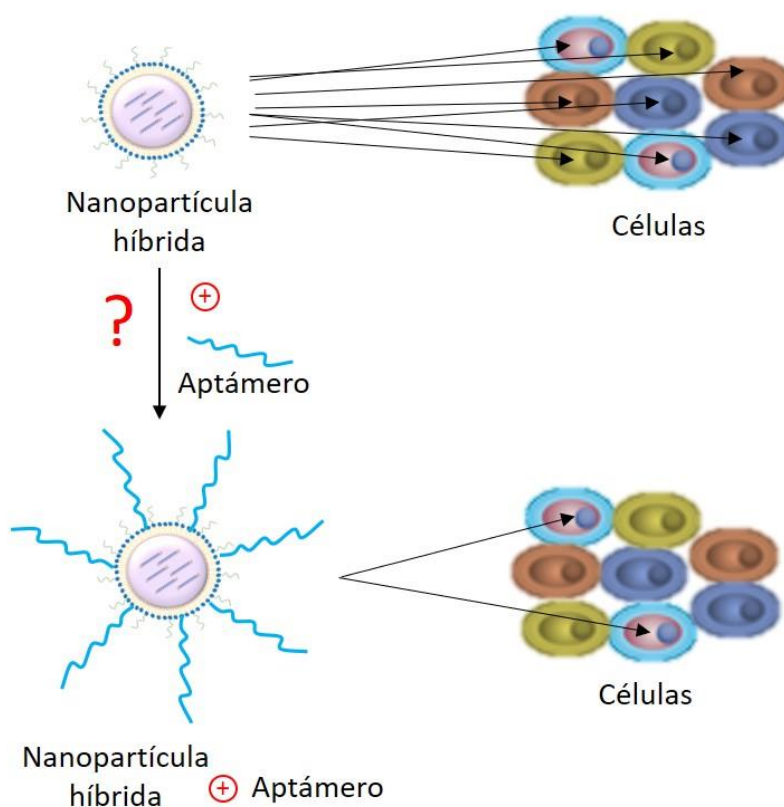


Elaboración de nanopartículas híbridas para la vectorización activa de oligonucleótidos



Curso 2019-2020

Alumna: Andrea Santos Fagundo

Tutora: Araceli Delgado Hernández

Co-tutora: Patricia Díaz Rodríguez

Índice

1. Abstract	3
2. Resumen	4
3. Introducción	5
4. Objetivos	8
5. Materiales y Métodos	9
5.1. Materiales	9
5.2. Preparación de las nanopartículas	9
5.3. Caracterización de las nanopartículas	10
5.3.1. Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños	11
5.3.2. Determinación de la carga superficial	11
5.4. Adsorción del aptámero a la superficie de las nanopartículas	11
5.4.1. Recta de calibrado del aptámero conjugado con fluoróforo	12
5.4.2. Determinación de la eficiencia de adsorción del aptámero	12
5.4.3. Caracterización de las nanopartículas	12
6. Resultados y Discusión	13
6.1. Caracterización de las nanopartículas	13
6.2. Adsorción del aptámero a la superficie de las nanopartículas ...	14
6.2.1. Recta de calibrado del aptámero conjugado con fluoróforo	14
6.2.2. Caracterización de las nanopartículas y eficiencia de adsorción	15
A. Efecto de la carga superficial de las nanopartículas y de las condiciones de incubación sobre la eficiencia de adsorción	15
B. Efecto de la adsorción del aptámero sobre la caracterización de las nanopartículas	16
7. Conclusiones	19
8. Referencias bibliográficas	20

1. Abstract

The discovery of genes involved in the regulation of bone regeneration together with the progress of nanotechnology, can led to the development of gene therapy systems with specific vectorization to cellular targets using molecules such as aptamers or antibodies. In this work, the main objective was to obtain hybrid nanoparticles functionalized with an aptamer by surface adsorption able to present suitable physicochemical characteristics for their loading with antisense oligonucleotides for bone regenerative medicine.

In this way, the influence of nanoparticles surface charge and aptamer-nanoparticles incubation conditions (ambient temperature for 1 hour, or 4°C for 24 hours) on the adsorption efficiency of the aptamer was studied. Also, the modifications this adsorption produces on nanoparticles properties, specifically, size and Z potential was assessed. As result, an increase in the adsorption efficiency of the aptamer was observed with an increase in the positive surface charge of the nanoparticles, as well as an increase in the diameter and decrease of the Z potential at higher adsorption efficiency of the aptamer. No differences were observed in the adsorption efficiencies between both incubation conditions.

2. Resumen

La identificación de genes implicados en la regulación de la regeneración ósea y el avance de la nanotecnología permiten desarrollar sistemas de terapia génica para su vectorización a dianas celulares específicas mediante el empleo de moléculas como aptámeros o anticuerpos. En este trabajo, el principal objetivo fue la obtención de nanopartículas híbridas funcionalizadas con un aptámero mediante adsorción superficial con características fisicoquímicas adecuadas para la incorporación de oligonucleótidos antisentido en medicina regenerativa ósea.

