde se va a replicar con el ADN de la célula hospedadora (Kesharwani et al., 2014).

4.3.1 Naturaleza de la interacción dendrímero-ADN

La combinación entre dendrímeros y ácidos nucleicos viene regida por interacciones hidrofóbicas y de tipo electrostático, en las que participan las cargas positivas de los grupos amino del dendrímero y las cargas negativas de los grupos fosfato del ácido nucleico. Durante la formación del complejo dendrímero-ADN se producirá la neutralización de estas cargas y, como consecuencia, el ADN pasará de una estructura más extendida a otra más compacta viendo condensada su estructura para el transporte (Dufès et al., 2005).

Cabe mencionar que el tipo de dendrímero más ensayado y sometido a simulaciones para estudiar la capacidad de complejación y transporte de material genético es el dendrímero PAMAM, sobre todo G3, G4 y G5 (Dufès et al., 2005), debido a su reducido nivel de toxicidad. Es por esto que, en este apartado del trabajo, nos centraremos en dar las explicaciones pertinentes basándonos en este tipo de dendrímero.

4.3.2 Factores determinantes en la interacción y formación del complejo dendrímero-ADN

Existe una serie de factores que van a condicionar la afinidad de la interacción:

- *La generación del dendrímero.* Conforme aumenta el tamaño del dendrímero (generación), va a presentar un número creciente de grupos funcionales en superficie, esto es, un mayor número de aminas terminales. Además, a pH fisiológico, estas aminas se presentarán cargadas aportando al dendrímero una carga neta positiva (Dufès et al., 2005). Por tanto, cuanto mayor es la generación, más elevado es el número de cargas positivas de la molécula dendrítica, que se traduce en un mayor número de contactos para su unión al ácido nucleico.
- *El pH de la disolución.* Los dendrímeros PAMAM tienen gran cantidad de aminas primarias y terciarias dependiendo del tamaño del dendrímero y pueden encontrarse protonadas o desprotonadas en función del pH de la disolución. A $\text{pH} > 7$, el dendrímero tendrá una carga neutra ya que las aminas no estarán protonadas, por lo que no existirá

formación del complejo ; a pH ~ 7, las aminas primarias del dendrímero ya sí se encontrarán protonadas y se producirá la atracción electrostática con la cadena de ADN cargada negativamente para formar el complejo; y a pH <7, tanto las aminas primarias como las terciarias estarán protonadas haciendo que el dendrímero posea aún más carga positiva. Por contra, los iones Cl^- van a solvatar en mayor medida tanto la superficie como el interior del dendrímero, aportándole neutralidad y, con ello, debilitando la unión ADN-dendrímero (Nandy et al., 2012). Por todo esto, las condiciones más ideales para que se produzca la complejación serían valores de pH cercanos al fisiológico.

- *La relación de cargas dendrímero/ADN (R).* Se define como el número de cargas positivas aportadas por las aminas del dendrímero/número de cargas negativas de los grupos fosfato del ADN. Esta relación de cargas es crítica para la forma y estructura del complejo, ya que para $R < 1$, en el caso de los dendrímeros de baja generación (G3 y G4), la interacción del dendrímero con el ADN está menos favorecida y la afinidad de la unión es menor, siendo superior la posibilidad de disociación (Nandy y Maiti, 2011). En cambio, para $R > 1$, dada por un alto número de cargas positivas sobre las negativas, y que ocurre en el caso de dendrímeros de mayor generación (G5), el ADN tenderá a enrollarse alrededor del dendrímero en cuestión de nanosegundos, superando las barreras energéticas y entrópicas pertinentes para alcanzar un patrón óptimo de embalaje y formación de un complejo mucho más estable (Nandy et al., 2012). Con el aumento en la cantidad de cargas positivas, el complejo se vuelve más estable y la disociación menos favorable. Esto se debe tener en cuenta ya que puede suponer un factor limitante en la eficacia de la transfección, puesto que el ADN debe disociarse del complejo antes de llegar al núcleo (Nandy y Maiti, 2011).
- *La longitud de la cadena de ADN.* Ésta va a determinar la rigidez o flexibilidad relativa a la hora de plegarse durante la complejación (Nandy y Maiti, 2011).
- *La concentración salina o contraiones y las moléculas de agua.* Van a jugar un papel neutralizador de las cargas para debilitar o imposibilitar la unión (Nandy y Maiti, 2011). Producen un debilitamiento de la interacción electrostática entre el dendrímero y la cadena de ADN. Desde un inicio, tanto el dendrímero como la cadena de ADN van a estar solvatados por iones Na^+ y Cl^- respectivamente, así como también por moléculas de agua, pero a medida que se va produciendo la interacción se van liberando y saliendo de las estructuras (Maiti y Bagchi, 2006). Con el aumento en la concentración salina, se criba la interacción electrostática y, por lo tanto, la afinidad de la unión disminuye. Esto se traduce en una disminución significativa del número de contactos y un menor grado

