



Programa de doctorado en bioingeniería

Caracterización de un péptido de origen catiónico como alternativa a los vectores virales para el tratamiento de enfermedades tumorales mediante terapia génica

Miguel Manuel Sánchez Martos

Director de la tesis

Dr. Eduardo Fernández Jover

Codirectora de la tesis

Dra. Gema Martínez Navarrete

Universidad Miguel Hernández de Elche

Instituto de Bioingeniería

2023





La presente Tesis Doctoral, titulada “**Caracterización de un péptido de origen catiónico como alternativa a los vectores virales para el tratamiento de enfermedades tumorales mediante terapia génica**”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

Evaluation and Optimization of Poly-D-Lysine as a Non-Natural Cationic Polypeptide for Gene Transfer in Neuroblastoma Cells

Miguel Sanchez-Martos, Gema Martínez-Navarrete, Adela Bernabéu-Zornoza, Lawrence Humphreys, Eduardo Fernández

Nanomaterials (Basel) 2021 Jul 5; 11,1756.

PMID: **34361142**

PMCID: [PMC8308159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34361142/)

DOI: [10.3390/nano11071756](https://doi.org/10.3390/nano11071756)





UNIVERSITAS
Miguel Hernández

El Dr. D. Eduardo Fernández Jover director, y la Dra. Dña. Gema Martínez Navarrete, codirectora de la tesis doctoral titulada **“Caracterización de un péptido de origen catiónico como alternativa a los vectores virales para el tratamiento de enfermedades tumorales mediante terapia génica”**

INFORMAN:

Que D. “Miguel Sánchez Martos” ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Evaluation and Optimization of Poly-D-Lysine as a Non-Natural Cationic Polypeptide for Gene Transfer in Neuroblastoma Cells”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo/firmamos para los efectos oportunos, en Elche a de de 202....

Director de la tesis

Dr. D. Eduardo Fernández Jover

Codirectora de la tesis

Dra. Dña. Gema Martínez Navarrete



La Dra. Dña. Piedad de Aza, Coordinador/a del Programa de Doctorado en bioingeniería

INFORMA:

Que D./Dña. Miguel Sanchez Martos ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“Caracterización de un péptido de origen catiónico como alternativa a los vectores virales para el tratamiento de enfermedades tumorales mediante terapia génica”**

conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Elche a 12 de Julio. de 2023.

Profa. Dra. Dña. Piedad de Aza
Coordinador/a del Programa de Doctorado en bioingeniería

Contenido

Índice de abreviaturas	10
Índice de figuras	12
Resumen	14
Abstract	16
1. Introducción	19
1.1. Tumores cerebrales	20
1.1.2. Neuroblastoma	22
1.1.3. Tratamientos convencionales	23
1.1.5. Tratamientos de terapia génica.....	28
1.1.6. Tratamientos con vectores virales	28
1.1.7. Tratamientos con vectores no virales	29
1.1.8. Posibles dianas terapéuticas	30
1.2. Tratamientos <i>in vivo</i> del cáncer usando la terapia génica con vectores no virales	34
1.3. Terapia génica.....	35
1.3.1. Vectores virales	37
1.3.1.1. Adenovirus	37
1.3.1.1. Retrovirus y lentivirus.	39
1.3.1.3. Virus Adeno-asociados	40
1.3.1.4. Otros vectores virales.....	41
1.4. Alternativas a los vectores virales.....	42
1.4.1. Métodos físicos	42
1.4.1.1. Microinyección	42
1.4.1.2. Electroporación.....	43
1.4.1.3. Fotoporación	44
1.4.1.4. Microfluídica.....	44
1.4.1.5. Sonoporación.....	45
1.5. Vectores no virales y métodos químicos	46
1.5.1. Nanopartículas poliméricas	46
1.5.2. Nanopartículas de oro	47
1.5.3. Nanopartículas magnéticas.....	47
1.8. Péptidos de penetración celular	52
1.8.1. Origen de los CPP	52

1.8.2. Clasificación de los CPP	52
1.8.2.1. CPP's catiónicos	53
1.8.2.2. CPP's anfipáticos.....	54
1.8.2.3. CPP's anfipáticos primarios.....	55
1.8.2.4. CPP's anfipáticos secundarios	55
1.8.2.5. CPP ricos en prolina	55
1.8.2.6. CPP's hidrofóbicos	56
1.8.3. Mecanismo de entrada en la célula de los CPP's	56
1.8.3.1. Endocitosis mediada por caveolinas.....	56
1.8.3.3. Macropinocitosis.....	58
1.8.4. Estudios con polilisinas y sus derivados a través de la historia.....	60
2. Objetivos	67
3. Materiales y métodos.....	70
3.1. Aprobación del comité de ética	70
3.2. Ensayo de retardo en gel con el péptido de diseño	70
3.4. Evaluación de la toxicidad del péptido diseñado	74
3.5. Preparación de los complejos EGFP/péptido	75
3.6. Experimentos de transfección <i>in vitro</i> con el péptido diseñado	75
3.7. Técnicas de encapsulación de los complejos plásmido/péptido en liposomas.....	76
3.7.1. Sonicación.....	76
3.7.2. Técnica de inyección en frío y en caliente	78
3.8. Experimentos de transfección basados en el PLL	79
3.8.1. Preparación de los complejos EGFP/PLL comercial para ensayos de viabilidad	79
3.9. Ensayos de transfección utilizando el PDL como vector no viral	80
3.9.1. Preparación de los complejos EGFP/PDL comercial para ensayos de transfección en cultivos de corteza embrionaria	80
3.9.2. Ensayo de viabilidad celular del PDL sobre células de corteza embrionaria	80
3.9.3. Transfección de células de corteza con los complejos EGFP/PDL.....	81
3.10. Mejora de la eficiencia de transfección del PDL	81
3.11. Preparación de los complejos EGFP/PDL para ensayos de transfección y viabilidad a tiempos crecientes en cultivos de corteza embrionaria	82
3.11.1. Caracterización del PDL comercial como vector no viral en líneas celulares tumorales	83

3.11.1.1. Ensayo de viabilidad celular del PDL en cultivos de las líneas celulares SH-SY5Y HeLa y 3T3.....	83
3.11.1.2. Estudio de las interacciones EGFP/PDL mediante el ensayo de retardo en gel de agarosa.....	84
3.12. Ensayo de protección frente a ADNasa I con PDL	85
3.13. Ensayo de transfección <i>in vitro</i> en SH-SY5Y, HeLa y 3T3 con PDL	85
3.14. Ensayo de recuento celular en SH-SY5Y, HeLa y 3T3 con PDL.....	86
3.15. Ensayo de citometría de flujo en SH-SY5Y, HeLa y 3T3 con PDL	87
3.16. Análisis estadístico.....	87
4. Resultados	90
4.1. Técnicas de encapsulación de los complejos EGFP/péptido en liposomas	92
4.2. Resultados de los experimentos de transfección con PLL	93
4.2.1 Resultados de los experimentos de transfección con PLL	93
4.3. Ensayos de transfección utilizando el PDL.....	93
4.3.1. Resultados de viabilidad del PDL en células de corteza embrionaria de rata. 93	
4.4. Transfección de células de corteza con los complejos EGFP/PDL.....	94
4.4.1 Resultados de mejora de la eficiencia de transfección del PDL.....	95
4.4.2. Resultados del MTT y conteo de células transfectadas a distintos tiempos en cultivos embrionarios de rata.	96
4.4.3. Ensayo de retardo en gel de agarosa	98
4.4.4. Ensayo de protección frente a ADNasa I y liberación del ADN	99
4.5.1 Ensayo viabilidad celular en función de la concentración y la administración de PDL a distintos tiempos	100
4.5.2. Expresión de EGFP en varias líneas celulares utilizando el PDL como vector	102
5. Discusión.....	111
Conclusiones	118
Perspectivas futuras.....	120
Bibliografía	121
Otras Publicaciones	
Agradecimientos	

Índice de abreviaturas

μl	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
CAR	Receptor de coxsackievirus y adenovirus (<i>Coxsackievirus and adenovirus receptor</i>)
cDNA	ADN complementario (<i>Complementary DNA</i>)
CPP	Péptido de penetración celular (<i>Cell penetrating peptide</i>)
-D	Dextrógiro
DMSO	Dimetil sulfóxido
dsDNA	ADN de doble cadena (<i>double strand DNA</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente intensificada (<i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
Ex/Em	Excitación/Emisión
FBS	Suero bovino fetal (<i>Fetal bovine serum</i>)
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
kb	Kilobase
-L	Levógiro
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>Low density lipoprotein</i>)
mg	Miligramo
MgCl₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
MLV	Vesículas multilamelares (<i>Multilamellar vesicles</i>)
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
NLS	Secuencia de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Sequence</i>)
nm	Nanómetro
ns	No significancia
° C	Grados centígrados
p/p	Peso/peso
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffer saline</i>)
PDL	Poli-D-lisina
pDNA	ADN plasmídico (<i>plasmidic DNA</i>)
PEI	Polietilenimina
PLL	Poli-L-lisina
RAP	Proteína asociada a Ras (<i>Ras associated protein</i>)
siRNA	ARN de interferencia pequeño (<i>small interference RNA</i>)
ssDNA	ADN de cadena simple (<i>single strand DNA</i>)
ssRNA	ARN de cadena simple (<i>single strand RNA</i>)
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas (<i>Small unilamellar vesicles</i>)
TAT	Transactivadora de la transcripción
U	Unidad

ULV	Vesículas unilamelares (<i>Unilamellar vesicles</i>)
UV	Ultravioleta
V	Voltio
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial grow factor</i>)
VSV	Virus de la estomatitis vesicular (<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>)



Índice de figuras

Figura 1. Repulsión de cargas entre la membrana celular y los de ácidos nucleicos.....	36
Figura 2. Estructura básica de un adenovirus	37
Figura 3. Estructura básica de un retrovirus	39
Figura 4. Estructura básica de un virus adeno-asociado	40
Figura 5. Transfección mediante la técnica de microinyección..	42
Figura 6. Esquemización de la técnica de la electroporación..	43
Figura 7. Recreación de la técnica fotoporación,.....	44
Figura 8. Esquema de la microfluídica	45
Figura 9. Sonoporación.....	46
Figura 10. Nanopartícula polimérica.....	46
Figura 11. Nanopartícula formada por un núcleo de oro	47
Figura 12. Transfección con nanopartículas magnéticas,.....	48
Figura 13. Estructura básica de un lípido	50
Figura 14. Formación espontánea de una monocapa lipídica	50
Figura 15. Procedimiento de formación espontánea de liposomas.....	51
Figura 16. Clasificación de los lípidos según tamaño y composición.....	51
Figura 17. Endocitosis mediada por caveolinas	57
Figura 18. Endocitosis mediada por clatrin.....	58
Figura 19. Representación de la macropinocitosis	59
Figura 20. Estructura del plásmido pCAG-EGFP	71
Figura 22. Reducción de MTT (color amarillo) a Formazán (color púrpura).....	74
Figura 23. Tipos de lípidos utilizados en los experimentos	76
Figura 24. Imagen del sonicador	77
Figura 25. Técnica de inyección en frío y en caliente.	78
Figura 26. Esquema de los tratamientos realizados en los cultivos	83
Figura 27. Secuencia peptídica rica en aminoácidos catiónicos	91
Figura 28. Cultivo in vitro de células embrionarias.	91
Figura 29. Ensayos de transfección	92
Figura 30. Ensayo de MTT.....	94
Figura 31. Ensayo de transfección.	95
Figura 32. Transfección de cultivo de células embrionarias	96
Figura 33. Ensayo de viabilidad celular	97
Figura 34. Recuento celular manual de células transfectadas.....	98
Figura 35. Análisis de retardo en gel.....	99
Figura 36. Ensayo de liberación de diferentes proporciones EGFP/PDL.....	101
Figura 37. Porcentajes de transfección	103
Figura 38. Expresión de EGFP.....	107
Figura 39. Porcentaje de células transfectadas.....	108
Figura 40. Comparación de la expresión de EGFP entre el PDL y la Lipofectamina	108

Índice de tablas

Tabla 1. Genes regulados por MYCN.....	33
Tabla 2. Familias de virus más utilizados como vectores	41
Tabla 3. Resumen de los experimentos de transfección con PLL y PDL.....	65
Tabla 4. Distribución para el experimento de inyección en frío y en caliente	79
Tabla 5. Tratamientos realizados con los complejos EGFP/PDL.....	86
Tabla 6. Porcentajes de transfección a distintos tiempos.....	106
Tabla 7. Porcentajes de transfección del total de células transfectadas	109



Resumen

El neuroblastoma es un tipo de cáncer infantil, con una tasa de supervivencia muy baja. Por su localización, los tratamientos convencionales no son los suficientemente eficaces para revertir esta situación. Por ello se buscan alternativas a dichos tratamientos, siendo la terapia génica una de las técnicas más prometedoras. El principal inconveniente que se presenta es la dificultad que tienen las secuencias nucleotídicas de atravesar la membrana plasmática de las células tumorales, por lo que se debe recurrir a la ayuda de elementos transportadores para realizar esta función, conocidos como vectores.

Los vectores utilizados en terapia génica pueden ser de origen viral o no viral. En base a los ensayos realizados con anterioridad, en este trabajo nos centramos en la búsqueda de un vector no viral basado en un tipo de proteínas conocidas como CPP's, que tienen la capacidad por sí mismas de atravesar la membrana plasmática, con el objetivo de transfectar células de la línea SH-SY5Y en experimentos *in vitro*. En un principio se trabajó con un péptido diseñado a medida, pero con el objetivo de mejorar los resultados obtenidos, y en base a las referencias bibliográficas estudiadas, se decidió cambiar la línea de trabajo por un péptido catiónico comercial utilizado habitualmente en cultivos celulares para mejorar la adherencia de las células, el PLL, pero el rendimiento de este péptido en los ensayos de transfección realizados, no fueron lo suficientemente satisfactorios en las líneas celulares estudiadas, por lo que se decidió recurrir al PDL (poli-D-lisina) que es el enantiómero del PLL (poli-L-lisina). Los resultados obtenidos en los experimentos

indican que el PDL tiene la capacidad de empaquetar el ADN, de protegerlo de las enzimas que pueden degradarlo presentes en el torrente sanguíneo, y que puede ser un excelente vector para los tratamientos de terapia génica en la línea SH-SY5Y mejorando al mejor vector utilizado hasta la fecha para dicha línea celular, la Turbofectina 8.0, en lo que se refiere a la línea celular HeLa, el rendimiento se redujo considerablemente, siendo en la línea 3T3 en la que no se consiguió transfectar prácticamente ninguna célula. A raíz de los resultados se puede concluir que el PDL puede ser un buen candidato para tratamientos de terapia génica en enfermos de neuroblastoma, por lo que el siguiente paso sería la realización de experimentos *in vivo*.

Con los experimentos llevados a cabo a lo largo de estos años, se han publicado tres artículos, en el primero de ellos, se trabajó el desarrollo del profármaco CPT 5-ALA, en el segundo artículo, se analizan las posibilidades del PDL para transfectar las líneas HeLa, 3T3 y SH-SY5Y responsable de la patología conocida como neuroblastoma, y en el tercer artículo se estudió la capacidad de unos compuestos derivados del imidazol para realizar ensayos de terapia fotodinámica en células tumorales.

Abstract

Neuroblastoma is a type of childhood cancer with a very low survival rate. Due to its location, conventional treatments are not effective enough to reverse this situation. Therefore, alternatives to these treatments are being sought, being gene therapy one of the most promising techniques. The main drawback is the difficulty that nucleotide sequences have in crossing the plasma membrane, which is why it is necessary to resort to the help of transporters to carry out this function, known as vectors.

The vectors used in gene therapy can be of viral or non-viral origin. Based on previous trials, in this work we focused on the search for a non-viral vector based on a type of protein known as CPP's, which have the capacity to cross the plasma membrane by themselves, with the aim of transfecting cells of the SH-SY5Y line *in vitro* experiments. Initially, we worked with a custom-designed peptide, but in view of the poor results obtained and the bibliographic references, it was decided to change the working line for a commercial cationic peptide commonly used in cell culture to improve cell adhesion to PLL, but the performance of this peptide was also practically null in all cell lines, so we resorted to PDL (poly-D-lysine), which is the enantiomer of PLL (poly-L-lysine). The results obtained in the experiments indicate that PDL has the ability to package the DNA, to protect it from the enzymes that can degrade it present in the bloodstream, and that it can be an excellent vector for gene therapy treatments in the SH-SY5Y line, compared to the HeLa line in which the yield was considerably reduced, and in the 3T3 line where practically no cells

were transfected. From the results it can be concluded that PDL may be a good candidate for gene therapy treatments in neuroblastoma patients, so the next step would be to perform *in vivo* experiments.

With the experiments carried out over these years, three articles have been published, in the first one, the development of the CPT 5-ALA prodrug was worked on, in the second article, the possibilities of PDL to transfect the HeLa, 3T3 and SH-SY5Y lines responsible for the pathology known as neuroblastoma are analysed, and the third article studied the ability of imidazole-derived compounds to perform photodynamic therapy assays on tumour cells.



Capítulo 1: Introducción



1. Introducción

Con más de 10 millones de óbitos al año, las enfermedades de origen tumoral son la principal causa de muerte en el mundo [1]. Como alternativa a los procedimientos convencionales se están desarrollando nuevos tratamientos con los enfoques más diversos, entre los que se encuentra la terapia génica.

El principal problema a los que se enfrentan los investigadores que trabajan desarrollando nuevos fármacos para este tipo de terapias, es la dificultad que se presenta a la hora de introducir el material genético, ya sean secuencias tanto de ADN como de ARN, al interior de las células.

Los compuestos utilizados para realizar esta función son conocidos como vectores, siendo los virus los más habituales para desempeñar este trabajo. Pero los distintos inconvenientes que presentan las partículas virales hacen necesaria la búsqueda de alternativas, los conocidos como vectores no virales.

En un primer bloque, se ha elaborado una pequeña introducción en la que se habla del cáncer en células del sistema nervioso central, centrándose principalmente en dos tipos de tumores cerebrales, el glioblastoma y más específicamente el neuroblastoma.

En un segundo bloque se ha hecho un recorrido por los distintos tipos de vectores desarrollados hasta la fecha, tanto virales como no virales, analizando las distintas ventajas e inconvenientes que cada uno de ellos presenta.

En el tercer y último bloque se ha prestado una especial atención a un tipo de vector en particular, los CPP's. Después de realizar ensayos con diversos tipos de CPP, y a raíz de los resultados obtenidos, nos hemos centrado más concretamente en un CPP en particular, el PDL, que por su naturaleza catiónica y los bajos costes de producción lo convierten en posible alternativa frente a otros tipos de compuestos.

Después de la introducción se hace una breve descripción de los objetivos del presente trabajo, para a continuación explicar en el apartado materiales y métodos todos los experimentos realizados, en el capítulo resultados, se detallan los efectos de dichas experiencias, en el apartado discusión se interpretan los resultados obtenidos anteriormente, dando lugar a las conclusiones obtenidas y las posibles perspectivas futuras que se pudieran desarrollar.

1.1. Tumores cerebrales

Los tumores cerebrales se pueden dividir en dos categorías, tumores primarios y tumores secundarios. Los tumores primarios son aquellos que tienen su origen en las meninges, nervios, glándulas, neuronas u otras células cerebrales, mientras que los tumores secundarios son aquellos que se originan en el resto del cuerpo y difunden al cerebro.

Cuando hablamos de tratar enfermedades que tienen su origen en el sistema nervioso central, bien sea por medio de la farmacología convencional o terapia génica dirigida, el primer obstáculo que se nos presenta es la barrera

hematoencefálica, una fina capa de tejido endotelial con permeabilidad selectiva que rodea al encéfalo y cuya función principal es proteger al cerebro tanto de agentes químicos como biológicos [2], por lo que es el primer desafío al que se enfrentan los investigadores a la hora de diseñar fármacos que tengan como diana las células del sistema nervioso central.

Los tumores cerebrales más frecuentes entre la población son los neuroblastomas, gliomas y meningiomas [3], cuyo diagnóstico se puede realizar mediante resonancia magnética, rayos X, biopsias, angiografía o TAC. Como principal tratamiento se encuentra la resección quirúrgica, seguido de la quimioterapia y radioterapia, siendo el principal inconveniente que se presenta, la localización del tumor y la imposibilidad de acceder hasta él sin riesgo para el paciente [4], lo que obliga a buscar alternativas como pueden ser los tratamientos dirigidos de terapia genética.

1.1.1. Glioblastoma multiforme

El glioblastoma multiforme es la clase de formación tumoral más habitual y con peor pronóstico que se da sobre todo en la población adulta masculina cercana a la tercera edad, con una frecuencia de entre 5,26 nuevos casos cada 100.000 habitantes, con un índice de supervivencia de unos 15 meses [5] [6].

Los tratamientos más habituales son la cirugía, y las terapias con quimiotóxicos y radiación, aunque una técnica novedosa aún en desarrollo que combina la resección quirúrgica con la quimioterapia y la inmunoterapia ha obtenido una recuperación del 100% de los casos en ensayos realizados en roedores [7].

Aunque en estadios tempranos de la enfermedad se baraja la posibilidad de trabajar con el profármaco antitumoral CPT-5ALA, que está formado por la camptotecina, un compuesto de origen natural conocido por sus propiedades antitumorales y el ácido 5-aminovulénico, que induce la producción de protoporfirina IX, una molécula fotoactiva que se podría usar como marcador de las células tumorales tanto para obtener un diagnóstico temprano y preciso o en el caso de tener que recurrir a la cirugía o tratamientos de fototerapia [8].

1.1.2. Neuroblastoma

Neuroblastoma es el tumor sólido más frecuente en neonatos y en edad infantil [9], esta formación tumoral suele aparecer en tejidos del sistema nervioso simpático, con origen en las células de la cresta neural embrionaria [10], y en casi dos tercios de los casos diagnosticados, lo hacen con elevados niveles de metástasis, proliferando con facilidad en otros tejidos del organismo como el cuello, pecho, pelvis o abdomen [11], suponiendo casi el 6% de los cánceres pediátricos [9], y con una esperanza de vida inferior al 20% [12]. El neuroblastoma está dividido principalmente en dos grupos, de riesgo alto y de riesgo bajo. Los pacientes con riesgo bajo tienen una tasa de supervivencia del 95% a los cinco años del diagnóstico, mientras que los de riesgo alto, la tasa en ese mismo tiempo se reduce a menos del 40% [13], lo que hace que el diagnóstico temprano sea una herramienta fundamental para revertir el desarrollo de esta enfermedad, actualmente, la secuenciación del protooncogén *MYCN* se considera un instrumento imprescindible para una valoración precisa de la patología, sobre todo cuando se detecta también

metástasis [14], siendo ésta manifestación de la enfermedad uno de los principales objetivos a revertir para evitar la dispersión del tumor y asegurar una completa recuperación.

1.1.3. Tratamientos convencionales

Una vez diagnosticada la enfermedad tumoral, el principal mecanismo de actuación sobre la misma es la intervención quirúrgica con el objetivo de extirpar la tumoración por completo, incluso en los casos diagnosticados de alto riesgo, ya que se ha observado que la eliminación completa del tumor primario se relaciona con un incremento de la supervivencia del paciente [13], y en combinación con los tratamientos de quimioterapia y radioterapia el pronóstico de la patología mejora considerablemente [15].

El tratamiento con quimioterapia consiste en administrar al enfermo un fármaco o combinación de compuestos químicos de origen sintético o natural con el objetivo de atacar las células en división, durante un número determinado de ciclos para asegurarse la eliminación de todas las células que se encuentren la fase de mitosis [16]. Los compuestos farmacológicos usados más habitualmente son cisplatino, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido, topotecan, melfalan etc, o una combinación de estos [13], en función del tipo de tumor, la fase en la que se encuentre el paciente o el grupo de riesgo al que pertenezca. Generalmente, en enfermos que se encuentran en el grupo de riesgo alto y en estado de metástasis avanzado, las dosis y el número de ciclos suele ser más elevado [13]. El principal problema que presentan los tratamientos de quimioterapia es la aparición de los

efectos adversos, sobre todo cuando se administran en dosis elevadas, por las propiedades intrínsecas de los fármacos utilizados que no pueden diferenciar las células sanas en división de las células malignas [17], lo que lleva al constante desarrollo de nuevas terapias farmacológicas.

Otra técnica comúnmente utilizada para el tratamiento del neuroblastoma es la radioterapia, que consiste en administrar al paciente elevadas dosis de radiación con el objetivo de destruir las células cancerosas, se puede administrar de forma localizada lo que se conoce como radioterapia de haz externo, o bien de forma sistémica ya sea vía oral o intravenosa, y que recibe el nombre de radioterapia interna [18]. En los pacientes con neuroblastoma se aplica sobre todo a los de riesgo alto, y en los que el tratamiento quirúrgico y la quimioterapia no han conseguido erradicar por completo las células tumorales. Aunque no se ha mostrado que sea efectiva en el 100% de los casos tratados. Las mejoras en este campo consisten en aplicarla de la forma más localizada posible con el objetivo de reducir los efectos adversos que surgen por la utilización de este tipo de tratamientos siendo la protonterapia la técnica más avanzada en este campo [19].

En algunos casos cuando los tratamientos descritos anteriormente no son suficientes, se puede proceder al trasplante autólogo de células madre de la médula ósea después de haber realizado una terapia mieloablativa [20].

1.1.4. Terapias biológicas

La heterogeneidad biológica del neuroblastoma hace que esta enfermedad presente unas características únicas que la diferencian de otros tipos de tumores, como pueden ser los casos observados en algunos pacientes en los que se ha producido una remisión completa de la enfermedad, llegando a conseguir la recuperación completa sin la necesidad de recurrir a ningún tipo de tratamiento. Este hecho se encuentra en contraste con los casos en los que se ha visto un rápido desarrollo de la enfermedad y avance extremadamente rápido de la metástasis en un muy corto espacio de tiempo.

Una vez que todas las técnicas terapéuticas mencionadas anteriormente han fallado, bien por no haber conseguido erradicar las células tumorales por completo o bien porque los efectos adversos ponen en peligro la vida del paciente, la única alternativa posible que se presenta son los tratamientos biológicos, que debe plantearse de forma individual en función del paciente y de la etiología de la enfermedad.

Dentro de las terapias biológicas, la inmunoterapia es un conjunto de diversas técnicas entre las que se encuentran la terapia con citoquinas, vacunoterapia, terapia con anticuerpos o la terapia celular [21]. En todas ellas el objetivo es utilizar el sistema inmune como frente de batalla contra las células tumorales, ya sea estimulando las células *natural killer* o linfocitos-T, usando la interleucina-12 sola, o bien en sinergia con la interleucina-2 [22] o interleucina-18, para potenciar los efectos de la primera [23]. En los ensayos clínicos realizados con este tipo de terapia se

han obtenido resultados esperanzadores [24], pero necesitan de la aplicación al mismo tiempo de otro tipo de tratamientos con inmunoterapia para mejorar los resultados, como puede ser la terapia con anticuerpos monoclonales antitumorales, que presentan las ventajas de tener una vida media elevada, baja toxicidad y una alta especificidad y afinidad. Una de las dianas más utilizadas en los pacientes con neuroblastoma es la proteína GD2, que se expresa en la membrana de las células tumorales [25], y que aunque su función no está del todo aún bien descrita, se cree que está relacionada con la capacidad de adhesión del tumor a las proteínas de la matriz extracelular [26]. La terapia celular consiste en trasplantar al paciente células madre hematopoyéticas de un familiar cercano no gemelar, o bien un donante no emparentado pero con características genéticas compatibles con el enfermo [27], ya que en caso contrario pueden aparecer efectos secundarios, conocidos como injerto contra huésped. Dicho efecto adverso está causado por la respuesta inmune de las células del tejido trasplantado hacia las células del receptor del trasplante [28]. Si en principio este tipo de trasplantes fueron descartados, más adelante se comprobó que en algunos casos se daba el fenómeno de injerto contra tumor, mediante el cual, las células-T del donante atacaban a las células cancerígenas del receptor. En un ensayo clínico realizado se comparó la evolución de un grupo de enfermos de neuroblastoma en los que una parte recibió un trasplante de células madre hematopoyéticas de origen alógeno y otro recibió el mismo tipo de células, pero de tipo autólogo. En los resultados obtenidos no se vieron diferencias significativas a nivel de supervivencia tras dos años entre los dos grupos, además 9 de los enfermos que recibieron el trasplante de otros donantes manifestaron el

fenómeno del injerto contra huésped lo que deja a este tipo de terapias en suspenso a expensas de realizar más investigaciones [29].

Los tratamientos nombrados anteriormente se agrupan en lo que se denominan terapias adoptivas o pasivas ya que consiste en atacar directamente a las células tumorales. Por el contrario, la inmunidad activa consiste en estimular el sistema inmune del paciente para que sea éste el que se enfrente a la tumefacción, para ello se recurre a la administración de vacunas para que sea el huésped el que desarrolle una respuesta inmune dirigida. Una de las ventajas que presenta este tipo de terapias es el desarrollo a largo plazo de una respuesta inmune frente a tumores. En el primer ensayo probado en humanos, a cuatro enfermos con linfoma de células B se les administraron varias dosis de células dendríticas propias, las cuales fueron expuestas a antígenos provenientes de los propios tumores de los pacientes, hasta obtener una respuesta inmune a dichos antígenos. De los cuatro pacientes, en uno se observó una remisión completa de la enfermedad, mientras que los otros tres presentaron una considerable mejoría [30]. Los problemas que se presentan a la hora de desarrollar una vacuna efectiva contra el neuroblastoma son debido a la supresión de la respuesta inmune en los pacientes a causa de los tratamientos de quimioterapia y radioterapia que suelen recibir, unido a una baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad, imprescindible para activar los linfocitos. Lo que hace imprescindible profundizar en las investigaciones con el fin de obtener una respuesta inmune efectiva contra este tipo de tumores.

1.1.5. Tratamientos de terapia génica

A pesar de los tratamientos descritos anteriormente en la lucha contra el neuroblastoma, la esperanza de supervivencia a largo plazo de los enfermos sigue siendo muy baja [31]. Los oncogenes relacionados con la progresión de esta enfermedad, no están relacionados únicamente con la proliferación celular, sino que también regulan otras actividades celulares, como pueden ser el metabolismo de la glucosa y la síntesis de lípidos [32]. Uno de los principales oncogenes descritos hasta la fecha es el gen *MYC*, cuyo papel en la activación de otros oncogenes es fundamental en el desarrollo de la enfermedad [33], lo que hace a este gen una diana ideal para luchar contra esta enfermedad, bien sea mediante tratamientos farmacológicos, químicos, biológicos o con terapia génica.

1.1.6. Tratamientos con vectores virales

La lucha contra el cáncer utilizando los virus como herramientas, se puede abordar desde dos planteamientos distintos. De forma directa, introduciendo en el huésped algún virus específico de las células tumorales, para que este inicie el ciclo lítico, dando lugar a la lisis de las células cancerígenas, fenómeno conocido como oncolisis [34]. O bien de forma indirecta, usando partículas virales como vehículo transportador de ácidos nucleicos para introducir secuencias genéticas en las células malignas que permitan iniciar la muerte celular programada o apoptosis [34].

Los vectores virales han sido desde sus inicios una herramienta importante en la lucha contra el neuroblastoma, siendo los retrovirus [35] [36], adenovirus [37],

herpes virus [38] [39], y virus adeno-asociados [40] [41], los vehículos más utilizados habitualmente para introducir material genético en el interior de las células cancerígenas [42] [43]. Sin embargo, presentan los mismos inconvenientes que se comentarán en apartado **1.3.1.1 Adenovirus**, lo que hace necesario seguir investigando.

1.1.7. Tratamientos con vectores no virales

Los principales desafíos a los que hay que enfrentarse a la hora de tratar el neuroblastoma mediante la terapia génica utilizando como herramienta los vectores no virales, son en primer lugar atravesar la barrera hematoencefálica y, en segundo lugar, la baja especificidad que suelen presentar estas moléculas sobre las células diana. Para solventar estos inconvenientes, los recursos utilizados hasta la fecha han sido la funcionalización de los vectores con moléculas que permitan la transciptosis a través de la barrera hematoencefálica como la transferrina [44], y también con proteínas o moléculas que sean reconocidos por los receptores más abundantes en las células tumorales como pueden ser la familia de los receptores transmembrana VEGF que favorecen la angiogénesis [45]. Se han diseñado vectores específicos para solventar los inconvenientes anteriormente citados, como las nanopartículas pegiladas conjugadas con albúmina catiónica, administradas de forma intravenosa [46], y también se han creado proteínas de fusión uniendo el péptido TAT a la proteína β -galactosidasa [47].

Por ello, cuando se trata de desarrollar vectores no virales para acceder a las zonas más profundas del cerebro, no solo se deben de tener en cuenta los

mecanismos de endocitosis característicos de todas las células vivas, sino que además tienen que tener la capacidad de atravesar la capa endotelial sin perder sus propiedades, fenómeno conocido como transcitosis [48]. Para mejorar la eficiencia de los vectores no virales a la hora de enfrentarse a la barrera hematoencefálica se ha recurrido a distintas soluciones, como la de funcionalizar cadenas de octoargininas con Angiope-2 u otras moléculas de características similares capaces de ser reconocidas por el tejido endotelial y permitir su paso [49].

1.1.8. Posibles dianas terapéuticas

Una vez que se ha conseguido liberar las secuencias de nucleótidos en el interior de las células tumorales, el siguiente reto que se presenta es determinar cuál puede ser la mejor diana para eliminarlas de la forma más aséptica posible y sin que el resto de las células sanas se vean afectadas.

Para conseguir este objetivo se pueden plantear tres estrategias distintas, bien bloqueando alguna o varias de las rutas que están relacionadas con la proliferación y/o adhesión celular, intentar que la célula inicie los mecanismos necesarios para entrar en apoptosis, y también se podría plantear la introducción de genes suicidas con el objetivo de expresar algún fármaco o profármaco que pudiera ser tóxico para el tumor [50]. Adicionalmente, siempre será necesario la realización de un pronóstico preciso acompañado de análisis genético para estudiar que gen o genes están relacionados con la evolución de la enfermedad.

El gen *MYC* pertenece a una familia de protooncogenes formada por *c-MYC*, *MYCN* y *MYCL*. Este gen expresa un factor de transcripción, el cual es una de las

dianas más estudiadas para el diagnóstico y tratamientos relacionados con varios tipos de tumores, entre los que se encuentra el neuroblastoma, ya que tanto la evolución de la enfermedad como la esperanza de vida de los enfermos tienen una estrecha relación con este gen [51]. En el 25% de los enfermos de neuroblastoma de alto riesgo, este gen aparece amplificado y su sobreexpresión es utilizada como biomarcador de esta patología [52]. Esta familia de genes se expresa principalmente en algunas etapas del desarrollo embrionario y juega un papel importante en la proliferación y crecimiento celular [53], además de regular la sobre y sub expresión de un elevado número de genes con funcionalidades muy diversas (Tabla 1). Ver [54] como ejemplo de bloqueo de *MYCN*.

La molécula diasialogangliosido 2 (GD2) es una macromolécula lipídica glicosilada perteneciente a la clase de los glicoesfingolípidos, con residuos de ácido siálico en la estructura de hidratos de carbono [55]. GD2 es otra posible diana debido a su sobreexpresión en una amplia variedad de tumores, entre los que se encuentra el neuroblastoma [56].

GD2 se expresa en la membrana celular y está relacionado con la adhesión de las células cancerígenas a las proteínas de la matriz extracelular [26], también parecen desempeñar un papel importante en la regulación de la señalización de la muerte celular, ya que cuando se bloquea esta molécula en las células tumorales, éstas inician un mecanismo de muerte celular a caballo entre la apoptosis y la necrosis [55], al no ser GD2 una proteína, no se puede actuar directamente sobre la

molécula, pero se han descrito dos genes que están directamente relacionados con su síntesis, los genes *ST8SIA1* y *B4GALNT1*.

ST8SIA1 expresa la proteína Alfa-N-acetilneuroaminidasa alfa-2,8-sialiltransferasa, *B4GALNT1* a su vez expresa la enzima Beta-1,4 N-acetilgalactosaminiltransferasa 1. La expresión de estos genes también se usa para establecer un diagnóstico más preciso de la enfermedad [57] [25], y su inhibición da lugar a una disminución de las células tumorales [55].

Está demostrado que la acumulación de histonas acetiladas (unas proteínas que están presentes en los cromosomas) dan lugar a la activación de genes que inhiben el desarrollo tumoral [58], esta característica convierte a las enzimas desacetiladoras de histona una excelente diana en la lucha contra el cáncer. Estas proteínas están codificadas por el gen *HDAC* por lo que la inhibición total o parcial de esta secuencia de nucleótidos daría lugar al inicio de una cascada de señalización que inducirían a las células tumorales a entrar en apoptosis [59].

El gen anti-apoptosis *Bcl-2* se encuentra sobreexpresado en un número elevado de tumores entre los que se encuentra el neuroblastoma [60] [61], su silenciamiento es el objetivo de algunos fármacos y tratamientos de terapia génica con pequeños ARNi [60].

Descrito por primera vez a finales del siglo pasado y relacionado directamente con la migración, invasión y metástasis en las células tumorales [62], *MDA-9* o gen 9, está asociado a la diferenciación del melanoma. Por este motivo bloquear

la expresión de este gen o su silenciamiento es otra posible diana en los casos de neuroblastoma en los que esta secuencia de nucleótidos se encuentre sobreexpresado [63].

Gen	+ / – regulado por MYCN	Función
Activina-A	-	Inhibe la angiogénesis (TGF β superfamilia)
CRABP II	+	Regulador de la señalización del ácido retinoico
HMGA1	+	Protooncogén, factor transcripción
ID2	+	Inhibidor de RB
IL-6	-	Inhibe la proliferación celular endotelial
LIF	-	Inhibe la proliferación celular endotelial
MCM7	+	Replicación del ADN
MDM2	+	Regulador negativo de p53
MRP1	+	Proteína de resistencia a fármacos
NDRG1	-	Gen inhibidor del crecimiento
NLRR1	+	Proteína transmembrana
ODC	+	Síntesis de poliamina
p53	+	Guardián del genoma, supresor de tumores
PAX 3	+	Protooncogén regulador del desarrollo
α -Protymosina	+	Remodelación de la cromatina
TERT	+	Mantenimiento de los telómeros
TG2	-	Gen supresor de tumores

Tabla 1. Genes regulados por MYCN

Desde que en 2008 se identificaron que mutaciones presentes en el gen de la quinasa del linfoma anaplásico *ALK* en enfermos de neuroblastoma eran responsables de la multiplicación de las células cancerosas [64], esta secuencia de

ácidos nucleicos pasó a ser otra posible diana sobre la que actuar, bloqueando las mutaciones que dan lugar a la sobreexpresión de este gen mediante el uso de oligonucleótidos antisentido o bien pequeños ARNi, es una posible alternativa a tener en cuenta.