Para ello, se estudió la influencia de la carga superficial de las nanopartículas y de las condiciones de incubación (temperatura ambiente durante 1 hora, o 4°C durante 24 horas) sobre la eficiencia de adsorción del aptámero a la superficie de las nanopartículas, así como las modificaciones que esta adsorción produce sobre las propiedades de las mismas, en concreto, tamaño y potencial Z. Los resultados indicaron un incremento en la eficiencia de adsorción del aptámero a medida que aumenta la carga superficial positiva de las nanopartículas, así como un aumento del diámetro y disminución del potencial Z con el incremento de la eficiencia de adsorción del aptámero. No se observaron diferencias en la eficiencia de adsorción entre ambas condiciones de incubación.

3. Introducción

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado, vascularizado e innervado que realiza numerosas funciones: es el soporte estructural del organismo, sirve de punto de anclaje para los músculos y tendones, está involucrado en el movimiento, es la principal reserva de calcio y fosfato del organismo, protege los órganos vitales y es el soporte de la hematopoyesis (1-3). Se trata de un tejido dinámico, con capacidad de regeneración, sometido a un continuo proceso de remodelado.

Sin embargo, a pesar de la destacable capacidad intrínseca de regeneración ósea, hay una serie de situaciones clínicas en las que no se consigue una regeneración completa tras la pérdida de masa ósea por lesiones, infecciones o tumores. Las causas no están claras, aunque se sabe que el tamaño a regenerar es crucial (4), y que la falta de regeneración completa es más común en pacientes fumadores, alcohólicos, diabéticos, personas de edad avanzada o con osteoporosis (5, 6).

La investigación actual en el campo de la regeneración ósea está centrada en la biología molecular: búsqueda de factores de crecimiento, hormonas, y anticuerpos monoclonales como alternativas terapéuticas e identificación de genes implicados en la regulación de la regeneración ósea, que se convierten en dianas terapéuticas para la prevención y tratamiento del déficit de regeneración ósea con gran eficiencia y pocos efectos adversos (1, 7).

En este sentido, diversos autores han señalado el silenciamiento del gen *Smurf1*, modulador de la señalización de las proteínas morfogenéticas óseas, BMPs, como un objetivo potencial para promover la regeneración ósea, pues su expresión bloquea la señal osteogénica provocada por BMP-2 (8).

Dentro de la terapia génica, los oligonucleótidos antisentido (ASOs) son moléculas capaces de inhibir la expresión génica, al tener como diana el ARN mensajero (ARNm) del gen. Han mostrado ser muy potentes en ensayos *in vitro*. Sin embargo, la traslación a la clínica ha sido obstaculizada por tres principales limitaciones: inestabilidad, baja permeabilidad celular y toxicidad (9, 10). Para afrontar estas limitaciones se han desarrollado modificaciones químicas y sistemas de liberación específicos que permiten una mejor penetración intracelular, mayor intervalo entre dosis, aumentar la eficacia y disminuir los efectos adversos (10, 11).

Dentro de las modificaciones químicas de los ASOs, se encuentran los gapmers, oligonucleótidos quiméricos antisentido con una secuencia central de ADN flanqueada por ribonucleótidos bloqueados, LNA. Este diseño aumenta la resistencia a las nucleasas, presenta un potencial inmunoestimulador más bajo dando lugar a una menor toxicidad, y aumenta la afinidad de hibridación con el ARNm, aumentando la potencia terapéutica, en relación con otras modificaciones (10, 11).

Por otra parte, para asegurar la efectividad de los gapmers se requiere englobarlos en una estructura que permita la distribución específica al lugar de acción. Para ello, se dispone de dos grandes grupos de sistemas: virales, basados en la capacidad de los virus de transferir su propio material genético a las células de manera eficiente (12), y los no virales, preferidos por su baja inmunogenicidad y facilidad de producción a gran escala (13).

Dentro de los sistemas de transporte no virales se encuentran las nanopartículas, sistemas con un tamaño comprendido entre 10 y 1000 nm. Estas nanopartículas resultan ideales debido al tamaño que presentan, permitiendo el paso a través de las membranas biológicas. Además, pueden cargar grandes cantidades de principio activo al tener gran superficie específica permitiendo una menor frecuencia de administración, aumentando la efectividad de las moléculas terapéuticas, y son fácilmente funcionalizables para realizar una liberación celular específica, reduciendo los efectos adversos (14, 15).

Existen diferentes tipos de nanopartículas: inorgánicas (la potencial toxicidad y la falta de distribución específica *in vivo* restringe su uso en clínica), y orgánicas (poliméricas, lipídicas, e híbridas, con un núcleo polimérico y envuelta lipídica). Las nanopartículas híbridas presentan muchas ventajas, pues comparten las características positivas de las nanopartículas poliméricas: estabilidad física e índice de polidispersión bajo, y de las nanopartículas lipídicas: fácilmente funcionalizables, buena estabilidad en circulación general y mayor eficacia de captación *in vivo*, lo que las convierte en sistemas prometedores en el tratamiento de diferentes enfermedades (15).

Sin embargo, la llegada de nanopartículas a las células diana y la liberación específica del gapmer es difícil (2). Existe una gran cantidad de moléculas que pueden ser utilizadas para funcionalizar las nanopartículas y permitir una vectorización específica a los diferentes tipos celulares del hueso. Entre ellos, los aptámeros, oligonucleótidos sintéticos, constituidos por una pequeña cadena sencilla de ADN o ARN (16). Su

estructura tridimensional única justifica su capacidad de unión a ciertas moléculas diana por complementariedad, enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas, con alta afinidad y especificidad, de forma similar a los anticuerpos monoclonales con las ventajas de presentar una mayor vida útil, ausencia de inmunogenicidad y toxicidad, menores costes de producción y menor variabilidad entre lotes a escala industrial (2, 17).