de flexión del ADN. Asimismo, se puede aprovechar la adición de cierta concentración salina para mejorar la capacidad de liberación del ADN del complejo, previa entrada al núcleo, gracias a la disminución en la fuerza de la unión (Nandy y Maiti, 2011).

4.3.3 Cambios conformacionales

Durante la formación del complejo, tanto el dendrímero como el ADN van a experimentar diversos cambios conformacionales para acoplarse de manera más eficiente.

El dendrímero por su parte extiende su estructura en la etapa inicial para aumentar la superficie de contacto con el ADN y buscar más puntos de unión para así optimizar el acoplamiento, tal y como puede observarse en la Figura 10 (Maiti y Bagchi, 2006). En este caso, los dendrímeros de menor generación (G3), debido a su menor superficie, sufren una deformación más fuerte comparada con los de mayor generación, alejándose de su forma esférica (véase Figura 10c) (Nandy et al., 2012). En la Figura 10 se puede ver la transformación que sufre la estructura dendrímica durante la complejación desde una más esférica y retraída hacia otra más extendida y asimétrica (Nandy y Maiti, 2011), siendo la deformación más importante en los dendrímeros de menor generación.

El ADN, por su parte, también soporta una serie de cambios en su estructura, pero que se ven más pronunciados en la conjugación con dendrímeros de mayor generación. Se produce una serie de torsiones y flexiones en su estructura helicoidal, inducidas por la neutralización parcial de las cargas, para acoplarse al dendrímero y envolverlo, produciéndose el enrollamiento o "wrapping" de la cadena de ADN alrededor de la estructura dendrímica, de manera análoga a como lo hace alrededor de las histonas en su proceso natural en los organismos vivos (Nandy et al., 2012).

Es importante destacar que el grado de flexión del ADN va a depender de G y de la relación de cargas dendrímero/ADN. El grado de flexión será inferior en dendrímeros de menor G debido a la relación de cargas más baja que presentan, como puede extraerse de las Figuras 10-11. Además, estas flexiones llevarán asociadas cierto acortamiento de la longitud de cadena (véase Figura 12). Por tanto, flexión y acortamiento de la cadena de ADN están correlacionados y, estos a su vez, son dependientes de la generación del dendrímero y la relación de cargas dendrímero/ADN. Un grado de flexión y acortamiento significativo de la longitud de la cadena es indicativo de una estructura de ADN más compacta (Nandy et al., 2012).

Para dendrímeros de mayor generación (G5), el ADN tiende a compactarse en mayor medida sufriendo una mayor flexión y acortamiento de la longitud de cadena al tener lugar el enrollamiento sobre la estructura del dendrímero. Debido a la mayor cantidad de cargas positivas, la afinidad de la unión es mayor, formándose un complejo de unión más fuerte, estable y compacto (Nandy y Maiti, 2011). Además, en el caso de PAMAM G5, se da una cierta

penetración del ADN en el interior del dendrímero, lo que puede afectar y complicar la liberación de la molécula de ADN del complejo previa entrada al núcleo. Sin embargo, esta penetración puede controlarse por la relación de cargas dendrímero/ADN (Maiti y Bagchi, 2006).