1.2. Tratamientos *in vivo* del cáncer usando la terapia génica con vectores no virales.

Aunque se use un único termino para definir esta patología, el cáncer es un conjunto de diversas enfermedades que pueden afectar a uno o varios tipos celulares, y cuyo origen está siempre en una desregulación en la expresión de varios genes que dan lugar a una proliferación de las células malignas e invasión de otros tejidos [65], fenómeno conocido como metástasis [66]. Es dicha desregulación genética la que abre la puerta a los tratamientos de terapia génica con el objetivo de incrementar o silenciar el gen o genes que estén implicados en la proliferación celular, o bien hacerlo más sensibles a los fármacos actualmente utilizados.

El uso de moléculas policatiónicas para los tratamientos de terapia génica, ya sea enfocados a enfermedades hereditarias o a tratamientos antitumorales, no solo tienen que sortear las barreras naturales que ofrecen los organismos vivos, sino que además deben de ser lo menos tóxicos posibles para estos [67] [68]. Esto ha llevado a los investigadores a desarrollar distintas estrategias con el fin de mejorar la eficiencia de la transfección al mismo tiempo que se procura que sean lo más inocuos posibles. Los polímeros catiónicos contienen grupos amino en su conformación, aportando las cargas positivas, imprescindibles para poder interactuar en primer lugar con las cargas negativas de los ácidos nucleicos con el objetivo

inicial de formar los poliplejos y a continuación interactuar con la membrana plasmática para que se disparen los mecanismos que permitan la entrada del complejo ADN-polición al interior de las células [69].

Según el tipo de patología a tratar puede ser necesario incrementar la expresión de un gen mediante ADN plasmídico o bien proceder a su silenciamiento con la utilización de nucleótidos antisentido o secuencias de ARN interferente, lo que hace imprescindible adaptar el tipo de polímero a la secuencia de ácidos nucleicos que se quiera introducir en el interior de las células y el destino que se desee alcanzar [70].

Se ha observado que compuestos con un peso molecular que oscile entre los 40 y 70 kDa tienen más facilidad para atravesar los poros nucleares por difusión, aunque aún no se conocen en profundidad los mecanismos que permiten a estas moléculas atravesar la membrana del núcleo celular [71], así como también se desconoce si el proceso de desempaquetamiento del complejo vector/ADN se produce en el exterior del núcleo o, si por el contrario, es la maquinaria de replicación la que realiza esta tarea.

1.3. Terapia génica

La membrana celular es una barrera con permeabilidad selectiva que envuelve a las células y es un elemento imprescindible para su desarrollo y supervivencia, les da cohesión y al mismo tiempo, actúa como dique protector contra agentes externos, actuando de forma específica sobre las moléculas que pueden

atravesarla [72]. Esta característica intrínseca de la membrana celular es el primer obstáculo que se presenta en el desarrollo de fármacos, ya sea para terapias convencionales o para tratamientos de terapia génica.

Incluso antes de que finalizara la secuenciación del genoma humano [73], ya se trabajaba con la posibilidad de poder modificar las secuencias de ADN en pacientes enfermos para el tratamiento de patologías con origen genético [74]. El inconveniente que se presenta con este tipo de terapias es la dificultad que tiene una cadena de ácidos nucleicos de atravesar por sí misma la membrana plasmática de las células, ya que ambos compuestos poseen la misma polaridad (Figura 1). Debido a la capacidad intrínseca de los virus para introducir material genético en el interior de las células [75], las partículas virales fueron las primeras herramientas que se empezaron a utilizar como vectores para desempeñar esta tarea [76]. Sin embargo, como consecuencia de los efectos adversos observados en los pacientes tratados con vectores virales así como en los ensayos *in vivo* llevados a cabo con virus (mutaciones insercionales y una elevada respuesta inmune), se hizo necesaria la búsqueda de herramientas alternativas a los virus para insertar el material genético en el interior de las células [77].

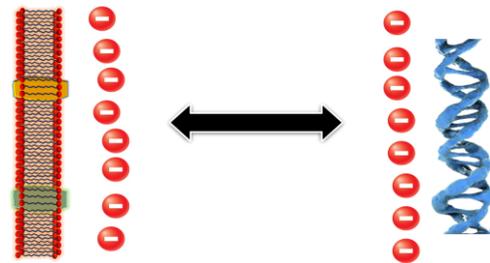


Figura 1. Repulsión de cargas entre la membrana celular (a la izquierda de la imagen) y las secuencias de ácidos nucleicos. (Elaboración propia)

1.3.1. Vectores virales

1.3.1.1. Adenovirus

Los adenovirus (Figura 2), fueron una de las primeras familias de virus en los que se pensó hace ya más de 25 años para usarlos como vectores, con el objetivo de liberar secuencias de ácidos nucleicos en el medio intracelular en los tratamientos de terapia génica [78]. Perteneciente a la familia de los *Adenoviridae*, los adenovirus tienen un tamaño entre los 70 y 100 nm. La cápside vírica es una estructura proteica sin envoltura de geometría icosaédrica formada por unidades más

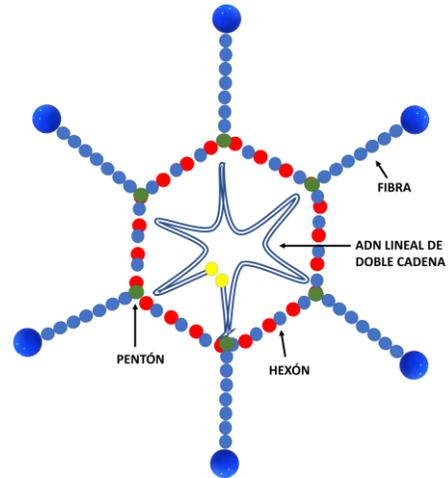


Figura 2. Estructura básica de un adenovirus formada por los pentones, hexones la fibra y el ADN lineal de doble cadena. (Elaboración propia)

pequeñas denominadas exones, pentones y fibras alrededor del núcleo [79], en cuyo interior se encuentra el ADN lineal de doble cadena (dsDNA) de unos 35 kb de tamaño [80]. La fibra del virión se une a unas proteínas específicas de la membrana celular de las células del huésped denominadas CAR [81]. Una vez que el virus consigue introducir su material genético en el interior de las células, éste no se integra dentro del genoma del huésped sino que forma un episoma lineal en el interior del núcleo [82], lo que elimina el riesgo de las mutaciones insercionales, llegando así a perdurar hasta 2 años la capacidad de expresar los genes que lo componen [83].

La idea inicial de los grupos de investigación que trabajaban en este campo era la de utilizar los adenovirus para emplearlos en un amplio abanico de tratamientos clínicos, que abarcaban desde la terapia génica hasta la medicina regenerativa [84]. Lamentablemente se observó que incluso genéticamente desactivados, las cápsides por sí solas, presentaban una elevada inmunogenicidad, dando lugar a una respuesta inflamatoria aguda al ser utilizados en elevadas dosis [14]. Todo esto, unido a la inactivación completa de la partícula vírica, debido a que muchos componentes virales de los adenovirus interaccionan de forma inespecífica con elementos de la sangre como las plaquetas, proteínas de la cascada de coagulación y los eritrocitos, se empezaron a descartar para tratamientos de terapia génica y fueron relegados a su uso en tratamientos antitumorales localizados o para el desarrollo de vacunas [85]. En la actualidad se está estudiando el uso de quimeras formadas por adenovirus de chimpancé junto con fragmentos de adenovirus humano, debido a que la cápside vírica de los simios no desencadena una respuesta inmune en el *homo sapiens* [86]. El máximo exponente de esta tecnología son las vacunas contra el Sars-Cov2 desarrolladas por AstraZeneca en el Reino Unido, CanSino Biologics en China, Gamaleya Research en Rusia y Johnson & Johnson en Estados Unidos. Todas ellas han superado con éxito la fase III en los ensayos clínicos y están siendo administradas actualmente a la población general con resultados esperanzadores [87].

1.3.1.1. Retrovirus y lentivirus.

Pertencientes a la familia *Retroviridae*, los retrovirus son virus de ARN de cadena simple (ssRNA) cuyo genoma se retrotranscribe a ADN antes de integrarse en el genoma de la célula huésped. Con un tamaño de unos 100 nm, la nucleocápside tiene una envoltura lipídica que la rodea y alberga en su interior dos copias de su genoma en forma de ARN, así como varias proteínas virales [88]. Por su capacidad de integración en el genoma del huésped, los primeros ensayos de terapia génica con retrovirus estaban relacionados con patologías monogénicas, como la

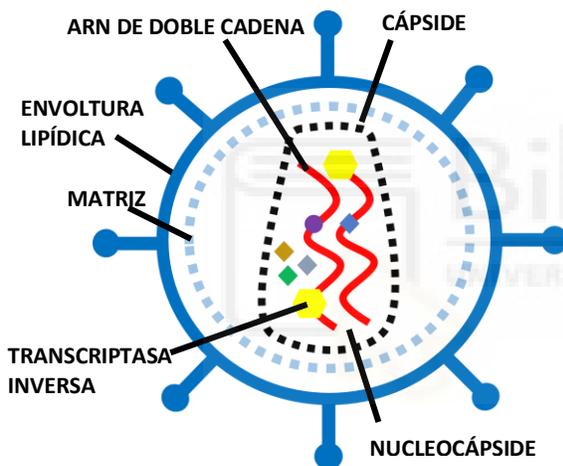


Figura 3. Estructura básica de un retrovirus compuesto por ARN de doble cadena, y las proteínas necesarias para la retrotranscripción, rodeados por la cápside, la matriz y una envoltura lipídica. (Elaboración propia)

deficiencia de la adenosina desaminasa [89]. El virus de la leucemia murina perteneciente a la familia de los γ -retrovirus fue el seleccionado para el tratamiento de esta patología, pero debido a los efectos adversos observados en los enfermos durante los ensayos clínicos, como consecuencia de las mutaciones insercionales presentes en el genoma de los pacientes, (fenómeno conocido como genotoxicidad) [90]. Se

descartó el uso de estos vectores y se sustituyeron por los lentivirus. Éste es un grupo de retrovirus entre los que se encuentra el VIH, y cuyo material genético está limitado en su mayor parte, tan solo conservan los genes responsables de transportar el ARN al interior del núcleo de las células del huésped, además de los genes

encargados del empaquetamiento de la maquinaria viral y la retrotranscriptasa [91]. Aunque en menor medida, la genotoxicidad seguía estando presente en los pacientes tratados con estos vectores [92]. En la actualidad se están desarrollando vectores virales basados en lentivirus de tercera generación más seguros (Figura 3), en los que se han eliminado las secuencias responsables de la genotoxicidad, dejando tan sólo aquellos genes responsables de mantener la estructura del virus, así como las secuencias que son reconocidas por la célula huésped para su internalización junto al gen de interés [93].

1.3.1.3. Virus Adeno-asociados

Con un tamaño de unos 20 nm, los virus adeno-asociados (Figura 4) son virus de cadena simple de ADN (ssDNA) de unos 4,7 kb de longitud, sin envoltura, y perteneciente a la familia de los *Parvoviridae*. Son incapaces de replicarse por sí mismos, y por ello necesitan de la presencia de *helper-virus* del tipo Adenovirus o Herpesvirus para poder completar esta función [94]. En ausencia de Adenovirus o Herpesvirus, el genoma de los virus adeno-

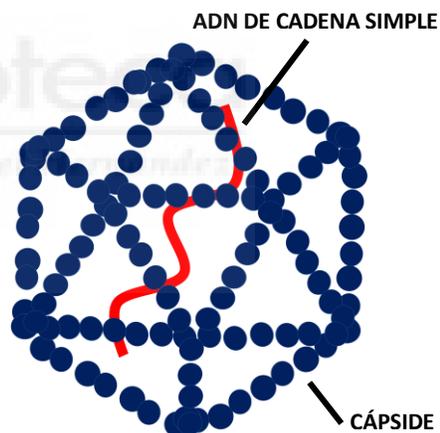


Figura 4. Estructura básica de un virus adeno-asociado formado por una cadena de ADN sencilla, rodeado de la cápside. (Elaboración propia)

asociados permanece latente en forma de episoma circular o lineal [95]. Aunque cuando se integra, lo hace en una zona específica del cromosoma 19 del genoma del huésped, no obstante es un fenómeno que se da con una frecuencia muy baja, lo que reduce considerablemente el riesgo de la genotoxicidad [96]. Ensayos

realizados con animales demuestran que la duración de la expresión de los genes de interés en tratamientos de terapia génica usando los virus adeno-asociados como vector, pueden ir desde los 6 meses en ratones hasta los 8 años en canes [97] [98]. A día de hoy, los virus adeno-asociados son los vectores virales más utilizados, tanto en ensayos preclínicos como clínicos aprobados en Europa y Estados Unidos, relacionados estos con el reemplazo y silenciamiento génico o la edición del genoma [99].

1.3.1.4. Otros vectores virales

Además de los mencionados anteriormente, también se han estudiado otras familias de virus como los Herpesvirus [100] y Poxvirus [101], pero su utilidad se ha centrado mayoritariamente en el desarrollo de vacunas (Tabla 2).

	Adenovirus	Lentivirus	Retrovirus	V. Adeno-asociados
Tipo de administración	Subcutánea, Intratumoral localizada	<i>Ex vivo</i> , transfección en células madre	<i>Ex vivo</i> , transfección en células madre	Intramuscular
Tamaño máximo del transgén	30 kb	10 kb	10 kb	4 kb
Tiempo de expresión del transgén	Corto	Muy largo	Muy largo	Muy largo
Seguridad	Baja	Aceptable en caso de enfermedades letales	Muy baja, genotóxico	Elevada
Inmunogenicidad	Elevada	Baja	Baja	Baja
Principal campo de aplicación	Vacunas y tratamientos de tumores	Enfermedades genéticas, principalmente en células hematopoyéticas	Enfermedades genéticas, sobre varios genes diana	Vacunas, tratamientos antitumorales

Tabla 2. Familias de virus más utilizados como vectores para terapia génica. El color indica la idoneidad como vector para cada característica. Verde: característica idonea; naranja: limitada; rojo: se recomienda buscar alternativas. En amarillo, se acepta en caso de patologías terminales.

1.4. Alternativas a los vectores virales

Debido a las limitaciones intrínsecas que presenta el desarrollo de vectores basados en los virus (Tabla 2), se continúa con la búsqueda de alternativas que mejoren las carencias que actualmente presentan estas opciones y que se conocen con el nombre de vectores no virales, los cuales podemos dividir en dos apartados bien diferenciados: métodos físicos y métodos químicos.

1.4.1. Métodos físicos

1.4.1.1. Microinyección

Es una técnica sencilla mediante la cual se introduce un plásmido de ADN o bien secuencias de ARN directamente en el interior del citoplasma o núcleo celular (Figura 5). Para esta técnica se usan microjeringas con agujas de tamaño micrométrico apoyado por sistemas avanzados de visualización, lo que requiere de personal entrenado y cualificado [102] [103]. Esta tecnología permite controlar con bastante precisión la cantidad y localización del material genético que se desea introducir. El inconveniente más importante que presenta esta estrategia es que tan solo puede ser aplicada mediante técnicas *in vitro* o *ex vivo*. De hecho, cuando se ha usado esta herramienta para introducir el gen de interés



Figura 5. Transfección mediante la técnica de microinyección. Para este procedimiento es imprescindible recurrir a instrumental de alta precisión, es un recurso lento, aunque muy eficiente. (Elaboración propia)

directamente en el torrente sanguíneo, la acción de las nucleasas y los fagocitos presentes en la sangre, han reducido su eficacia considerablemente [104].

1.4.1.2. Electroporación

Este método físico consiste en la formación de nanoporos en la membrana plasmática mediante la aplicación de una corriente eléctrica externa durante un periodo de tiempo del orden de los nanosegundos [105], el fluido extracelular atraviesa los poros creados en la bicapa lipídica y arrastra con él el ADN o ARN presente en el medio hacia el interior de la célula. Una vez que el flujo de corriente cesa, los poros creados se cierran, quedando atrapadas en el citosol celular todas las moléculas presentes en el fluido (Figura 6). Esta es una técnica bastante eficiente y reproducible pero también tiene sus limitaciones debido al daño que las corrientes eléctricas pueden ocasionar a la membrana celular [106]. De hecho, en experimentos realizados *in vivo* se observó daño en los tejidos tratados, así como un

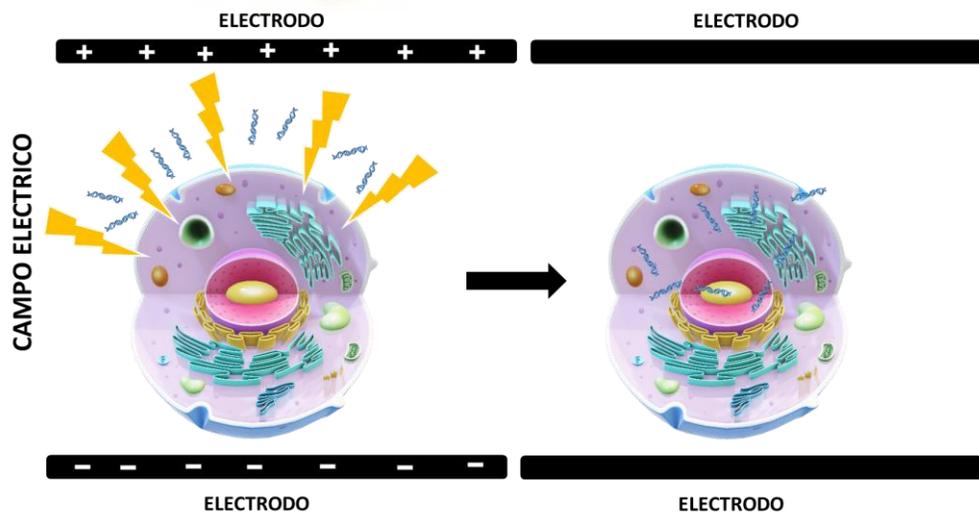


Figura 6. Esquematización de la técnica de la electroporación. Los pulsos eléctricos emitidos por los electrodos dan lugar a la formación de micro poros en la membrana plasmática por los que los ácidos nucleicos entran al interior celular. (Elaboración propia)

incremento de la inflamación causada por los pulsos eléctricos. Es por ello por lo que su uso se limita a experimentos *in vitro* y *ex vivo* [107].

1.4.1.3. Fotoporación

La fotoporación consiste en la creación de poros en la membrana celular durante un breve espacio de tiempo, mediante el uso de un pulso de luz láser de alta intensidad condensado en un punto de tamaño nanométrico, permitiendo la difusión de las macromoléculas presentes en el medio extracelular hacia el interior de las células (Figura 7). Al no existir contacto físico de las células con ningún objeto, es una técnica ideal para utilizarlas en entornos estériles. Aunque preferentemente se utiliza para experimentos *in vitro* y *ex vivo*, se han llevado a cabo algunos ensayos *in vivo*. Sin embargo, la limitada capacidad de penetración del haz de luz limita su potencial para usos clínicos [108].

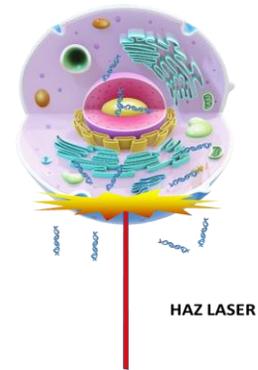


Figura 7. Recreación de la técnica fotoporación, micro-pulsos de luz laser inciden en la membrana plasmática dando lugar a la formación de micro cavidades por las que se introducirán compuestos de pequeño tamaño. (Elaboración propia)

1.4.1.4. Microfluídica

La microfluídica consiste en utilizar el efecto Venturi que se produce al hacer pasar un fluido a través de un capilar de tamaño micrométrico que contiene las células a transfectar junto con las macromoléculas que queremos introducir dentro de ellas [109]. En este capilar existe una región más estrecha que da lugar a un incremento de la velocidad y una reducción de la presión. Cuando la mezcla heterogénea compuesta de células y fragmentos de ácidos nucleicos, pasa a través de

dicho estrechamiento, estos cambios de velocidad y presión provocan deformaciones en la células, permitiendo que el medio extracelular atraviese la bicapa lipídica, y arrastrando consigo el material genético de interés (Figura 8) [110]. Una de las principales ventajas de esta técnica con respecto a otras es que ofrece un elevado rendimiento en la transfección y un alto porcentaje de viabilidad en las células tratadas, aunque está limitada a ensayos *in vitro* y *ex vivo* [111].

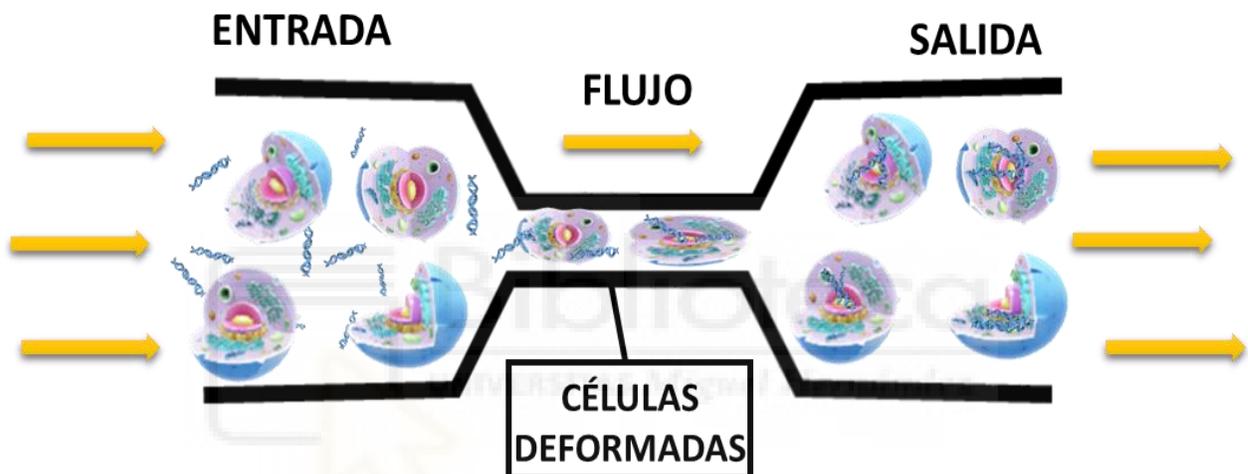


Figura 8. Esquema de cómo la microfluídica deforma las células mediante los cambios de presión y velocidad del medio en el que se desplazan, favoreciendo la entrada del plásmido al interior celular. (Elaboración propia)

1.4.1.5. Sonoporación

La sonoporación es la técnica por la que se introduce material genético en el interior de las células mediante el uso de sonidos de alta frecuencia, dando lugar a la formación de poros de tamaño nanoscópico como consecuencia de los fenómenos de compresión y expansión que las ondas sonoras producen en el espacio intermembrana, permitiendo que el medio que rodea a la célula entre en el interior de la misma por difusión (Figura 9) [112]. Una de las principales ventajas que

presenta este método es que es no-invasivo por lo que puede ser utilizado también para experimentos *in vivo* [113], aunque como inconveniente podemos citar el bajo rendimiento que se obtiene comparado con la electroporación [114].

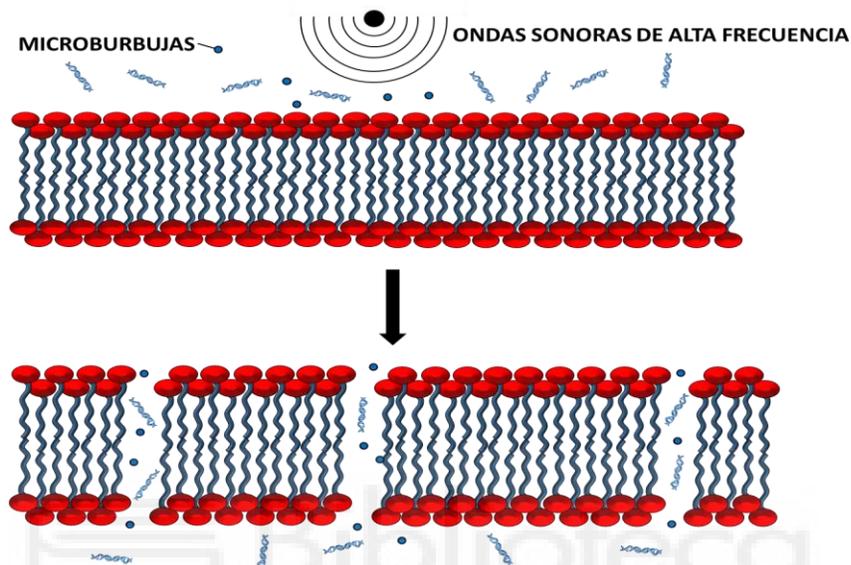


Figura 9. Sonoporación. Efecto de los ultrasonidos sobre la membrana celular, las ondas sonoras de alta frecuencia generan poros entre los lípidos de la membrana permitiendo la entrada del medio extracelular al interior, arrastrando con él las secuencias de ácidos nucleicos presentes en el medio. (Elaboración propia)

1.5. Vectores no virales y métodos químicos

1.5.1. Nanopartículas poliméricas

Los vectores basados en nanopartículas poliméricas (Figura 10) son otro tipo de compuestos orgánicos usados para el transporte de material genético [115]. Las nanopartículas poliméricas tienen una elevada capacidad de encapsulación y pueden estabilizar el material genético en fluidos orgánicos impidiendo la formación de agregados



Figura 10. Nanopartícula polimérica, de base orgánica u inorgánica. (Elaboración propia)

[116]. Uno de los inconvenientes que presentan estas estructuras, es que con motivo de su elevado peso molecular pueden presentar una alta citotoxicidad. Para superar este inconveniente, los polímeros se pueden organizar en forma de dendrímeros, que son formaciones poliméricas ordenadas y con estructura repetitiva ramificada [117]. Para los ensayos *in vivo*, los complejos polímeros-ácidos nucleicos se pueden combinar con polietilenglicol para aumentar su estabilidad y, por tanto, el tiempo de vida media en el flujo sanguíneo [118].

1.5.2. Nanopartículas de oro

Las propiedades ópticas y la alta biocompatibilidad de las nanopartículas de oro (Figura 11), lo hacen un buen candidato para su uso como vector no viral [119]. Poseen la capacidad de absorber la luz en una zona del espectro cercana al infrarrojo, esta longitud de onda permite al haz atravesar los tejidos, lo que permite explotar el efecto fototérmico del oro (producción de calor mediante la absorción de luz) y de esta forma, se pueden transfectar las

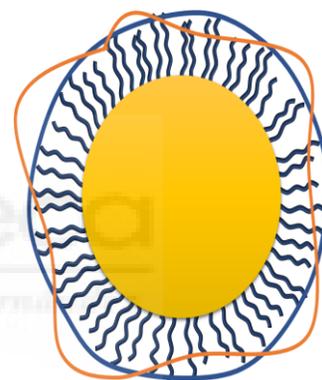


Figura 11. Nanopartícula formada por un núcleo de oro funcionalizado con polímeros de origen iónico. (Elaboración propia)

células diana por medio de la desnaturalización por calor de las nanopartículas y la posterior liberación del ADN funcionalizado [120].

1.5.3. Nanopartículas magnéticas

La terapia génica con nanopartículas magnéticas (Figura 12) también conocida como magnetofección, consiste en el uso de partículas nanoscópicas de óxido

de hierro que han sido funcionalizadas con secuencias de ADN o ARN [121]. En los ensayos *in vivo*, una vez introducidas en el huésped, las nanopartículas pueden ser dirigidas a una región concreta de los tejidos mediante la aplicación de campos magnéticos [122]. Con su uso en los experimentos *in vitro* y *ex vivo*, esta técnica permite mejorar el rendimiento de la transfección al forzar el paso del material genético a través de la membrana plasmática [123]. Los inconvenientes que presentan estos compuestos son la tendencia a crear agregados y la toxicidad producida por la acumulación del hierro

en los tejidos, para mejorar la biocompatibilidad y evitar la formación de agregados, las nanopartículas magnéticas a menudo son tratadas con

Polietilenimina (PEI) [124].

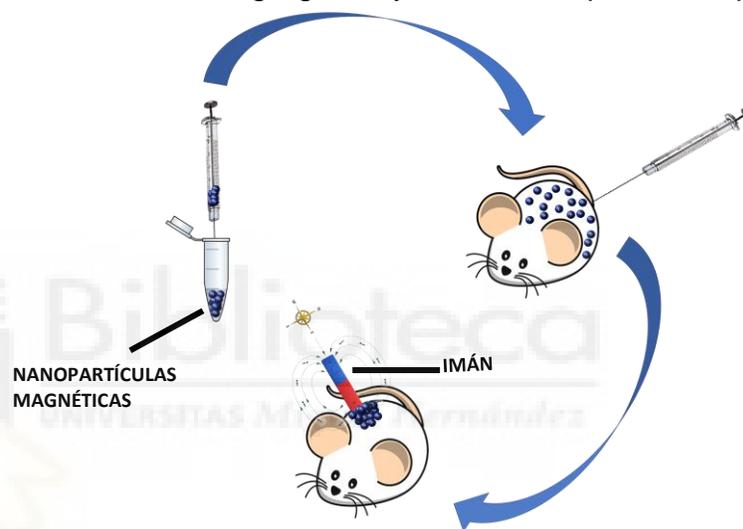


Figura 12. Transfección con nanopartículas magnéticas, después de la administración las nanopartículas se dirigen con un potente imán a la zona de se desee tratar. (Elaboración propia)

1.6. Métodos químicos

1.6.1. Fosfato cálcico

Usado desde 1970 por su sencillez de utilización y su baja toxicidad [125], el fosfato cálcico fue de los primero compuestos utilizados para transportar material genético al interior de las células. El fosfato cálcico co-precipita con el ADN formando el complejo DNA-CaP protegiéndolo de la acción de las nucleasas

presentes en el medio extracelular y permitiendo la entrada del complejo (DNA-Cap) al interior de la célula por fusión de membrana o endocitosis [126].

1.7. Liposomas

Ya en la antigüedad se conocía el comportamiento de los compuestos lipídicos en medio acuoso [127]. El descubrimiento de la célula por parte de Antonio Van Leeuwenhoek en el siglo XVII [128], dio lugar a las más diversas discusiones sobre la estructura celular, en dichos debates, entre otras ideas, se especulaba cual era la composición de los límites de las células. En 1889, Charles Overton, a raíz de los resultados obtenidos en una serie de experimentos que estaba realizando sobre la permeabilidad de los límites celulares, llegó a la conclusión de que esta barrera estaba compuesta principalmente por lípidos, lo que le confería unas características particulares, como la capacidad de dejar atravesar compuestos lipídicos no polares con relativa facilidad, mientras que los polares a excepción del agua, eran incapaces de cruzar dichos límites [129]. Años después, en 1925 los investigadores Gorter y Grendel, estudiando las membranas de los eritrocitos, dedujeron de los resultados obtenidos en sus experimentos, que las células estaban realmente rodeadas de una doble película compuesta por lípidos [130]. Tuvieron que pasar casi 40 años más para que Alec D. Bangham, mediante la técnica de microscopía electrónica aislara e identificara unas esférulas lipídicas a las que denominó Bangasomas [131]. Cuatro años más tarde, Gerald Weismann estableció el paralelismo que existía entre los Bangasomas compuestos de una bicapa lipídica de fosfolípidos y la membrana plasmática de las células, ya que compartían

características fisicoquímicas similares, finalmente las esférulas lipídicas o Bangasomas pasaron a denominarse formalmente liposomas [132], denominación que se ha mantenido hasta la fecha. Desde el mismo instante en el que se estableció el paralelismo entre los liposomas y la membrana celular se planteó la posibilidad de usar las partículas lipídicas para introducir fármacos en el interior de las células, sobre todo, aquellos compuestos que por sus propiedades fisicoquímicas eran incompatibles con la bicapa lipídica [133]. Actualmente, los liposomas están presentes como vectores en el desarrollo de vacunas contra la Covid-19 [134], o en tratamientos contra distintos tipos de cáncer [135].

1.7.1. Clasificación de los liposomas

Los lípidos son moléculas anfifílicas que están formadas por dos estructuras bien definidas, una cabeza polar o hidrofílica y una cola apolar o hidrofóbica (Figura 13). Cuando entran en contacto con un medio acuoso, los compuestos lipídicos se alinean de manera espontánea formando una monocapa (Figura 14). En el momento que una monocapa se rodea de agua, tanto por arriba como por

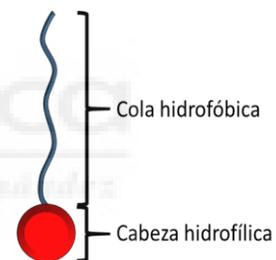


Figura 13. Estructura básica de un lípido, se aprecian dos estructuras bien diferenciadas, la cabeza polar o hidrofílica y la cola apolar o hidrofóbica. (Elaboración propia)

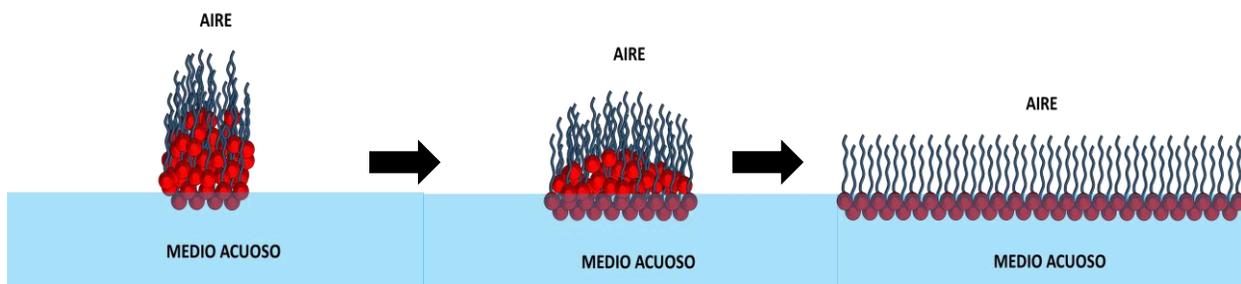


Figura 14. Formación espontánea de una monocapa lipídica en contacto con el agua, las cabezas polares se distribuyen por la superficie del medio acuoso quedando las colas apolares en contacto con el aire. (Elaboración propia)

abajo mediante procedimientos físicos, lo que se forma es una bicapa, dando lugar a la formación de liposomas (Figura 15).

Según su estructura y tamaño (Figura 16), los liposomas se pueden clasificar

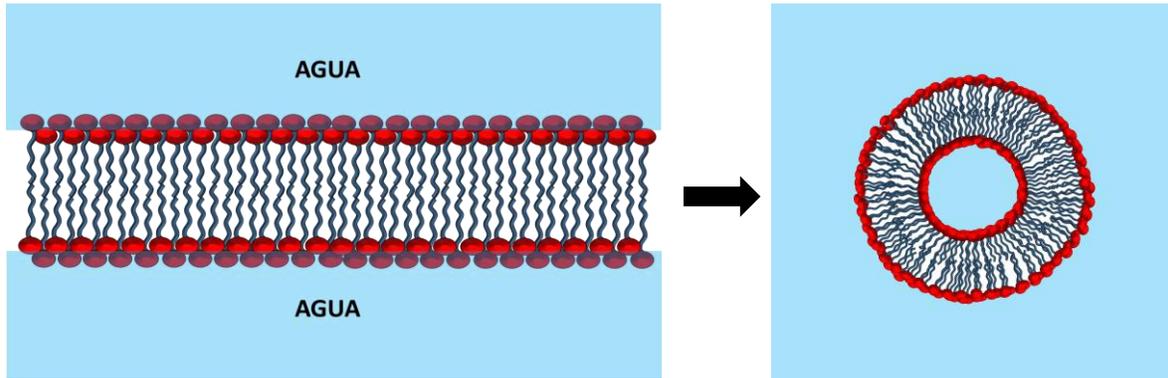


Figura 16. Procedimiento de formación espontánea de liposomas a partir de una bicapa lipídica. En ausencia de aire las colas hidrofóbicas se reorganizan quedando enfrentadas entre sí, y dejando que sean las cabezas polares la que se mantienen en contacto con el medio acuoso. (Elaboración propia)

en tres categorías distintas: liposomas multilamelares (MLV) (con un tamaño que oscila entre los 0.1 y 10 μm se componen de varias capas lipídicas), los liposomas unilamelares de pequeños (SUV) (formados por una sola capa de lípidos y tamaño inferior a los 100 nm), y por último los liposomas unilamelares grandes (LUV) cuyo tamaño oscila entre los 100 y 500 nm.