4. Objetivos

El principal objetivo del trabajo es obtener nanopartículas híbridas funcionalizadas con un aptámero mediante adsorción superficial que presenten características fisicoquímicas adecuadas para la incorporación de gapmers en medicina regenerativa ósea.

Para ello nos centraremos en los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un protocolo para la elaboración de nanopartículas híbridas con distinta carga superficial utilizando el método de nanoprecipitación modificada.
- Estudiar la influencia de la carga superficial de las nanopartículas elaboradas, y de las condiciones de incubación, sobre la eficiencia de adsorción del aptámero.
- Estudiar el efecto de la adsorción del aptámero sobre las propiedades de las nanopartículas obtenidas, específicamente, sobre el tamaño y potencial Z.

5. Materiales y métodos

5.1 Materiales

Se utilizaron los siguientes productos: Ácido poli (D,L-láctico-co-glicólico) 50:50 (PLGA; viscosidad intrínseca 22g /dL, Resomer® RG 502, Boehringer Ingelheim), Sulfato de protamina (Sigma Aldrich), DSPE-PEG₂₀₀₀ (Nanosoft polymers™), DOTAP (Sigma Aldrich), Lecitina (Avanti Lipids), Acetona para análisis (EMSURE®), Aptámero diseñado para vectorización selectiva conjugado con fluoróforo (Ap1-FAM; secuencia 5'-56/FAM/GAA TTC AGT CGG ACA GCG ACG ACG GTG ATA TGT CAA GGT CGT ATG CAC GAG TCA GAG GGA TGG ACG AAT ATC GTC TCC C-3'; Integrated DNA Technologies™), cuyos pesos moleculares se recogen en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Características de los materiales.

Producto	Peso molecular (g/mol)
Resomer® RG 502 (PLGA)	12000 ,0
DSPE-PEG ₂₀₀₀	2748,1
DOTAP	698,5
Lecitina	706,1
Ap1-FAM	25066,4

5.2 Preparación de las nanopartículas

Para evaluar el efecto de la carga superficial sobre la adsorción del aptámero, se prepararon tres formulaciones de nanopartículas híbridas con proporciones variables de lípidos para dar lugar a cargas superficiales diferentes mediante el método de nanoprecipitación modificada (*Tabla 2*).

Tabla 2. Composición de las nanopartículas híbridas.

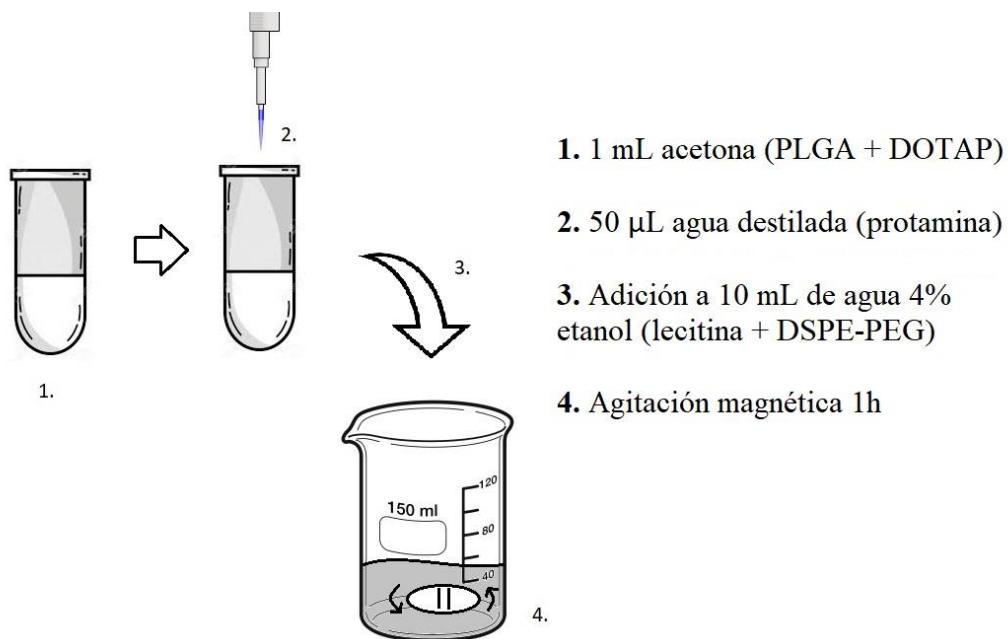
Formulación	Componentes	
	Fase orgánica (1mL acetona)	Fase acuosa (10mL agua 4% etanol)
1	PLGA 5 mg Protamina 45 µg en 50 µL agua destilada	Lecitina 0,6 mg DSPE-PEG 0,43 mg
2	PLGA 5 mg Protamina 45 µg en 50 µL agua destilada DOTAP 0,2 mg	Lecitina 0,3 mg DSPE-PEG 0,43 mg
3	PLGA 5 mg Protamina 45 µg en 50 µL agua destilada DOTAP 0,4 mg	DSPE-PEG 0,43 mg

Se comenzó preparando la fase acuosa, formada por los componentes lipídicos: lecitina y DSPE-PEG en las proporciones indicadas en la *Tabla 2*. Se pesó la cantidad total necesaria de cada componente y se disolvieron, por separado, en agua etanol 4%, bajo agitación magnética, a 65°C, hasta completa disolución.