Como se puede observar en la Figura 10c, para dendrímeros de menor generación (G3 y G4), este enrollamiento o "wrapping" no se produce, sino una adsorción a la superficie del dendrímero, configurando una unión de carácter más débil debido al menor número de cargas positivas ($R < 1$), y se observa que la cadena de ADN tiene una conformación más estirada (Nandy y Maiti, 2011). Además, presenta un menor grado de flexión y acortamiento de la cadena como puede observarse en la Figura 11a y 12a.

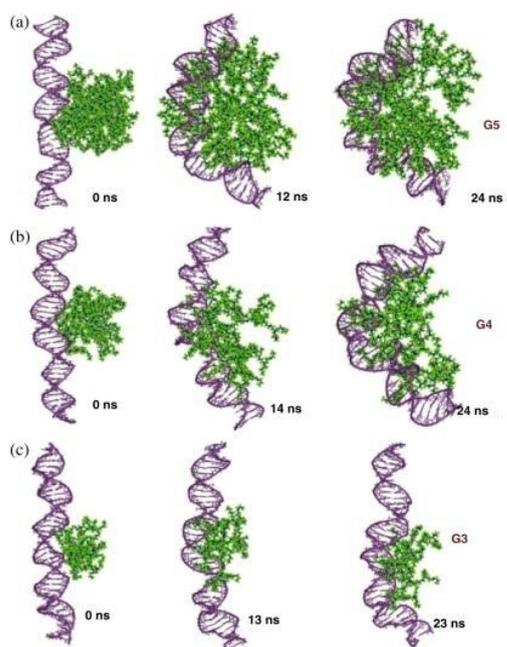


Figura 10. Cambios conformacionales durante la formación del complejo dendrímero-ADN en un intervalo de nanosegundos, para dendrímeros PAMAM: a) G5; b) G4; y c) G3 (Nandy et al., 2012).

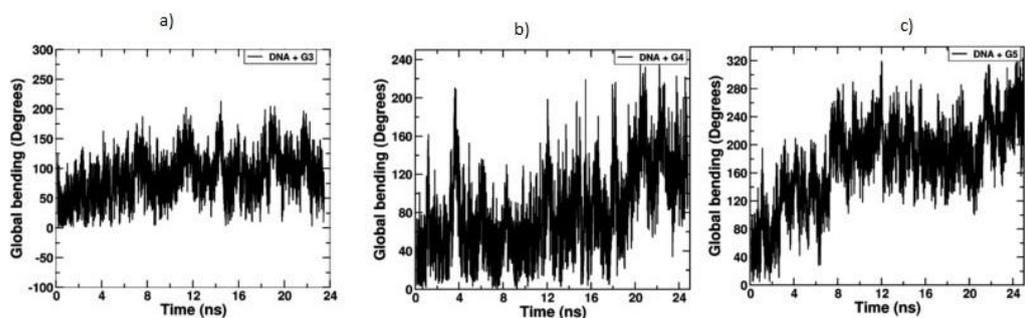


Figura 11. Flexión global de la molécula de ADN inducida por dendrímeros en función del tiempo, para dendrímeros PAMAM a) G3; b) G4; c) G5 (Nandy y Maiti, 2011).

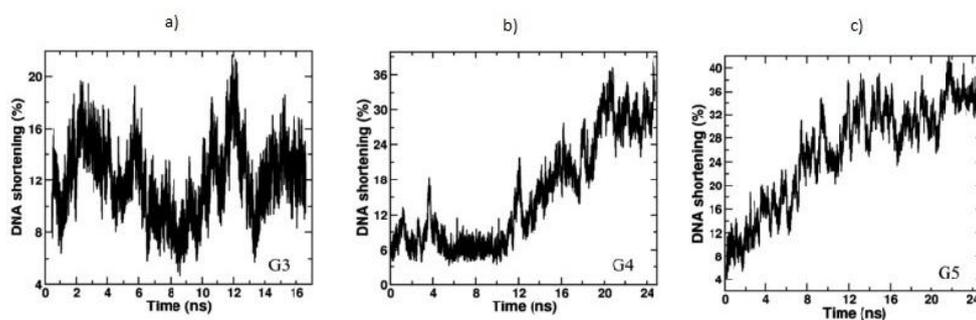


Figura 12. Porcentaje de acortamiento de la cadena de ADN inducida por dendrímeros en función del tiempo, para dendrímeros PAMAM a) G3; b) G4; c) G5 (Nandy y Maiti, 2011).