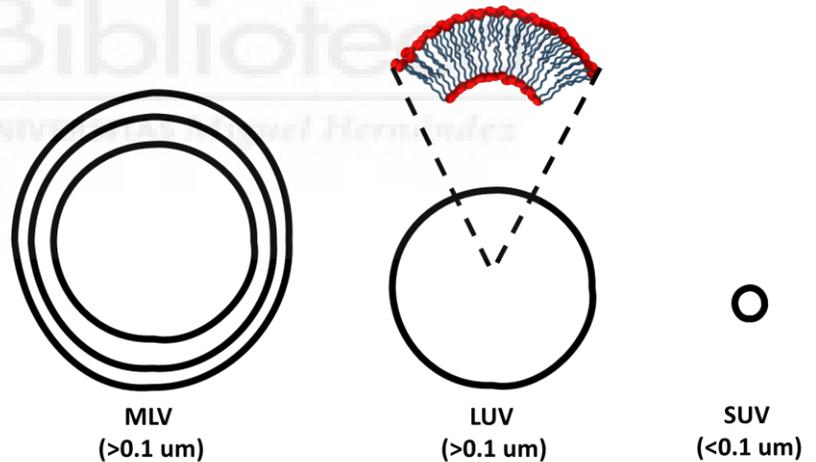


Figura 15. Clasificación de los lípidos según tamaño y composición. Las vesículas multilamelares (MLV) están formadas de varias capas de lípidos y tienen un tamaño superior a los 0,1 μm , las vesículas unilamelares grandes (LUV) están compuestas de una sola capa y tienen un tamaño superior a 0,1 μm y las vesículas unilamelares pequeñas también están formadas por una única capa y su tamaño es inferior a 0,1 μm . (Elaboración propia)

1.8. Péptidos de penetración celular

1.8.1. Origen de los CPP

Fue a finales del siglo pasado cuando se descubrió que una proteína conocida como Transactivadora de la Transcripción (TAT), cuyo origen se encuentra en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), tenía la capacidad por sí misma de traspasar la membrana plasmática de las células [136]. En experimentos posteriores, se observó que un pequeño fragmento de esta proteína seguía manteniendo las mismas propiedades, y que una secuencia de aminoácidos localizada entre los residuos 49 a 57 (región TAT₄₉₋₅₇) no solo seguía realizando por sí sola la misma función [137], sino que podía transportar moléculas tanto de origen sintético como biológico y liberarlas en el interior de las células [138]. Posteriormente, se identificaron más secuencias proteicas que compartían características similares a TAT. Es el caso de la penetratina, un fragmento de 16 aminoácidos que forma parte de la tercera hélice del homeodominio de Antennapedia, dominio que pertenece a una clase de proteínas transactivadoras de *Drosophila* [139]. Desde entonces, se han identificado un elevado número de pequeñas moléculas tanto de origen biológico como sintetizadas químicamente que comparten características similares [140] [141].

1.8.2. Clasificación de los CPP

Los CPP poseen un nexo en común basado en su capacidad de translocarse a través de la membrana plasmática. Sin embargo, su clasificación es una tarea compleja debido a la naturaleza propia de éstos. Se puede encontrar péptidos que

difieren entre sí por sus propiedades electrostáticas, tamaño, solubilidad, hidrofobicidad, etc. Por ello, la primera clasificación que se planteó se realizó en función de su origen, que podía ser mediante síntesis química o bien ser fragmentos de proteínas [142]. Pero el hecho de que se fueran descubriendo más secuencias peptídicas con similares propiedades, aunque de origen muy diverso, unido al incremento de fragmentos que se desarrollaban químicamente, obligó a buscar una nueva estrategia a la hora de clasificarlos. Finalmente, los CPP's se organizaron en tres familias en función de sus propiedades fisicoquímicas: hidrofóbicos, catiónicos y anfipáticos. Cada una de estas familias interacciona con la membrana plasmática de forma similar, disparando alguno de los mecanismos de endocitosis.

1.8.2.1. CPP's catiónicos

Una característica que comparten las tres familias de CPP's es que, en condiciones fisiológicas, la gran mayoría tienen carga positiva, mientras que con carga negativa apenas existen unas pocas secuencias peptídicas [143]. Por lo tanto, para diferenciar a los CPP's catiónicos de los anfipáticos, se consideran tan sólo CPP's de la primera familia a aquellos que contienen como mínimo un fragmento consecutivo de varios aminoácidos básicos [144], que suele ser la región que interactúa con la bicapa lipídica. Tomando como prototipo de CPP catiónico la secuencia RKKRRQRRR que forma parte de la proteína TAT, las 8 cargas positivas de los aminoácidos básicos se consideran el mínimo imprescindible para poder incluirlos dentro del grupo de los CPP's catiónicos [145]. Además, un incremento en el número de argininas en la secuencia peptídica resulta en una mejora de la eficiencia

para translocarse [146]. Otros aminoácidos pueden no ser tan relevantes para la interacción con la membrana plasmática, pero su ausencia puede significar la diferencia entre tener la capacidad de penetrar en la célula o no, como ocurre en la secuencia de la Penetratina (RQIKIWFQNRRMKWKK), ya que cambiando el triptófano₁₄ por una fenilalanina, esta cadena de residuos pierde por completo la capacidad de translocación en cultivos de neuronas [147]. Las secuencias de localización nuclear (NLS) son pequeños fragmentos peptídicos que están formados principalmente por residuos básicos de arginina, lisina o prolina en uno o dos fragmentos y que forman parte de los CPP's, aunque estos fragmentos por sí solos tienen una escasa capacidad de penetración [148]. Cuando las NLS forman parte de un CPP, ya sea de origen catiónico o anfipático, mejoran el rendimiento a la hora de transportar todo el compuesto formado desde el citoplasma hasta el núcleo, pudiendo atravesar la membrana nuclear a través de los complejos proteicos que forman los poros nucleares [149].

1.8.2.2. CPP's anfipáticos

Los CPP's anfipáticos son aquellos que presentan dos regiones bien diferenciadas, una región hidrofóbica y otra zona hidrofílica o con carga neta positiva. Por otro lado, también son la familia más numerosa, representando más del 40% del total de los CPP's descritos actualmente [150]. Los CPP's anfipáticos se pueden dividir a su vez en tres subcategorías bien definidas: CPP's anfipáticos primarios, CPP's anfipáticos secundarios, y CPP's anfipáticos ricos en prolinas.

1.8.2.3. CPP's anfipáticos primarios

Con un tamaño mínimo de unos 20 aminoácidos, los CPP's anfipáticos primarios suelen ser más largos que los CPP's catiónicos y los anfipáticos secundarios, aunque se encuentran presentes en la naturaleza formando parte de proteínas específicas. La mayoría de los CPP's anfipáticos primarios son o de origen sintético o bien se unen a fragmentos hidrofóbicos para mejorar el reconocimiento por parte de la membrana celular, dando lugar a péptidos quiméricos [151].

1.8.2.4. CPP's anfipáticos secundarios

Una de las principales características de los CPP's anfipáticos secundarios es su estructura en forma de hélice- α , en la que los residuos hidrofóbicos están agrupados en una región, y los aminoácidos hidrofílicos se encuentra agrupados en otra, dando lugar a un péptido con las propiedades anfipáticas que los caracteriza, siendo la Penetratina el modelo ideal de CPP anfipático secundario [152].

1.8.2.5. CPP ricos en prolinas

Como su nombre indica los CPP's ricos en prolinas forman una subfamilia de CPP's anfipáticos que difieren tanto química como estructuralmente entre ellos y cuyo nexo en común es que están formados en su mayoría por residuos de prolina. El anillo de pirrolidina que posee le da a este aminoácido unas características únicas que se reflejan en el CPP formado y que son los responsables de su anfipaticidad [153].

1.8.2.6. CPP's hidrofóbicos

Se consideran CPP's hidrofóbicos aquellos que están exclusivamente formados por aminoácidos apolares [154], su carga neta es muy baja o la presencia de estos residuos es imprescindible para poder desarrollar su función, independientemente del resto de la secuencia peptídica [155]. Por sus características, los CPP's hidrofóbicos son los menos abundantes de las tres familias, aunque no se descarta la posibilidad que su número se incremente conforme se vayan realizando investigaciones sobre ellos.

1.8.3. Mecanismo de entrada en la célula de los CPP's

A pesar de todos los ensayos realizados con los CPP's desde su descubrimiento, el mecanismo por el cual son capaces por sí mismos de atravesar la membrana plasmática y llegar hasta el núcleo, permanece aún sin dilucidar. Esto es debido a que la ruta que sigue cada CPP parece depender tanto de la secuencia de aminoácidos, como de su estructura secundaria y del tipo de carga que transporta [145] [148] [156]. Es por ello por lo que no se plantea un único mecanismo de entrada, sino que se han identificado varias vías de translocación a través la membrana y su posterior acceso al núcleo.

1.8.3.1. Endocitosis mediada por caveolinas

La endocitosis mediada por caveolinas (Figura 17) es el mecanismo al que recurre la proteína TAT para acceder al interior de la célula [145]. Esta ruta descrita en la década de los 50 del siglo pasado [157], es de las más estudiadas y

conocidas. Las caveolas son unas invaginaciones de la membrana plasmática en forma de letra omega invertida, con un diámetro aproximado de entre 50 y 100 nm. Las caveolas están formadas por fosfolípidos, esfingolípidos, colesterol y unas pro-

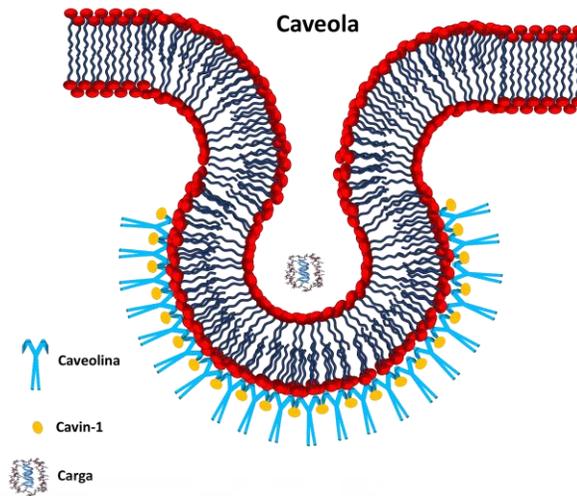


Figura 17. Endocitosis mediada por caveolinas que son unas proteínas que se encuentran en el medio intracelular de unas invaginaciones de la membrana plasmática conocidas como caveolas. (Elaboración propia)

teínas conocidas como caveolinas. La familia de las caveolinas consta de varias proteínas que se encuentran distribuidas aproximadamente de la mitad hacia el interior de la caveola, y están relacionadas con la señalización celular, la regulación lipídica y la endocitosis [158]. Esta ruta endocítica se ha descrito en los CPP's anfipáticos secundarios como el Transportan cuando está unido a proteínas [159], y también se ha observado en los CPP's ricos en prolina [153].

1.8.3.2. Endocitosis mediada por clatrin

Actualmente la endocitosis mediada por clatrin (Figura 18) es la más estudiada y mejor conocida de este tipo de mecanismos [160]. Además de las clatrin para comenzar el evento, también se hace necesaria la presencia de dinaminas

[161]. Las clatrininas son unas proteínas presentes en el medio intracelular, en pequeñas depresiones de la bicapa lipídica, unidas a receptores específicos. Cuando un ligando es reconocido por un receptor, las clatrininas se unen a dicho receptor dando lugar a la formación de una vesícula con un tamaño de entre 100 y 150 nm, y forma poliédrica en el citosol. Una vez formada la figura geométrica, entran en juego las dinaminas, cuya función es la de separar la vesícula formada en el interior de la célula para que de esta forma pueda alcanzar su destino [162].

Los ensayos realizados indican que los CPP que son traslocados al interior de la célula utilizando esta ruta son el péptido TAT, CPP ricos en arginina y los CPP aniónicos [163].

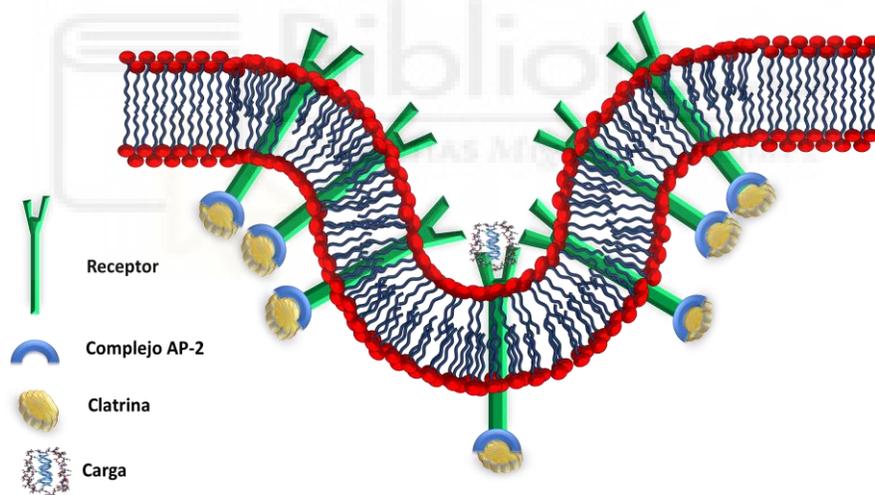


Figura 18. Endocitosis mediada por clatrininas, cuando los receptores de membrana reconocen algún compuesto, activan una serie de proteínas dando lugar a la internalización de dicho compuesto al interior de la célula. (Elaboración propia)

1.8.3.3. Macropinocitosis

La macropinocitosis (Figura 19) es una forma de endocitosis relativamente rápida, dependiente de balsas lipídicas e independiente de receptores [164].

Utilizando un símil, el mecanismo se asemeja según sea el tipo celular a una única ola o bien dos olas enfrentadas entre sí que engullen a un surfista [165], siendo el agua la membrana que rodea a la célula y el surfista el compuesto o molécula a asimilar. Una vez que la membrana ha colapsado sobre la molécula, y las bicapas se fusionan, se forma una gran vesícula endocítica denominada macropinosoma [166]. En contra de lo inicialmente considerado, la macropinocitosis es un mecanismo no dependiente de receptores [165] que cursa una secuencia de eventos muy organizados y que incluye una reestructuración del citoesqueleto. La mayoría de los eventos que se suceden por esta ruta, están regulados por enzimas pertenecientes a las familias de las quinasas y GTPasas [166].

Esta ruta es la elegida para asimilar los CPP catiónicos, CPP ricos en argininas y en conjugados con la proteína TAT [164].

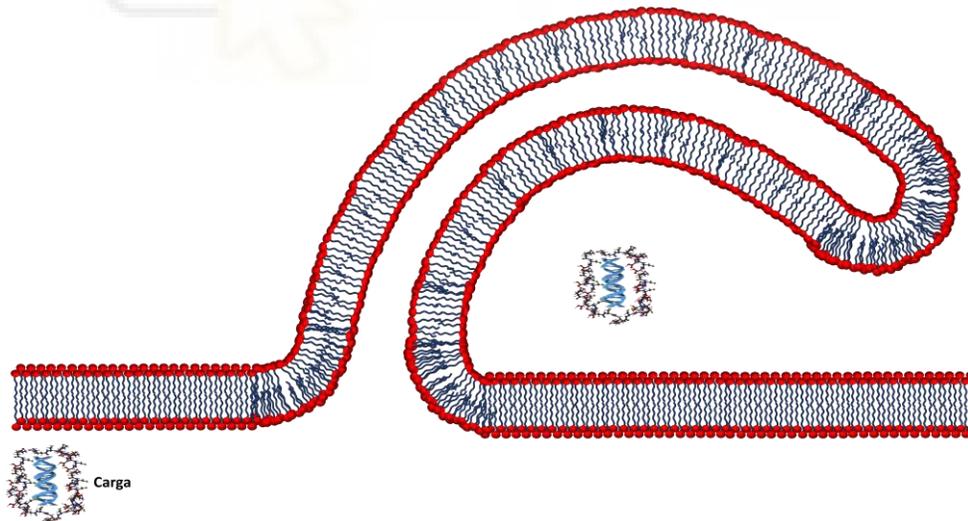


Figura 19. Representación de la macropinocitosis, un tipo de endocitosis en la que la membrana plasmática se extiende hasta rodear una carga que posteriormente introducirá al interior de la célula mediante la formación de un macropinosoma. (Elaboración propia)

1.8.3.4. Endocitosis independiente de clatrin y caveolinas

Además de las rutas de endocitosis descritas anteriormente, se han estudiado otras posibles vías de acceso al interior de la célula que no parecen estar relacionadas con clatrin ni caveolinas, y que tampoco tienen conexión con la macropinocitosis. Son las conocidas como rutas independientes de clatrin y caveolinas [167]. Este tipo de endocitosis parece tener relación con determinadas estructuras del tipo balsas lipídicas de la membrana celular, distintas a las que se encuentran presentes en las caveolas [167].

Son pocas las secuencias peptídicas las que hasta ahora se han descrito utilizando esta ruta de acceso al núcleo de las células, entre ellas se encuentra la Azurina y algunos fragmentos derivados de ésta, CPP's en los que también se ha demostrado que pueden compartir alguna de las vías mencionadas anteriormente [168]. El Transportan es otro CPP en el que también se ha podido demostrar que además de usar los caveosomas para acceder al citosol de la célula, puede usar alguna otra ruta independiente de clatrin y caveolinas [159].

1.8.4. Estudios con polilisinas y sus derivados a través de la historia

Hay que remontarse hasta finales de la década de los 70 del siglo pasado, momento en el que todavía no se habían identificado y caracterizado los péptidos de penetración celular, cuando se empezaba a barajar la idea de que ciertas estructuras proteicas tenían la capacidad de atravesar la membrana plasmática y acceder al interior de la célula. Fueron los investigadores Shen y Ryser los que

demonstraron que, tanto la albúmina como la peroxidasa de rábano, conjugados a una cadena de polilisinas de 6,7 kDa, tenían la capacidad de acceder al interior de la célula [169]. Unos meses más tarde, los mismos investigadores realizaron un ensayo similar, pero esta vez conjugaron el PLL de 7 kDa a una molécula de metotrexato obteniendo similares resultados [170]. Casi una década más tarde, los científicos Wu, GY. et al., demostraron la capacidad de transfección de una cadena de polilisinas conjugadas con asialorosomucoides acomplejadas a un plásmido pSV2-CAT en células de hepáticas Hek-2. Aunque no se pudo establecer una relación directa entre las polilisinas y la endocitosis de todo el complejo PLL+asialorosomucoides-pSV2-CAT, debido a que los asialorosomucoides son unas glicoproteínas específicas de unos receptores presentes en las células Hek-2, y en los controles que se realizaron con los complejos polilisinas-plásmido no se observó presencia de transfección del gen marcador [171]. Tuvieron que pasar tres años para que Leonetti JP. et al., utilizaran las propiedades de la polilisina en sus formas -D y -L para incrementar la capacidad antiviral de nucleótidos antisentido contra el virus VSV (cepa india). En los resultados obtenidos, observaron que la forma -L unida incrementaba la capacidad antiviral de la secuencia antisentido, sin embargo, para la forma -D no se apreció este efecto [172]. Al año siguiente, Wagner E. et al, evaluaron compuestos ternarios formados por transferrina-espaciador-polilisina, y, por otro lado, la capacidad de incrementar el rendimiento de transfección añadiendo distintas concentraciones de PLL a otro compuesto ternario formado por el plásmido pRSVL+transferrina-etidio. Observaron así que en el primer caso, el conjugado formado por transferrina-polilisina en proporción 2,3:1, era el que obtenía mejor

rendimiento a la hora de expresar el gen de la luciferasa, y que a la hora de formar complejos plásmido pRSVL + transferrina + etidio-polilisina, no solo era importante la concentración del péptido, sino que también influía el orden que se seguía a la hora de sintetizar el complejo [173]. En 1998 un grupo de investigación creó compuestos conjugados formados por PLL-adenovirus-ADN con el objetivo de estimularlos con luz UV para inactivar los genes patológicos presentes en los adenovirus, los cuales son responsables, entre otros efectos adversos, de la elevada respuesta inmune que se da en el organismo hospedador. El ensayo se realizó en células dendríticas y el PLL se utilizó como guía del conjugado para atravesar la membrana celular [174]. En los ensayos realizados con ratas *in vivo* a finales de la década de los 90 del pasado siglo por Laurent N. et al., se observó que los complejos formados por PDL-[³⁵S]-ADN eran más resistentes a la degradación enzimática en las células hepáticas que los que estaban compuestos por el PLL-[³⁵S]-ADN [175].

Meses más tarde, Barrett LB. et al., demostraron que, uniendo con enlaces tioles cadenas de 100 D-lisinas a la cadena B de la toxina de la bacteria del cólera, la internalización de un plásmido acompañado al conjugado formado por el péptido y la toxina aumentaba entre 10 y 100 veces más que la toxina por sí sola, aun cuando en la membrana plasmática se encuentran los receptores gangliósidos GM1 los cuales son específicos de la cadena B de la toxina del cólera. Cabe reseñar que los controles positivos utilizados formados únicamente por PDL y plásmido, no mostraron presencia del ADN marcado con un fluoróforo en el interior de las células en los ensayos de localización celular, ni apenas expresión de los genes de la EGFP

ni de la luciferasa en los ensayos de transfección [176]. Tuvieron que pasar 5 años para que Kim TG. et al., experimentaran con PDL y PLL de unos 50 kDa de tamaño, conjugados a una proteína asociada a receptor (RAP), que es un ligando para todos los componentes de la familia de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que inician los mecanismos de endocitosis una vez reconocido RAP. El objetivo era mejorar la capacidad de RAP para entrar en las células, y a través del gen de la luciferasa, los investigadores comprobaron que había más expresión de dicho gen cuando RAP estaba conjugado a PDL que cuando estaba unido a PLL y que con este último la expresión de la luciferasa era inferior al control realizado solo con PDL [177].

Ese mismo año, Barrett LB. et al., volvieron a repetir los mismos experimentos anteriormente realizados, pero esta vez cambiaron plásmido por una cadena de cDNA obteniendo resultados similares, y otra vez no se observó expresión del gen marcador en los controles en los que tan solo se usó PDL acompañado al ADN [178]. Fue a mediados de la primera década del presente siglo cuando Michael W. et al., realizaron el primer ensayo clínico con pacientes enfermos de fibrosis quística mediante terapia génica, para ellos utilizaron como vector no viral cadenas de 30 lisinas conjugadas con polietilenglicol, que administraron por vía nasal a 12 pacientes con dichas patologías. Los resultados obtenidos invitaron al optimismo así como la constatación de que no solo eran posibles y efectivos estos tipos de tratamientos, sino que además la expresión del transgén se mantuvo entre los 7 y los 28 días en función del paciente [179]. Casi una década más tarde Lee SA. et al., entre otros

experimentos, conjugaron los CPP's GV1001, oligoglicinas, y el péptido TAT con cadenas de 15 lisinas, con el objetivo de estudiar las sinergias de que se producen entre ellos, llegando a la conclusión de que la secuencia de oligolisinas utilizadas en los experimentos, conjugados a GV1001, mejoraba la capacidad de internalización de un plásmido con el gen de la luciferasa como marcador sobre el mismo péptido sin conjugar, así como también sobre el péptido TAT en todas las líneas celulares utilizadas [180]. El último trabajo encontrado, trata sobre la toxicidad y capacidad de transfección de las formas quirales PDL/PLL en cultivos de células HeLa, Bin-wei Z. et al., observaron que el comportamiento de ambas formas difiere en lo que se refiere a su habilidad para entrar dentro de dichas células ya que según los resultados obtenidos en este trabajo el PLL consigue mejores tasas de transfección que su homólogo el PDL en dicha línea celular.

Además de los trabajos mencionados anteriormente, también se han realizado ensayos sobre el PDL/PLL en los que se ha estudiado entre otras propiedades, la influencia del tamaño del péptido en la toxicidad del mismo [181] mediante la perturbación de la membrana mitocondrial [182], la interferencia en la resistencia a ciertos fármacos antitumorales en algunos tipos celulares [183] y, sobre todo, las sinergias con otros compuestos [184] [185] [186]. Con el objetivo de poder atravesar la membrana plasmática, también se han conjugado otros péptidos como el Pep-7 con dendrímeros y funcionalizados con polietilenglicol para el tratamiento de gliomas con ARNi [187], pero hasta la fecha apenas se han estudiado las

propiedades del PDL utilizado en este trabajo, y como por sí solo tiene la capacidad de transfectar con eficiencia algunos tipos celulares.

Año	Compuesto PDL/PLL	Tipo de compuesto a introducir	Interacción CPP/Compuesto	Tipo de ensayo	Tipo celular	Ref.
1978	PLL 6,7 kDa	Albúmina-PLL y peroxidasa de rábano-PLL	Conjugación	Localización celular	Fibroblastos L929	[169]
	PLL 7 kDa	Metotrexato-PLL	Conjugación	Localización celular	Células ováricas de hámster chino	[170]
1987	PLL 69 kDa	Asialoglicoproteína-PLL+plásmido	Conjugación+acomplejamiento	Transfección	SK-Hep 1	[171]
1990	PLL/PDL	PLL-oligómeros antisentido	Conjugación	Antiviral	L 929	[172]
1991	PLL 80 kDa	PLL-transferrina+plásmido	Conjugación+acomplejamiento	Transfección	K562	[173]
1998	PLL	PLL-adenovirus	Conjugación	Terapia anti-tumoral	Células dendríticas	[174]
1999	PLL/PDL 100 kDa	PLL/PDL-plásmido	Acomplejamiento	Distribución sistémica	Células hepáticas	[175]
	PDL 100 kDa	PDL-Toxina B del cólera	Conjugación	Localización celular/transfección	PCI2/BHK	[176]
2004	PDL/PLL 50 kDa	PDL/PLL RAP (proteína asociada a receptor)	Conjugación+acomplejamiento	Transfección	HepG2	[177]
	PDL 100 kDa	PDL-Toxina B del cólera	Conjugación+acomplejamiento	Transfección	PC12	[178]
2005	PLL 30 aa.	PDL-polietilenglicol	Conjugación	Transfección	<i>In vivo</i> (ensayo clínico)	[179]
2013	PLL	PLL-GV1001	Conjugación	Transfección	Huh7/HepG2/MCF/CHO	[180]
2014	PLL (8 residuos)	PLL-liposoma	Enlace covalente	Respuesta inmune		[188]
2016	PLL/PDL	PDL/PLL-plásmido	Acomplejamiento	Quiralidad/transfección	HeLa	[189]

Tabla 3. Resumen de los experimentos de transfección realizados con PLL y PDL

Capítulo 2: Objetivos



2. Objetivos

El objetivo a largo plazo que se plantea es la búsqueda de un tratamiento alternativo a la farmacología convencional mediante el desarrollo de nuevas estrategias para la transfección de DNA, y que a la vez que estos tratamientos puedan ser económicamente viables para la población en general.

Los objetivos específicos que se plantean en este trabajo son:

- 1) Evaluar la capacidad para atravesar la membrana plasmática de un CPP catiónico diseñado a medida para su uso como vector no viral de fármacos o secuencias de ADN mediante ensayos de transfección en cultivos primarios de corteza embrionaria de rata.
- 2) Analizar el efecto del encapsulamiento en liposomas utilizando fosfolípidos, ácidos grasos o triglicéridos para ver el efecto sobre la eficiencia de transfección del CPP diseñado a medida.
- 3) Valorar si secuencias peptídicas comerciales son capaces de actuar como CPP catiónicos en cultivos embrionarios de córtex y retina de rata.
- 4) Comprobar la posible toxicidad y capacidad de polímeros de L-lisina y su enantiómero D-lisina para actuar como CPP para condensar y empaquetar ADN mediante ensayos de retardo en gel para posteriormente realizar

experimentos de transfección y viabilidad *in vitro* en cultivos de líneas celulares tumorales.



Capítulo 3: Materiales y Métodos



3. Materiales y métodos

3.1. Aprobación del comité de ética

Todos los procedimientos experimentales se han llevado a cabo conforme a la directiva 2010/EU del Parlamento Europeo, y el real decreto RD53/2013 sobre la regulación de la protección de los animales con propósitos científicos y aprobada por el Comité de para el uso de Animales en el Laboratorio de la Universidad Miguel Hernández.

3.2. Ensayo de retardo en gel con el péptido de diseño

Para realizar todos los experimentos, se optó por la utilización de los plásmidos pCAG-EGFP (AdGene) (Figura 20) y pCAG-Chrimson-R (AdGene) (Figura 21), debido a la presencia en ambos del promotor CMV originario del citomegalovirus y que favorece la expresión de dichos plásmidos en mamíferos [190]. El pCAG-EGFP se seleccionó como marcador mediante la expresión de la proteína verde fluorescente. Y el plásmido pCAG-Chrimson-R que expresa la proteína Chrimson, una proteína de membrana unida a un canal iónico sensible a la luz, lo que permitiría realizar experimentos de optogenética en un futuro.

El primer requisito indispensable que debe presentar una molécula que se pretenda utilizar como vector no viral, es que sea capaz de empaquetar el ADN con el objetivo de anular las cargas negativas que poseen los ácidos nucleicos y que entrarían en repulsión con las cargas aniónicas de la membrana plasmática. Mediante la realización de este ensayo se quiso comparar el comportamiento de un ADN plasmídico (pDNA) que se utilizó para nuestros experimentos (EGFP) variando la

concentración del péptido diseñado. Para ello, se partió de una concentración constante de ADN y una cantidad creciente de péptido que oscilaba desde la proporción plásmido/péptido 1:0,125 hasta 1:16 en un gel de agarosa al 0,5% y Midori Green (Cultek) como marcador del ADN.

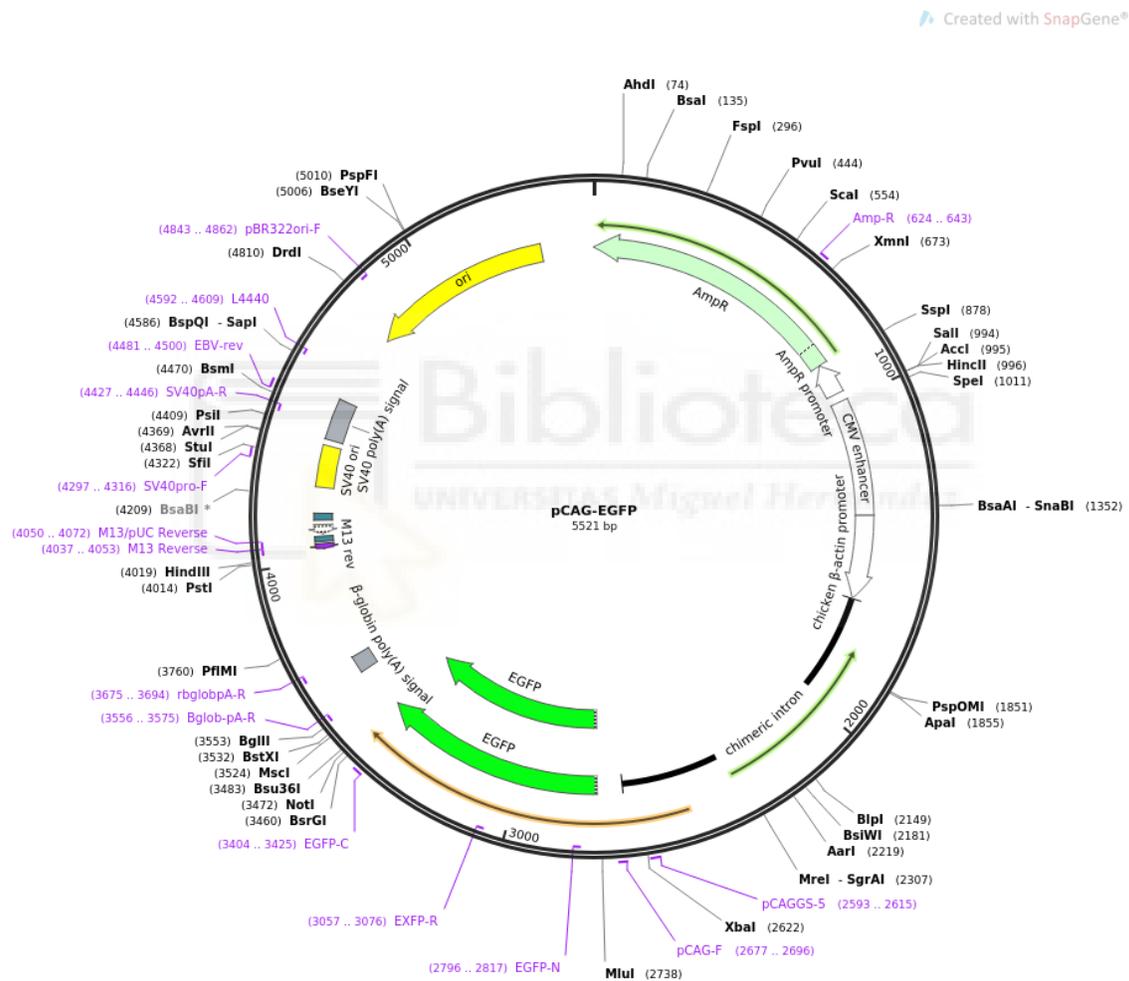


Figura 20: Estructura del plásmido pCAG-EGFP, utilizados en los experimentos de empaquetamiento y transfección.
Fuente: <https://www.addgene.org/>

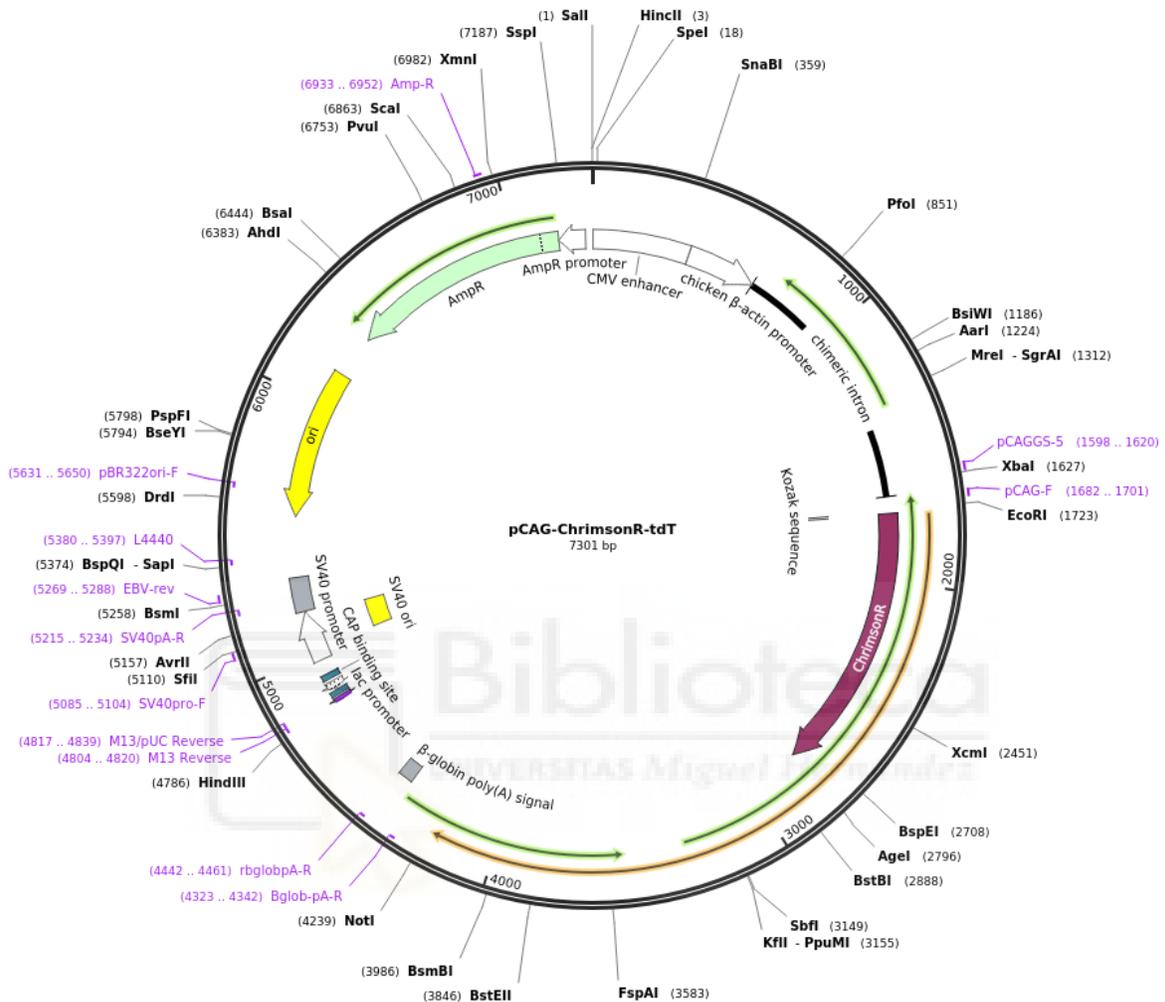


Figura 21: Estructura del plásmido pCAG-Chrimson-R, utilizado en los ensayos de transfección.
 Fuente: <https://www.addgene.org>

3.3. Protocolos estándar de cultivos celulares utilizados en los experimentos

Todos los experimentos practicados en este trabajo se han realizado sobre cultivos primarios de corteza de embrión de rata Wistar (Servicio de Experimental Animal, SEA-UMH) de 19 días de gestación, y sobre las líneas celulares SH-SY5Y

(ECEACC: 94030304) que es una sublínea clonada 3 veces de una biopsia de médula ósea derivada de la línea SK-N-SH [191], la línea HeLa (ECEACC: 93021013) extraída del epitelio de cáncer de cuello de útero [192], y por último la línea celular 3T3 (ECEACC: 89022402) perteneciente a fibroblastos extraídos de ratón [193].

Para los ensayos de transfección se utilizaron cubreobjetos de cristal 12 mm de diámetro (Thermo Scientific) colocados en placas de 24 pocillos. Dichos cubreobjetos se trataron posteriormente con PDL (Fisherscientific) y Laminina (Fisherscientific) para favorecer la adherencia celular. Las células de los cultivos primarios de corteza se sembraron siempre con una cantidad fija de 75.000 células en 500 µl en el medio de cultivo Neurabasal Medio (Gibco) enriquecido con 2% FBS, 2% B-27 (Thermofisher) 0,4% Penicilina-Estreptomicina (Thermofisher) y 0,4% Glutamax (Thermofisher). Las células sembradas se dejaron 7 días en el incubador a una temperatura constante de 37 °C y 5% de CO₂ para su maduración y diferenciación. Las células de las líneas SH-SY5Y, HeLa y 3T3 se sembraron con una cantidad de 1x10³ células/pocillo. En la siembra de la línea SH-SY5Y se utilizó medio Dmem (Gibco) + Ham (F₁₂) (Gibco) enriquecido con 10% FBS (Gibco) y 1% Penicilina-Estreptomicina. La línea HeLa se sembró con el medio MEM Ready (Gibco) suplementado con 10% FBS y 1% Penicilina-Estreptomicina. Por último, para la línea 3T3 se usó medio DMEM (Gibco) potenciado con 10% FBS y 1% Penicilina-Estreptomicina. Los ensayos de transfección y viabilidad en las líneas celulares comenzaron siempre 48h después de la siembra.