Paralelamente, se prepararon, por separado, los componentes de la fase orgánica: polímero (PLGA), y, en los casos necesarios, DOTAP (*Tabla 2*), en 1 mL de acetona. Y la protamina en agua destilada.

A continuación, se pipeteó la protamina sobre el resto de la fase orgánica y, finalmente, como se muestra en la *Figura 1*, los componentes de la fase orgánica, disueltos en 1 mL de acetona, se vertieron sobre 10 mL de fase acuosa, formándose las nanopartículas por precipitación del polímero, tras una rápida difusión del disolvente orgánico al medio acuoso, en agitación magnética. La dispersión de las nanopartículas se mantuvo en una campana de extracción de gases, durante 1 hora en agitación magnética, para favorecer la evaporación de la acetona, quedando las nanopartículas en suspensión acuosa.

Figura 1. Preparación de nanopartículas híbridas por nanoprecipitación modificada.



5.3 Caracterización de las nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas obtenidas se realizó mediante la determinación del tamaño medio, distribución de tamaños y carga superficial.

5.3.1 Determinación del tamaño medio y distribución de tamaños

Una muestra de cada formulación se sometió a ultrasonidos (JP Selecta, España) durante 1 minuto. Posteriormente, 100 μL de muestra se diluyeron con 900 μL de agua destilada y se determinó el tamaño medio, índice de polidispersión (PDI) y distribución de tamaños, por triplicado, mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) en el equipo Zetasizer Nano (Malvern Instruments, EEUU). Esta técnica está basada en la medición de la variación de la intensidad de la luz dispersada con el tiempo, tras la incidencia de un haz de luz láser sobre una solución de partículas en suspensión.

5.3.2 Determinación de la carga superficial

La determinación de la carga superficial de las nanopartículas se realizó, por triplicado, a partir de la medición del potencial Z en una microcubeta, utilizando una celda de inmersión, mediante la técnica de dispersión de luz electroforética (ELS), en el equipo Zetasizer Nano (Malvern Instruments, UK).

Tras la aplicación de un campo eléctrico, el potencial zeta se determinó a partir de la movilidad electroforética de las nanopartículas hacia el electrodo de platino de la celda, determinada en función de la intensidad del haz de luz láser dispersada.

5.4 Adsorción del aptámero a la superficie de las nanopartículas

Para evaluar el efecto de la concentración del aptámero y de las condiciones en el proceso de adsorción, una vez obtenidas las nanopartículas, se prepararon alícuotas de 200 μL de cada formulación y se incubaron con dos proporciones diferentes de nanopartículas:aptámero conjugado con fluoróforo (Ap1-FAM): 10:0,2 y 10:0,02.

Para ello, las alícuotas de nanopartículas (200 μL) se mezclaron con 1 μL de disolución de Ap1-FAM a 100 μM , para la proporción de 0,2 Ap1-FAM, o 10 μM , para la proporción de 0,02, en una campana de flujo laminar horizontal (Esco, Estados Unidos).

Posteriormente, se utilizó un agitador vórtex (Scientific Industries SI, Estados Unidos) para homogeneizar las muestras. La incubación de las nanopartículas con las dos concentraciones de aptámero ensayadas se realizó en dos condiciones: a temperatura ambiente durante 1 hora, y a 4°C durante 24 horas, ambas en oscuridad.

5.4.1 Recta de calibrado del aptámero conjugado con fluoróforo

Para determinar la eficiencia de adsorción del aptámero a la superficie de las nanopartículas se evaluó la relación entre la señal de fluorescencia y la concentración del aptámero conjugado con fluoróforo, Ap1-FAM.

Para ello, una disolución de 100 μM de aptámero Ap1-FAM se diluyó con agua destilada libre de DNAsas para obtener muestras de 300 μL en el intervalo de concentraciones de 0,025 a 0,25 μM . Las muestras se colocaron en placas negras de 96 pocillos (Corning, EEUU) y se midió la fluorescencia de cada muestra por duplicado en un fluorímetro (Biotek, Estados Unidos) con filtros de excitación y de emisión de 485 ± 20 nm y 528 ± 20 nm respectivamente.

5.4.2 Determinación de la eficiencia de adsorción del aptámero

Una vez terminado el proceso de adsorción, se centrifugaron las suspensiones de nanopartículas a 16.000 g durante 30 minutos a 20°C.

Se recogió el sobrenadante resultante, y se determinó la concentración de aptámero libre midiendo la fluorescencia de cada muestra, por duplicado en un fluorímetro como se indicó anteriormente.

A partir de la cantidad de aptámero libre en el sobrenadante, se determinó la eficiencia de adsorción empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de adsorción (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Cantidad de aptámero en el sobrenadante (\mu\text{g})}}{\text{Cantidad de aptámero inicial (\mu\text{g})}} \right) \times 100$$

5.4.3 Caracterización de las nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas tras la adsorción del aptámero se realizó mediante la determinación del tamaño medio, distribución de tamaños y carga superficial según el procedimiento descrito anteriormente en los apartados 5.3.1 y 5.3.2.