4.3.4 Termodinámica de la complejación

Tabla 7. Parámetros termodinámicos, obtenidos de dinámicas moleculares, de los complejos formados por dendrímeros PAMAM G3, G4 y G5 y una secuencia de ds-DNA de 38 pb.

Complejo	Cargas dendrímero	Cargas ADN	Relación de cargas (R)	ΔH (kcal/mol)	- T ΔS (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	Referencias
G3-ADN	+ 32	- 74	0,43	- 253,78 \pm 5,75	7,506	- 246,27	(Nandy y Maiti, 2011)
G4-ADN	+ 64	- 74	0,86	- 789,71 \pm 10,78	53,191	- 736,52	(Nandy y Maiti, 2011)
G5-ADN	+ 128	- 74	1,72	- 1283,42 \pm 16,07	52,862	- 1230,56	(Nandy y Maiti, 2011)

Como ya se ha comentado, el dendrímero va a compactar el ADN para su transporte. Esto se logra mediante la neutralización parcial de las cargas negativas del ADN por el dendrímero cargado positivamente. Durante la complejación, la carga del ADN se apantalla debido a la unión del dendrímero a su estructura.

En la Tabla 7 se recogen las variaciones de entalpía (ΔH), entropía (ΔS) y energía libre (ΔG) correspondientes al proceso de complejación existente entre dendrímeros PAMAM de varias generaciones (G3, G4 y G5) y el ADN, obtenidos a partir de datos de dinámica molecular.

A medida que la generación del dendrímero aumenta, y con ella la relación de cargas dendrímero/ADN, la interacción electrostática es más significativa. Como consecuencia, las energías libres de interacción toman valores cada vez más negativos y el proceso está más favorecido desde el punto de vista termodinámico (véase Tabla 7).

Por otro lado, la tabla refleja una pérdida de entropía en el sistema debida a la naturaleza del proceso de complejación que limita los grados de libertad del sistema. Además, el

término entrópico aumenta con la generación del dendrímero y la relación de cargas. Sin embargo, esta disminución de entropía es compensada por el término entálpico, donde la contribución electrostática juega un papel fundamental. Por otra parte, el papel de los contraiones del sistema resulta relevante, ya que la liberación de contraiones de ambos sustratos, Na^+ para el DNA y Cl^- en el dendrímero, en el proceso de complejación induce una ganancia entrópica adicional sobre el sistema.

Por tanto, la energía libre de complejación está dominada por el término entálpico y la ganancia de entropía de los contraiones.

4.4 Ventajas de los dendrímeros frente a la administración clásica de fármacos

Los sistemas transportadores de compuestos activos basados en dendrímeros junto con los citados más adelante (liposomas y nanopartículas), los cuales se engloban dentro de la nanotecnología aplicada a la medicina, van a presentar una serie de ventajas comparadas con la administración convencional de fármacos:

- permiten aumentar la solubilidad de principios activos en los fluidos fisiológicos y, consecuentemente, un aumento en la biodisponibilidad
- constituyen un ambiente de protección para evitar la rápida degradación o aclaramiento (aumento de estabilidad)
- favorecen la acumulación en el sitio de acción
- permiten el transporte dirigido o vectorización de moléculas activas a la diana terapéutica, con el consiguiente aumento de la selectividad y minimización de las reacciones adversas.
- consiguen una liberación controlada y/o sostenida del agente terapéutico para mantener los niveles plasmáticos de fármacos y poder reducir la frecuencia de dosificación y la dosis de fármaco requerida.

Estos vectores destacan sobre todo en su aplicación en terapias anticancerosas y antiinfecciosas, ya que los fármacos empleados en esos casos generan gran cantidad de reacciones adversas asociadas a la falta de especificidad y a su amplia biodistribución.