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron en placas de 96 pocillos, también pretratados con PDL y laminina. En el caso de los cultivos primarios se sembraron $1,5 \times 10^4$ células/pocillo y para las líneas celulares tumorales 2×10^2 células, utilizando siempre 100 μl de volumen final del medio correspondiente a cada tipo celular utilizado.

3.4. Evaluación de la toxicidad del péptido diseñado

Otro de los requisitos que debe de presentar cualquier vector independientemente de cuál sea su origen, es la biocompatibilidad, es decir que no sea tóxico o que presente la menor toxicidad posible para el huésped. Para realizar esta prueba se recurrió a la técnica de viabilidad celular con MTT (SigmaAldrich), dicha prueba consistió en un ensayo colorimétrico que permitió evaluar la viabilidad de un cultivo a partir de la actividad de una enzima presente en las mitocondrias de las células vivas, la Succinato Deshidrogenasa, que reduce el 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazoilo (MTT) de color amarillo, a 1-(4,5-dimatiltiazol-2-il)-3,5difenilFormazán (Formazán) que presenta una coloración púrpura (Figura 26). Para

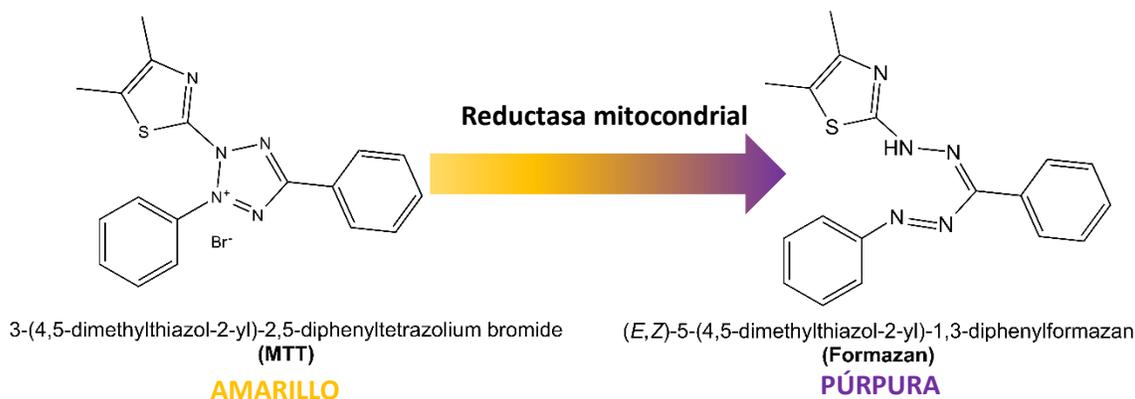


Figura 22. Reducción de MTT (color amarillo) a Formazán (color púrpura) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, la intensidad final del color púrpura es proporcional al número de células vivas presentes en el cultivo. (Elaboración propia)

realizar el MTT, se procedió tal y como se describe en el apartado 3.4. Siete días después de la siembra, las células se trataron con una concentración creciente de 20 a 120 μM del péptido a estudiar, excepto en 2 columnas las cuales se utilizaron como referencia (control negativo). Se dejó actuar el CPP en el incubador durante 5 horas, se retiró por completo, y se lavó con PBS. A continuación, se depositó en cada pocillo un volumen final de 100 μl del medio correspondiente con una concentración final de MTT de 1 mg/ml y se dejó incubar durante 4h a 37°C. Pasado ese tiempo, se procedió a la retirada completa del medio con MTT y se añadieron a cada pocillo 100 μl de DMSO (SigmaAldrich) para disolver los cristales de Formazán. Posteriormente, los pocillos se leyeron en un lector de placas iMark© de la casa BIO-RAD, a una longitud de onda de 595 nm.

3.5. Preparación de los complejos EGFP/péptido

En tubos Eppendorf se prepararon 4 condiciones distintas de plásmido/péptido, en proporciones crecientes que oscilaron desde 1:0,5 hasta 1:4, y en un quinto Eppendorf se preparó el complejo EGFP/Lipofectamina para utilizarlo como control positivo. Todos los compuestos se llevaron a un volumen final de 500 μl de agua Mili-Q y se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente para que se formaran los complejos.

3.6. Experimentos de transfección *in vitro* con el péptido diseñado

Los ensayos de transfección *in vitro* se realizaron con células de córtex y retina embrionaria de rata, tal y como está descrito en el apartado 3.4, y se dejaron madurar una semana para su diferenciación. Pasado este tiempo, se añadió a cada

uno de los pocillos el volumen de los complejos plásmido/péptido preparados anteriormente, dejando en cada pocillo la cantidad final fija de 500 ng de plásmido. Las placas se dejaron en el incubador a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas, tiempo tras el cual se procedió a su fijación con PFA 4% (SigmaAldrich). Se lavaron y se marcaron los núcleos con Hoechst (Thermofisher). A continuación, se montaron sobre portaobjetos de 80 mm para su posterior análisis mediante microscopia de fluorescencia con el microscopio Zeiss AxioObserver Z1 Apotome (Carl Zeiss). Las muestras se excitaron a una longitud de onda de 488 nm, que es la longitud de onda a la que la EGFP se excita y la emisión se recogió con un filtro de 525 nm. De cada uno de los cubreobjetos de las distintas condiciones utilizadas en cada experimento, se tomaron 10 imágenes al azar a con el objetivo a 20x y se mantuvieron siempre fijos todos los parámetros de captura, para su posterior recuento manual.

3.7. Técnicas de encapsulación de los complejos plásmido/péptido en liposomas

3.7.1. Sonicación

La primera técnica a la que se recurrió para empaquetar en el interior de los liposomas los complejos plásmido/péptido fue el de la sonicación. En primer lugar, se prepararon los complejos plásmido/péptido en proporciones crecientes de péptido desde 1:1 a 1:4 manteniendo la cantidad

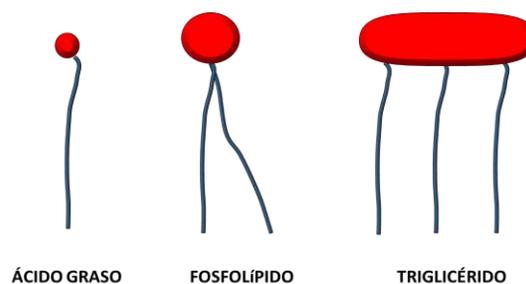


Figura 23. Tipos de lípidos utilizados en los experimentos, las regiones rojas representan las zonas polares o hidrofílicas, y las colas representan las regiones apolares o hidrofóbicas. (Elaboración propia)

de plásmido constante (4 μg). Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, tiempo tras el cual se añadieron 16 μg de cada uno de los tres compuestos lipídicos utilizados en los experimentos: ácidos grasos (250-500mg DHA-EPA/ml) omega-3 (NowFoods), triglicéridos de cadena media (930mg/ml) (Jarrows) y fosfolípidos (385mg/ml) (Nutricology) (Figura 23). Se llevaron toda la muestra a un volumen final de 120 μl . Posteriormente se introdujeron en el sonicador (Figura 24). Se dejaron actuar a los ultrasonidos sobre los complejos durante 1 hora. Pasado este tiempo, las muestras se reposaron 30 minutos a 4°C. A continuación, se depositaron 25 μl de cada condición en cada uno de los pocillos de una placa de 24 previamente sembrada de cultivo de embrión de rata de 19 días de gestación. Seguidamente, se dejaron en el incubador a 37° C y 5% CO₂ durante 48 horas. Finalmente, se procedió a la fijación de las muestras con PFA 4%, lavado y contrastado de los núcleos con Hoechst para su posterior análisis mediante microscopia de fluorescencia.



Figura 24. Imagen del sonicador utilizado en los experimentos para producir los liposomas. (Elaboración propia)

3.7.2. Técnica de inyección en frío y en caliente

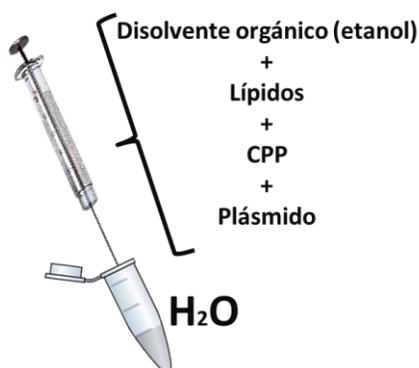


Figura 25. Técnica de inyección en frío y en caliente. Los lípidos disueltos en un disolvente orgánico junto con el plásmido se proyectan a alta presión sobre una suspensión acuosa para que se formen los liposomas de manera espontánea. (Elaboración propia)

Para encapsular los complejos plásmido/péptido mediante la técnica de inyección en frío se combinaron en tres tubos Eppendorf EGFP (1µg/µl) y CPP (1µg/µl) en una relación 1:4 en cada uno de los tubos, en un volumen final por tubo de 50 µl y 10 µg de EGFP, respectivamente. Se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora para dar lugar a la formación de los complejos. Seguidamente, se prepararon en otros tres tubos Eppendorf 300 µl de etanol absoluto (Panreac) con 50 µl de cada uno de los lípidos en tres Eppendorf distintos. Se mezclaron cada uno de los complejos formados anteriormente con cada una de las combinaciones etanol/lípido (Tabla 4). Se sometieron las mezclas a agitación vigorosa durante 30 segundos y se dejaron reposar 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, cada mezcla se recogió con una jeringuilla de 2 ml con una aguja 30G x 1/2", y se proyectó dicha mezcla energicamente sobre un tubo Eppendorf de 1,5 ml en la que previamente se había depositado 1 ml de agua Mili-Q a temperatura ambiente. Se dejó a una distancia de 2 cm entre la punta de la aguja y la superficie del agua del tubo Falcon (Figura 25). Seguidamente, se mantuvieron los tubos abiertos durante 24h en el incubador a 37° C para permitir que el etanol se evaporara. Pasado ese tiempo, se añadieron 25 µl de las mezclas formadas con anterioridad a los cultivos de córtex de embrión

de rata y se dejaron actuar durante 24h. Tiempo tras el cual se fijaron las células con 4% PFA. A continuación, se marcaron los núcleos con Hoechst para su posterior análisis mediante microscopia de fluorescencia. Para la técnica de inyección en caliente se realizaron los mismos pasos que en la de inyección en frío, pero se incrementó la temperatura del agua del tubo Falcon sobre la que se proyectaron los compuestos hasta los 56°C.

	EGFP/PPP	Etanol+ Triglicéridos	Etanol+ Ácidos grasos	Etanol+ Fosfolípidos
Muestra 1	X	X	-	-
Muestra 2	X	-	X	-
Muestra 3	X	-	-	X

Tabla 4. Distribución para el experimento de inyección en frío y en caliente de los tres lípidos utilizados para encapsular los complejos plásmido/péptido en liposomas

3.8. Experimentos de transfección basados en el PLL

3.8.1. Preparación de los complejos EGFP/PLL comercial para ensayos de viabilidad

En tubos Eppendorf sobre un volumen final de 100 µl de agua Mili-Q se prepararon 6 condiciones distintas EGFP/PLL desde 1:0,5 hasta y 1:16, más una tercera muestra en la que se combinó EGFP/Lipofectamina (1:1) como control positivo. Una vez realizadas las mezclas, se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para que tuviese lugar la formación de los poliplexos.

3.8.2. Transfección con los complejos EGFP/PLL en células de corteza embrionaria

Para la preparación y siembra de las células se siguieron los mismos pasos que en apartado 3.4. Se depositó en este caso una cantidad final de plásmido de 400 ng por pocillo, se volvieron a introducir en el incubador durante 48 horas antes de fijar las muestras con PFA 4%. Para el marcaje de los núcleos celulares se recurrió al Hoechst (1:500) para su posterior análisis con el microscopio de fluorescencia.

3.9. Ensayos de transfección utilizando el PDL como vector no viral

3.9.1. Preparación de los complejos EGFP/PDL comercial para ensayos de transfección en cultivos de corteza embrionaria

Los complejos EGFP/PDL se prepararon mezclando el plásmido de EGFP con diferentes volúmenes de PDL para obtener las proporciones 1:2 y 1:4. Como control positivo se usó una combinación de EGFP/Lipofectamina (1:1) y como control negativo ADN solo. Todas las mezclas se prepararon a un volumen final de 100 μ L en agua destilada y se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente para que el plásmido y los polímeros de lisina interaccionaran entre sí.

3.9.2. Ensayo de viabilidad celular del PDL sobre células de corteza embrionaria.

El protocolo utilizado para estudiar la toxicidad del PDL es el mismo que el descrito en el apartado 3.4. En esta ocasión las células se trataron con proporciones crecientes de los complejos EGFP/PDL desde 1:0,5 hasta 1:16 preparadas con

anterioridad. Se depositó en cada pocillo una cantidad final de 80 ng de plásmido, y se dejaron 2 columnas sin tratar para utilizarlas como control negativo del 100% de viabilidad.

3.9.3. Transfección de células de corteza con los complejos EGFP/PDL

Para el ensayo de transfección, se siguieron los pasos descritos en el apartado 3.4 para células embrionarias. Pasados 7 días tras la siembra, se añadieron a cada pocillo el volumen necesario de cada uno de los compuestos obtenidos en el apartado 3.8.1 obteniendo una cantidad final de 400 ng de plásmido por pocillo. Las placas tratadas se volvieron a dejar en el incubador durante 24 h, tiempo tras el cual se procedió al fijado de las células con PFA 4%. Finalmente, los núcleos se marcaron con Hoechst (1:500) para su posterior análisis mediante microscopia de fluorescencia.

3.10. Mejora de la eficiencia de transfección del PDL

Hasta la fecha, todos los experimentos que se han realizado tanto de transfección como de viabilidad habían sido con tiempos relativamente cortos, como máximo de 48 horas [194]. Por este motivo, se decidió analizar una estrategia a más largo plazo para observar los resultados.

Para ello, se sembró una placa de 24 pocillos siguiendo los mismos pasos que en el apartado 3.1.3. Tras un periodo de 7 días en el incubador, se realizó un primer tratamiento con el complejo EGFP/PDL a una relación 1:2 con una cantidad final de plásmido de 400 ng. Tras 48h, se cambió todo el medio por medio nuevo

para realizar un segundo tratamiento, en este caso se sustituyó el plásmido de EGFP por el plásmido pcag-Chrimson (1mg/ml) (AddGene) dando lugar al complejo Chrimson/PDL. Se trataron las células con el nuevo compuesto en las mismas condiciones que con el compuesto EGFP/PDL. Se dejó incubar el cultivo durante 48h más, y a continuación, las células se fijaron con PFA 4%. Posteriormente, se analizaron mediante microscopia de fluorescencia.

3.11. Preparación de los complejos EGFP/PDL para ensayos de transfección y viabilidad a tiempos crecientes en cultivos de corteza embriónica

Después del periodo de maduración de las células, se realizó el primer tratamiento con las distintas proporciones EGFP/PDL elaborado anteriormente. En las placas de 24 pocillos la cantidad final de plásmido fue de 400 ng por pocillo, y en las placas de 96 de 80 ng. Nuevamente se dejaron en el incubador durante 48 horas, tiempo tras el cual se retiró todo el medio de los pocillos de las placas y se volvieron a llenar con 500 µl medio de neuronas fresco. A continuación, se realizó el segundo tratamiento utilizando las mismas cantidades que se usaron en el primero. Las células se dejaron durante 48 horas más en el incubador, y seguidamente, se llevó a cabo el tercer y último tratamiento, siguiendo los mismos pasos que en los anteriores tratamientos. Pasadas 48 horas desde el último tratamiento, las placas se fijaron con PFA 4% y se marcaron los núcleos con Hoechst. (Figura 26). Las placas de 96 pocillos se trataron con MTT disuelto en medio de neuronas (1 mg/ml), durante 3 horas y media. Pasado ese tiempo, se disolvieron los cristales

de Formazán con 100 μ l de DMSO. Las placas se midieron en un lector de placas de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

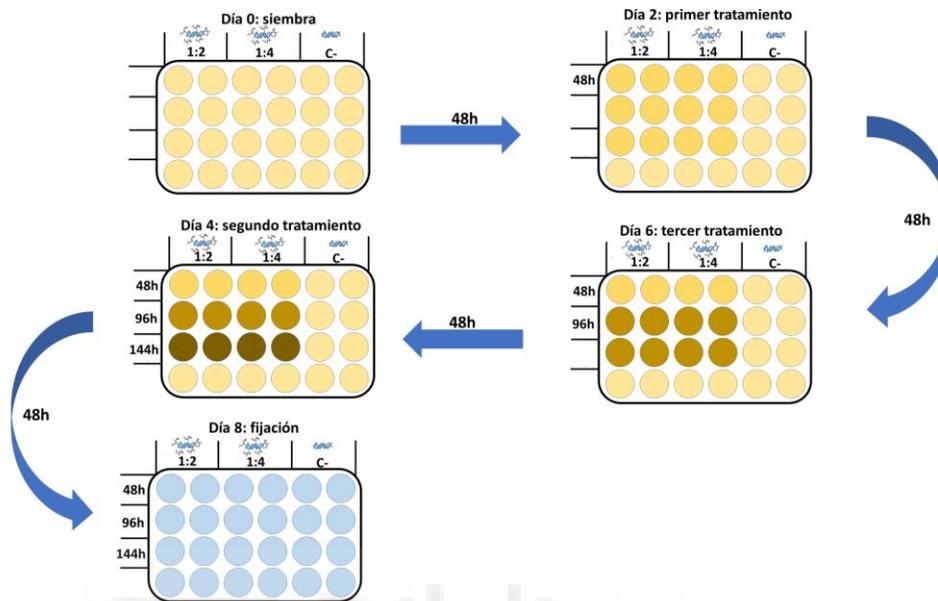


Figura 26. Esquema de los tratamientos realizados en los cultivos para su posterior análisis. La columna horizontal indica la proporción utilizada (1:2, 1:4 y C-) y la columna vertical el tiempo al que se realiza cada tratamiento (48,96 y 144 horas). (Elaboración propia)

3.11.1. Caracterización del PDL comercial como vector no viral en líneas celulares tumorales

3.11.1.1. Ensayo de viabilidad celular del PDL en cultivos de las líneas celulares SH-SY5Y HeLa y 3T3

Para los ensayos de viabilidad celular, se utilizaron las líneas SH-SY5Y, HeLa y 3T3, las cuales se encontraban almacenadas a -80° C en FBS (Gibco) y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%.

Las líneas SH-SY5Y, HeLa y 3T3 se sembraron tal y como se ha descrito en el apartado 4.4. Pasadas las primeras 48 horas desde la siembra, se procedió a realizar el primer tratamiento con las condiciones 1:2 y 1:4 del complejo EGFP/PDL, se dejó 80 ng de plásmido por pocillo, y se procedió a realizar el mismo protocolo

de transfección que en los ensayos realizados en el apartado 4.8, de forma que se quedaban columnas que habían recibido un tratamiento a las 48 horas desde que se sembró, otras dos columnas con tratamientos a 48 y 96 horas, y un tercer grupo se trató 3 veces: a las 48, 96 y 144 horas, el grupo de control no recibió ningún tratamiento. Independientemente del tratamiento recibido, todas las células se dejaron crecer durante 8 días desde la siembra, antes de proceder a realizar al estudio de la viabilidad.

3.11.1.2. Estudio de las interacciones EGFP/PDL mediante el ensayo de retardo en gel de agarosa.

El plásmido que se utilizó para los ensayos fue el plásmido pCMS-EGFP, el cual codifica para la proteína verde fluorescente intensificada (EGFP), se amplificó en nuestras instalaciones utilizando la bacteria E. Coli y el kit QIAFilter de Qiagen a una concentración final de 1 mg/ml, el PDL se diluyó también a la misma concentración

Para analizar las interacciones entre los polímeros de D-lisina y el plásmido, se incubó PDL (1 mg/ml) y plásmido de la EGFP (1 mg/ml) durante una hora a temperatura ambiente. Las proporciones de PDL se incrementaron desde 1:0,125 hasta 1:4 para obtener varias proporciones de los complejos EGFP/PDL manteniéndose la concentración de ADN constante. Las interacciones se analizaron corriendo las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Se utilizó GreenSafe como agente intercalante para ver la localización del ADN. Las mezclas se dejaron correr durante 45 minutos a 90 V a temperatura ambiente. Pasado ese

tiempo el gel se iluminó con una lámpara UV y se tomaron imágenes con el transiluminador de Vilber Lourmart.

3.12. Ensayo de protección frente a ADNasa I con PDL

Con el objetivo de estudiar la capacidad del PDL de proteger al ADN de la degradación enzimática, se llevó a cabo el ensayo de protección frente a ADNasa I. Los complejos EGFP-PDL se prepararon con las proporciones 1:2 y 1:4, y como control se utilizó ADN desnudo. Los complejos se incubaron a 37° C durante 60 minutos en presencia de ADNasa I (1 U/μg de ADN) y 1 μL MgCl₂ 25mM. Pasado ese tiempo, la actividad de la ADNasa I se bloqueó con 1 μL de EDTA 50 mM, y seguidamente las muestras se calentaron a 65° C durante 10 minutos para desnaturalizar la enzima. Una vez enfriada la muestra, se añadieron 500 U de heparina (Hospira) con el objetivo de liberar el ADN del PDL. A continuación, las mezclas se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante 45 minutos a 90 V, se utilizó GreenSafe para marcar el ADN mediante luz UV y las imágenes se tomaron con el transiluminador de Vilbert Lourmart.

3.13. Ensayo de transfección *in vitro* en SH-SY5Y, HeLa y 3T3 con PDL

Las líneas celulares SH-SY5Y, HeLa y 3T3 se sembraron de la misma forma que se describió en el apartado 4.4. Las células se trataron de igual manera que en el ensayo de viabilidad celular y el control positivo se trató con Lipofectamina a los mismos tiempos que el resto de las condiciones, se depositó en cada pocillo la cantidad final de 400 ng de plásmido (Tabla 5). Pasadas 48 horas del último tratamiento (9º día desde el inicio de los tratamientos), se procedió a la retirada completa

del medio. Las células se fijaron con 500 μ L de PFA 4% durante 5 minutos, tiempo tras el cual se retiró por completo de los pocillos y se añadió nuevamente 500 μ L de PFA 4% durante 15 minutos. Posteriormente, las células fijadas se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS y 1 μ L Hoechst (1 μ g/ μ L) durante 5 minutos, tiempo tras el cual se procedió a realizar 2 lavados más con PBS y se mantuvieron a 4° C hasta su posterior análisis.

		1	2	3	4
<i>Tiempo</i>		Proporción 1:2	Proporción 1:4	C +	C -
3 ^{er} día (48 h)	A	X	X	X	-
	B	X	X	X	-
	C	X	X	X	-
5 ^o día (96 h)	A	-	-	-	-
	B	X	X	X	-
	C	X	X	X	-
7 ^o día (144 h)	A	-	-	-	-
	B	-	-	-	-
	C	X	X	X	-

Tabla 5. Tratamientos realizados con los complejos EGFP/PDL en placas de 24 pocillos. Los números 1,2,3 y 4 pertenecen a las columnas de las placas, A, B y C son las filas. Las células se fijaron al noveno día. (X) indica tratamiento, (-) indica solo cambio del medio de cultivo. El orden de días hace referencia a los días que pasan desde la siembra de las células. El tiempo entre paréntesis se refiere a las horas que las células han estado con el tratamiento.

3.14. Ensayo de recuento celular en SH-SY5Y, HeLa y 3T3 con PDL

Las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia con un filtro de 488 nm para observar las células transfectadas y otro filtro de 358 nm para localizar los núcleos celulares. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Zeiss AxioObserver Z1 Apotome (Carl Zeiss) con un objetivo 20X.

3.15. Ensayo de citometría de flujo en SH-SY5Y, HeLa y 3T3 con PDL

Las células se sembraron como se describió en el apartado 4.4 y se llevó a cabo el mismo protocolo de transfección que en el punto 4.9.4. Al 9º día tras el primer tratamiento con los complejos EGFP/PDL, los cultivos se lavaron 2 veces con PBS a 37º C y, a continuación, se trataron con 200 µL de Tripsina 0,05%-EDTA (1x) (Gibco) durante 5 minutos a 37º C con el objetivo de despegar las células de la placa. Seguidamente, se añadió a cada pocillo 400 µL de PBS con FBS al 20% para bloquear la acción de la tripsina. Las células se recogieron y se depositaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugaron durante 5 minutos a 200 G. A continuación, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de PBS con FBS (2%) y se conservaron en hielo. La expresión de EGFP de las células transfectadas se midió con el citómetro de flujo SONY SH800 con una longitud de onda de Ex/Em=488/510 nm. Se contabilizaron un mínimo de 10000 eventos en cada una de las condiciones de los tres experimentos que se realizaron. Los datos se procesaron con la versión 2.5.1 de Flowing Software. Los datos de expresión de las células se representaron como el porcentaje de células fluorescentes con respecto al total de células. Como control negativo las muestras se compararon con células que habían sido tratadas con ADN solo.

3.16. Análisis estadístico

Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba T-de Student cuando las variables presentaban una distribución normal para dos muestras realizado mediante la prueba

Kolgomorov-Smirnof, y el test no paramétrico Kruskal-Wallis en el caso contrario. Para los cálculos estadísticos se recurrió al plug-in Real Statistics Resource Pack para Excel. Cada experimento se repitió al menos tres veces.



Capítulo 4: Resultados



4. Resultados

El primer objetivo que se planteó en esta tesis doctoral, se formuló a partir de los resultados obtenidos con el profármaco CPT 5ALA y en el trabajo final de máster en Bioingeniería realizado con anterioridad, en los que se pudo corroborar que, una secuencia peptídica conjugada a un fluoróforo (Figura 27) era capaz de atravesar la membrana plasmática y acceder hasta el núcleo de las células embrionarias de córtex de rata en ensayos *in vitro* (Figura 28) y en neuronas y retina de ratón *in vivo* (datos no mostrados). En base a los resultados obtenidos durante el máster, la presente tesis doctoral se comenzó con el diseño de un péptido catiónico formado por la secuencia de aminoácidos VKRPKKRKGKC (Watsonbio) para su posterior valoración. En este diseño se mantuvo el núcleo catiónico del CPP (KKRKG) utilizado en los ensayos realizados durante el máster con el que se obtuvieron excelentes resultados, y se le añadió una secuencia NLS (VKRP) para dirigir el complejo al núcleo [195], más una cisteína (C) en el carbono terminal para mejorar la capacidad del péptido de atravesar la membrana plasmática [196].

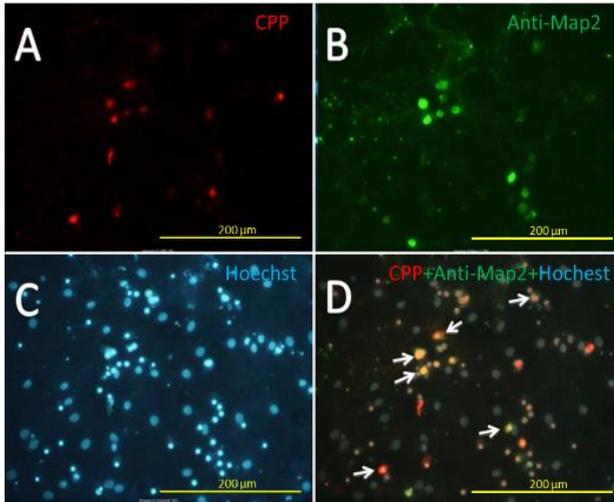


Figura 28. Cultivo *in vitro* de células embrionarias de corteza incubadas durante 5 horas con el CPP+TAMRA (rojo) a una concentración 5 μm . Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul) y las neuronas (en verde) con un anticuerpo Anti-MAP2. En la imagen D se señalan con flechas las células donde se colocan los tres fluoróforos, lo que nos indicaba la presencia del péptido en los núcleos de las neuronas.

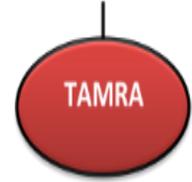
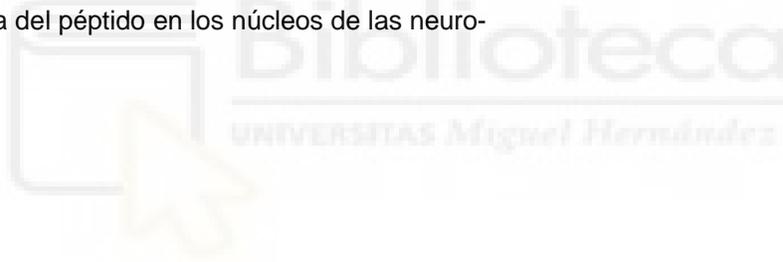


Figura 27. Secuencia peptídica rica en aminoácidos catiónicos utilizada para el experimento con el fluoróforo TAMRA conjugado. Las letras en minúscula indican que los aminoácidos son la forma isomérica -D y las mayúsculas identifican a los aminoácidos con la forma -L. El fluoróforo se excita con una longitud de onda de 555 nm y emite fluorescencia a 580 nm de longitud de onda. (Elaboración propia)



4.1. Técnicas de encapsulación de los complejos EGFP/péptido en liposomas

Los resultados obtenidos con los tres tipos de lípidos mostraron que mediante la técnica de sonicación no se obtuvo ningún resultado (datos no mostrados), mientras que con la de inyección en frío, se consiguieron transfectar neuronas de corteza cerebral de rata embrionarias con ácidos grasos y triglicéridos (Figura 29 A

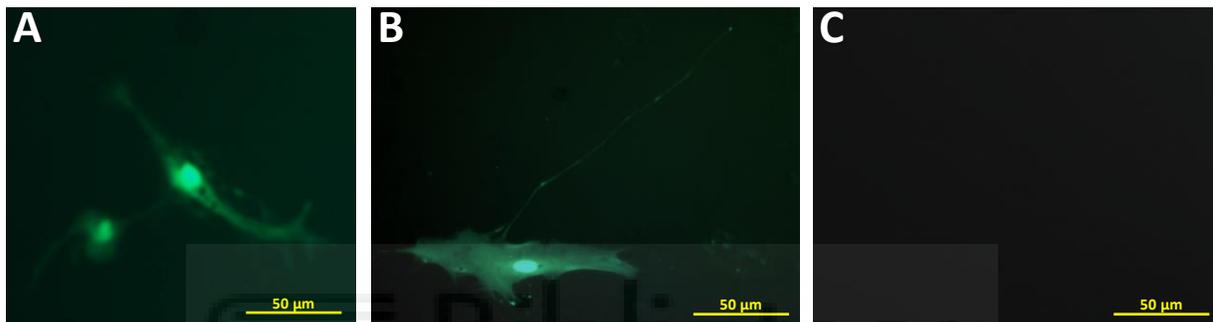


Figura 29. Ensayos de transfección con los distintos tipos de lípidos utilizados, ácidos grasos (A), triglicéridos (B) y fosfolípidos (C) y B) mientras que con fosfolípidos no se obtuvo tampoco ningún resultado (Figura 29 C).

A raíz de la escasa transfección en los resultados mostrados anteriormente (apenas una célula en todo el cubreobjetos), debido a las limitaciones técnicas de las instalaciones y basándonos en la literatura previamente estudiada sobre el uso de CPP's para transfectar células, se decidió un cambio radical de estrategia y desechar el CPP diseñado para los experimentos y sustituirlo por un polipéptido catiónico basado en el aminoácido L-lisina (PLL) (SigmaAldrich).

4.2. Resultados de los experimentos de transfección con PLL

4.2.1 Resultados de los experimentos de transfección con PLL

A pesar de la abundante literatura existente sobre las propiedades del PLL para atravesar la membrana plasmática (Tabla 3), tanto en cultivos de neuronas como de células de la retina embrionaria de rata, no se obtuvo resultado alguno en los experimentos de transfección. Debido a ello, se variaron las concentraciones, las cantidades finales, e incluso el tipo de plásmido (EGFP y Chrimson), pero en ningún momento se consiguió transfectar ninguna célula en los ensayos realizados en los cultivos embrionarios.

Por las razones mencionadas anteriormente se planteó un nuevo cambio en la estrategia a seguir y se decidió probar con el PDL comercial disponible en el laboratorio, que es el utilizado habitualmente para favorecer la adhesión celular a los cubreobjetos que se usan en los experimentos.

4.3. Ensayos de transfección utilizando el PDL

4.3.1. Resultados de viabilidad del PDL en células de corteza embrionaria de rata.

En los resultados obtenidos mediante el ensayo de viabilidad celular a 24h (Figura 30), se observa que en la proporción 1:0,5 EGFP/PDL, la viabilidad fue $01,7\pm 6,6\%$, a 1:1 resultó $99,1\pm 7\%$, a 1:2 se obtuvo el valor $96,2\pm 7,4\%$, a 1:4 el dato arrojado fue $86,7\pm 3,7\%$, y, por último, a 1:8 de $70,0\pm 1,2\%$ y a 1:16 de $50,1\pm 4,7\%$ de viabilidad con respecto al control. Con estos datos se descartaron las

proporciones 1:8 y 1:16 por su elevada toxicidad y se seleccionaron las 4 primeras proporciones (1:0,5 1:1 1:2 y 1:4) para el siguiente ensayo de transfección.

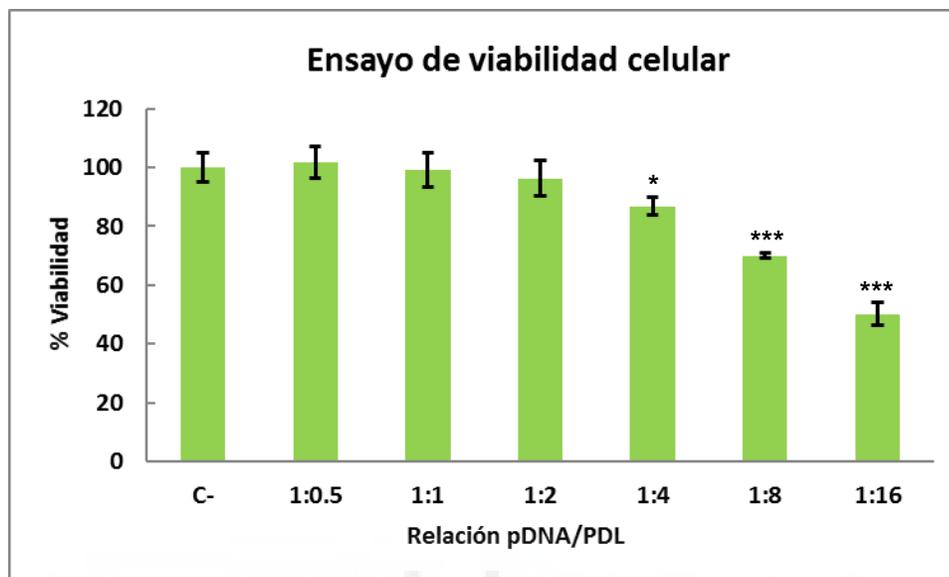


Figura 30. Ensayo de MTT en células de corteza de rata embrionaria a distintas proporciones de EGFP/PDL durante 48 horas, se muestran las medias de las lecturas obtenidas de tres experimentos diferentes, y se comparan con las células no tratadas como referencia (C-) que representan el 100% de viabilidad. Las barras de error indican \pm la desviación estándar * $p > 0.05$, ** $p > 0.005$, *** $p > 0.001$ con respecto a C-.

4.4. Transfección de células de corteza con los complejos EGFP/PDL

En las muestras del cultivo de corteza embrionaria de rata analizadas (Figura 31) se pudo observar expresión de EGFP tanto en la proporción 1:2 como en la 1:4 (Figura 31 C y D respectivamente) mientras que a las proporciones 1:0,5 y 1:1 (Figura 31 A y B) no se apreció transfección alguna.

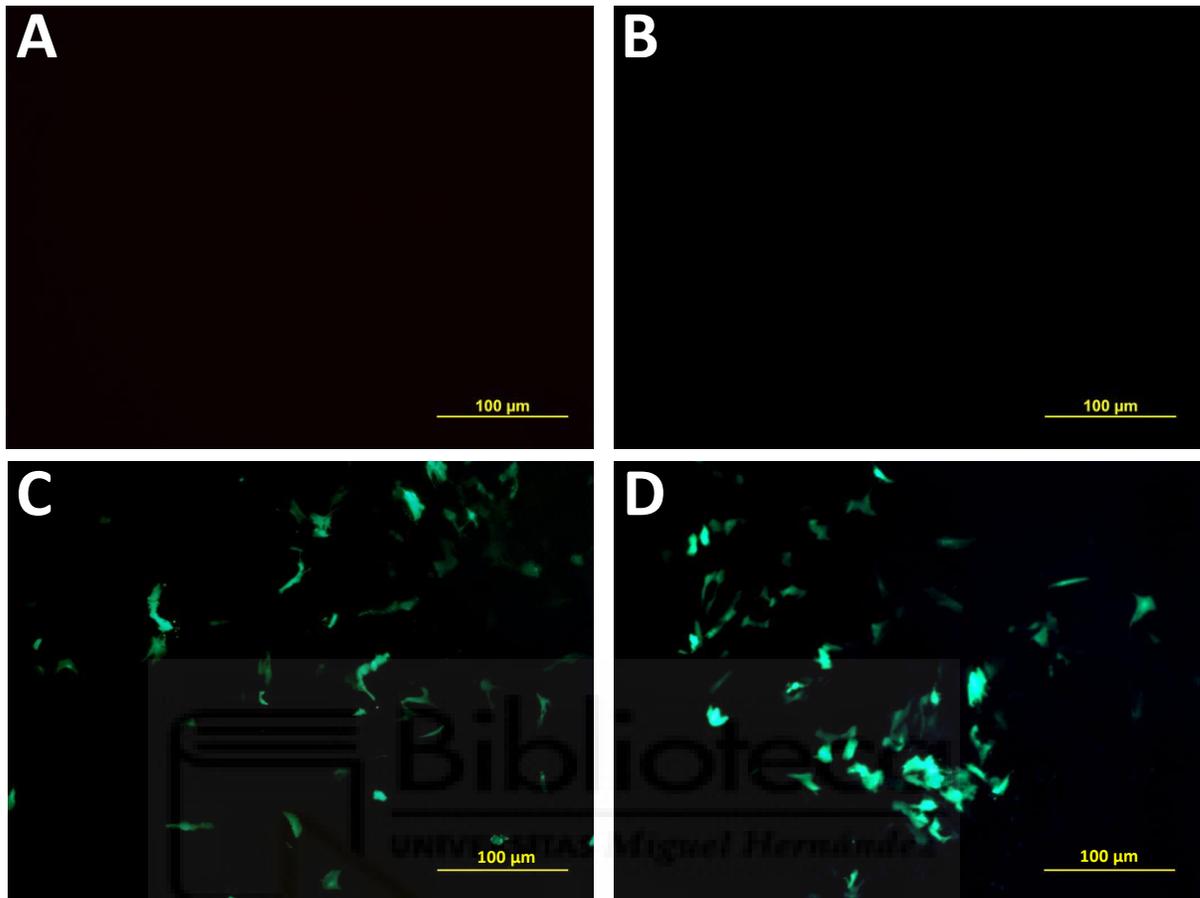


Figura 31. Ensayo de transfección en cultivo células de córtex embrionario tratadas con distintas proporciones EGFP/PDL: 1:0,5 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D) mediante microscopia de fluorescencia. En color verde se muestra la expresión de la proteína verde fluorescente (EGFP) cuando el cultivo es expuesto a una longitud de onda de 455 nm.