6. Resultados y discusión

6.1 Caracterización de las nanopartículas

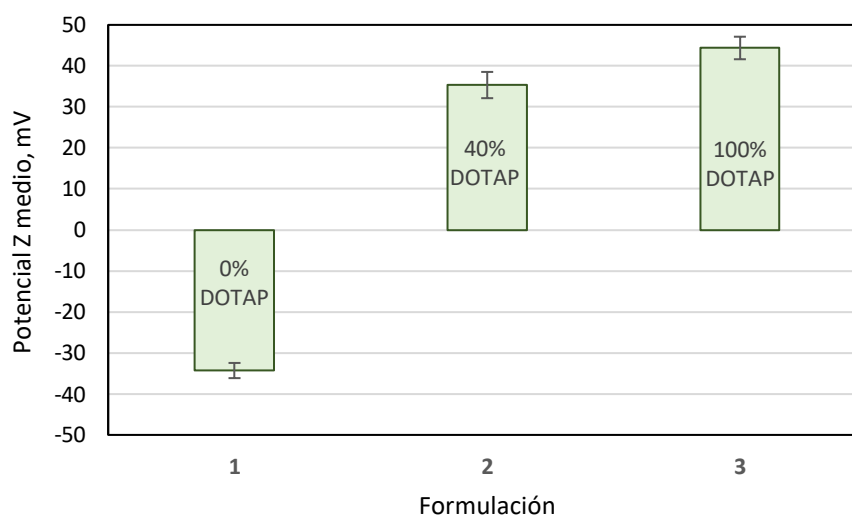
Las formulaciones de nanopartículas híbridas preparadas se caracterizaron de acuerdo con lo descrito obteniendo los resultados que se muestran en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Tamaño medio, índice de polidispersión (PDI) y potencial Z de las nanopartículas antes de la adsorción del aptámero.

Formulación	Tamaño medio (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
1	150,80 ± 0,78	0,11 ± 0,0087	-34,30 ± 1,85
2	167,77 ± 0,91	0,10 ± 0,0038	+35,33 ± 3,20
3	165,03 ± 0,45	0,10 ± 0,016	+44,37 ± 2,75

Las nanopartículas elaboradas presentaron un diámetro medio en el rango de 150-168 nm, con una distribución de tamaños monodispersa, reflejada por un índice de polidispersión bajo, PDI ~0,1, en las tres formulaciones preparadas. Por otra parte, las nanopartículas obtenidas presentaron diferentes cargas superficiales en función de la proporción de DOTAP con respecto a la mezcla de DOTAP + lecitina ($\frac{DOTAP}{DOTAP+lecitina} \times 100$). Ambos lípidos se emplearon para ajustar la carga mientras que el resto de los componentes de la formulación se mantuvo constante. De esta manera, se puede evaluar el efecto de la carga superficial sobre la adsorción del aptámero.

Gráfica 1. Influencia de la proporción de DOTAP en el Potencial Z de las nanopartículas elaboradas.



Como se puede observar en la *Gráfica 1*, el potencial Z de las nanopartículas aumenta a medida que aumenta la proporción de DOTAP, pasando de $-34,30 \pm 1,85$ mV en la formulación 1 (0% DOTAP), a $+35,33 \pm 3,20$ mV, en la formulación 2 (40% DOTAP), y $+44,37 \pm 2,75$ mV en la formulación 3 (100% DOTAP).

6.2 Adsorción del aptámero a la superficie de las nanopartículas

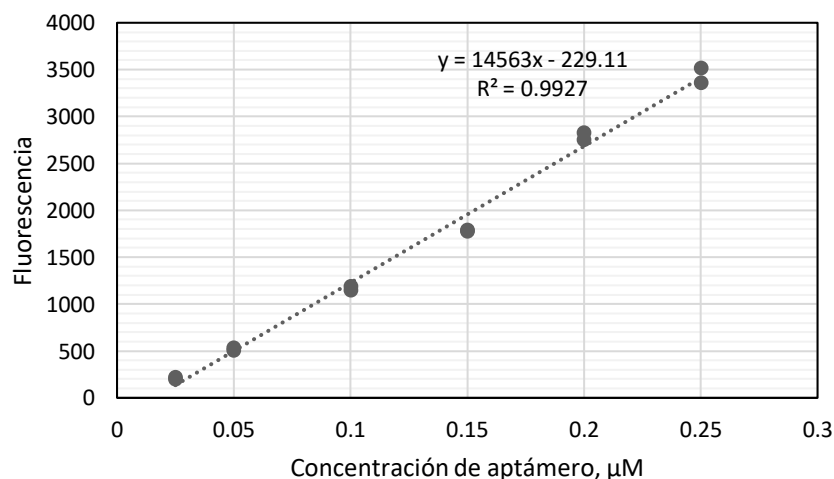
6.2.1 Recta de calibrado del aptámero conjugado con fluoróforo

Para determinar la relación entre la señal de fluorescencia y la concentración de Ap1-FAM se estudió la fluorescencia en el intervalo de concentraciones 0,025-0,25 μ M por duplicado en un fluorímetro, obteniéndose los resultados recogidos en la *Tabla 4* y que se representan en la *Gráfica 2*.

Tabla 4. Resultados fluorescencia media en el intervalo de linealidad corregida por el blanco.