Por tanto, este tipo de transportadores cobran gran importancia a la hora de desarrollar nuevas formas terapéuticas con el objetivo de solucionar algunos de los problemas a los que se enfrentan muchos fármacos, tanto a nivel de formulación (mejoras en la estabilidad, solubilidad..), como en cuanto a resultados terapéuticos y toxicidad asociada, mejorando la eficacia y seguridad (Wilczewska et al., 2012) (Safari y Zarnegar, 2014) (Ochekpe et al., 2009).

4.5 Análisis comparativo entre dendrímeros y otros vectores

Vector	Toxicidad (IC ₅₀)	Eficiencia de encapsulación o conjugación (%)	Eficiencia de Transfección (%)	ΔG Vector/ADN
Dendrímeros	(PAMAM G4) >10 mg/ml (Fischer et al., 2003)	PAMAM G4- Doxorrubicina (encapsulación) ~ 100%	PAMAM G4 78 ± 6,8 PAMAM G5 25,69 ± 3,8 PAMAM G6 13,1 ± 0,78 (Shakhbazau et al., 2010)	(PAMAM G4:ADN) - 736,5 kcal/mol (Nandy y Maiti, 2011)
Nanopartículas de oro (AuNPs)	(1,2 nm) :140 (1,8 nm) : 30 (mmol/L) (Pan et al., 2007) (5 nm) : 50μM (15 nm) : 100 μM (Coradeghini et al., 2013) (30 nm) : 13,9 (50 nm) : 15,4 (90 nm) : 17,5 (μg/ml) (Mateo et al., 2015) AuNPs-NH ₃ ⁺ : 1± 0,5 μM AuNPs-COO ⁻ : 7,37 μM (Goodman et al., 2004)	AuNPs-CMquitosan- Doxorrubicina (conjugación) 83,3% (Madhusudhan et al., 2014)	-----	AuNP-SS-ADN (AuNP 20,2 nm) - 9,6 Kcal/mol (Lang, 2010)
Liposomas	neutro PC:Chol (4:1) 954 nmol/ml aniónico PC:Chol:PS > 2000 nmol/ml catiónico PC:Chol:SA 20 nmol/ml (Parnham y Wetzig, 1993)	Liposoma- Doxorrubicina (EPC/Colesterol=5:5) (encapsulación) 50,3% (Takeuchi et al., 1999)	DC- Chol/DOPE:ADN 25% PEG-DC- Chol/DOPE:ADN 15% (Zhang et al., 2010)	Chol/DOPE:ADN - 7,7 kcal/mol (Keller et al., 2003)

A continuación se van a exponer algunas de las ideas que se pueden extraer de la Tabla 8.

A partir de los datos de la columna de toxicidad se pueden realizar las siguiente conclusiones:

- Los dendrímeros presentan niveles más bajos de toxicidad en comparación con AuNPs y liposomas. Este hecho se corresponde con valores más elevados de IC₅₀.

- En el caso de las AuNPs, existe una relación directa entre tamaño y toxicidad, presentando menor grado de toxicidad las nanopartículas de menor tamaño (~2nm). A partir de un tamaño superior a los 5nm, la toxicidad comienza de nuevo a aumentar con el tamaño del sistema, teniendo éstas una biodistribución más amplia y una mayor acumulación en órganos y tejidos. (Aillon et al., 2009) (Al-Qadi y Remuñán-López, 2009).
- La toxicidad de las AuNPs es dependiente de la densidad de carga que le aporta la funcionalización de su superficie. Tras comparar AuNPs catiónicas (grupos amonio) y aniónicas (grupos carboxilato), ambas del mismo tamaño (2 nm), se observa que la toxicidad es mayor para las AuNPs de carácter catiónico. Este hecho se plantea en numerosos estudios que afirman que la carga positiva interacciona con las membranas biológicas produciendo su disrupción y lisis celular; mientras que la naturaleza aniónica de AuNP-COO⁻ limitaría la interacción con las membranas por repulsión electrostática (Jia et al., 2017) (Goodman et al., 2004) (Aillon et al., 2009) (Al-Qadi y Remuñán-López, 2009).
- La toxicidad de los liposomas van a ser más relevante en el caso de liposomas catiónicos, pero aún así su toxicidad no es significativa ya que sus componentes lipídicos van a ser degradados fácilmente por el organismo.