4.4.1 Resultados de mejora de la eficiencia de transfección del PDL

En experimentos previos se pudo observar que en células de corteza embrionaria de rata la expresión del transgén se llegó a mantener hasta un periodo 30 días (datos no mostrados), y que la transfección con el PDL podía ser un fenómeno acumulativo en el que cada vez son células diferentes las que internalizan el plásmido (Figura 32). Teniendo en cuenta estos datos, se plantea la posibilidad de incrementar la transfección de los cultivos primarios mediante tratamientos sucesivos durante periodos de 48 horas, que es el tiempo en el que se observa que la

intensidad de la transfección en las células transfectadas se estabiliza (datos no mostrados). Para ello, se diseñó un nuevo protocolo en el que las células se trataron en tres etapas diferenciadas, dejando 48 horas entre cada tratamiento y reemplazando por completo el medio de cultivo antes de volver a depositar los complejos EGFP/PDL 1:1 y Chrimson/PDL 1:1 para mantener de esta forma las mismas concentraciones durante todo el tiempo que duraba el experimento.



Figura 32. Transfección de cultivo de células embrionarias de corteza de rata tratadas con una relación 1:2 del compuesto EGFP/PDL (verde) y 48 horas más tarde con Chrimson/PDL (rojo) en la misma proporción. Montaje de dos imágenes tomadas a 455/535 y 555/580 nm de excitación/emisión respectivamente 96 horas después del primer tratamiento con compuesto EGFP/PDL

4.4.2. Resultados del MTT y conteo de células transfectadas a distintos tiempos en cultivos embrionarios de rata.

En los ensayos realizados de viabilidad celular (Figura 33) y recuento celular (Figura 34) a distintos tiempos se puede apreciar que, si bien la viabilidad se reduce ligeramente con cada tratamiento con respecto al control (proporción 1:2

48h=97,1±4,8%, 96h=86,9±4,7%, 144h=75,7±2,0%) (proporción 1:4
 48h=83,5±6,5%, 96h=78,3±8,6%, 144h=60,13±6,25%) la expresión de EGFP se in-
 crementa considerablemente con cada ronda de transfección (proporción 1:2 48
 h=0,07±0,02%, 96 h=0,6±0,09%, 144 h=1,41±0,06%) (proporción 1:4
 48h=0,6±0,04%, 96h=1,1±0,1% 144h=2,15±0,09%), mejorando ambas proporci-
 ones al control positivo preparado con Lipofectamina (48h=0,06±0,07%,
 96h=0,19±0,13%, 144h=0,21±0,09%).

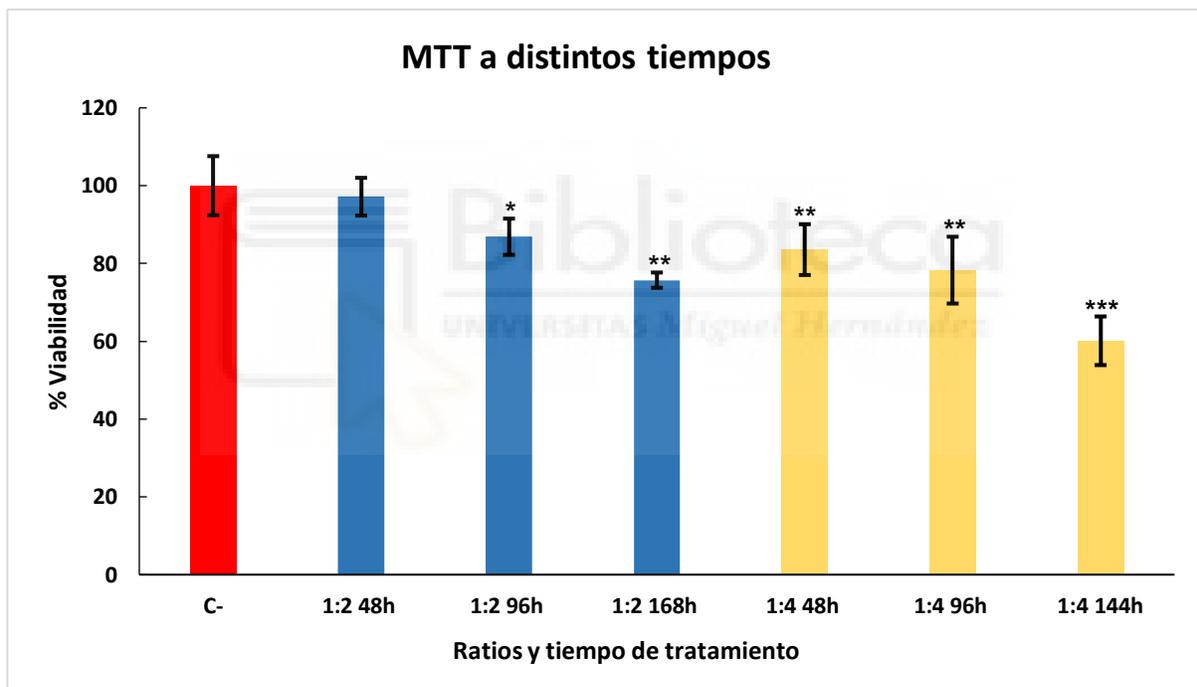


Figura 33. Ensayo de viabilidad celular con distintas proporciones EGFP/PDL y tiempo de tratamientos en cultivos de corteza embrionaria a diversos tiempos y proporciones. Los datos se representan sobre el porcentaje de células viables con respecto a las células sin tratar. Se presentan las medias ± la desviación estándar. * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.001 con respecto al Control negativo (C-)

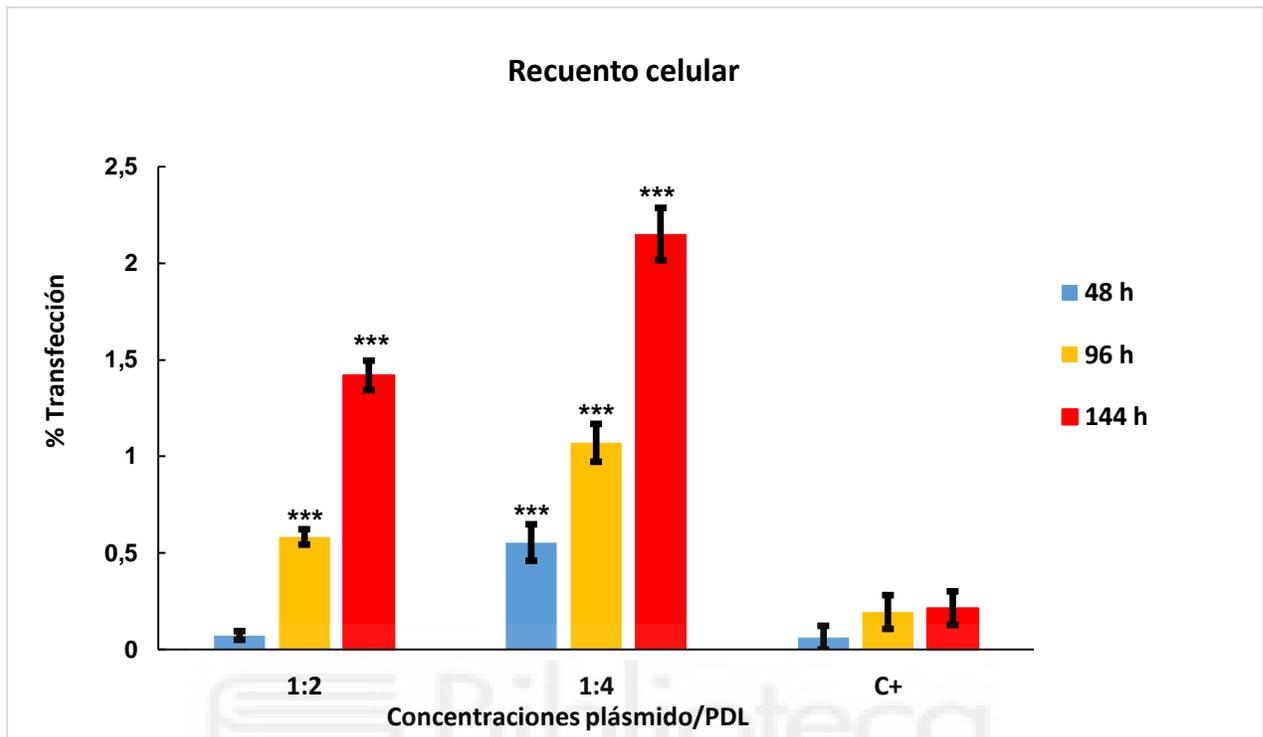


Figura 34. Recuento celular manual de células transfectadas de cultivo primario de corteza embrionaria, se representa el porcentaje total de células transfectadas con EGFP/PDL a diferentes intervalos de tiempo sobre el total de células en la muestra. Comparadas con células que se trataron con EGFP/Lipofectamina como control positivo (C+). Las barras de error representan \pm la desviación estándar (* $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$).

4.4.3. Ensayo de retardo en gel de agarosa

Las interacciones entre los complejos EGFP/PDL se analizaron mediante movilidad electroforética utilizando proporciones incrementales de PDL con respecto al ADN (Figura 35). Desde la relación 1:0,12 hasta la 1:1 (calles A-D) la movilidad es similar al plásmido solo (calle H). En cambio, a las proporciones 1:2 y 1:4 se puede observar que la interacción es lo suficientemente fuerte entre el péptido y el ADN para bloquear la migración del plásmido en el gel.

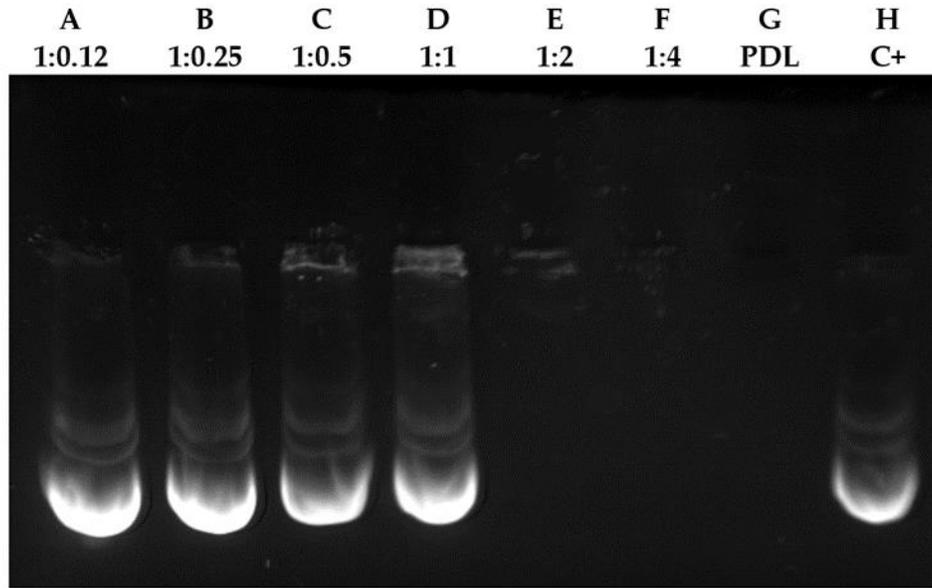


Figura 35. Análisis de retardo en gel entre las diferentes proporciones EGFP/PDL en gel. En las columnas A-F se muestran las diferentes proporciones de EGFP/PDL 1:0,1, 1:0,25, 1:0,5, 1:1, 1:2 y 1:4, respectivamente. La columna G contiene únicamente PDL y en la columna H se depositó ADN solo.

4.4.4. Ensayo de protección frente a ADNasa I y liberación del ADN

Una característica esencial que cualquier vector debe presentar para poder ejecutar ensayos de transfección *in vivo* es la capacidad de proteger el ADN de las nucleasas presentes en la sangre y los tejidos [197]. En el experimento de protección frente a ADNasas y la posterior liberación del ADN (Figura 36), se evaluó la capacidad del PDL a las proporciones 1:2 y 1:4 para proteger el ADN plasmídico de la digestión de la ADNasa I. Con la utilización de la heparina se pretendió liberar el ADN de los complejos plásmido-PDL. Para ambas proporciones se observó que el PDL no solo es capaz de formar complejos con el plásmido, sino que también lo protegía parcialmente de la digestión por parte de la enzima. También se apreció la acción antiagregante de la heparina por la liberación parcial del ADN de los

complejos formados con el PDL (columnas A y E). Cuando se añadió heparina sin ADNasa I, se observó la liberación parcial del ADN de los complejos formados con PDL (columnas B y F). Cuando se incorporó ADNasa I sin heparina, el ADN no fue liberado (columnas C y G), la ausencia de bandas indicaba que se producía un fenómeno similar que cuando no se añadía ADNasa I ni heparina (columnas D y H). A la proporción 1:4 se observó una liberación del ADN más pronunciada cuando se comparaba con la proporción 1:2 (columnas A y E). Cuando se añadió ADNasa I al plásmido solo, no se apreció la presencia de ninguna banda (Columna I). Todas las muestras del gel se compararon con la calle donde se depositó plásmido solo (columna J). Es posible que en las zonas de carga de las columnas B, D, E, F, H, el PDL pudiera interferir en la unión entre el plásmido y el agente intercalante en el ADN GreenSafe, y que la heparina pudiera liberar el plásmido de los complejos formados con el ADN, permitiendo el marcaje de los ácidos nucleicos. Aunque serían necesarios más experimentos para obtener conclusiones definitivas.

4.5.1 Ensayo viabilidad celular en función de la concentración y la administración de PDL a distintos tiempos

Para evaluar la posible toxicidad del PDL se usó el ensayo de MTT, en el que se estudiaron diferentes proporciones EGFP/PDL, y a distintos tiempos, en las líneas SH-SY5Y, HeLa y 3T3. Tras 48 horas después de la siembra de las líneas celulares, se llevó a cabo el primer tratamiento con los complejos EGFP/PDL, y se repitió este proceso cada 48 horas dos veces más. Como control se utilizaron células sin tratar para utilizarlos como referencia del 100% de viabilidad. Los resultados obtenidos (Figura 37) demostraron que la línea celular HeLa es la que presentaba

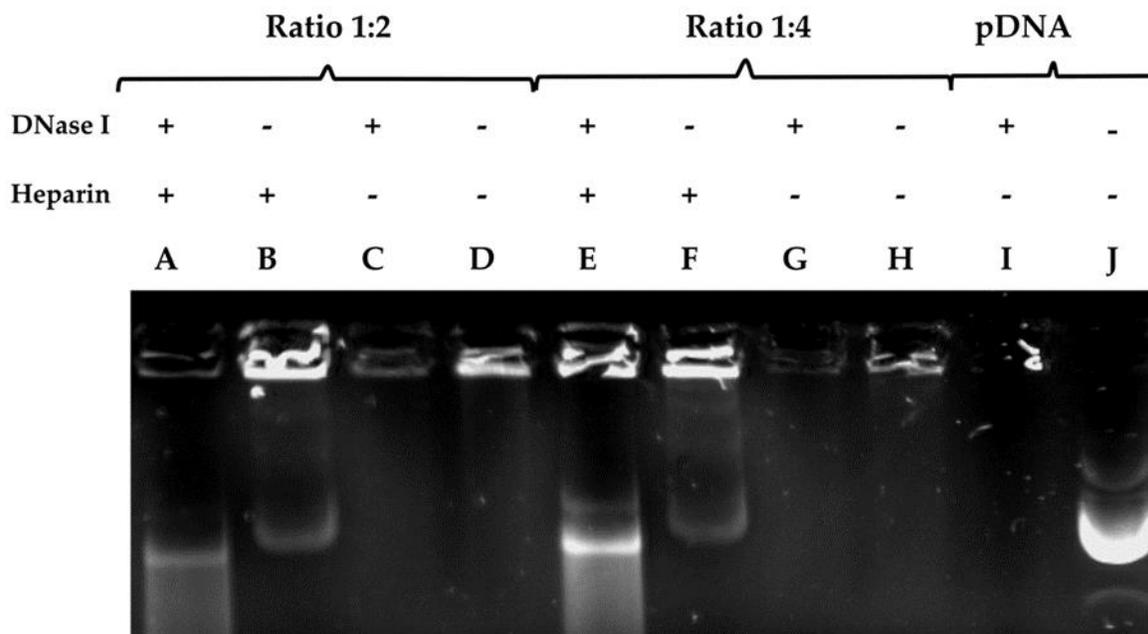


Figura 36. Ensayo de liberación de diferentes proporciones EGFP/PDL utilizando heparina. Los complejos se formaron utilizando PDL en proporciones 1:2 (columnas (A-D), 1:4 (columnas E-H), y plásmido solo (columnas I, J). La capacidad de protección del PDL se evaluó utilizando ADNasa I. El ADN se liberó parcialmente por la acción de la heparina (columnas A, B, E y F). Los signos (+) y (-) indican la presencia o ausencia de ADNasa I y heparina, respectivamente.

la más alta tasa de viabilidad en todos los tratamientos y tiempos de transfección en comparación con las líneas SH-SY5Y y 3T3. Concretamente, en la proporción 1:2 a las 48h desde el primer tratamiento, se observó la mayor supervivencia en las células HeLa ($98 \pm 2,2\%$ ($p = 3,0 \times 10^{-1}$)), seguida por las células 3T3 ($88,39 \pm 2,67\%$ ($p = 1 \times 10^{-3}$)), y por último la línea SH-SY5Y ($86,7 \pm 2,72\%$ ($p = 9 \times 10^{-3}$)). Tras 96h, se observó una tendencia similar, aunque la viabilidad se redujo en las tres líneas (HeLa = $92,98 \pm 1,82\%$ ($p = 2 \times 10^{-4}$), 3T3 = $85 \pm 6,9\%$ ($p = 2 \times 10^{-3}$), SH-SY5Y = $80,88 \pm 3,3\%$ ($p = 2 \times 10^{-3}$)) y a 144h de tratamiento (HeLa = $87,28 \pm 1,36\%$ ($p = 6,43 \times 10^{-5}$), 3T3 = $77,31 \pm 6,23\%$ ($p = 2,1 \times 10^{-4}$), SH-SY5Y = $73,15 \pm 2,86\%$ ($p = 5,85 \times 10^{-5}$)). Con la proporción 1:4 la viabilidad descendió en las tres líneas cuando se comparó con la proporción 1:2, siendo nuevamente la línea HeLa la que

presentó la mayor viabilidad, a 48h (HeLa = $91,97 \pm 1,4\%$ ($p = 3,54 \times 10^{-5}$), 3T3 = $55 \pm 11,89\%$ ($p = 2,24 \times 10^{-5}$), SH-SY5Y = $63,21 \pm 2,86\%$ ($p = 2,45 \times 10^{-5}$)), a 96h (HeLa = $88,93 \pm 2,64\%$ ($p = 1,06 \times 10^{-4}$), 3T3 = $36,15 \pm 9,9\%$ ($p = 1,36 \times 10^{-7}$), SH-SY5Y = $51,91 \pm 1,19\%$ ($p = 2,12 \times 10^{-6}$)), y a 144h es cuando la viabilidad descendió considerablemente (HeLa = $88,11 \pm 2,24\%$ ($p = 7,43 \times 10^{-5}$), 3T3 = $23,76 \pm 8,99\%$ ($p = 2,1 \times 10^{-3}$), SH-SY5Y = $48,61 \pm 2\%$ ($p = 9,09 \times 10^{-7}$)).

4.5.2. Expresión de EGFP en varias líneas celulares utilizando el PDL como vector

Con el objetivo de analizar la eficiencia de la transfección del complejo EGFP/PDL a distintas proporciones (1:2) y (1:4) y diferentes tiempos de administración (48h, 96h y 144h) se utilizó la microscopia de fluorescencia para contar el número de células que expresaban la proteína verde fluorescente en las líneas celulares SH-SY5Y, HeLa y 3T3. La eficiencia de la transfección para cada condición y tiempo se determinó comparando dichas condiciones con los controles positivos de EGFP tratados con Lipofectamina (1:1). En líneas generales, en la línea SH-SY5Y (Figura 38 A), la transfección con Lipofectamina a 48h fue muy pobre ($1,13 \pm 0,37\%$), en cambio al usar el PDL como vector en la proporción 1:2 a 48h ya se observó un incremento de la transfección en comparación al control al mismo tiempo ($1,24 \pm 0,56\%$) aunque no se apreciaron diferencias significativas entre ambas condiciones. En cambio, a 96h de tratamiento con la proporción 1:2 sí que se apreció ya un incremento considerable de la transfección $7,73 \pm 0,8\%$ ($p = 6,45 \times 10^{-7}$) con respecto al control a igual periodo de tiempo $1,10 \pm 0,28\%$. A las 144h el

porcentaje de transfección fue del $7,37 \pm 1,87\%$ ($p = 9,26 \times 10^{-4}$) cuando se comparó con la Lipofectamina $1,19 \pm 0,41\%$. Cuando se elevó la proporción de PDL hasta 1:4, se observó un incremento de la expresión en todos los tiempos de tratamiento al compararlo con el control positivo. A 48h, 96h y 144h los porcentajes de transfección fueron del $9,49 \pm 0,97\%$ ($p = 3,8 \times 10^{-8}$), $9,75 \pm 1,02\%$ ($p = 8,27 \times 10^{-7}$) y $18,06 \pm 1,7\%$ ($p = 7,8 \times 10^{-8}$) respectivamente con respecto al control.

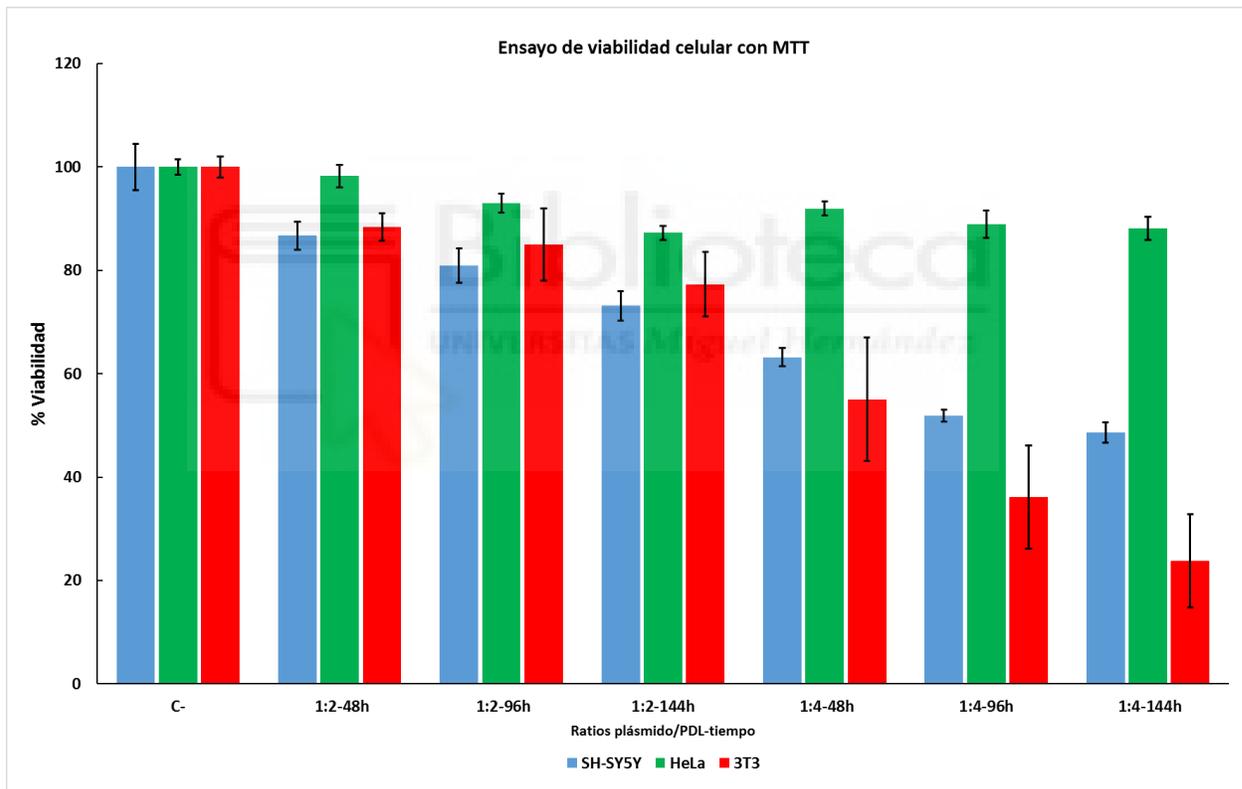


Figura 37. Porcentajes de transfección obtenido en cada línea celular mediante la técnica de conteo manual. Los resultados se muestran como células que expresan EGFP/células totales, con al menos 500 núcleos por campo de conteo. Los datos están representados como la media \pm desviación estándar de tres experimentos distintos

En la transfección sobre cultivos de células HeLa (Figura 38 B), el resultado que se obtuvo en las mismas condiciones utilizadas con la línea Sh-SY5Y, varió por completo, de hecho, el control positivo tratado con Lipofectamina presentó las tasas más altas de expresión de EGFP. Tras 48h se observó transfección en el $4,69 \pm 1,3\%$ de las células tratadas mientras que las células tratadas con los complejos EGFP/PDL fue de $0,83 \pm 0,21\%$ ($p = 4,0 \times 10^{-2}$) con la proporción 1:2, con la proporción 1:4 = $0,86 \pm 0,32\%$ ($p = 2,1 \times 10^{-2}$), a 96h con Lipofectamina = $5,78 \pm 1,24\%$, con PDL a proporción 1:2 = $1,29 \pm 0,26\%$ ($p = 2,5 \times 10^{-2}$), con la proporción 1:4 = $1,16 \pm 0,21\%$ ($p = 2,2 \times 10^{-2}$), y a 144h con Lipofectamina = $9,05 \pm 1,78\%$, con PDL a proporción 1:2 = $1,76 \pm 0,16\%$ ($p = 9,6 \times 10^{-3}$) y proporción 1:4 = $2,91 \pm 1,01\%$ ($p = 5,1 \times 10^{-3}$).

En lo que respecta a la línea 3T3 (figura 38 C), la transfección que se obtuvo tanto con los complejos EGFP/PDL como con el control con Lipofectamina fue residual (figura 39).

Con el objetivo de comparar mejor la eficiencia de transfección entre el PDL y la Lipofectamina en las líneas SH-SY5Y, HeLa y 3T3 se usó también la citometría de flujo para cuantificar la expresión de EGFP [198] (Figura 40). En la línea SH-SY5Y se apreció una mayor tasa de transfección en las dos condiciones utilizadas y a los mismos tiempos que el control positivo, con Lipofectamina 48h = $0,48 \pm 0,01\%$, a 96h = $0,5 \pm 0,01\%$, y a 144h = $0,79 \pm 0,01\%$ con PDL 1:2 a 48h = $17,11 \pm 0,74\%$ ($p = 2,5 \times 10^{-3}$) a 96h = $22,24 \pm 0,36\%$ ($p = 3,6 \times 10^{-4}$) y a 144h = $22,24 \pm 0,36\%$ ($p = 3,6 \times 10^{-4}$). Con la relación de PDL 1:4, la expresión de EGFP se

incrementó considerablemente a 48h = $31,10 \pm 2,1\%$ ($p = 1,2 \times 10^{-3}$) a 96h = $47,61 \pm 1,3\%$ ($p = 1,1 \times 10^{-3}$) y 144h = $42,37 \pm 0,54\%$ ($p = 2,2 \times 10^{-4}$). Estos resultados demuestran que en SH-SY5Y la expresión de EGFP utilizando el PDL como vector, fue superior a la observada con Lipofectamina y que existía una relación directa entre la concentración y tiempo de administración.

En la línea celular HeLa, es con la Lipofectamina con la que se obtuvieron las tasas más elevadas de transfección y se apreció claramente como también se incrementaba con el tiempo, a 48h = $18,68 \pm 0,59\%$ a 96h = $17,72 \pm 0,59\%$ y a 144h = $20,79 \pm 0,34\%$. Valores que se vieron reducidos considerablemente cuando el vector utilizado fue el PDL, con la proporción 1:2, a 48h = $1,40 \pm 0,1\%$ ($p = 2,8 \times 10^{-4}$) a 96h = $2,29 \pm 0,13\%$ ($p = 3,6 \times 10^{-4}$) y a 144h = $2,54 \pm 0,1\%$ ($p = 4,6 \times 10^{-4}$). Se obtuvieron similares resultados cuando se usó la proporción 1:4, a 48h = $1,33 \pm 0,18\%$ ($p = 6,2 \times 10^{-4}$) a 96h = $1,79 \pm 0,11\%$ ($p = 2,8 \times 10^{-4}$) y a 144h = $2,40 \pm 0,24\%$ ($p = 9,0 \times 10^{-4}$). Estos datos también demostraron que la expresión utilizando el PDL en HeLa era muy inferior cuando se comparaba con la Lipofectamina, y que al igual que en SH-SY5Y, ésta aumentaba en cada tratamiento.

En la línea 3T3 los niveles de expresión observados tanto con PDL como con Lipofectamina fueron extremadamente bajos, aunque aumentaron levemente con cada tratamiento, con Lipofectamina la expresión observada a 48h = $0,13 \pm 0,005\%$ a 96h = $1,05 \pm 0,14\%$ y a 144h = $1,63 \pm 0,11\%$). Cuando se usó PDL como vector a la proporción 1:2, a 48h = $0,084 \pm 0,011\%$ ($p = 4,3 \times 10^{-3}$) a 96h = $0,36 \pm 0,03\%$ ($p = 3,9 \times 10^{-2}$) a 144h = $0,49 \pm 0,04\%$ ($p = 5,8 \times 10^{-3}$), y cuando se usó la

proporción 1:4, a 48h $0,16 \pm 0,03\%$ (ns) a 96h = $0,67 \pm 0,14\%$ ($p = 4,6 \times 10^{-2}$) y a 144h = $0,53 \pm 0,03\%$ ($p = 6,3 \times 10^{-3}$).

Con los datos obtenidos pudimos deducir que es la línea SH-SH5Y la que presentaba mayor afinidad con el PDL muy por encima de HeLa, cuya mejor tasa de transfección se obtuvo con Lipofectamina y que la línea 3T3 se resistió a ser transfectada ya fuera con PDL o con Lipofectamina se obtuvo una expresión de EGFP muy pobre.

Líneas celulares	Tiempo	Control positivo	Relación 1:2	Relación 1:4
SH-SY5Y	48h	$1,13 \pm 0,37\%$	$1,24 \pm 0,56\%$	$9,49 \pm 0,97\%$
	96h	$1,10 \pm 0,28\%$	$7,73 \pm 0,8\%^{***}$	$9,75 \pm 1,02\%^{***}$
	144h	$1,19 \pm 0,41\%$	$7,37 \pm 1,87\%^{***}$	$18,06 \pm 1,7\%^{***}$
HeLa	48h	$4,69 \pm 1,3\%$	$0,83 \pm 0,21\%^{*}$	$0,86 \pm 0,32\%^{*}$
	96h	$5,78 \pm 1,24\%$	$1,29 \pm 0,26\%^{*}$	$1,16 \pm 0,21\%^{*}$
	144h	$9,05 \pm 1,78\%$	$1,76 \pm 0,16\%^{**}$	$2,91 \pm 1,01\%^{**}$

Tabla 6. Porcentajes de transfección a distintos tiempos y relaciones de EGFP/PDL en las líneas SH-SY5Y y HeLa mediante la técnica de recuento celular. Comparados con las células tratadas con Lipofectamina a diversos tiempos como control positivo. (* $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$)

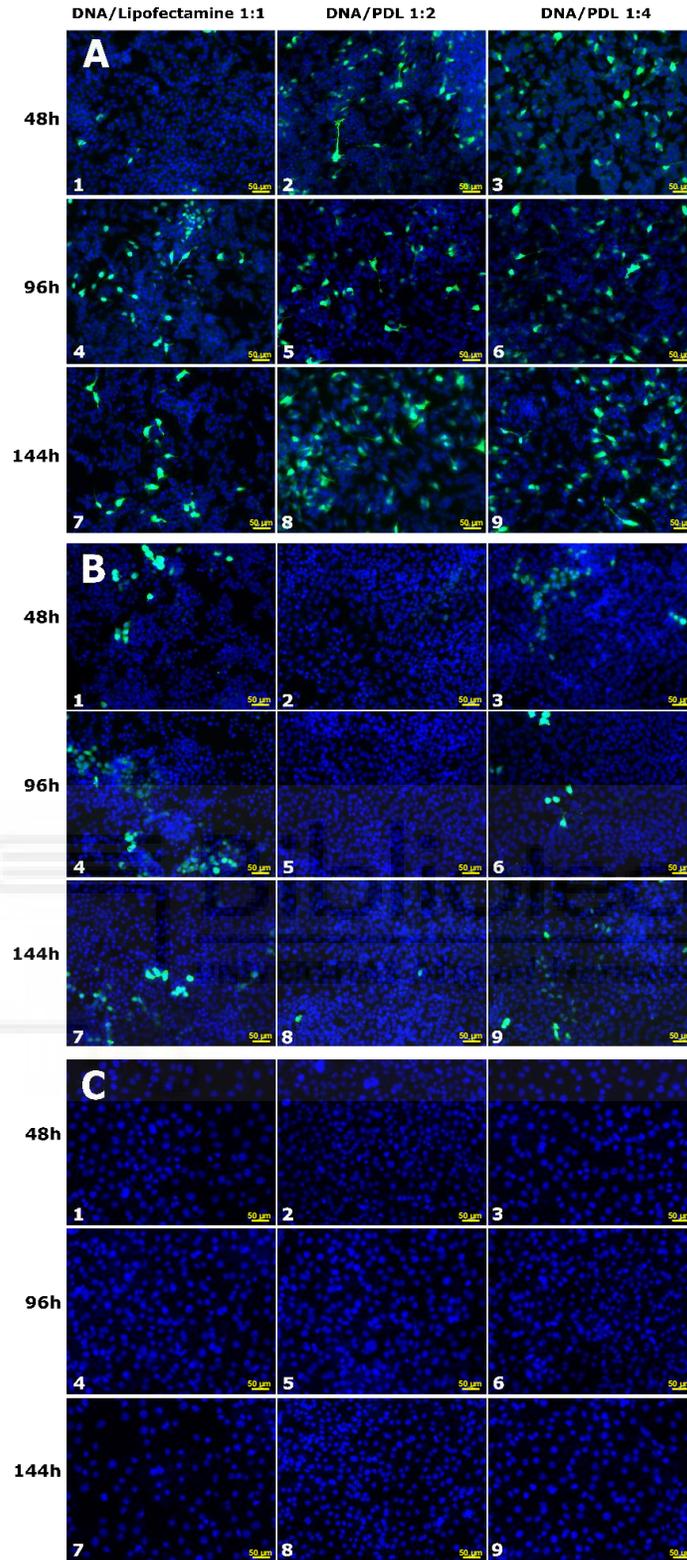


Figura 38. Expresión de EGFP en las líneas SH-SY5Y (A), HeLa (B) y 3T3 (C). La expresión de EGFP (verde) con Lipofectamina (columnas 1,4,7), con EGFP/PDL (1:2) (columnas 2,5,8) y EGFP/PDL (1:4) (columnas 3,6,9) durante 48h (filas 1,2,3), 96h (filas 4,5,6) y 144h (filas 7,8,9). Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul) Escala = 50 μ m.