Fluorescencia media	Concentración (μ M)
3441,5	0,25
2791	0,2
1782,5	0,15
1169	0,1
518,5	0,05
209,5	0,025

Gráfica 2. Relación entre fluorescencia y concentración de Ap1-FAM.



Como puede observarse en la *Gráfica 2*, la relación entre la señal de fluorescencia y la concentración de Ap1-FAM se encuentra definida mediante la siguiente ecuación:

$$y = 14563 \times x - 229,11 \qquad r^2 = 0,9927$$

Mostrando un coeficiente de correlación, r^2 , próximo a la unidad, por lo que, para los datos obtenidos, el modelo lineal es adecuado y la variabilidad de la fluorescencia es explicada por el modelo de regresión ajustado (18).

6.2.2 Caracterización de las nanopartículas y eficiencia de adsorción

Una vez obtenidas las nanopartículas, cada formulación se incubó con dos proporciones de Ap1-FAM en dos condiciones: a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora, y a 4°C durante 24 horas, ambas en oscuridad.

El efecto de la carga superficial de las nanopartículas, las condiciones de adsorción y la concentración de aptámero se evaluaron sobre la eficiencia de adsorción obteniendo los resultados que se muestran en la *Tabla 5*, y sobre las propiedades de las nanopartículas obteniendo los resultados que se muestran en la *Tabla 6*.

A) Efecto de la carga superficial de las nanopartículas y de las condiciones de incubación sobre la eficiencia de adsorción

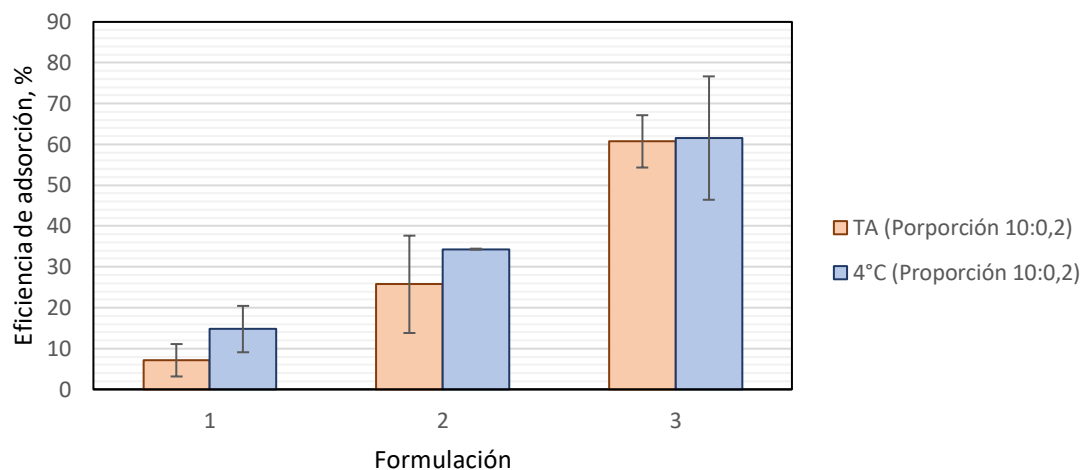
Tabla 5. Eficiencia de adsorción del aptámero.

Formulación	Proporción NPs:Ap1-FAM	Condiciones	Eficiencia de adsorción (%)
1	10:0,02	TA/1 h	0,26 ± 0,46
		4°C/24 h	26,7 ± 21,7
	10:0,2	TA/1 h	7,13 ± 3,97
		4°C/24 h	14,77 ± 5,68
2	10:0,02	TA/1 h	0,92 ± 1,59
		4°C/24 h	3,27 ± 5,67
	10:0,2	TA/1 h	25,73 ± 11,92
		4°C/24 h	34,35 ± 0,11
3	10:0,02	TA/1 h	-
		4°C/24 h	-
	10:0,2	TA/1 h	60,74 ± 6,41
		4°C/24 h	61,55 ± 15,11

Para evaluar los resultados con mayor claridad solo se representa la proporción de aptámero más elevada (0,2), pues, con la proporción menor de aptámero (0,02), las desviaciones estándar son muy elevadas.

Al ser el aptámero un oligonucleótido y estar cargado negativamente, se observa un aumento significativo en su eficiencia de adsorción con el aumento de la carga superficial positiva de las nanopartículas, consecuencia de un aumento de las fuerzas electrostáticas atractivas (*Gráfica 3*).

Gráfica 3. Efecto de la carga superficial de las nanopartículas y de las condiciones de incubación sobre la eficiencia de adsorción.



Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la eficiencia de adsorción entre ambas condiciones de incubación encontrándose las diferencias respectivas dentro del intervalo de error.

B) Efecto de la adsorción del aptámero sobre la caracterización de las nanopartículas

Tabla 6. Tamaño medio, índice de polidispersión (PDI) y potencial Z de las nanopartículas después de la adsorción del aptámero.