En cuanto a la eficiencia de encapsulación (dendrimeros, liposomas) y/o conjugación (AuNPs), se observa que la capacidad de carga de los liposomas con moléculas activas es mucho más reducido si se compara con dendrimeros y AuNPs. Esto podría deberse a la inestabilidad química de este tipo de vector, ya que la hidrólisis y/o oxidación de los lípidos que componen su estructura supondrían la ruptura de la vesícula transportadora liberando el contenido de manera prematura.

En términos de eficiencia de transfección se puede decir lo siguiente:

- Es superior en el caso de los dendrimeros.
- Existe una relación inversa entre la generación del dendrimeros y su eficiencia de transfección. Algunos autores lo atribuyen a un aumento en el número de cavidades internas hidrofóbicas con la generación del dendrimeros, que junto con los grupos superficiales hacen que el dendrimeros adquiera un carácter más hidrofóbico e interaccione de esta manera con el ADN dificultando su posterior liberación intracelular (Shakhbazau et al., 2010).
- En los liposomas se puede observar que la transfección disminuye con la pegilación de su superficie. Esto se puede deber a su carácter hidrófilo y neutro que va a dificultar la entrada a la célula y su liberación del endosoma una vez internalizado.

Otro término que se emplea como objeto de comparación es el incremento en energía libre (ΔG) del proceso de complejación vector-ADN. Se puede decir que a valores más negativos de ΔG , el proceso de formación del complejo está más favorecido, y podría significar un mayor grado de compactación del ADN. El proceso de complejación está más favorecido en el caso del dendrímero en comparación con liposomas y AuNPs.

En líneas generales, y para estos ejemplos concretos, se podría decir que los dendrímeros presentan algunas ventajas con respecto a liposomas y AuNPs, como es una menor toxicidad, una mayor capacidad para transportar moléculas activas y un proceso de complejación con ADN más favorable.

5. CONCLUSIONES

De la elaboración de esta revisión bibliográfica se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La toxicidad de los dendrímeros está relacionada, fundamentalmente, con la densidad de carga y el tamaño que poseen. Así, los dendrímeros catiónicos y de más alta generación son comparativamente más tóxicos que los aniónicos y aquellos de menor generación. Además, el tipo de amina presente en la estructura del dendrímero también afecta, aunque en menor grado, a su toxicidad, siendo los dendrímeros PAMAM menos tóxicos que los PLL o PEI.
2. Algunas de las estrategias para reducir la toxicidad consiste en la modificación de la carga superficial, entre las que destacan la pegilación, hidroxilación, acetilación o incorporación de grupos aniónicos; así como también el empleo de esqueletos dendríticos más biocompatibles y biodegradables como por ejemplo dendrímeros poliéter, poliéster, triazina, melamina.
3. Los dendrímeros de mayor generación sufren una excreción renal más lenta y una mayor acumulación en órganos. Los dendrímeros catiónicos son eliminados más rápidamente y se acumulan en hígado y/o riñón en mayor medida que los aniónicos.
4. El transporte de fármacos a su diana terapéutica se consigue mediante conjugación y/o encapsulación en las cavidades internas del dendrímero. La capacidad de carga y liberación posterior está influenciada por la flexibilidad/compactación de la estructura dendrítica.
5. Gracias a la densidad de carga positiva, los dendrímeros son capaces de compactar el ADN y otros polímeros para su transporte. Además, el mecanismo de complejación entre las dos macromoléculas está regido por interacciones electrostáticas, y supondrá una serie de cambios conformacionales por parte de ambas. En el caso particular del ADN, el grado de compactación depende, fundamentalmente, de la generación del dendrímero y, en consecuencia, de la relación de cargas dendrímero/ADN, así como de

las condiciones del medio (pH, concentración salina). Los parámetros termodinámicos indican que el proceso de complejación está más favorecido en el caso de dendrímeros de mayor generación con $R > 1$. En el campo de la terapia génica destacan por generar menos efectos adversos y una menor respuesta inmunogénica.