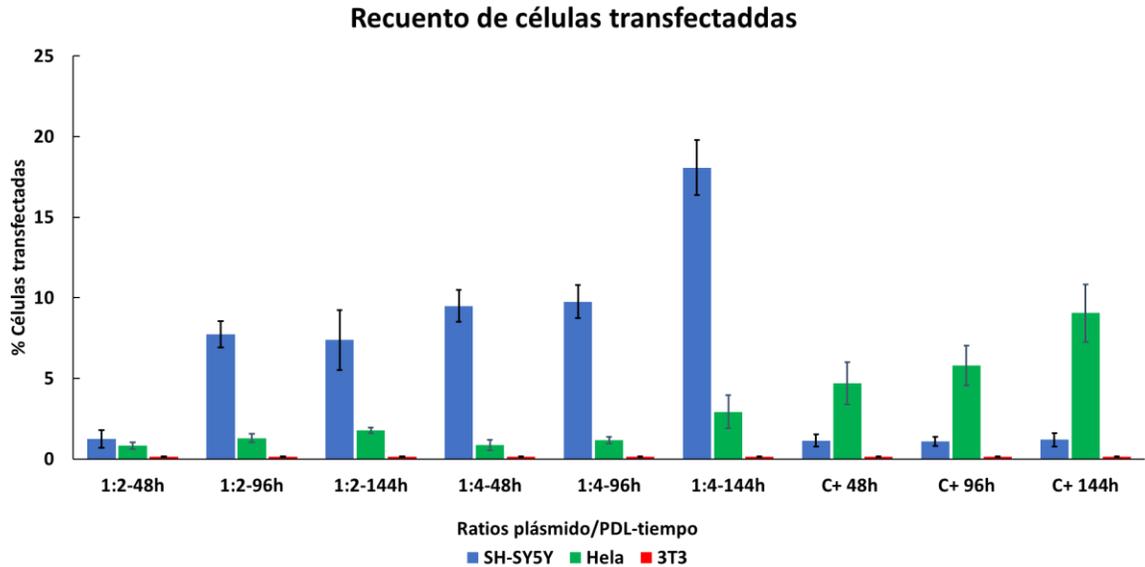


Figura 40. Porcentaje de células transfectadas en cada una de las líneas celulares utilizadas (SH-SY5Y, HeLa y 3T3) mediante contaje manual. Los resultados se muestran como células transfectadas/número total de células contadas, contando como mínimo 500 núcleos en cada imagen tomada. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar cada uno de los tres experimentos realizados

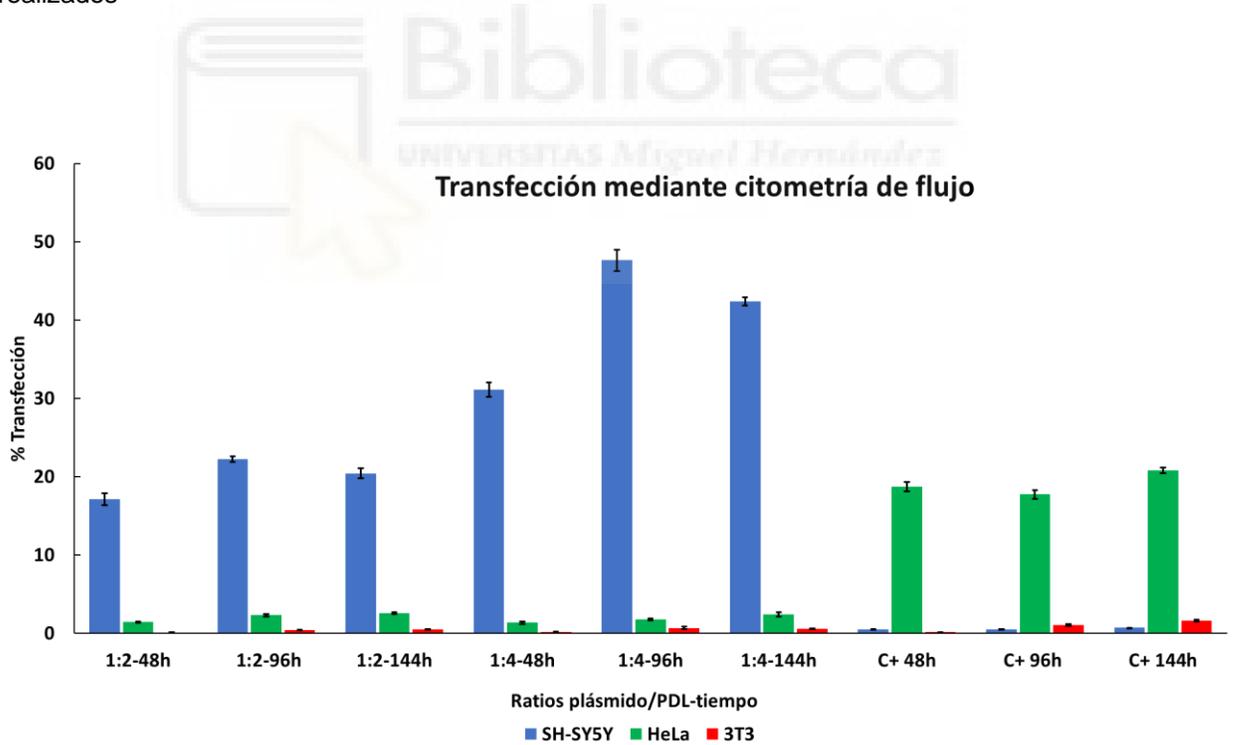


Figura 39. Comparación de la expresión de EGFP entre el PDL y la Lipofectamina determinado por citometría de flujo. Las líneas SH-SY5Y, HeLa y 3T3 se trataron tres veces con diferentes proporciones EGFP/PDL (p/p) y Lipofectamina (C+) (1:1) Los datos representan la media de tres experimentos distintos \pm la desviación estándar.

Líneas celulares	Tiempo	Control positivo	Proporción 1:2	Proporción 1:4
	48h	0,48 ± 0,01%	17,11 ± 0,74%	31,10 ± 2,1%
SH-SY5Y	96h	0,5 ± 0,01%	22,24 ± 0,36 ***	47,61 ± 1,3%***
	144h	0,79 ± 0,01%	22,24 ± 0,36***	42,37 ± 0,54% ***
HeLa	48h	18,68 ± 0,59%	1,40 ± 0,1%***	1,33 ± 0,18%***
	96h	17,72 ± 0,59%	1,79 ± 0,11%***	1,79 ± 0,11%***
	144h	20,79 ± 0,34%	2,54 ± 0,1%***	2,40 ± 0,24%***
3T3	48h	0,13 ± 0,005%	0,08 ± 0,01%***	0,16 ± 0,03%
	96h	1,05 ± 0,14%	0,36 ± 0,03%**	0,67 ± 0,14%*
	144h	1,63 ± 0,11%	0,49 ± 0,04%**	0,53 ± 0,03%**

Tabla 7. Porcentajes de transfección del total de células transfectadas con respecto al total de células presentes en cada recuento. Se realizaron contajes a distintos tiempos y proporciones de EGFP/PDL en las líneas SH-SY5Y, HeLa y 3T3 mediante la técnica de citometría de flujo. Comparados con las células tratadas con EGFP/Lipofectamina a diversos tiempos como control positivo. (*p<0,05 **p<0,005 ***p<0,001)

Capítulo 5: Discusión



5. Discusión

A pesar de existir una amplia literatura sobre el uso del PLL y de las formas levóginas de los péptidos de penetración celular como vehículo transportador de material genético al interior de las células, los resultados iniciales obtenidos en este trabajo (apartado 4.2) no parecen corroborar dichos resultados, al menos en lo que se refiere a la capacidad del PLL de transfectar células por sí solo, tal vez en sinergia con otros tipos moleculares puede llegar a completar esta función (Tabla 3). Tanto con el péptido diseñado a medida en su forma -L como con el PLL, fue imposible transfectar ninguno de los tipos celulares utilizados en este trabajo en las mismas condiciones con la que se utilizó el PDL. Tal vez formando parte de estructuras más complejas como con el PEI u otros tipos de polímeros, o bien formando parte de liposomas, los resultados puedan ser diferentes. Sin embargo, usados como vector única y exclusivamente parece que no pueden ser capaces de realizar dicha función. Por causas que se desconocen al principio de la vida, la naturaleza eligió la forma -L de los aminoácidos [199], relegando el enantiómero -D a funciones muy concretas tanto en microorganismos como en organismos superiores [200]. Tal vez este es el motivo por el que el la forma -D pasa desapercibida por la maquinaria celular con respecto a la forma -L.

Por su similitud con la membrana celular, los liposomas son un recurso bastante utilizado para el encapsulamiento de material genético y su posterior translocación al interior de las células [201]. Aunque se obtuvo alguna transfección aislada mediante esta técnica con el péptido diseñado a medida (figura 27), dichos

resultados no invitaban al optimismo, en parte por las limitaciones técnicas que se presentaban con el instrumental disponible. Es por este motivo por el que se decidió cambiar la línea de investigación y utilizar el recurso de los polímeros de lisina. Siendo la forma -D con la que se empezaron a obtener resultados en cultivos primarios de corteza embrionaria.

Hasta la fecha, todos los experimentos que se han publicado, tanto de transfección como de viabilidad, han sido a tiempos relativamente cortos, como máximo de 48 horas [202].

De acuerdo con su clasificación en función del tamaño, los péptidos están definidos como cadenas de entre 2 y 60 aminoácidos [203] [204], mientras que las proteínas están consideradas como cadenas más largas [205], aunque no existe un límite definido entre los que se considera un péptido y lo que se considera una proteína. EL PDL utilizado en nuestros experimentos está formado por polilisinas de distintos tamaños, que oscilan entre los 70 hasta los 150 aminoácidos aproximadamente, lo que nos llevaría a considerarlos como proteínas más que como CPP's. O bien crear una nueva categoría de CPP's a las que se les podría acuñar el nombre de proteínas de penetración celular (CPro).

Con este trabajo se evidencia la dificultad para transfectar distintos tipos celulares, y que en ocasiones la solución se encuentra más cerca de lo que se piensa. El PDL utilizado en los experimentos es utilizado para mejorar la adherencia entre las células y el soporte usado en los cultivos, y aunque existe una amplia literatura sobre el uso del PLL, al PDL se le ha prestado hasta ahora poca atención. Hemos

demostrado en este trabajo que el PDL tiene la capacidad de empaquetar y proteger el plásmido frente a la degradación de la nucleasas que normalmente se encuentran en sangre y tejidos [206]. De hecho, hemos conseguido transfectar células de cultivos primarios de corteza de rata, aunque es en la línea tumoral SH-SY5Y de neuroblastoma humano, donde se aprecia que el PDL posee el mayor potencial para introducir material genético en su interior, muy por encima de las líneas HeLa y 3T3. Neuroblastoma es uno de los tumores más comunes en la infancia, con una tasa de recuperación muy baja y altos niveles de mortalidad [207] [10]. Aunque se han desarrollado estrategias para el tratamiento de este tipo de tumores, los resultados obtenidos hasta ahora han sido limitados, lo que lleva a la búsqueda de terapias alternativas. La terapia génica se ha postulado como una potencial herramienta en la lucha contra esta enfermedad [208], pero la eficiencia de transfección de vectores comerciales habitualmente utilizados como la Lipofectamina y la Turbofectina es inferior al 5% [209], lo que hace necesaria la búsqueda de alternativas a este compuesto comercial en lo que se refiere a la transfección de las células pertenecientes a la línea SH-SY5Y, pudiendo ser el PDL una interesante alternativa en este campo.

Debido a que la arginina es el residuo más abundante en el péptido TAT [210], la mayoría de los estudios realizados sobre el transporte de material genético o fármacos al interior de las células con CPP's se han centrado principalmente en péptidos basados en arginina [210] [211]. En una gran parte de los trabajos desarrollados con CPP's como vectores no virales que están basados en lisinas, este

aminoácido está enlazado en su forma -L a otra molécula para favorecer su traslocación a través de la membrana. Hasta la fecha, sobre la forma -D de la lisina existe muy poca literatura, y la mayoría está centrada en su utilización para favorecer la adhesión celular en los cultivos [212], como vector apenas ha sido descrito [213]. Los resultados obtenidos en este trabajo, sin embargo, demuestran que el PDL puede actuar como vector no viral de forma prolongada y que tiene un efecto acumulativo en la transfección.

Cuando se compara el PDL con la Lipofectamina, que es uno de los vectores no virales comerciales más populares, se observa que el PDL lo mejora en hasta casi 100 veces más, superando incluso a la Turbofectina 8.0, hasta la fecha el mejor transportador de ácidos nucleicos comercial de origen no viral para la línea SH-SY5Y [209]. De esta forma, se abre la puerta para el desarrollo de diferentes CPP's basados en la forma quiral -D de los aminoácidos como vectores para terapia génica, transporte de fármacos o imagen para el diagnóstico. El PDL soluciona una de las limitaciones más importantes que presentan los virus, el tamaño máximo de la secuencia genética que pueda transportar [208], lo que convierte a este péptido catiónico en una buena alternativa a las partículas virales. La proporción EGFP/PDL en la que se observa expresión y la menor toxicidad es la 1:2. Incrementando esta proporción a 1:4, el rendimiento de la expresión de EGFP se incrementa considerablemente, pero como también se observa una reducción de la viabilidad en los cultivos, se hacen necesarios experimentos más específicos con el objetivo de analizar si a la proporción 1:4, esta reducción de la proliferación celular se debe a un

fenómeno citotóxico o citostático. También se hace necesaria la realización de más experimentos para determinar el mecanismo por el cual la membrana de las células de SH-SY5Y reconoce al PDL y dispara los mecanismos de endocitosis que permiten el paso del material genético a través de la bicapa lipídica, con el fin de favorecer dicho proceso en otras líneas celulares como HeLa y 3T3.

La nueva técnica de reemplazar todo el medio de cultivo por medio fresco y añadir una nueva mezcla de EGFP/PDL cada 48 horas parece contrarrestar en gran manera la posible toxicidad del PDL. Estos tratamientos consecutivos parecen ser bien tolerados por las células y presentan una mayor tasa de expresión de EGFP cuando se compara con la Lipofectamina en las mismas condiciones. Se decidió utilizar este procedimiento experimental con el objetivo de simular en la mayor medida de lo posible los tratamientos experimentales recurrentes a largo plazo *in vivo*, ya que en la mayoría de los ensayos realizados sobre terapia génica hasta la fecha los tiempos más habituales de tratamiento, oscilan entre 1 y 48 horas como tiempo máximo [214] [194], siendo el tiempo de 4 horas el más habitual en este tipo de experimentos [215] [216]. Nuestros resultados sugieren que cambiar el medio cada 2 días y repetir el procedimiento de transfección con el complejo EGFP/PDL nuevo puede ser adaptado para terapias recurrentes *in vivo*. En los experimentos *in vitro* realizados en líneas celulares, el tiempo máximo desde que se sembraban las células hasta su posterior análisis, no se pudo pasar de los 9 días debido a que en este plazo los cultivos presentaban una confluencia cercana al 100 % con los problemas que ello representa, principalmente por las características intrínsecas de

las líneas celulares. Para poder realizar los ensayos *in vivo* se hará necesario determinar el mejor balance de los complejos EGFP/PDL a administrar con el fin de obtener los mejores resultados de transfección manteniendo la toxicidad en los niveles más bajos posible. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos demuestran que tratamientos repetidos con PDL incrementan los niveles de expresión de EGFP y que ésta es también dependiente de la dosis. El análisis de los datos en los que se refiere la afinidad de la línea celular SH-SY5Y por el PDL, abre otra posible línea de investigación en la que usar dicha preferencia sobre los oligo-D-lisinas para utilizarlas como fármaco quimiotóxico.

El PDL presenta las características más importantes que debe tener un candidato a vector no viral. En la búsqueda de transportadores de material genético como alternativa a los virus, las propiedades más importantes que debe presentar cualquier candidato son una elevada capacidad de transfección, persistencia en la expresión del gen terapéutico, baja toxicidad y una producción lo más económica posible [77].

En este trabajo, se transfectaron células con fragmentos de distintos tamaños de PDL (70-150 residuos de lisina). Queda por despejar la duda de si alguno de estos fragmentos es el responsable de la transfección o, por el contrario, si es la sinergia producida por los diversos tamaños lo que favorece este fenómeno, así como estudiar el efecto del tamaño del plásmido en la capacidad de transfección para tener una visión completa del PDL como vector no viral.

Analizando la capacidad del PDL de transportar pDNA con relativa facilidad a través de la membrana de las células de SH-SY5Y, también sería interesante estudiar la capacidad de realizar el mismo trabajo, pero cambiando el ADN por ARN, lo que abriría un nuevo abanico de posibilidades para utilizar ARNi contra los genes relacionados con dicha enfermedad citados en el apartado 1.1.7.3.3 como posible diana terapéutica.

Nuestros resultados sugieren que el PDL se presenta como una herramienta útil en el campo de la terapia génica y farmacológica y que puede abrir un nuevo abanico de posibilidades para el tratamiento de tumores del SNC y otras patologías.



Conclusiones

1. Los péptidos catiónicos en su forma levógira no tienen la capacidad por sí solos de atravesar la membrana plasmática de células de cultivos de corteza embrionaria.
2. El PDL tiene la capacidad de empaquetar el ADN y protegerlo de la acción de las nucleasas.
3. El PDL tiene la capacidad de transportar un plásmido a través de la membrana plasmática por sí solo, y que dicho plásmido sea transportado hasta el interior de núcleo celular. Las proporciones 1:0,5 y 1:1 se descartan por su incapacidad de transfectar células, y las proporciones 1:8 y 1:16 también se han descartado para futuros experimentos por su elevada toxicidad. Por ello, las proporciones que parecen tener la mejor relación capacidad de transfección/toxicidad son la 1:2 y la 1:4.
4. El PDL no solo posee la capacidad de transfectar entre otras, células del sistema nervioso, sino que la utilización de tratamientos recurrentes permite incrementar el porcentaje de transfección sin que la viabilidad de las células tratadas se vea comprometida.
5. La membrana plasmática de la línea SH-SY5Y tiene más afinidad por el PDL que la línea HeLa y que la línea celular 3T3, la cual es prácticamente insensible al efecto del PDL.

6. El PDL presenta toxicidad a altas concentraciones, lo que en principio se puede presentar como un inconveniente, se podría convertir en una ventaja en tratamientos para provocar la muerte celular células tumorales.



Perspectivas futuras.

A raíz de los resultados obtenidos y viendo la capacidad del PDL para empaquetar ADN e introducirlo hasta el interior de las células en la línea SH-SY5Y, el siguiente paso natural sería iniciar los ensayos “*in vivo*” en roedores para validar los resultados obtenidos “*in vitro*”, así como intentar optimizar aún más el rendimiento del PDL, bien funcionalizando algún tipo de nanopartícula con cadenas de PDL, o bien buscando compuestos que realizaran una acción sinérgica con el PDL como pudiera ser la cloroquina.

También se abre la puerta a los ensayos con PDL en otros tipos celulares como la línea C6 nombrada anteriormente y responsable del glioblastoma multiforme, ya sea para actuar directamente sobre alguno de los genes implicados en dicha patología o bien para potenciar el profármaco CPT 5-ALA

Bibliografía

1. Cáncer Available online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed on 19 June 2023).
2. Reddy, S.; Tatiparti, K.; Sau, S.; Iyer, A.K. Recent Advances in Nano Delivery Systems for Blood-Brain Barrier (BBB) Penetration and Targeting of Brain Tumors. *Drug Discov. Today* **2021**, doi:10.1016/j.drudis.2021.04.008.
3. @healthline Brain Tumor: Types, Risk Factors, and Symptoms 2021.
4. Lauko, A.; Rauf, Y.; Ahluwalia, M.S. Medical Management of Brain Metastases. *Neuro-Oncol. Adv.* **2020**, *2*, vdaa015, doi:10.1093/noonjnl/vdaa015.
5. Guo, X.; Wang, G. Advances in Research on Immune Escape Mechanism of Glioma. *CNS Neurosci. Ther. n/a*, doi:10.1111/cns.14217.
6. Alexopoulos, G.; Zhang, J.; Karampelas, I.; Patel, M.; Kemp, J.; Coppens, J.; Mattei, T.A.; Mercier, P. Long-Term Time Series Forecasting and Updates on Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme: A 1975–2018 Population-Based Study. *Neuroepidemiology* **2022**, *56*, 75–89, doi:10.1159/000522611.
7. Wang, F.; Huang, Q.; Su, H.; Sun, M.; Wang, Z.; Chen, Z.; Zheng, M.; Chakroun, R.W.; Monroe, M.K.; Chen, D.; et al. Self-Assembling Paclitaxel-Mediated Stimulation of Tumor-Associated Macrophages for Postoperative Treatment of Glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2023**, *120*, e2204621120, doi:10.1073/pnas.2204621120.
8. Checa-Chavarria, E.; Rivero-Buceta, E.; Sanchez Martos, M.A.; Martinez Navarrete, G.; Soto-Sánchez, C.; Botella, P.; Fernández, E. Development of a Prodrug of Camptothecin for Enhanced Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Mol. Pharm.* **2021**, *18*, 1558–1572, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c00968.
9. Colon, N.C.; Department of Pediatric Surgery, U., Vanderbilt University Medical Center, 2200 Children's Way, Suite 7100, Nashville, TN 37232; Chung, D.H.; dai.chung@vanderbilt.edu; Department of Pediatric Surgery, U., Vanderbilt University Medical Center, 2200 Children's Way, Suite 7100, Nashville, TN 37232; Department of Cancer Biology, U., Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37232 Neuroblastoma. *Adv. Pediatr.* **2011**, *58*, 297–311.
10. Ara, T.; DeClerck, Y.A. Mechanisms of Invasion and Metastasis in Human Neuroblastoma. *Cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 645–657, doi:10.1007/s10555-006-9028-9.
11. BH, K. Neuroblastoma: A Disease Requiring a Multitude of Imaging Studies. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2004**, *45*.
12. Kumar, M.D.; Dravid, A.; Kumar, A.; Sen, D. Gene Therapy as a Potential Tool for Treating Neuroblastoma—a Focused Review. *Cancer Gene Ther.* **2016**, *23*, 115–124, doi:10.1038/cgt.2016.16.
13. American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin Available online: <https://www.cancer.org> (accessed on 9 June 2021).
14. Monclair, T.; Brodeur, G.M.; Ambros, P.F.; Brisse, H.J.; Cecchetto, G.; Holmes, K.; Kaneko, M.; London, W.B.; Matthay, K.K.; Nuchtern, J.G.; et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 298–303, doi:10.1200/JCO.2008.16.6876.
15. Green, D.M.; Kun, L.E.; Matthay, K.K.; Meadows, A.T.; Meyer, W.H.; Meyers, P.A.; Spunt, S.L.; Robison, L.L.; Hudson, M.M. Relevance of Historical Therapeutic Approaches to the Contemporary Treatment of Pediatric Solid Tumors. *Pediatr. Blood Cancer* **2013**, *60*, 1083–1094, doi:10.1002/pcb.24487.

16. Collaboration, G.B. of D.C.; Fitzmaurice, C.; Division of Hematology, S., Department of Medicine, University of Washington; Metrics, I. for H.; Evaluation, S., University of Washington; Allen, C.; Metrics, I. for H.; Evaluation, S., University of Washington; Barber, R.M.; Metrics, I. for H.; et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2021, 3, 524–548.
17. Ganeshan, V.R.; Schor, N.F. Pharmacologic Management of High-Risk Neuroblastoma in Children. *Paediatr. Drugs* **2011**, 13, 245–255, doi:10.2165/11591630-000000000-00000.
18. Radioterapia para el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer Available online: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia> (accessed on 9 June 2021).
19. Jazmati, D.; Butzer, S.; Hero, B.; Ahmad Khalil, D.; Merta, J.; Bäumer, C.; Plum, G.; Fuchs, J.; Koerber, F.; Steinmeier, T.; et al. Proton Beam Therapy for Children With Neuroblastoma: Experiences From the Prospective KiProReg Registry. *Front. Oncol.* **2020**, 10, 617506, doi:10.3389/fonc.2020.617506.
20. Matthay, K.K.; Villablanca, J.G.; Seeger, R.C.; Stram, D.O.; Harris, R.E.; Ramsay, N.K.; Swift, P.; Shimada, H.; Black, C.T.; Brodeur, G.M.; et al. Treatment of High-Risk Neuroblastoma with Intensive Chemotherapy, Radiotherapy, Autologous Bone Marrow Transplantation, and 13-Cis-Retinoic Acid. Children’s Cancer Group. *N. Engl. J. Med.* **1999**, 341, 1165–1173, doi:10.1056/NEJM199910143411601.
21. Navid, F.; Armstrong, M.; Barfield, R.C. Immune Therapies for Neuroblastoma. *Cancer Biol. Ther.* **2009**, 8, 874–882, doi:10.4161/cbt.8.10.8358.
22. Siapati, K.E.; Barker, S.; Kinnon, C.; Michalski, A.; Anderson, R.; Brickell, P.; Thrasher, A.J.; Hart, S.L. Improved Antitumour Immunity in Murine Neuroblastoma Using a Combination of IL-2 and IL-12. *Br. J. Cancer* **2003**, 88, 1641–1648, doi:10.1038/sj.bjc.6600928.
23. Iinuma, H.; Okinaga, K.; Fukushima, R.; Inaba, T.; Iwasaki, K.; Okinaga, A.; Takahashi, I.; Kaneko, M. Superior Protective and Therapeutic Effects of IL-12 and IL-18 Gene-Transduced Dendritic Neuroblastoma Fusion Cells on Liver Metastasis of Murine Neuroblastoma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2006**, 176, 3461–3469, doi:10.4049/jimmunol.176.6.3461.
24. Motzer, R.J.; Rakhit, A.; Thompson, J.A.; Nemunaitis, J.; Murphy, B.A.; Ellerhorst, J.; Schwartz, L.H.; Berg, W.J.; Bukowski, R.M. Randomized Multicenter Phase II Trial of Subcutaneous Recombinant Human Interleukin-12 versus Interferon-Alpha 2a for Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **2001**, 21, 257–263, doi:10.1089/107999001750169934.
25. Wu, Z.L.; Schwartz, E.; Seeger, R.; Ladisch, S. Expression of GD2 Ganglioside by Untreated Primary Human Neuroblastomas. *Cancer Res.* **1986**, 46, 440–443.
26. Cheresch, D.A.; Pierschbacher, M.D.; Herzig, M.A.; Mujoo, K. Disialogangliosides GD2 and GD3 Are Involved in the Attachment of Human Melanoma and Neuroblastoma Cells to Extracellular Matrix Proteins. *J. Cell Biol.* **1986**, 102, 688–696, doi:10.1083/jcb.102.3.688.
27. Definición de trasplante alogénico de células madre - Diccionario de cáncer del NCI - Instituto Nacional del Cáncer Available online: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/trasplante-alogenico-de-celulas-madre> (accessed on 9 June 2021).
28. Morisse-Pradier, H.; Nove-Josserand, R.; Philit, F.; Senechal, A.; Berger, F.; Callet-Bauchu, E.; Traverse-Glehen, A.; Maury, J.-M.; Grima, R.; Tronc, F.; et al. [Graft-versus-host disease, a rare complication of lung transplantation]. *Rev. Pneumol. Clin.* **2016**, 72, 101–107, doi:10.1016/j.pneumo.2015.05.004.

29. Ladenstein, R.; Lasset, C.; Hartmann, O.; Klingebiel, T.; Bouffet, E.; Gadner, H.; Paolucci, P.; Burdach, S.; Chauvin, F.; Pinkerton, R. Comparison of Auto versus Allografting as Consolidation of Primary Treatments in Advanced Neuroblastoma over One Year of Age at Diagnosis: Report from the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **1994**, *14*, 37–46.
30. Hsu, F.J.; Benike, C.; Fagnoni, F.; Liles, T.M.; Czerwinski, D.; Taidi, B.; Engleman, E.G.; Levy, R. Vaccination of Patients with B-Cell Lymphoma Using Autologous Antigen-Pulsed Dendritic Cells. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 52–58, doi:10.1038/nm0196-52.
31. Shimada, H.; Ambros, I.M.; Dehner, L.P.; Hata, J.; Joshi, V.V.; Roald, B.; Stram, D.O.; Gerbing, R.B.; Lukens, J.N.; Matthay, K.K.; et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer* **1999**, *86*, 364–372.
32. Aminzadeh, S.; Vidali, S.; Sperl, W.; Kofler, B.; Feichtinger, R.G. Energy Metabolism in Neuroblastoma and Wilms Tumor. *Transl. Pediatr.* **2015**, *4*, 20–32, doi:10.3978/j.issn.2224-4336.2015.01.04.
33. Wenzel, A.; Schwab, M. The MycN/Max Protein Complex in Neuroblastoma. Short Review. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **1995**, *31A*, 516–519, doi:10.1016/0959-8049(95)00060-v.
34. Niemann, J.; Kühnel, F. Oncolytic Viruses: Adenoviruses. *Virus Genes* **2017**, *53*, 700–706, doi:10.1007/s11262-017-1488-1.
35. Steffens, S.; Sandquist, A.; Frank, S.; Fischer, U.; Lex, C.; Rainov, N.G.; Kramm, C.M. A Neuroblastoma-Selective Suicide Gene Therapy Approach Using the Tyrosine Hydroxylase Promoter. *Pediatr. Res.* **2004**, *56*, 268–277, doi:10.1203/01.PDR.0000132666.23103.EF.
36. Cho, H.S.; Song, J.Y.; Park, C.Y.; Lyu, C.J.; Kim, B.S.; Kim, K.Y. Retroviral-Mediated IL-2 Gene Transfer into Murine Neuroblastoma. *Yonsei Med. J.* **2000**, *41*, 76–81, doi:10.3349/yjmj.2000.41.1.76.
37. García-Castro, J.; Alemany, R.; Cascalló, M.; Martínez-Quintanilla, J.; Arriero, M. del M.; Las-saletta, A.; Madero, L.; Ramírez, M. Treatment of Metastatic Neuroblastoma with Systemic Oncolytic Virotherapy Delivered by Autologous Mesenchymal Stem Cells: An Exploratory Study. *Cancer Gene Ther.* **2010**, *17*, 476–483, doi:10.1038/cgt.2010.4.
38. McLennan, J.L.; Darby, G. Herpes Simplex Virus Latency: The Cellular Location of Virus in Dorsal Root Ganglia and the Fate of the Infected Cell Following Virus Activation. *J. Gen. Virol.* **1980**, *51*, 233–243, doi:10.1099/0022-1317-51-2-233.
39. Parker, J.N.; Gillespie, G.Y.; Love, C.E.; Randall, S.; Whitley, R.J.; Markert, J.M. Engineered Herpes Simplex Virus Expressing IL-12 in the Treatment of Experimental Murine Brain Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 2208–2213, doi:10.1073/pnas.040557897.
40. Streck, C.J.; Zhou, J.; Ng, C.Y.; Zhang, Y.; Nathwani, A.C.; Davidoff, A.M. Longterm Recombinant Adeno-Associated, Virus-Mediated, Liver-Generated Expression of an Angiogenesis Inhibitor Improves Survival in Mice with Disseminated Neuroblastoma. *J. Am. Coll. Surg.* **2004**, *199*, 78–86, doi:10.1016/j.jamcollsurg.2004.02.011.
41. Streck, C.J.; Dickson, P.V.; Ng, C.Y.C.; Zhou, J.; Gray, J.T.; Nathwani, A.C.; Davidoff, A.M. Adeno-Associated Virus Vector-Mediated Systemic Delivery of IFN-Beta Combined with Low-Dose Cyclophosphamide Affects Tumor Regression in Murine Neuroblastoma Models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2005**, *11*, 6020–6029, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0502.
42. Solly, S.K.; Trajcevski, S.; Frisén, C.; Holzer, G.W.; Nelson, E.; Clerc, B.; Abordo-Adesida, E.; Castro, M.; Lowenstein, P.; Klatzmann, D. Replicative Retroviral Vectors for Cancer Gene Therapy. *Cancer Gene Ther.* **2003**, *10*, 30–39, doi:10.1038/sj.cgt.7700521.
43. Wold, W.S.M.; Toth, K. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* **2013**, *13*, 421–433, doi:10.2174/1566523213666131125095046.

44. Koneru, T.; McCord, E.; Pawar, S.; Tatiparti, K.; Sau, S.; Iyer, A.K. Transferrin: Biology and Use in Receptor-Targeted Nanotherapy of Gliomas. *ACS Omega* **2021**, *6*, 8727–8733, doi:10.1021/acsomega.0c05848.
45. Becker, J.; Pavlakovic, H.; Ludewig, F.; Wilting, F.; Weich, H.A.; Albuquerque, R.; Ambati, J.; Wilting, J. Neuroblastoma Progression Correlates with Downregulation of the Lymphangiogenesis Inhibitor SVEGFR-2. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2010**, *16*, 1431–1441, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1936.
46. Lu, W.; Sun, Q.; Wan, J.; She, Z.; Jiang, X.-G. Cationic Albumin-Conjugated Pegylated Nanoparticles Allow Gene Delivery into Brain Tumors via Intravenous Administration. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11878–11887, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2354.
47. Schwarze, S.R.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S.F. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science* **1999**, *285*, 1569–1572, doi:10.1126/science.285.5433.1569.
48. Yang, L.; Rongqin, H.; Chen, J. Non-Viral Gene Delivery and Therapeutics Targeting to Brain. *Curr. Nanosci.* **2011**, *7*, 55–70.
49. Jiao, X.; Yu, Y.; Meng, J.; He, M.; Zhang, C.J.; Geng, W.; Ding, B.; Wang, Z.; Ding, X. Dual-Targeting and Microenvironment-Responsive Micelles as a Gene Delivery System to Improve the Sensitivity of Glioma to Radiotherapy. *Acta Pharm. Sin. B* **2019**, *9*, 381–396, doi:10.1016/j.apsb.2018.12.001.
50. Kim, J.; Mondal, S.K.; Tzeng, S.Y.; Rui, Y.; Al-Kharboosh, R.; Kozielski, K.K.; Bhargav, A.G.; Garcia, C.A.; Quiñones-Hinojosa, A.; Green, J.J. Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Beta-Amino Ester)-Based Nanoparticles for Suicide Gene Therapy Enhance Brain Penetration and Extend Survival in a Preclinical Human Glioblastoma Orthotopic Xenograft Model. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 2943–2955, doi:10.1021/acsbiomaterials.0c00116.
51. Marrano, P.; Irwin, M.S.; Thorner, P.S. Heterogeneity of MYCN Amplification in Neuroblastoma at Diagnosis, Treatment, Relapse, and Metastasis. *Genes. Chromosomes Cancer* **2017**, *56*, 28–41, doi:10.1002/gcc.22398.
52. Schwab, M. Amplification of N-Myc as a Prognostic Marker for Patients with Neuroblastoma. *Semin. Cancer Biol.* **1993**, *4*, 13–18.
53. Meyer, N.; Penn, L.Z. Reflecting on 25 Years with MYC. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 976–990, doi:10.1038/nrc2231.
54. Mechanism of Antagomir-17-5p Action in the Treatment of MYCN-Amplified Neuroblastoma. Available online: /articles/figure/_Mechanism_of_antagomir_17_5p_action_in_the_treatment_of_MYCN_amplified_neuroblastoma_/602335/1 (accessed on 10 June 2021).
55. Doronin, I.I.; Vishnyakova, P.A.; Kholodenko, I.V.; Ponomarev, E.D.; Ryazantsev, D.Y.; Molotkovskaya, I.M.; Kholodenko, R.V. Ganglioside GD2 in Reception and Transduction of Cell Death Signal in Tumor Cells. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 295, doi:10.1186/1471-2407-14-295.
56. ZL, W.; E, S.; R, S.; S, L. Expression of GD2 Ganglioside by Untreated Primary Human Neuroblastomas. *Cancer Res.* **1986**, *46*.
57. Sorokin, M.; Kholodenko, I.; Kalinovskiy, D.; Shamanskaya, T.; Doronin, I.; Konovalov, D.; Mironov, A.; Kuzmin, D.; Nikitin, D.; Deyev, S.; et al. RNA Sequencing-Based Identification of Ganglioside GD2-Positive Cancer Phenotype. *Biomedicines* **2020**, *8*, doi:10.3390/biomedicines8060142.
58. Johnstone, R.W. Histone-Deacetylase Inhibitors: Novel Drugs for the Treatment of Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 287–299, doi:10.1038/nrd772.
59. Ramaiah, M.J.; Tangutur, A.D.; Manyam, R.R. Epigenetic Modulation and Understanding of HDAC Inhibitors in Cancer Therapy. *Life Sci.* **2021**, *277*, 119504, doi:10.1016/j.lfs.2021.119504.

60. Shen, M.; Gong, F.; Pang, P.; Zhu, K.; Meng, X.; Wu, C.; Wang, J.; Shan, H.; Shuai, X. An MRI-Visible Non-Viral Vector for Targeted Bcl-2 siRNA Delivery to Neuroblastoma. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 3319–3332, doi:10.2147/IJN.S32900.
61. Thomas, S.; Quinn, B.A.; Das, S.K.; Dash, R.; Emdad, L.; Dasgupta, S.; Wang, X.-Y.; Dent, P.; Reed, J.C.; Pellicchia, M.; et al. Targeting the Bcl-2 Family for Cancer Therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2013**, *17*, 61–75, doi:10.1517/14728222.2013.733001.
62. Lin, J.J.; Jiang, H.; Fisher, P.B. Melanoma Differentiation Associated Gene-9, Mda-9, Is a Human Gamma Interferon Responsive Gene. *Gene* **1998**, *207*, 105–110, doi:10.1016/s0378-1119(97)00562-3.
63. Bhoopathi, P.; Pradhan, A.K.; Bacolod, M.D.; Emdad, L.; Sarkar, D.; Das, S.K.; Fisher, P.B. Regulation of Neuroblastoma Migration, Invasion, and in Vivo Metastasis by Genetic and Pharmacological Manipulation of MDA-9/Syntenin. *Oncogene* **2019**, *38*, 6781–6793, doi:10.1038/s41388-019-0920-5.
64. Schulte, J.H.; Eggert, A. ALK Inhibitors in Neuroblastoma: A Sprint from Bench to Bedside. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2021**, doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-0627.
65. Currie, E.; Schulze, A.; Zechner, R.; Walther, T.C.; Farese, R.V. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 153–161, doi:10.1016/j.cmet.2013.05.017.
66. Chambers, A.F.; Groom, A.C.; MacDonald, I.C. Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 563–572, doi:10.1038/nrc865.
67. Smedt, S.C.D.; Demeester, J.; Hennink, W.E. Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems. *Pharm. Res.* **2021**, *17*, 113–126.
68. Chen, J.; Tian, B.; Yin, X.; Zhang, Y.; Hu, D.; Hu, Z.; Liu, M.; Pan, Y.; Zhao, J.; Li, H.; et al. Preparation, Characterization and Transfection Efficiency of Cationic PEGylated PLA Nanoparticles as Gene Delivery Systems. *J. Biotechnol.* **2007**, *130*, 107–113, doi:10.1016/j.jbiotec.2007.02.007.
69. Pack, D.W.; Hoffman, A.S.; Pun, S.; Stayton, P.S. Design and Development of Polymers for Gene Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 581–593, doi:10.1038/nrd1775.
70. He, J.; Xu, S.; Leng, Q.; Mixson, A.J. Location of a Single Histidine within Peptide Carriers Increases mRNA Delivery. *J. Gene Med.* **2021**, *23*, e3295, doi:10.1002/jgm.3295.
71. Pandey, A.P.; Sawant, K.K. Polyethylenimine: A Versatile, Multifunctional Non-Viral Vector for Nucleic Acid Delivery. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2016**, *68*, 904–918, doi:10.1016/j.msec.2016.07.066.
72. Gould, S.B. Membranes and Evolution. *Curr. Biol. CB* **2018**, *28*, R381–R385, doi:10.1016/j.cub.2018.01.086.
73. Venter, J.C.; Adams, M.D.; Myers, E.W.; Li, P.W.; Mural, R.J.; Sutton, G.G.; Smith, H.O.; Yandell, M.; Evans, C.A.; Holt, R.A.; et al. The Sequence of the Human Genome. *Science* **2001**, *291*, 1304–1351, doi:10.1126/science.1058040.
74. Rogers, S. Gene Therapy: A Potentially Invaluable Aid to Medicine and Mankind. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1971**, *2*, 587–600.
75. Dulbecco, R. Oncogenic Viruses: The Last Twelve Years. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1975**, *39 Pt 1*, 1–7.
76. Naso, M.F.; Tomkowicz, B.; Perry, W.L.; Strohl, W.R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* **2017**, *31*, 317–334, doi:10.1007/s40259-017-0234-5.
77. Lentz, T.B.; Gray, S.J.; Samulski, R.J. Viral Vectors for Gene Delivery to the Central Nervous System. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *48*, 179–188, doi:10.1016/j.nbd.2011.09.014.