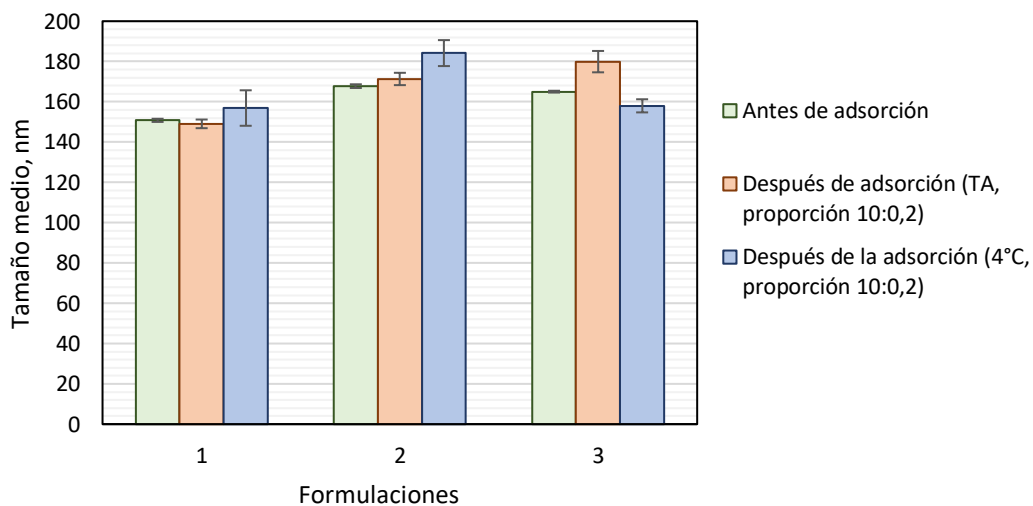
Formulación	Proporción NPs:Ap1-FAM	Condiciones	Tamaño medio	PDI	Potencial Z (mV)
1	10:0,02	TA/1 h	173,80 ± 3,25	0,21 ± 0,012	-19,60 ± 4,69
		4°C/24 h	190,33 ± 2,03	0,30 ± 0,0066	-13,26 ± 0,95
	10:0,2	TA/1 h	149,06 ± 2,15	0,087 ± 0,017	-28,43 ± 0,40
		4°C/24 h	156,90 ± 8,81	0,11 ± 0,0075	-14,67 ± 0,45
2	10:0,02	TA/1 h	165,17 ± 2,26	0,12 ± 0,024	-12,27 ± 1,23
		4°C/24 h	165,57 ± 5,45	0,082 ± 0,016	33,77 ± 1,12
	10:0,2	TA/1 h	171,33 ± 3,06	0,17 ± 0,012	-22,07 ± 1,60
		4°C/24 h	184,17 ± 6,44	0,20 ± 0,0090	-26,67 ± 0,64
3	10:0,02	TA/1 h	153,87 ± 0,81	0,099 ± 0,015	35,50 ± 0,92
		4°C/24 h	140,80 ± 2,82	0,11 ± 0,012	24,27 ± 2,06
	10:0,2	TA/1 h	179,93 ± 5,30	0,22 ± 0,0092	-23,07 ± 1,65
		4°C/24 h	158,00 ± 3,26	0,17 ± 0,016	-23,20 ± 1,08

Tras la adsorción del aptámero, las nanopartículas presentaron un diámetro medio superior, en el rango de 149-191 nm, frente a los 150-168 nm iniciales, con una

distribución de tamaños monodispersa, reflejada por un índice de polidispersión bajo, PDI $\sim 0,1$.

Por una parte, como puede observarse en la *Gráfica 4*, a temperatura ambiente, a medida que aumenta la eficiencia de adsorción (Formulación 1 < Formulación 2 < Formulación 3), aumenta ligeramente el diámetro medio de las nanopartículas. Mientras que, a 4°C, no se observa este aumento del diámetro, que se mantiene similar a las nanopartículas sin funcionalizar, posiblemente como consecuencia de un cambio de conformación de los lípidos de la cubierta al mantener las nanopartículas a bajas temperaturas (19). Cabe esperar que esta pequeña diferencia de diámetro medio (de 150-168 nm a 149-191 nm) no tenga ninguna repercusión en las características de la formulación.

Gráfica 4. Efecto de la adsorción sobre el tamaño medio de las nanopartículas a temperatura ambiente y 4°C.



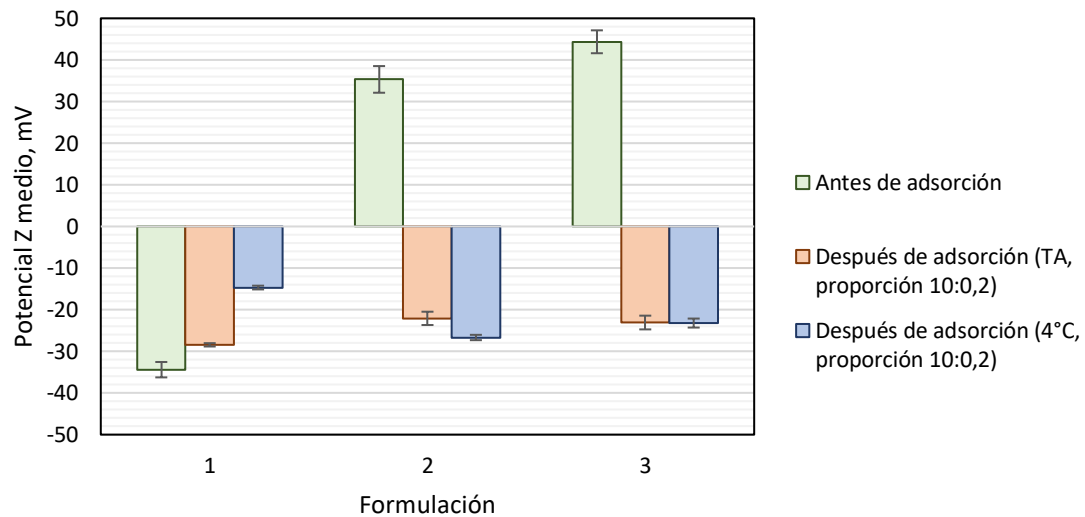
Por otra parte, como se muestra en la *Gráfica 5*, la modificación del potencial Z varía en función de la carga inicial y la eficiencia de adsorción del aptámero. Así, en la formulación 2, con eficiencias de adsorción del 26 % (temperatura ambiente durante 1h) y 34% (4°C durante 24 horas), el potencial Z inicial, +35,33 mV, disminuyó a -22,07 mV (57,4 mV de diferencia) y a -26,67 mV (62 mV de diferencia), respectivamente.