6. Los dendrímeros suponen un avance hacia el desarrollo de nuevas formulaciones de agentes terapéuticos al presentar una menor toxicidad, una mayor capacidad de transporte de moléculas activas y un proceso de complejación más favorable que en el caso de liposomas y AuNPs. Aún así, todas estas propiedades van a depender de la composición, tamaño y funcionalización de cada uno de los vectores.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abbasi E, Aval S, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi H, Joo S, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* 2014;9(1):247-56.

Agashe HB, Dutta T, Garg M, Jain NK. Investigations on the toxicological profile of functionalized fifth-generation poly(propylene imine) dendrimer. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006;58(11):1491-8.

Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N, Berkland CJ, Forrest ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* junio de 2009;61(6):457-66.

Al-Qadi S, Remuñán-López C. 7. Nanopartículas metálicas: oro. *Monogr. XXVIII Nanotecnología Farm.* 2009;8-17.

Ambade A V., Savariar EN, Thayumanavan S. Dendrimeric Micelles for Controlled Drug Release and Targeted Delivery. *Mol. Pharm.* agosto de 2005;2(4):264-72.

Choudhary S, Gupta L, Rani S, Dave K, Gupta U. Impact of Dendrimers on Solubility of Hydrophobic Drug Molecules. *Front. Pharmacol.* 16 de mayo de 2017;8(May):261.

Coradeghini R, Gioria S, García CP, Nativo P, Franchini F, Gilliland D, et al. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicol. Lett.* 2013;217(3):205-16.

Dufès C, Uchegbu IF, Schätzlein AG. Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005;57(15):2177-202.

Duncan R, Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 14 de diciembre de 2005;57(15):2215-37.

Eliyahu H, Barenholz Y, Domb AJ. Polymers for DNA delivery. *Molecules.* 31 de enero de 2005;10(1):34-64.

Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today.* 1 de abril de 2001;6(8):427-36.

Fang JY, Hong CT, Chiu WT, Wang YY. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *Int. J. Pharm.* 2001;219(1-2):61-72.

Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Kriegelstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. marzo de 2003;24(7):1121-31.

Garrido BA, Santana CMC. Dendrímeros: Macromoléculas versátiles con interés interdisciplinar. *Encuentros Multidiscip.* 2016;18(54):1-14.

Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* 2004;15(4):897-900.

Gupta U, Agashe HB, Asthana A, Jain NK. Dendrimers: Novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement. *Biomacromolecules*. 2006;7(3):649-58.

Jain K, Kesharwani P, Gupta U, Jain NK. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int. J. Pharm.* Elsevier B.V.; 15 de julio de 2010;394(1-2):122-42.

Jevprasesphant R. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* 18 de febrero de 2003;252(1-2):263-6.

Jia Y-P, Ma B-Y, Wei X-W, Qian Z-Y. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Chinese Chem. Lett.* Chinese Chemical Society; 2017;28(4):691-702.

Kannan RM, Nance E, Kannan S, Tomalia DA. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. *J. Intern. Med.* diciembre de 2014;276(6):579-617.

Keller M, Jorgensen MR, Perouzel E, Miller AD. Thermodynamic aspects and biological profile of CDAN/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes. *Biochemistry*. 2003;42(20):6067-77.

Kesharwani P, Banerjee S, Gupta U, Mohd Amin MCI, Padhye S, Sarkar FH, et al. PAMAM dendrimers as promising nanocarriers for RNAi therapeutics. *Mater. Today*. Elsevier Ltd.; diciembre de 2015;18(10):565-72.

Kesharwani P, Jain K, Jain NK. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* Elsevier Ltd; 2014;39(2):268-307.

Klajnert B, Bryszewska M. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochim. Pol.* 2001;48(1):199-208.

Kumari A, Singla R, Guliani A, Yadav SK. Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI J.* 2014;13:265-86.