78. Quantin, B.; Perricaudet, L.D.; Tajbakhsh, S.; Mandel, J.L. Adenovirus as an Expression Vector in Muscle Cells in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 2581–2584, doi:10.1073/pnas.89.7.2581.
79. Reddy, V.S.; Natchiar, S.K.; Stewart, P.L.; Nemerow, G.R. Crystal Structure of Human Adenovirus at 3.5 Å Resolution. *Science* **2010**, *329*, 1071–1075, doi:10.1126/science.1187292.
80. Davison, A.J.; Benkő, M.; Harrach, B. Genetic Content and Evolution of Adenoviruses. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2895–2908, doi:10.1099/vir.0.19497-0.
81. Bergelson, J.M.; Cunningham, J.A.; Droguett, G.; Kurt-Jones, E.A.; Krithivas, A.; Hong, J.S.; Horwitz, M.S.; Crowell, R.L.; Finberg, R.W. Isolation of a Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science* **1997**, *275*, 1320–1323, doi:10.1126/science.275.5304.1320.
82. Hillgenberg, M.; Tönnies, H.; Strauss, M. Chromosomal Integration Pattern of a Helper-Dependent Minimal Adenovirus Vector with a Selectable Marker Inserted into a 27.4-Kilobase Genomic Stuffer. *J. Virol.* **2001**, *75*, 9896–9908, doi:10.1128/JVI.75.20.9896-9908.2001.
83. Morral, N.; O’Neal, W.; Rice, K.; Leland, M.; Kaplan, J.; Piedra, P.A.; Zhou, H.; Parks, R.J.; Velji, R.; Aguilar-Córdova, E.; et al. Administration of Helper-Dependent Adenoviral Vectors and Sequential Delivery of Different Vector Serotype for Long-Term Liver-Directed Gene Transfer in Baboons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 12816–12821, doi:10.1073/pnas.96.22.12816.
84. Tsai, S.Y.; Schillinger, K.; Ye, X. Adenovirus-Mediated Transfer of Regulable Gene Expression. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2000**, *2*, 515–523.
85. Lyons, M.; Onion, D.; Green, N.K.; Aslan, K.; Rajaratnam, R.; Bazan-Peregrino, M.; Phipps, S.; Hale, S.; Mautner, V.; Seymour, L.W.; et al. Adenovirus Type 5 Interactions with Human Blood Cells May Compromise Systemic Delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2006**, *14*, 118–128, doi:10.1016/j.ymthe.2006.01.003.
86. Roy, S.; Clawson, D.S.; Lavrukhin, O.; Sandhu, A.; Miller, J.; Wilson, J.M. Rescue of Chimeric Adenoviral Vectors to Expand the Serotype Repertoire. *J. Virol. Methods* **2007**, *141*, 14–21, doi:10.1016/j.jviromet.2006.11.022.
87. Zhao, J.; Zhao, S.; Ou, J.; Zhang, J.; Lan, W.; Guan, W.; Wu, X.; Yan, Y.; Zhao, W.; Wu, J.; et al. COVID-19: Coronavirus Vaccine Development Updates. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 602256, doi:10.3389/fimmu.2020.602256.
88. Coffin, J.M. Genetic Diversity and Evolution of Retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1992**, *176*, 143–164, doi:10.1007/978-3-642-77011-1_10.
89. Kohn, D.B.; Weinberg, K.I.; Nolta, J.A.; Heiss, L.N.; Lenarsky, C.; Crooks, G.M.; Hanley, M.E.; Annett, G.; Brooks, J.S.; el-Khourey, A. Engraftment of Gene-Modified Umbilical Cord Blood Cells in Neonates with Adenosine Deaminase Deficiency. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1017–1023, doi:10.1038/nm1095-1017.
90. Hacein-Bey-Abina, S.; Garrigue, A.; Wang, G.P.; Soulier, J.; Lim, A.; Morillon, E.; Clappier, E.; Caccavelli, L.; Delabesse, E.; Beldjord, K.; et al. Insertional Oncogenesis in 4 Patients after Retrovirus-Mediated Gene Therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 3132–3142, doi:10.1172/JCI35700.
91. Dull, T.; Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R.J.; Nguyen, M.; Trono, D.; Naldini, L. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8463–8471, doi:10.1128/JVI.72.11.8463-8471.1998.
92. Montini, E.; Cesana, D.; Schmidt, M.; Sanvito, F.; Ponzoni, M.; Bartholomae, C.; Sergi Sergi, L.; Benedicenti, F.; Ambrosi, A.; Di Serio, C.; et al. Hematopoietic Stem Cell Gene Transfer in a Tumor-Prone Mouse Model Uncovers Low Genotoxicity of Lentiviral Vector Integration. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 687–696, doi:10.1038/nbt1216.

93. Milone, M.C.; O'Doherty, U. Clinical Use of Lentiviral Vectors. *Leukemia* **2018**, *32*, 1529–1541, doi:10.1038/s41375-018-0106-0.
94. Atchison, R.W.; Casto, B.C.; Hammon, W.M. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science* **1965**, *149*, 754–756, doi:10.1126/science.149.3685.754.
95. Duan, D.; Sharma, P.; Yang, J.; Yue, Y.; Dudus, L.; Zhang, Y.; Fisher, K.J.; Engelhardt, J.F. Circular Intermediates of Recombinant Adeno-Associated Virus Have Defined Structural Characteristics Responsible for Long-Term Episomal Persistence in Muscle Tissue. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8568–8577, doi:10.1128/JVI.72.11.8568-8577.1998.
96. McCarty, D.M.; Young, S.M.; Samulski, R.J. Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors. *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 819–845, doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143717.
97. Klein, R.L.; Muir, D.; King, M.A.; Peel, A.L.; Zolotukhin, S.; Möller, J.C.; Krüttgen, A.; Heymach, J.V.; Muzyczka, N.; Meyer, E.M. Long-Term Actions of Vector-Derived Nerve Growth Factor or Brain-Derived Neurotrophic Factor on Choline Acetyltransferase and Trk Receptor Levels in the Adult Rat Basal Forebrain. *Neuroscience* **1999**, *90*, 815–821, doi:10.1016/s0306-4522(98)00537-5.
98. Niemeyer, G.P.; Herzog, R.W.; Mount, J.; Arruda, V.R.; Tillson, D.M.; Hathcock, J.; van Ginkel, F.W.; High, K.A.; Lothrop, C.D. Long-Term Correction of Inhibitor-Prone Hemophilia B Dogs Treated with Liver-Directed AAV2-Mediated Factor IX Gene Therapy. *Blood* **2009**, *113*, 797–806, doi:10.1182/blood-2008-10-181479.
99. Wang, D.; Tai, P.W.L.; Gao, G. Adeno-Associated Virus Vector as a Platform for Gene Therapy Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 358–378, doi:10.1038/s41573-019-0012-9.
100. Krisky, D.M.; Wolfe, D.; Goins, W.F.; Marconi, P.C.; Ramakrishnan, R.; Mata, M.; Rouse, R.J.; Fink, D.J.; Glorioso, J.C. Deletion of Multiple Immediate-Early Genes from Herpes Simplex Virus Reduces Cytotoxicity and Permits Long-Term Gene Expression in Neurons. *Gene Ther.* **1998**, *5*, 1593–1603, doi:10.1038/sj.gt.3300766.
101. Volz, A.; Sutter, G. Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development. *Adv. Virus Res.* **2017**, *97*, 187–243, doi:10.1016/bs.aivir.2016.07.001.
102. Yang, H.; Wang, H.; Shivalila, C.S.; Cheng, A.W.; Shi, L.; Jaenisch, R. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* **2013**, *154*, 1370–1379, doi:10.1016/j.cell.2013.08.022.
103. Gurumurthy, C.B.; O'Brien, A.R.; Quadros, R.M.; Adams, J.; Alcaide, P.; Ayabe, S.; Ballard, J.; Batra, S.K.; Beauchamp, M.-C.; Becker, K.A.; et al. Reproducibility of CRISPR-Cas9 Methods for Generation of Conditional Mouse Alleles: A Multi-Center Evaluation. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 171, doi:10.1186/s13059-019-1776-2.
104. Herweijer, H.; Wolff, J.A. Progress and Prospects: Naked DNA Gene Transfer and Therapy. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 453–458, doi:10.1038/sj.gt.3301983.
105. Teissie, J.; Golzio, M.; Rols, M.P. Mechanisms of Cell Membrane Electroporation: A Minireview of Our Present (Lack of ?) Knowledge. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1724*, 270–280, doi:10.1016/j.bbagen.2005.05.006.
106. Mellott, A.J.; Forrest, M.L.; Detamore, M.S. Physical Non-Viral Gene Delivery Methods for Tissue Engineering. *Ann. Biomed. Eng.* **2013**, *41*, 446–468, doi:10.1007/s10439-012-0678-1.
107. Heller, L.C.; Heller, R. In Vivo Electroporation for Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* **2006**, *17*, 890–897, doi:10.1089/hum.2006.17.890.
108. Stevenson, D.J.; Gunn-Moore, F.J.; Campbell, P.; Dholakia, K. Single Cell Optical Transfection. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7*, 863–871, doi:10.1098/rsif.2009.0463.

109. Olmedo, V. Efecto Venturi.
110. Sharei, A.; Zoldan, J.; Adamo, A.; Sim, W.Y.; Cho, N.; Jackson, E.; Mao, S.; Schneider, S.; Han, M.-J.; Lytton-Jean, A.; et al. A Vector-Free Microfluidic Platform for Intracellular Delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 2082–2087, doi:10.1073/pnas.1218705110.
111. Movahed, S.; Li, D. Microfluidics Cell Electroporation. *Microfluid. Nanofluidics* 2010, *10*, 703–734.
112. Krasovitski, B.; Frenkel, V.; Shoham, S.; Kimmel, E. Intramembrane Cavitation as a Unifying Mechanism for Ultrasound-Induced Bioeffects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 3258–3263, doi:10.1073/pnas.1015771108.
113. Unger, E.C.; Hersh, E.; Vannan, M.; Matsunaga, T.O.; McCreery, T. Local Drug and Gene Delivery through Microbubbles. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2001**, *44*, 45–54, doi:10.1053/pcad.2001.26443.
114. Gantenbein, B.; Tang, S.; Guerrero, J.; Higuera-Castro, N.; Salazar-Puerta, A.I.; Croft, A.S.; Gazdhar, A.; Purmessur, D. Non-Viral Gene Delivery Methods for Bone and Joints. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 598466, doi:10.3389/fbioe.2020.598466.
115. Yin, H.; Kanasty, R.L.; Eltoukhy, A.A.; Vegas, A.J.; Dorkin, J.R.; Anderson, D.G. Non-Viral Vectors for Gene-Based Therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541–555, doi:10.1038/nrg3763.
116. Storrie, H.; Mooney, D.J. Sustained Delivery of Plasmid DNA from Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 500–514, doi:10.1016/j.addr.2006.03.004.
117. Mousazadeh, H.; Pilehvar-Soltanahmadi, Y.; Dadashpour, M.; Zarghami, N. Cyclodextrin Based Natural Nanostructured Carbohydrate Polymers as Effective Non-Viral siRNA Delivery Systems for Cancer Gene Therapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2021**, *330*, 1046–1070, doi:10.1016/j.jconrel.2020.11.011.
118. Hussain, Z.; Khan, S.; Imran, M.; Sohail, M.; Shah, S.W.A.; de Matas, M. PEGylation: A Promising Strategy to Overcome Challenges to Cancer-Targeted Nanomedicines: A Review of Challenges to Clinical Transition and Promising Resolution. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2019**, *9*, 721–734, doi:10.1007/s13346-019-00631-4.
119. Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhonde, R.R.; Sastry, M. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2005**, *21*, 10644–10654, doi:10.1021/la0513712.
120. Dai, X.; Zhao, X.; Liu, Y.; Chen, B.; Ding, X.; Zhao, N.; Xu, F.-J. Controlled Synthesis and Surface Engineering of Janus Chitosan-Gold Nanoparticles for Photoacoustic Imaging-Guided Synergistic Gene/Photothermal Therapy. *Small Wein. Bergstr. Ger.* **2021**, *17*, e2006004, doi:10.1002/smll.202006004.
121. Mehier-Humbert, S.; Guy, R.H. Physical Methods for Gene Transfer: Improving the Kinetics of Gene Delivery into Cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 733–753, doi:10.1016/j.addr.2004.12.007.
122. Cui, Y.; Li, X.; Zeljic, K.; Shan, S.; Qiu, Z.; Wang, Z. Effect of PEGylated Magnetic PLGA-PEI Nanoparticles on Primary Hippocampal Neurons: Reduced Nanoneurotoxicity and Enhanced Transfection Efficiency with Magnetofection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 38190–38204, doi:10.1021/acsami.9b15014.
123. Zuvim, M.; Kuruoglu, E.; Kaya, V.O.; Unal, O.; Kutlu, O.; Yagci Acar, H.; Gozuacik, D.; Koşar, A. Magnetofection of Green Fluorescent Protein Encoding DNA-Bearing Polyethyleneimine-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to Human Breast Cancer Cells. *ACS Omega* **2019**, *4*, 12366–12374, doi:10.1021/acsomega.9b01000.

124. Wang, X.; Zhou, L.; Ma, Y.; Li, X.; Gu, H. Control of Aggregate Size of Polyethyleneimine-Coated Magnetic Nanoparticles for Magnetofection. *Nano Res.* **2009**, *2*, 365–372, doi:10.1007/s12274-009-9035-6.
125. Graham, F.L.; van der Eb, A.J. A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. *Virology* **1973**, *52*, 456–467, doi:10.1016/0042-6822(73)90341-3.
126. Fu, H.; Hu, Y.; McNelis, T.; Hollinger, J.O. A Calcium Phosphate-Based Gene Delivery System. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *74A*, 40–48, doi:10.1002/jbm.a.30267.
127. Henderson, J. *Natural History, Volume II: Books 3-7*; ISBN 978-0-674-99388-4.
128. Lane, N. The Unseen World: Reflections on Leeuwenhoek (1677) ‘Concerning Little Animals.’ *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2015**, *370*, 20140344, doi:10.1098/rstb.2014.0344.
129. Lipid Bilayer | Learn Science at Scitable.
130. Gorter, E.; Grendel, F. ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *J. Exp. Med.* **1925**, *41*, 439–443, doi:10.1084/jem.41.4.439.
131. Bangham, A.D.; Horne, R.W. NEGATIVE STAINING OF PHOSPHOLIPIDS AND THEIR STRUCTURAL MODIFICATION BY SURFACE-ACTIVE AGENTS AS OBSERVED IN THE ELECTRON MICROSCOPE. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660–668, doi:10.1016/s0022-2836(64)80115-7.
132. Sessa, G.; Weissmann, G. Phospholipid Spherules (Liposomes) as a Model for Biological Membranes. *J. Lipid Res.* **1968**, *9*, 310–318.
133. Ladygina, G.A.; Tentsova, A.I.; Zizina, O.S. [Use of liposomes for the directed delivery of drugs to organs and tissues]. *Farmatsiia* **1978**, *27*, 52–57.
134. Huang, H.; Zhang, C.; Yang, S.; Xiao, W.; Zheng, Q.; Song, X. The Investigation of mRNA Vaccines Formulated in Liposomes Administrated in Multiple Routes against SARS-CoV-2. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2021**, *335*, 449–456, doi:10.1016/j.jconrel.2021.05.024.
135. Prasad, A.; Nair, R.; Bhatavdekar, O.; Howe, A.; Salerno, D.; Sempkowski, M.; Josefsson, A.; Pacheco-Torres, J.; Bhujwalla, Z.M.; Gabrielson, K.L.; et al. Transport-Driven Engineering of Liposomes for Delivery of α -Particle Radiotherapy to Solid Tumors: Effect on Inhibition of Tumor Progression and Onset Delay of Spontaneous Metastases. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2021**, doi:10.1007/s00259-021-05406-z.
136. Frankel, A.D.; Pabo, C.O. Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* **1988**, *55*, 1189–1193, doi:10.1016/0092-8674(88)90263-2.
137. Jeyapaul, J.; Reddy, M.R.; Khan, S.A. Activity of Synthetic Tat Peptides in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Long Terminal Repeat-Promoted Transcription in a Cell-Free System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 7030–7034, doi:10.1073/pnas.87.18.7030.
138. Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010–16017, doi:10.1074/jbc.272.25.16010.
139. Derossi, D.; Joliot, A.H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.
140. Johnson, J.R.; Kocher, B.; Barnett, E.M.; Marasa, J.; Piwnica-Worms, D. Caspase-Activated Cell-Penetrating Peptides Reveal Temporal Coupling between Endosomal Release and Apoptosis in an RGC-5 Cell Model. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1783–1793, doi:10.1021/bc300036z.
141. Delcroix, M.; Riley, L.W. Cell-Penetrating Peptides for Antiviral Drug Development. *Pharm. Basel Switz.* **2010**, *3*, 448–470, doi:10.3390/ph3030448.
142. Lindgren, M.; Hallbrink, M.; Prochiantz, A.; Langel, U. Cell-Penetrating Peptides. *Trends Pharmacol Sci* **2000**, *21*, 99–103.

143. Milletti, F. Cell-Penetrating Peptides: Classes, Origin, and Current Landscape. *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 850–860, doi:10.1016/j.drudis.2012.03.002.
144. Thimann, K.V. The Precipitation of the Basic Amino-Acids of Proteins with Phosphotungstic Acid. *Biochem. J.* **1930**, *24*, 368–378, doi:10.1042/bj0240368.
145. Tünnemann, G.; Martin, R.M.; Haupt, S.; Patsch, C.; Edenhofer, F.; Cardoso, M.C. Cargo-Dependent Mode of Uptake and Bioavailability of TAT-Containing Proteins and Peptides in Living Cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2006**, *20*, 1775–1784, doi:10.1096/fj.05-5523com.
146. Tünnemann, G.; Ter-Avetisyan, G.; Martin, R.M.; Stöckl, M.; Herrmann, A.; Cardoso, M.C. Live-Cell Analysis of Cell Penetration Ability and Toxicity of Oligo-Arginines. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **2008**, *14*, 469–476, doi:10.1002/psc.968.
147. Prochiantz, A. Getting Hydrophilic Compounds into Cells: Lessons from Homeopeptides. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, *6*, 629–634, doi:10.1016/s0959-4388(96)80095-x.
148. Mueller, J.; Kretzschmar, I.; Volkmer, R.; Boisguerin, P. Comparison of Cellular Uptake Using 22 CPPs in 4 Different Cell Lines. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2363–2374, doi:10.1021/bc800194e.
149. Yin, J.; Meng, X.; Zhang, S.; Zhang, D.; Wang, L.; Liu, C. The Effect of a Nuclear Localization Sequence on Transfection Efficacy of Genes Delivered by Cobalt(II)-Polybenzimidazole Complexes. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7884–7894, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.017.
150. Fernández-Carneado, J.; Kogan, M.J.; Pujals, S.; Giralt, E. Amphipathic Peptides and Drug Delivery. *Biopolymers* **2004**, *76*, 196–203, doi:10.1002/bip.10585.
151. Deshayes, S.; Plénat, T.; Aldrian-Herrada, G.; Divita, G.; Le Grimellec, C.; Heitz, F. Primary Amphipathic Cell-Penetrating Peptides: Structural Requirements and Interactions with Model Membranes. *Biochemistry* **2004**, *43*, 7698–7706, doi:10.1021/bi049298m.
152. Magzoub, M.; Eriksson, L.E.G.; Gräslund, A. Conformational States of the Cell-Penetrating Peptide Penetratin When Interacting with Phospholipid Vesicles: Effects of Surface Charge and Peptide Concentration. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1563*, 53–63, doi:10.1016/s0005-2736(02)00373-5.
153. Pujals, S.; Giralt, E. Proline-Rich, Amphipathic Cell-Penetrating Peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 473–484, doi:10.1016/j.addr.2007.09.012.
154. Volkenstein, M.V. Coding of Polar and Non-Polar Amino-Acids. *Nature* **1965**, *207*, 294–295, doi:10.1038/207294a0.
155. Pujals, S.; Fernández-Carneado, J.; López-Iglesias, C.; Kogan, M.J.; Giralt, E. Mechanistic Aspects of CPP-Mediated Intracellular Drug Delivery: Relevance of CPP Self-Assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 264–279, doi:10.1016/j.bbamem.2006.01.006.
156. Sahni, A.; Qian, Z.; Pei, D. Cell-Penetrating Peptides Escape the Endosome by Inducing Vesicle Budding and Collapse. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 2485–2492, doi:10.1021/acscchembio.0c00478.
157. Yamada, E. The Fine Structure of the Renal Glomerulus of the Mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1955**, *1*, 551–566, doi:10.1083/jcb.1.6.551.
158. Tagawa, A.; Mezzacasa, A.; Hayer, A.; Longatti, A.; Pelkmans, L.; Helenius, A. Assembly and Trafficking of Caveolar Domains in the Cell: Caveolae as Stable, Cargo-Triggered, Vesicular Transporters. *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 769–779, doi:10.1083/jcb.200506103.
159. Säälük, P.; Padari, K.; Niinep, A.; Lorents, A.; Hansen, M.; Jokitalo, E.; Langel, U.; Pooga, M. Protein Delivery with Transportans Is Mediated by Caveolae Rather than Flotillin-Dependent Pathways. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 877–887, doi:10.1021/bc800416f.

160. Pearse, B.M. Clathrin: A Unique Protein Associated with Intracellular Transfer of Membrane by Coated Vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1976**, *73*, 1255–1259, doi:10.1073/pnas.73.4.1255.
161. Giangreco, G.; Malabarba, M.G.; Sigismund, S. Specialised Endocytic Proteins Regulate Diverse Internalisation Mechanisms and Signalling Outputs in Physiology and Cancer. *Biol. Cell* **2021**, *113*, 165–182, doi:10.1111/boc.202000129.
162. Xiang, S.; Tong, H.; Shi, Q.; Fernandes, J.C.; Jin, T.; Dai, K.; Zhang, X. Uptake Mechanisms of Non-Viral Gene Delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2012**, *158*, 371–378, doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.093.
163. Ruseska, I.; Zimmer, A. Internalization Mechanisms of Cell-Penetrating Peptides. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2020**, *11*, 101–123, doi:10.3762/bjnano.11.10.
164. Wadia, J.S.; Stan, R.V.; Dowdy, S.F. Transducible TAT-HA Fusogenic Peptide Enhances Escape of TAT-Fusion Proteins after Lipid Raft Macropinocytosis. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 310–315, doi:10.1038/nm996.
165. Lin, X.P.; Mintern, J.D.; Gleeson, P.A. Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences. *Membranes* **2020**, *10*, doi:10.3390/membranes10080177.
166. Li, Y.-X.; Pang, H.-B. Macropinocytosis as a Cell Entry Route for Peptide-Functionalized and Bystander Nanoparticles. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2021**, *329*, 1222–1230, doi:10.1016/j.jconrel.2020.10.049.
167. Kirkham, M.; Parton, R.G. Clathrin-Independent Endocytosis: New Insights into Caveolae and Non-Caveolar Lipid Raft Carriers. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1746*, 349–363, doi:10.1016/j.bbamcr.2005.11.007.
168. Taylor, B.N.; Mehta, R.R.; Yamada, T.; Lekmine, F.; Christov, K.; Chakrabarty, A.M.; Green, A.; Bratescu, L.; Shilkaitis, A.; Beattie, C.W.; et al. Noncationic Peptides Obtained from Azurin Preferentially Enter Cancer Cells. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 537–546, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2932.
169. Shen, W.C.; Ryser, H.J. Conjugation of Poly-L-Lysine to Albumin and Horseradish Peroxidase: A Novel Method of Enhancing the Cellular Uptake of Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 1872–1876, doi:10.1073/pnas.75.4.1872.
170. Ryser, H.J.; Shen, W.C. Conjugation of Methotrexate to Poly(L-Lysine) Increases Drug Transport and Overcomes Drug Resistance in Cultured Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 3867–3870, doi:10.1073/pnas.75.8.3867.
171. Wu, G.Y.; Wu, C.H. Receptor-Mediated in Vitro Gene Transformation by a Soluble DNA Carrier System. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4429–4432.
172. Leonetti, J.P.; Degols, G.; Lebleu, B. Biological Activity of Oligonucleotide-Poly(L-Lysine) Conjugates: Mechanism of Cell Uptake. *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1*, 149–153, doi:10.1021/bc00002a010.
173. Wagner, E.; Cotten, M.; Mechtler, K.; Kirlappos, H.; Birnstiel, M.L. DNA-Binding Transferrin Conjugates as Functional Gene-Delivery Agents: Synthesis by Linkage of Polylysine or Ethidium Homodimer to the Transferrin Carbohydrate Moiety. *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 226–231, doi:10.1021/bc00010a006.
174. Mulders, P.; Pang, S.; Dannull, J.; Kaboo, R.; Hinkel, A.; Michel, K.; Tso, C.L.; Roth, M.; Bell-degrun, A. Highly Efficient and Consistent Gene Transfer into Dendritic Cells Utilizing a Combination of Ultraviolet-Irradiated Adenovirus and Poly(L-Lysine) Conjugates. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 956–961.
175. Laurent, N.; Wattiaux-De Coninck, S.; Mihaylova, E.; Leontieva, E.; Warnier-Pirotte, M.T.; Wattiaux, R.; Jadot, M. Uptake by Rat Liver and Intracellular Fate of Plasmid DNA Complexed

- with Poly-L-Lysine or Poly-D-Lysine. *FEBS Lett.* **1999**, *443*, 61–65, doi:10.1016/s0014-5793(98)01677-9.
176. Barrett, L.B.; Logan, A.; Berry, M.; Ying, W.; Gonzalez, A.M.; Baird, A.; Seymour, L.W. Targeted Transfection of Neuronal Cells Using a Poly(D-Lysine)-Cholera-Toxin b Chain Conjugate. *Biochem. Soc. Trans.* **1999**, *27*, 851–857, doi:10.1042/bst0270851.
 177. Kim, T.-G.; Kang, S.-Y.; Kang, J.-H.; Cho, M.-Y.; Kim, J.-I.; Kim, S.-H.; Kim, J.-S. Gene Transfer into Human Hepatoma Cells by Receptor-Associated Protein/Polylysine Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 326–332, doi:10.1021/bc0340262.
 178. Barrett, L.B.; Berry, M.; Ying, W.-B.; Hodgkin, M.N.; Seymour, L.W.; Gonzalez, A.-M.; Read, M.L.; Baird, A.; Logan, A. CTb Targeted Non-Viral CDNA Delivery Enhances Transgene Expression in Neurons. *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 429–438, doi:10.1002/jgm.524.
 179. Konstan, M.W.; Davis, P.B.; Wagener, J.S.; Hilliard, K.A.; Stern, R.C.; Milgram, L.J.H.; Kowalczyk, T.H.; Hyatt, S.L.; Fink, T.L.; Gedeon, C.R.; et al. Compacted DNA Nanoparticles Administered to the Nasal Mucosa of Cystic Fibrosis Subjects Are Safe and Demonstrate Partial to Complete Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Reconstitution. *Hum. Gene Ther.* **2004**, *15*, 1255–1269, doi:10.1089/hum.2004.15.1255.
 180. Lee, S.-A.; Kim, B.-R.; Kim, B.-K.; Kim, D.-W.; Shon, W.-J.; Lee, N.-R.; Inn, K.-S.; Kim, B.-J. Heat Shock Protein-Mediated Cell Penetration and Cytosolic Delivery of Macromolecules by a Telomerase-Derived Peptide Vaccine. *Biomaterials* **2013**, *34*, 7495–7505, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.015.
 181. Hall, A.; Wu, L.-P.; Parhamifar, L.; Moghimi, S.M. Differential Modulation of Cellular Bioenergetics by Poly(L-Lysine)s of Different Molecular Weights. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 2119–2126, doi:10.1021/acs.biomac.5b00533.
 182. Hall, A.; Moghimi, S.M. Determination of Polycation-Mediated Perturbation of Mitochondrial Respiration in Intact Cells by High-Resolution Respirometry (Oxygraph-2k, OROBOROS). *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2019**, *1943*, 313–322, doi:10.1007/978-1-4939-9092-4_20.
 183. Hall, A.; Maynard, S.; Wu, L.-P.; Merchut-Maya, J.M.; Strauss, R.; Moghimi, S.M.; Bartek, J. Perturbation of Mitochondrial Bioenergetics by Polycations Counteracts Resistance to BRAFE600 Inhibition in Melanoma Cells. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2019**, *309*, 158–172, doi:10.1016/j.jconrel.2019.07.032.
 184. Ullah, I.; Zhao, J.; Rukh, S.; Muhammad, K.; Guo, J.; Ren, X.-K.; Xia, S.; Zhang, W.; Feng, Y. A PEG-b-Poly(Disulfide-L-Lysine) Based Redox-Responsive Cationic Polymer for Efficient Gene Transfection. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 1893–1905, doi:10.1039/c8tb03226b.
 185. Stanić, V.; Arntz, Y.; Richard, D.; Affolter, C.; Nguyen, I.; Crucifix, C.; Schultz, P.; Baehr, C.; Frisch, B.; Ogier, J. Filamentous Condensation of DNA Induced by Pegylated Poly-L-Lysine and Transfection Efficiency. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2048–2055, doi:10.1021/bm800287z.
 186. Lühmann, T.; Rimann, M.; Bittermann, A.G.; Hall, H. Cellular Uptake and Intracellular Pathways of PLL-g-PEG-DNA Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1907–1916, doi:10.1021/bc800206r.
 187. Kuang, Y.; An, S.; Guo, Y.; Huang, S.; Shao, K.; Liu, Y.; Li, J.; Ma, H.; Jiang, C. T7 Peptide-Functionalized Nanoparticles Utilizing RNA Interference for Glioma Dual Targeting. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*, 11–20, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.019.
 188. Nakamura, T.; Ono, K.; Suzuki, Y.; Moriguchi, R.; Kogure, K.; Harashima, H. Octaarginine-Modified Liposomes Enhance Cross-Presentation by Promoting the C-Terminal Trimming of Antigen Peptide. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 2787–2795, doi:10.1021/mp500147y.
 189. Zhao, B.; Zhou, Z.; Shen, Y. Effects of Chirality on Gene Delivery Efficiency of Polylysine. *Chin. J. Polym. Sci.* **2016**, *34*, 94–103, doi:10.1007/s10118-016-1735-2.

190. Foeking, M.K.; Hofstetter, H. Powerful and Versatile Enhancer-Promoter Unit for Mammalian Expression Vectors. *Gene* **1986**, *45*, 101–105, doi:10.1016/0378-1119(86)90137-X.
191. SH-SY5Y Available online: https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=94030304&collection=ecacc_gc (accessed on 6 September 2022).
192. HeLa. In *HeLa*; Culture Collections.
193. 3T3 Available online: https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/general-cell/detail.jsp?refId=89022402&collection=ecacc_gc (accessed on 6 September 2022).
194. Sokolova, V.; Rojas-Sánchez, L.; Białas, N.; Schulze, N.; Epple, M. Calcium Phosphate Nanoparticle-Mediated Transfection in 2D and 3D Mono- and Co-Culture Cell Models. *Acta Biomater.* **2019**, *84*, 391–401, doi:10.1016/j.actbio.2018.11.051.
195. Teves, S.S.; An, L.; Hansen, A.S.; Xie, L.; Darzacq, X.; Tjian, R. A Dynamic Mode of Mitotic Bookmarking by Transcription Factors. *eLife* **5**, e22280, doi:10.7554/eLife.22280.
196. Åmand, H.L.; Nordén, B.; Fant, K. Functionalization with C-Terminal Cysteine Enhances Transfection Efficiency of Cell-Penetrating Peptides through Dimer Formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *418*, 469–474, doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.041.
197. Liang, W.; Gong, H.; Yin, D.; Lu, S.; Fu, Q. High-Molecular-Weight Polyethyleneimine Conjugated Pluronic for Gene Transfer Agents. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2011**, *59*, 1094–1101, doi:10.1248/cpb.59.1094.
198. Sørensen, S.J.; Sørensen, A.H.; Hansen, L.H.; Oregaard, G.; Veal, D. Direct Detection and Quantification of Horizontal Gene Transfer by Using Flow Cytometry and Gfp as a Reporter Gene. *Curr. Microbiol.* **2003**, *47*, 129–133, doi:10.1007/s00284-002-3978-0.
199. Fujii, N.; Saito, T. Homochirality and Life. *Chem. Rec.* **2004**, *4*, 267–278, doi:10.1002/tcr.20020.
200. Fujii, N. D-Amino Acids in Living Higher Organisms. *Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life* **2002**.
201. Panahi, Y.; Farshbaf, M.; Mohammadhosseini, M.; Mirahadi, M.; Khalilov, R.; Saghi, S.; Akbarzadeh, A. Recent Advances on Liposomal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Biomedical Applications. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **2017**, *45*, 788–799, doi:10.1080/21691401.2017.1282496.
202. Sokolova, V.; Rojas-Sánchez, L.; Białas, N.; Schulze, N.; Epple, M. Calcium Phosphate Nanoparticle-Mediated Transfection in 2D and 3D Mono- and Co-Culture Cell Models. *Acta Biomater.* **2019**, *84*, 391–401, doi:10.1016/j.actbio.2018.11.051.
203. Kalafatovic, D.; Giralt, E. Cell-Penetrating Peptides: Design Strategies beyond Primary Structure and Amphipathicity. *Mol. Basel Switz.* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22111929.
204. Kardani, K.; Bolhassani, A. Cppsites 2.0: An Available Database of Experimentally Validated Cell-Penetrating Peptides Predicting Their Secondary and Tertiary Structures. *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 166703, doi:10.1016/j.jmb.2020.11.002.
205. Agrawal, P.; Bhalla, S.; Usmani, S.S.; Singh, S.; Chaudhary, K.; Raghava, G.P.S.; Gautam, A. CPPsite 2.0: A Repository of Experimentally Validated Cell-Penetrating Peptides. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1098–1103, doi:10.1093/nar/gkv1266.
206. Zagorovsky, K.; Chou, L.Y.T.; Chan, W.C.W. Controlling DNA-Nanoparticle Serum Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 13600–13605, doi:10.1073/pnas.1610028113.
207. Louis, C.U.; Shohet, J.M. Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *Annu. Rev. Med.* **2015**, *66*, 49–63, doi:10.1146/annurev-med-011514-023121.
208. Kumar, M.D.; Dravid, A.; Kumar, A.; Sen, D. Gene Therapy as a Potential Tool for Treating Neuroblastoma—a Focused Review. *Cancer Gene Ther.* **2016**, *23*, 115–124.

209. Martín-Montañez, E.; López-Téllez, J.F.; Acevedo, M.J.; Pavía, J.; Khan, Z.U. Efficiency of Gene Transfection Reagents in NG108-15, SH-SY5Y and CHO-K1 Cell Lines. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2010**, *32*, 291–297, doi:10.1358/mf.2010.32.5.1498327.
210. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Arginine-Rich Peptides. An Abundant Source of Membrane-Permeable Peptides Having Potential as Carriers for Intracellular Protein Delivery. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836–5840, doi:10.1074/jbc.M007540200.
211. Suzuki, T.; Futaki, S.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-Rich Peptides. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2437–2443, doi:10.1074/jbc.M110017200.
212. Kim, Y.H.; Baek, N.S.; Han, Y.H.; Chung, M.-A.; Jung, S.-D. Enhancement of Neuronal Cell Adhesion by Covalent Binding of Poly-D-Lysine. *J. Neurosci. Methods* **2011**, *202*, 38–44, doi:10.1016/j.jneumeth.2011.08.036.
213. Zhou, X.H.; Klibanov, A.L.; Huang, L. Lipophilic Polylysines Mediate Efficient DNA Transfection in Mammalian Cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1065*, 8–14, doi:10.1016/0005-2736(91)90003-q.
214. van de Wetering, P.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.; Hennink, W.E.; Storm, G. Comparative Transfection Studies of Human Ovarian Carcinoma Cells in Vitro, Ex Vivo and in Vivo with Poly(2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate)-Based Polyplexes. *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 156–165, doi:10.1002/(SICI)1521-2254(199905/06)1:3<156::AID-JGM29>3.0.CO;2-O.
215. Mashal, M.; Attia, N.; Martínez-Navarrete, G.; Soto-Sánchez, C.; Fernández, E.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; Puras, G.; Pedraz, J.L. Gene Delivery to the Rat Retina by Non-Viral Vectors Based on Chloroquine-Containing Cationic Niosomes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2019**, *304*, 181–190, doi:10.1016/j.jconrel.2019.05.010.
216. Mashal, M.; Attia, N.; Puras, G.; Martínez-Navarrete, G.; Fernández, E.; Pedraz, J.L. Retinal Gene Delivery Enhancement by Lycopene Incorporation into Cationic Niosomes Based on DOTMA and Polysorbate 60. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2017**, *254*, 55–64, doi:10.1016/j.jconrel.2017.03.386.



Anexo I: Publicaciones





Article

Evaluation and Optimization of Poly-D-Lysine as a Non-Natural Cationic Polypeptide for Gene Transfer in Neuroblastoma Cells



Miguel Sanchez-Martos ¹, Gema Martinez-Navarrete ^{1,2}, Adela Bernabeu-Zornoza ¹ , Lawrence Humphreys and Eduardo Fernandez ^{1,2,*}

Citation: Sanchez-Martos, M.; Martinez-Navarrete, G.; Bernabeu-Zornoza, A.; Humphreys, L.; Fernandez, E. Evaluation and Optimization of Poly-D-Lysine as a Non-Natural Cationic Polypeptide for Gene Transfer in Neuroblastoma Cells. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1756. <https://doi.org/10.3390/nano11071756>

Academic Editor: Angelina Angelova

Received: 6 June 2021

Accepted: 29 June 2021

Published: 5 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Introduction

Gene therapy is a technique that alters gene expression to change the biological properties of cells for therapeutic purposes [1] and has proven to be a promising tool. There are several methods to achieve this objective, some of which include changing pathologic genes for functional genetic sequences, inactivating a defective gene, or treating a pathological condition by inserting a new gene [1]; however, many challenges remain [2,3]. One of the main problems is the difficulty in delivering the nucleic acids through the cell membrane. The most common carriers are viral vectors [4], but some studies have demonstrated that viruses have several limitations related to immunogenicity, the size of the nucleic acids they can transport, and the risk of mutagenesis [5]. In this framework, there is a clear need for the development of new approaches in gene therapy [6,7] and to look for alternative tools to viruses, known as nonviral vectors, among which are cationic polypeptides and cationic polymers.