Mientras que, en la formulación 3, con eficiencias de adsorción del 60% (temperatura ambiente durante 1h) y 61% (4°C durante 24 horas), el potencial Z inicial, +44,37 mV, disminuyó a -23,07 mV (67,44 mV de diferencia) y a -23,20 mV (67,57 mV de diferencia), respectivamente.

Por lo tanto, se observa una disminución del potencial Z medio de las nanopartículas con el aumento de la eficiencia de adsorción, debido a la carga negativa del aptámero. Las

nanopartículas obtenidas con carga positiva presentaron propiedades adecuadas para incorporar el gapmer y permitir al mismo tiempo la funcionalización de estas con el aptámero. Siendo necesaria la realización de estudios *in vitro* para determinar en qué medida la disminución del potencial Z y las variaciones en la eficiencia de adsorción del aptámero obtenidas afectan a la eficiencia de captación celular de las nanopartículas.

Gráfica 5. Efecto de la adsorción del aptámero sobre el potencial Z medio a temperatura ambiente y 4°C.



7. Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

1. Se pueden obtener nanopartículas híbridas con carga superficial variable en las que el potencial Z aumenta a medida que aumenta la proporción de DOTAP con respecto a la mezcla de DOTAP + lecitina.
2. La eficiencia de adsorción del aptámero aumenta con el aumento de la carga superficial positiva de las nanopartículas, consecuencia de un aumento de las fuerzas electrostáticas atractivas.
3. No se observan diferencias significativas en la eficiencia de adsorción del aptámero a temperatura ambiente durante 1 hora y a 4°C durante 24 horas.
4. A mayor eficiencia de adsorción del aptámero, mayor diámetro de las nanopartículas y menor potencial Z.

8. Referencias bibliográficas

1. Cheng H, Chawl A, Yang Y, Li Y, Zhang J, Jang HL, et al. Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery. *Drug Discov. Today.* 2017;22(9):1336–1350.
2. Liu X. Bone site-specific delivery of siRNA. *J Biomed Res.* 2016;30(4):264-271.
3. Prieto Pérez L, Prieto Rodríguez S. Fisiología del hueso. En: Jesús A. Fernández-Tresguerres. *Fisiología humana.* España: McGRAW-HILL Interamericana; 2010.
4. Barrère Clemens F, A van Blitterswijk, Klaas de Groot. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int. J. Nanomed.* 2006;1(3):317–332.
5. Gun-Il I. Nonviral gene transfer strategies to promote bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2013;101(A):3009–3018.
6. Newman MR, Benoit Danielle SW. Local and targeted drug delivery for bone regeneration. *Curr Opin Biotech.* 2016;40:125–132.
7. Chi X, Gatti P, Papoian T. Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics. *Drug Discov. Today.* 2017;22(5):823-831.
8. Rodríguez Évora M, García Pizarro E, Del Rosario C, Perez López J, Reyes R, Delgado A, et al. Smurf1 Knocked-Down, Mesenchymal Stem Cells and BMP 2 in an Electrospun System for Bone Regeneration. *Biomacromolecules.* 2014;15:1311–1322.
9. Bennett CF. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age. *Annu. Rev. Med.* 2019;70:307–321.
10. Frazier KS. Antisense oligonucleotide therapies: the promise and the challenges from a toxicologic pathologist’s perspective. *Toxicol. Pathol.* 2015;43:78-89.
11. DeVos SL, Miller TM. Antisense oligonucleotides: treating neurodegeneration at the level of RNA. *Neurother.* 2013;10:486–497.
12. Torrades S. Terapia génica, una nueva estrategia terapéutica. *OFFARM.* 2001;20(9):130-137.

13. Gary DJ, Puri N, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J. Control. Release.* 2007;121(1-2):64-73.
14. Zhanga D, Zhang J. Surface engineering of nanomaterials with phospholipid-polyethylene glycol-derived functional conjugates for molecular imaging and targeted therapy. *Biomater.* 2020;230:119646.
15. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013;85(3A):427-443.
16. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010;9(7):537-550.
17. 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):6315–6320.
18. Miller JN, Miller JC. *Estadística y quimiometría para Química Analítica.* 4^a Edición. Madrid: Pearson Educación S.A; 2002.
19. Bhojoo U, Chen M, Zou U. Temperature induced lipid membrane restructuring and changes in nanomechanics. *Biochim. Biophys. Acta.* 2018;1860(3):700-709.