Lang B. Hybridization thermodynamics of DNA bound to gold nanoparticles. *J. Chem. Thermodyn.* Elsevier Ltd; 2010;42(12):1435-40.

Liu M, Fréchet JMJ. Designing dendrimers for drug delivery. *Pharm. Sci. Technol. Today*. octubre de 1999;2(10):393-401.

Madhusudhan A, Reddy GB, Venkatesham M, Veerabhadram G, Kumar AD, Natarajan

S, et al. Efficient pH dependent drug delivery to target cancer cells by gold nanoparticles capped with carboxymethyl chitosan. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15(5):8216-34.

Maiti PK, Bagchi B. Structure and dynamics of DNA-dendrimer complexation: Role of counterions, water, and base pair sequence. *Nano Lett.* 2006;6(11):2478-85.

Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener JW, et al. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release.* 1 de marzo de 2000;65(1-2):133-48.

Mateo D, Morales P, Ávalos A, Haza AI. Comparative cytotoxicity evaluation of different size gold nanoparticles in human dermal fibroblasts. *J. Exp. Nanosci.* Taylor & Francis; 2015;10(18):1401-17.

McNerny DQ, Leroueil PR, Baker JR. Understanding specific and nonspecific toxicities: a requirement for the development of dendrimer-based pharmaceuticals. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* mayo de 2010;2(3):249-59.

Nandy B, Maiti PK. DNA compaction by a dendrimer. *J. Phys. Chem. B.* 2011;115(2):217-30.

Nandy B, Santosh M, Maiti PK. Interaction of nucleic acids with carbon nanotubes and dendrimers. *J. Biosci.* julio de 2012;37(3):457-74.

Ochekpe N, Olorunfemi P, Ngwuluka N. Nanotechnology and Drug Delivery Part 2: Nanostructures for Drug Delivery. *Trop. J. Pharm. Res.* 23 de julio de 2009;8(3):1233-1236.

Onoue S, Yamada S, Chan H. Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int. J. Nanomedicine.* 2014;9:1025-37.

Palmerston Mendes L, Pan J, Torchilin V. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. *Molecules.* 23 de agosto de 2017;22(9):1401-21.

Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small.* 2007;3(11):1941-9.

Parnham MJ, Wetzig H. Toxicity screening of liposomes. *Chem. Phys. Lipids.* 1993;64(1-3):263-74.

Safari J, Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *J. Saudi Chem. Soc. King Saud University;* abril de 2014;18(2):85-99.

Sato K, Anzai J. Dendrimers in layer-by-layer assemblies: synthesis and applications. *Molecules.* 17 de julio de 2013;18(7):8440-60.

Shakhbazau A, Isayenka I, Kartel N, Goncharova N, Seviaryn I, Kosmacheva S, et al. Transfection efficiencies of PAMAM dendrimers correlate inversely with their hydrophobicity. *Int. J. Pharm.* 2010;383(1-2):228-35.

Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 14 de diciembre de 2005;57(15):2106-29.

Takeuchi H, Kojima H, Toyoda T, Yamamoto H, Hino T, Kawashima Y. Prolonged circulation time of doxorubicin-loaded liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol after intravenous injection in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1999;48(2):123-9.

Tomalia DA. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Prog. Polym. Sci.* marzo de 2005;30(3-4):294-324.

Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, et al. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* enero de 1985;17(1):117-32.

Tomalia DA, Fréchet JMJ. Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2002;40(16):2719-28.

Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol. Reports.* septiembre de 2012;64(5):1020-37.

Wu LP, Ficker M, Christensen JB, Trohopoulos PN, Moghimi SM. Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges. *Bioconjug. Chem.* 2015;26(7):1198-211.

Yiyun C, Tongwen X. Dendrimers as potential drug carriers. Part I. Solubilization of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the presence of polyamidoamine dendrimers. *Eur. J. Med. Chem.* 2005;40(11):1188-92.

Zhang Y, Li H, Sun J, Gao W, Liu W, Li B, et al. DC-Chol/DOPE cationic liposomes: A comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery. *Int. J. Pharm. Elsevier B.V.*; 2010;390(2):198-207.