Cell-penetrating peptides (CPPs) are small peptides with between 7 to 30 residues of amino acid size, which exhibit improved cellular penetration through the plasma membrane [8]. CPPs can form complexes and carry peptides, drugs, nucleotide chains, enzymes, etc. Several CPPs have a biological origin such as the TAT protein [9] or Antp [10] and can also be produced synthetically [11]. CPPs can be linked to other molecules for transport through disulfide linkage, thioester linkage, or by creating chimeric proteins with other CPPs or proteins. The noncovalent formulation involves electrostatic or hydrophobic interactions between the molecule and the CPP [12].



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Neuroprosthesis and Neuroengineering Research Group, Miguel Hernández University, 03201 Elche, Spain; miguel.sanchez17@alu.umh.es (M.S.-M.); gema.martinezn@umh.es (G.M.-N.); adela.bernabeu@gmail.com (A.B.-Z.); lawrencehumphreys@hotmail.com (L.H.)

² Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: e.fernandez@umh.es; Tel.: +34-965222001

Abstract: Cationic polypeptides and cationic polymers have cell-penetrating capacities and have been used in gene transfer studies. In this study, we investigate the capability of a polymer of D-lysine (PDL), a chiral form of α -Poly-lysine, as a possible nonviral vector for releasing genetic materials to neuroblastoma cells and evaluate its stability against proteases. We tested and compared its transfection effectiveness in vitro as a vehicle for the EGFP plasmid DNA (pDNA) reporter in the SH-SY5Y human neuroblastoma, HeLa, and 3T3 cell lines. Using fluorescent microscopy and flow cytometry, we demonstrated high transfection efficiencies based on EGFP fluorescence in SH-SY5Y cells, compared with HeLa and 3T3. Our results reveal PDL as an efficient vector for gene delivery specifically in the SH-SY5Y cell line and suggest that PDL can be used as a synthetic cell-penetrating polypeptide for gene therapy in neuroblastoma cells.

Keywords: neuroblastoma; SH-SY5Y; HeLa; 3T3; PDL; CPP; gene therapy; nonviral vector poly-lysine

Nanomaterials **2021**, *11*, 1756. <https://doi.org/10.3390/nano11071756>

<https://www.mdpi.com/journal/nanomaterials>

The mechanisms by which CPP's penetrate through cell membranes can be by two distinct pathways—energy-dependent internalization by endocytosis mechanism or direct translocation through the cell membrane [8]. In addition, CPPs can be classified into three categories: peptide-based proteins such as TAT and penetratine, chimeric peptides such as transportan, and synthetic-based peptides such as polylysine (PLL) [13]. Moreover, CPPs can be further classified according to their physical–chemical properties as follows: cationic peptides, which are those that are made up of short sequences of amino acids that are mainly arginine, lysine, and histidine (TAT and PLL); amphipathic peptides, which are those with a polar domain and a nonpolar domain (MPG); hydrophobic peptides, which are formed by nonpolar residues of valine, leucine, and tryptophan [8,14].

CPPs have been used as nonviral vectors to introduce diverse compounds into cells for biomedical applications, such as drugs [15], proteins [16], quantum dots [17], radiolabeled antibodies [18], and nucleic acids such as siRNA or DNA [19]. The TAT peptide was one of the first CPPs used for gene delivery, due to its cationic nature and the abundance of arginine and lysine residues, which have a positive charge that interacts with the negative charges of nucleic acids [20]. Until now, more than 1700 peptide sequences of both biological or synthetic origin have been described and classified as CPPs [21]. As nonviral vectors, CPPs have been used to treat pathologies, such as lung diseases, with an octo–arginine conjugate to an amphiphilic region to improve DNA condensation, followed by HS-GAG binding domain to enhance transduction, and finally, a polyethylenglicol chain to protect therapeutic pDNA from the action of nucleases [22]. An example of a synthetic custom-designed CPPs are the POD “peptide for ocular delivery,” a GGG(ARKKAACA)₄ chain used for drug delivery treatment related to eye diseases. Here, they showed that POD is capable of condensing siRNA and pDNA and can also pass through the cell membrane of the neural retina, photoreceptors, ganglion cells, as well as enter in the sclera, choroids, and into the dura of the optic nerve via topical application [23].

Poly-L-lysine (PLL) was one of the first synthetic polypeptides that were studied for its DNA condensation capacity [24]. Its ability to transport genetic material inside certain types of

cells was tested in vitro and in vivo [25]. However, PLL is usually joined to other proteins and synthetic compounds such as polyethylenimine (PEI) when used as a vector and unconjugated polylysines have low transfection rates [26]. Furthermore, PLL exhibits positive electrostatic charges at a high density, which can induce some side effects such as cytotoxicity and membrane disruption [27,28].

A possible alternative to PLL is to use the poly-D-lysine (PDL), a chiral form of α -polylysine, which is widely used to improve cell adherence in neuronal cultures [29] and is relatively inexpensive and commercially available. PDL has been used in transfection assays conjugated to the cholera toxin B chain [30,31], and with the RAP protein to target human hepatoma cells [32]. Chirality and transfection capacity of PDL in HeLa cells has also been reported [33]. Moreover, its use has also been described in the systemic delivery of a PDL-plasmid complex in vivo [31] and in clinical trials to treat cystic fibrosis using conjugated PDL-peg [34]. In this context, PDL induces a low immune response [35] and can be used to increase cell-type specificity [36].

Here, we assess the potential of long-term PDL application for gene transfer in SHSY5Y human neuroblastoma and compared its capacity to transfect the enhanced green fluorescent protein plasmid (EGFP) in HeLa and 3T3 cells. Furthermore, we evaluated its stability against proteases as its effects on cell viability. We selected neuroblastoma cells since this cancer is the most common malignant tumor found in infancy [37,38] and has a survival rate of less than 20% [39]. Neuroblastoma treatments are based mainly on surgery, chemotherapy, and radiotherapy, but because of the nature of the disease, it can metastasize into other tissues with ease [38]; therefore, recovery rates are generally low [40]. Furthermore, frequent complications of these treatments include high levels of drug toxicity and low specificity on the target tissue, as well as the adaptability of the tumor cells to the drugs used, leading to what is known as refractory cancer [41]. Consequently, it is imperative to discover alternative treatments, and gene therapy has been proposed as a potential tool for treating this tumor [39]. We tested several DNA-PDL complexes and show that PDL has a high transfection efficiency in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line when compared to HeLa and 3T3 cell lines. These results suggest that PDL can be used as a synthetic cell-penetrating polypeptide for gene therapy in neuroblastoma cells [42].

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval

All experimental procedures conformed to directive 2010/63/ EU of the European Parliament and Council and the RD 53/2013 Spanish regulation on the protection of animal use for scientific purposes and approved by the Miguel Hernandez University Committee for Animal use in Laboratory.

2.2. Plasmid/PDL Interaction Assay

The pCMS-EGFP plasmid (5500 bp) bought from Addgene (Watertown, MA, USA) was provided by the Clontech laboratory PT3268-5, and the coding for the enhanced green fluorescent protein (EGFP) was stored at -80° . It was amplified in our facilities with *E. coli* bacteria and a QIAfilter plasmid kit provided by Qiagen at a final concentration of 1 mg/mL. PDL solution was prepared at 1 mg/mL 70/150 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cell lines SH-SY5Y, HeLa, and 3T3 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis,

MO, USA) were placed in an Eppendorf with heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Riverside, MO, USA) and 10% of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merk, Darmstadt, Germany) and stored at -80° C until used.

To check for interactions between lysines and the plasmid, we incubated PDL (1 mg/mL) and EGFP plasmid (1 mg/mL) for an hour. PDL concentrations were varied to obtain several plasmids to PDL

ratios (*w/w*). Interactions were analyzed by electrophoresis running the samples on an agarose gel at a 0.8% concentration. GreenSafe (NZYTech, Lisboa, Portugal) was used as a DNA stain. The mix was left to run for 45 min at room temperature at which point the gel was illuminated with a UV lamp, and the images were taken with a transilluminator (Vilber Luomart, Marne-la-Vallée, France).

2.3. DNase I Protection Assay

To analyze PDL's ability to protect the pDNA from enzymatic degradation, we carried out a DNase I (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) protection assay. pDNA–PDL complexes were prepared at *w/w* ratios of 1:2, 1:4, and control naked pDNA was incubated at 37 °C for 60 min with DNase I (1 U/μg of DNA), 1 μL MgCl₂ 25 mM (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), at which point 1 μL EDTA 50 mM (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was added and samples were heated at 65 °C for 10 min to inactivate DNase I. Heparin (500 U/μg of DNA) (Hospira-Pfizer, New York, NY, USA) was added for 1 h to release DNA from the PDL. The samples were analyzed by way of 0.8% agarose gel electrophoresis. GreenSafe was used to dye the pDNA. The complexes were left to run for 45 min at 90 V at room temperature before the gel was exposed to a UV light, and the images were acquired using a transilluminator (Vilber Luomart, Marne-la-Vallée, France).

2.4. Elaboration of DNA–Poly-D-Lysine Complex

The DNA–PDL complexes were made by mixing EGFP plasmid with different volumes of PDL to obtain different plasmid/PDL ratios ranging from 1:0.12 to 1:4. For the positive control, we used a mix of DNA/Lipofectamine (1:1) (ThermoFisher, Darmstadt, Germany) whereas for negative controls we used the naked plasmid. All compound mixtures were prepared at a final volume of 100 μL mixed with distilled water and were incubated at room temperature for 30 min to allow the interaction between the plasmid and PDL.

2.5. MTT Assay

Mitochondrial respiration was used as an indicator of cell viability because of its ability to convert Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) into formazan. Culture cell viability was performed using the MTT assay in 96-well plates. SH-SY5Y, HeLa, and 3T3 cells were seeded at 2×10^2 cells per well in 100 μL of culture medium and grown for 48 h at 5% CO₂ and 37 °C room temperature. After this time, we carried out the first treatment with our 1:2 or 1:4 plasmid/PDL (80 ng of pDNA per well) mixture and left it in the culture medium for 48 h. We then replaced the entire culture medium and added fresh plasmid/PDL mixture and repeated the same process twice more every 48 h. Thus, cells were incubated in either the plasmid/PDL mixture ratio of 1:2 or 1:4 for either 48, 96, or 144 h for comparative testing. All cells irrespective of treatment duration were left to grow for 9 days at which point they were analyzed. Culture medium was completely exchanged with fresh culture medium with the addition of MTT at 1 mg/mL concentration and was left to incubate for 4 h. The culture medium was then removed, and 100 μL/well of dimethyl sulfoxide DMSO (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was added to dissolve formazan crystals. Absorbance was measured at 595 nm in a microplate reader. Comparisons were performed using untreated cells as the control and normalized to 100% viability as the reference.

2.6. Assays In Vitro of SH-SY5Y Cells

The SH-SY5Y human neuroblastoma, HeLa, and 3T3 cell lines were seeded on 24-well plates with a 12 mm diameter coverslip, which was pretreated with PDL (0.0125 mg/mL) and laminin (0.0083 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) at a concentration of 1×10^3 per well in 500 μL of culture medium and left to grow in an incubator (37 °C and 5% CO₂) for 72 h. Cells were then treated with varying plasmid/PDL ratios for a duration of different times, as previously described above (400 ng of pDNA per well). This is depicted in Table 1. Control cells were transfected with

EGFP/lipofectamine two days after seeding for a total of 144 h with medium and EGFP/lipofectamine (1:1) replenished every 48 h.

Table 1. Preparation of 24-well plates. The numbers 1, 2, 3, and 4 are the columns in plates, and A, B, and C are the rows in the plate. Cells were fixed on the ninth day. X denotes a treatment, (-) denotes only a change in medium.

		1	2	3	4
Time		Ratio 1:2	Ratio 1:4	C+	C-
3rd day (48 h)	A	X	X	X	-
	B	X	X	X	-
	C	X	X	X	-
5th day (96 h)	A	-	-	-	-
	B	X	X	X	-
	C	X	X	X	-
7th day (144 h)	A	-	-	-	-
	B	-	-	-	-
	C	X	X	X	-

Cells were then fixed with 500 μ L of paraformaldehyde (PFA) 4% (v/p) (SigmaAldrich, Darmstadt, Germany) for 5 min in the same plate in which the cells were cultured. PFA was removed and another 500 μ L of PFA 4% was added again for 15 min at which point it was removed and cells were washed, once with 500 μ L phosphate buffer solution (PBS) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and 1 μ L Hoechst (1 μ g/ μ L) per well for 5 min and washed twice more with PBS and kept at 4 °C.

2.7. Cell Count Assay

Samples were analyzed on a fluorescence microscope with a 488 nm filter for EGFP expression in transfected cells and a 358 nm filter for Hoechst-stained nuclei. Images were captured with a Zeiss Apotome 2.0 fluorescent microscope with a 20 \times objective. In total, 10 areas were randomly selected, each containing a minimum of 500 nuclei. Cells were manually counted in a blind manner.

2.8. Flow Cytometer Assay

In a 24-well plate previously treated with PDL (0.0125 mg/mL) and laminin (0.0083 mg/mL), 1×10^3 cells were seeded directly over the well using the same protocol and the transfection process that was described in the previous section. On the ninth day after the seeding, cells were washed with PBS at a temperature of 37 °C and were treated with 200 μ L 0.05% Trypsin–EDTA (1 \times) (Gibco, Darmstadt, Germany, 64293) for 5 min in a 37 °C incubator to detach the cells from their support. Then, 400 μ L of cold phosphate buffer and 20% FBS were added to block trypsinization. Cells were then placed in a 1.5 mL Eppendorf and centrifuged at 200 g's for 5 min. After that, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 1 mL of PBS +2% FBS, and samples were conserved on ice. Transfected cells expressing EGFP were measured with a flow cytometer (SONY SH800) at Ex/Em = 488/510 nm wavelength. Over 10,000 counts were made in each of the three experiments that we performed, the data were processed with Flowing Software (version 2.5.1, Turku Centre for Biotechnology University of Turku, Finland, 2013). Cell expression data were expressed as the percentage of positive fluorescent cells. As a negative control, we compared cells that had been treated with naked DNA.

2.9. Statistical Analysis

Data are represented as mean \pm SD. Statistical analysis was made using a two-sample Student's t-tests. Each experiment was repeated at least three times.

3. Results

3.1. Gel Retardation Assay

Interactions between the plasmid–PDL complexes were evaluated by electrophoretic mobility shift assays using incremental ratios (Figure 1). The mobility of ratios ranging from 1:0.12 to 1:1 (lanes A–D) was comparable to that of naked DNA (Figure 1H). However, we observed that plasmid/PDL ratios of 1:2 to 1:4 interact sufficiently with each other to form a complex that is able to block the migration of DNA through the gel.

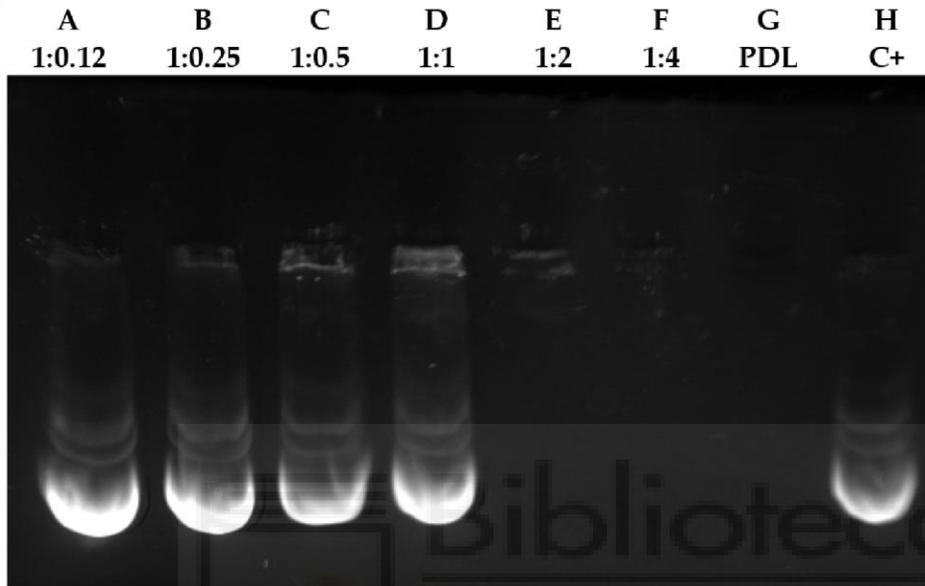


Figure 1. Interaction analysis between different plasmid/PDL ratios. Interaction analysis of plasmid–PDL complex at different ratios in agarose gel (0.8%) stained with GreenSafe. Columns A–F show the different plasmid/PDL ratios used (1:0.12, 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4 and 1:8 respectively). Column G only contains PDL and column H was used as a positive control where only DNA was inserted.

3.2. DNase I Protection and Release Assay

One of the essential properties that all vectors should exhibit for any *in vivo* experiments is the protection of the DNA they package and transport from the nucleases present in the blood and tissue [43]. In the DNase protection and release assay (Figure 2), we evaluated the capacity of PDL at a ratio of 1:2 or 1:4 to protect the plasmid DNA from digestion from DNase I. Heparin was used to liberate the DNA from the plasmid–PDL complexes. For both ratios, we observed that PDL was able to form a complex with the plasmid and partially protect it from being digested by DNase I, which was partly liberated by heparin (lane A and E). When we added heparin without DNase I, we observed the partial liberation of the DNA from the PDL complex (lane B and F). When we added DNase I without heparin, the DNA was not liberated (lane C and G). Similar results were observed when neither was added (lane D and H), and no band was formed. When using a ratio of 1:4, we observed a more pronounced liberation of DNA, in comparison to a 1:2 (lane A and E). In lane I, we added DNase I to naked plasmid DNA where no band was observed, and in lane J, we added DNA for comparative controls. It is possible that in the loading sites (B, D, E, F, H), PDL interferes in the binding between the plasmid and the GreenSafe DNA stain, and that heparin can liberate the plasmid from the PDL complex, allowing for the DNA to be stained. However, more experiments are still needed for more definitive conclusions to be drawn.

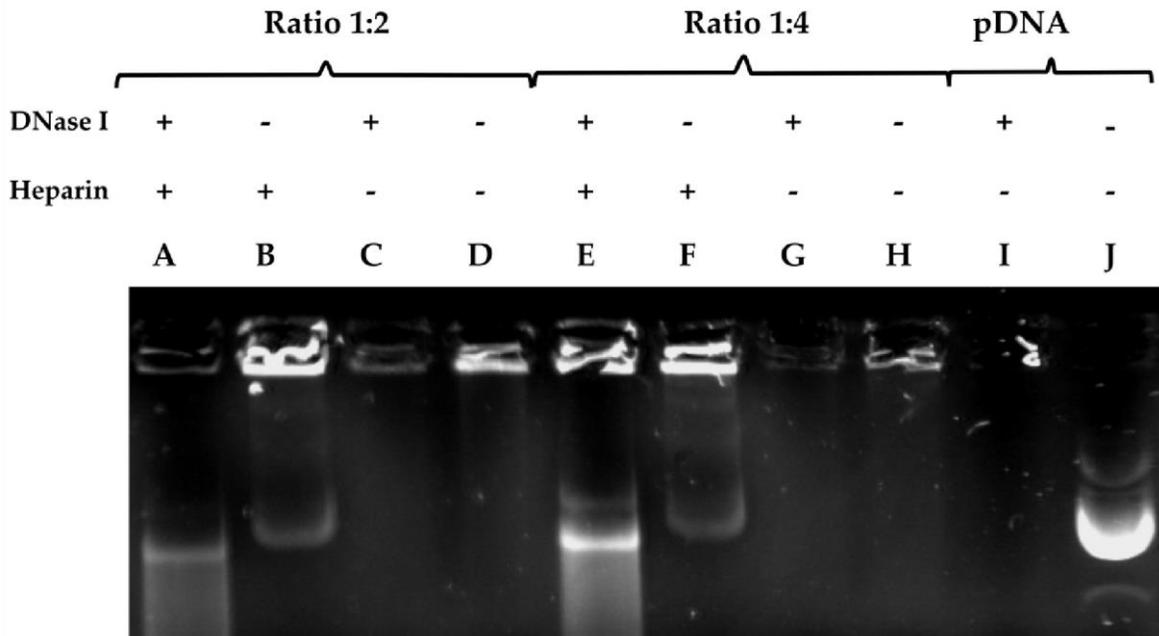


Figure 2. pDNA liberation assay from varying plasmid/PDL ratios using heparin. DNA complexes were formed with PDL at different ratios and run on a 0.8% agarose gel electrophoresis stained with GreenSafe. The protective properties of PDL were assessed after heparin released the DNA from the complex and DNase 1 was then allowed to cleave it. In columns A–D a plasmid-DNA ratio of 1:2 was inserted. Column A was run with the addition of DNase 1 and heparin. Column B only contained heparin and column C only contained DNase 1. In column D only the plasmid-DNA complex was inserted. Columns E–H were run with a plasmid-DNA ratio of 1:4. Column E was run with the addition of DNase 1 and heparin. Column F only contained heparin and column G only contained DNase 1. Column I only contained the plasmid-DNA complex. Column J was a positive control whereas only the naked DNA was inserted. + or – symbols indicate the presence or absence of heparin or DNase I.

3.3. Cell Viability Evaluated according to PDL Concentration and Duration of Administration

To evaluate the effects of PDL on cell survival, we used an MTT assay to test viability. We tested different DNA/PDL ratios and varied the time SH-SY5Y, HeLa, and 3T3 cells were exposed to the complex. Two days after seeding the cells, all the media in each well was completely replaced. DNA–PDL complex was then applied and left to mix with the cells for 48 h. This process of medium change and a new addition of DNA–PDL complex was repeated every 48 h, i.e., at 96 h and 144 h. Nontreated cells were used as a control and compared as a 100% reference. Results are shown in Figure 3. HeLa cells exhibited the highest viability throughout all treatments, in comparison to SH-SY5Y and 3T3 cells. Specifically, using a ratio of 1:2 for 48 h, we observed the highest viability in HeLa cells ($98 \pm 2.2\%$ $p = 3.0 \times 10^{-1}$), followed by 3T3 cells ($88.39 \pm 2.67\%$ ($p = 1 \times 10^{-3}$)), and then by SH-SY5Y cells ($86.7 \pm 2.72\%$ ($p = 9 \times 10^{-3}$)). A similar trend was observed at 96 h, although viability decreased in all three cell lines (HeLa = $92.98 \pm 1.82\%$ ($p = 2 \times 10^{-4}$), 3T3 = $85 \pm 6.9\%$ ($p = 2 \times 10^{-3}$), SH-SY5Y = $80.88 \pm 3.3\%$ ($p = 2 \times 10^{-3}$)) and at 144 h (HeLa = $87.28 \pm 1.36\%$ ($p = 6.43 \times 10^{-5}$), 3T3 = $77.31 \pm 6.23\%$ ($p = 2.1 \times 10^{-4}$), SHSY5Y = $73.15 \pm 2.86\%$ ($p = 5.85 \times 10^{-5}$)). Using a ratio of 1:4 decreased viability in all three cell lines when compared to 1:2 with HeLa cells, once again exhibiting the highest viability. At 48 h, a 1:4 treatment resulted in the highest viability in all three cell lines when compared to negative controls (HeLa = $91.97 \pm 1.4\%$ ($p = 3.54 \times 10^{-5}$), 3T3 = $55 \pm$

11.89% ($p = 2.24 \times 10^{-5}$), SH-SY5Y = $63.21 \pm 2.86\%$ ($p = 2.45 \times 10^{-5}$). At 96 h, we observed a further decrease in viability in all three cell lines (HeLa = $88.93 \pm 2.64\%$ ($p = 1.06 \times 10^{-4}$), 3T3 = $36.15 \pm 9.9\%$ ($p = 1.36 \times 10^{-7}$), SH-SY5Y = $51.91 \pm 1.19\%$ ($p = 2.12 \times 10^{-6}$)), which was even more pronounced at 144 h (HeLa = $88.11 \pm 2.24\%$ ($p = 7.43 \times 10^{-5}$), 3T3 = $23.76 \pm 8.99\%$ ($p = 2.1 \times 10^{-3}$), SH-SY5Y = $48.61 \pm 2\%$ ($p = 9.09 \times 10^{-7}$)).

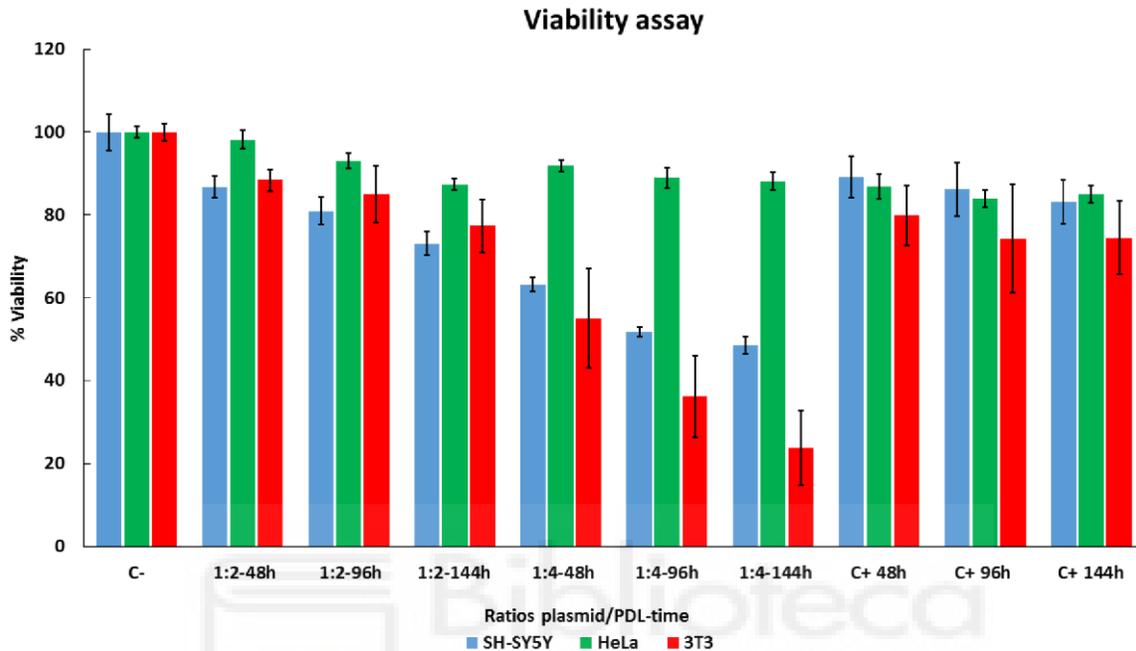


Figure 3. Evaluating cell viability with long-term DNA–PDL treatments in SH-SY5Y, HeLa, and 3T3 cells. Cells were treated with two ratios of plasmid/PDL 1:2 or 1:4 two days after seeding for 48 h, 96 h, and 144 h, and compared with control untreated cells 9 days after seeding. Cellular viability was measured using an MTT assay. Control cells were referenced as 100% viability for comparisons. These experiments were repeated three times and data are shown as mean \pm standard deviation (SD).

3.4. Cell-Type-Specific Differences in EGFP Expression Using PDL

We used confocal microscopy imaging to evaluate the optimal transfection protocol in terms of EGFP/PDL ratios (1:2, 1:4) and administration duration (44, 96, and 144 h) in SY5Y, HeLa, and 3T3 cells lines. Transfection efficiency for each condition was determined by comparing EGFP positive cells to lipofectamine treated control cells (1:1). Figure 4 shows representative images of EGFP expression, and the results of manual cell counts are shown in Figure 5. In general, the transfection activity of lipofectamine on SH-SY5Y after 48 h cells was very low. Using a PDL ratio of 1:2, we observed improved EGFP expression, in comparison to lipofectamine. At 48 h of treatment, a slight increase in EGFP transfection of $1.24 \pm 0.56\%$ was observed, although this was not statistically different when compared to with control cells transfected with lipofectamine treated for the same amount of time, $1.13 \pm 0.37\%$. However, after 96 h, EGFP expression increased to $7.73 \pm 0.8\%$ ($p = 6.45 \times 10^{-7}$), comparative to lipofectamine treatment for the same duration, with $1.10 \pm 0.28\%$. Similar results were obtained at 144 h of treatment with an increase of $7.37 \pm 1.87\%$ ($p = 9.26 \times 10^{-4}$) when compared to lipofectamine, with $1.19 \pm 0.41\%$. Incrementing the ratio to 1:4 resulted in higher expression for all treatments. At 48 h, 96 h and 144 h we observed an $9.49 \pm 0.97\%$ ($p = 3.8 \times 10^{-8}$), $9.75 \pm 1.02\%$ ($p = 8.27 \times 10^{-7}$) and $18.06 \pm 1.7\%$ ($p = 7.8 \times 10^{-8}$) increase, respectively, when compared to lipofectamine. However, when transfecting HeLa Cells with our plasmid–PDL

complex, we observed a decrease in EGFP expression when compared to lipofectamine irrespective of duration or ratio used (48 h lipofectamine = $4.69 \pm 1.3\%$, PDL ratio 1:2 = $0.83 \pm 0.21\%$ ($p = 4.0 \times 10^{-2}$), ratio 1:4 = $0.86 \pm 0.32\%$ ($p = 2.1 \times 10^{-2}$)); (96 h lipofectamine = $5.78 \pm 1.24\%$, PDL ratio 1:2 = $1.29 \pm 0.26\%$ ($p = 2.5 \times 10^{-2}$), ratio 1:4 = $1.16 \pm 0.21\%$ ($p = 2.2 \times 10^{-2}$)); (144 h lipofectamine = $9.05 \pm 1.78\%$, PDL ratio 1:2 = $1.76 \pm 0.16\%$ ($p = 9.6 \times 10^{-3}$), ratio 1:4 = $2.91 \pm 1.01\%$ ($p = 5.1 \times 10^{-3}$)). We did not observe any EGFP expression, neither when using lipofectamine nor with our plasmid–PDL complexes at any duration of application in 3T3 cells (Figure 3C).

To further compare transfection efficiency in SH-SY5Y, HeLa, and 3T3 cells between PDL and lipofectamine, we used flow cytometry for the quantification of EGFP expression [44]. Figure 6 shows the quantitative results. In SH-SY5Y cell line, increased transfection levels were observed, with the ratio 1:2 for all time durations of drug application when compared to lipofectamine (lipofectamine 48 h = $0.48 \pm 0.01\%$, 96 h = $0.5 \pm 0.01\%$, 144 h = $0.79 \pm 0.01\%$, PDL 48 h = $17.11 \pm 0.74\%$ ($p = 2.5 \times 10^{-3}$), 96 h = $22.24 \pm 0.36\%$ ($p = 3.6 \times 10^{-4}$), 144 h = $22.24 \pm 0.36\%$ ($p = 3.6 \times 10^{-4}$)). This was even more pronounced using a ratio of 1:4 at all-time durations (48 h = 31.10% ($p = 1.2 \times 10^{-3}$), 96 h = $47.61 \pm 1.3\%$ ($p = 1.1 \times 10^{-3}$), 144 h = $42.37 \pm 0.54\%$ ($p = 2.2 \times 10^{-4}$)). These results demonstrate a stronger expression in SH-SY5Y cells in comparison to lipofectamine and is dependent on the duration of treatment.

The highest expression obtained using lipofectamine was observed in HeLa cells, which was consistent throughout each of the time durations (48 h = $18.68 \pm 0.59\%$, 96 h = $17.72 \pm 0.59\%$, 144 h = $20.79 \pm 0.34\%$). However, when comparing with PDL, the expression levels were considerably lower (48 h = $1.40 \pm 0.1\%$ ($p = 2.8 \times 10^{-4}$), 96 h = $2.29 \pm 0.13\%$ ($p = 3.6 \times 10^{-4}$), 144 h = $2.54 \pm 0.1\%$ ($p = 4.6 \times 10^{-4}$)). Similar results were obtained using a PDL ratio of 1:4 (48 h = $1.33 \pm 0.18\%$ ($p = 6.2 \times 10^{-4}$), 96 h = $1.79 \pm 0.11\%$ ($p = 2.8 \times 10^{-4}$), 144 h = $2.40 \pm 0.24\%$ ($p = 9.0 \times 10^{-4}$)). Although expression was relatively low for both 1:2 and 1:4 ratios, we did observe increments after each treatment. These results suggest that HeLa cells prefer lipofectamine over PDL in terms of transfection efficiency.

Relatively low levels of expression were observed when transfecting 3T3 cells with lipofectamine, with slight increments after each treatment (48 h = $0.13 \pm 0.005\%$, 96 h = $1.05 \pm 0.14\%$, 144 h = $1.63 \pm 0.11\%$). Using a ratio of 1:2 PDL exhibited comparatively lower expression (48 h = $0.084 \pm 0.011\%$ ($p = 4.3 \times 10^{-3}$), 96 h = $0.36 \pm 0.03\%$ ($p = 3.9 \times 10^{-2}$), 144 h = $0.49 \pm 0.04\%$ ($p = 5.8 \times 10^{-3}$)), in comparison to lipofectamine, although we did observe slight increments again after each treatment. A similar trend was observed when using a PDL ratio of 1:4 (48 h $0.16 \pm 0.03\%$ (ns), at 96 h, $0.67 \pm 0.14\%$ ($p = 4.6 \times 10^{-2}$), and at 144 h, $0.53 \pm 0.03\%$ ($p = 6.3 \times 10^{-3}$)). Moreover, 3T3 cells exhibit the poorest expression when using PDL to transfect comparatively to the other cells lines. All together, these results suggest that SH-SY5Y cells have a higher affinity for PDL over lipofectamine and lipofectamine appears to favor expression in other cells over SH-SY5Y cells.

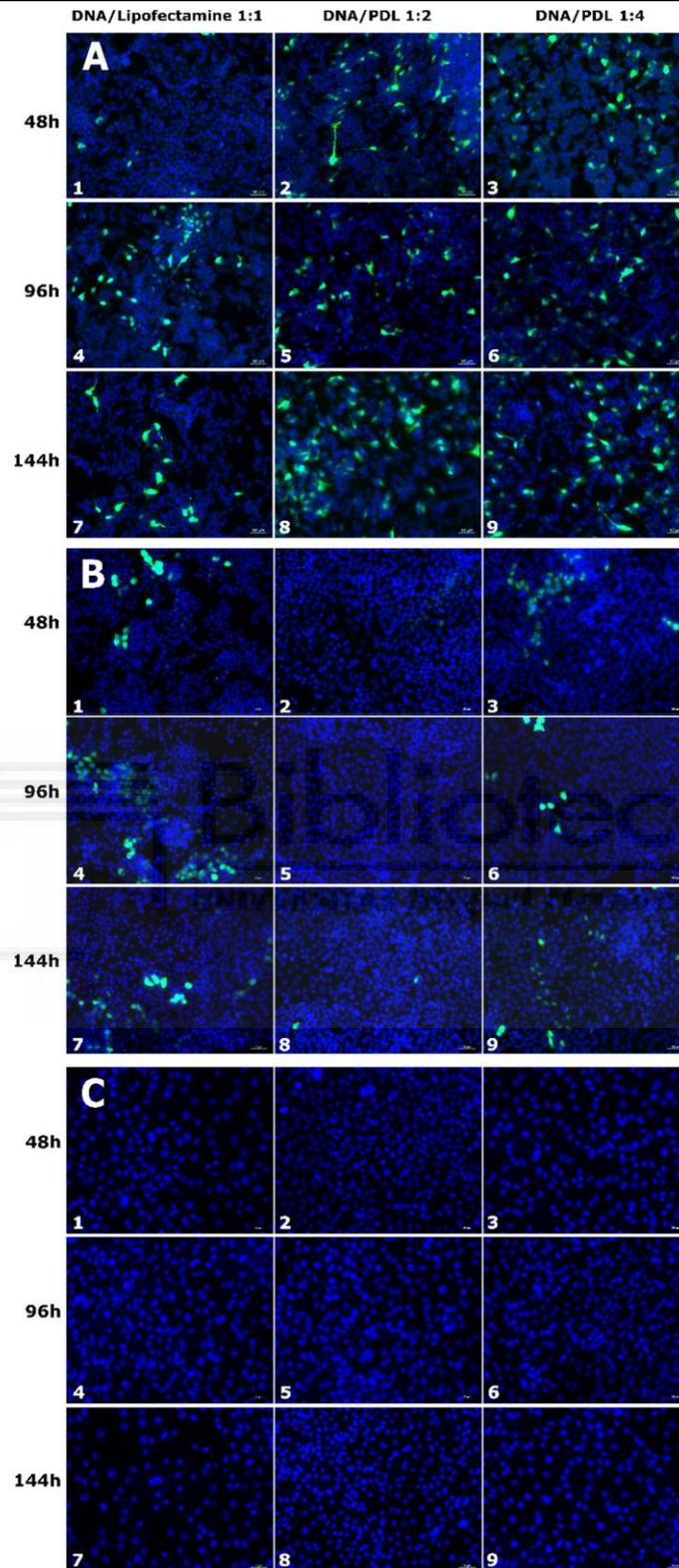


Figure 4. EGFP expression in SH-SY5Y (A), HeLa (B), and 3T3 (C) cells transfected with PDL or lipofectamine. EGFP expression (green) in cells treated with lipofectamine (1, 4, 7 columns), DNA/PDL (1:2) (2, 5, 8 columns) and DNA/PDL (1:4) (3, 6, 9 columns) for 48 h (1, 2, 3 rows), 96 h (4, 5, 6 rows) and 144 h (7, 8, 9 rows) in each cell line. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale = 50 μ m.

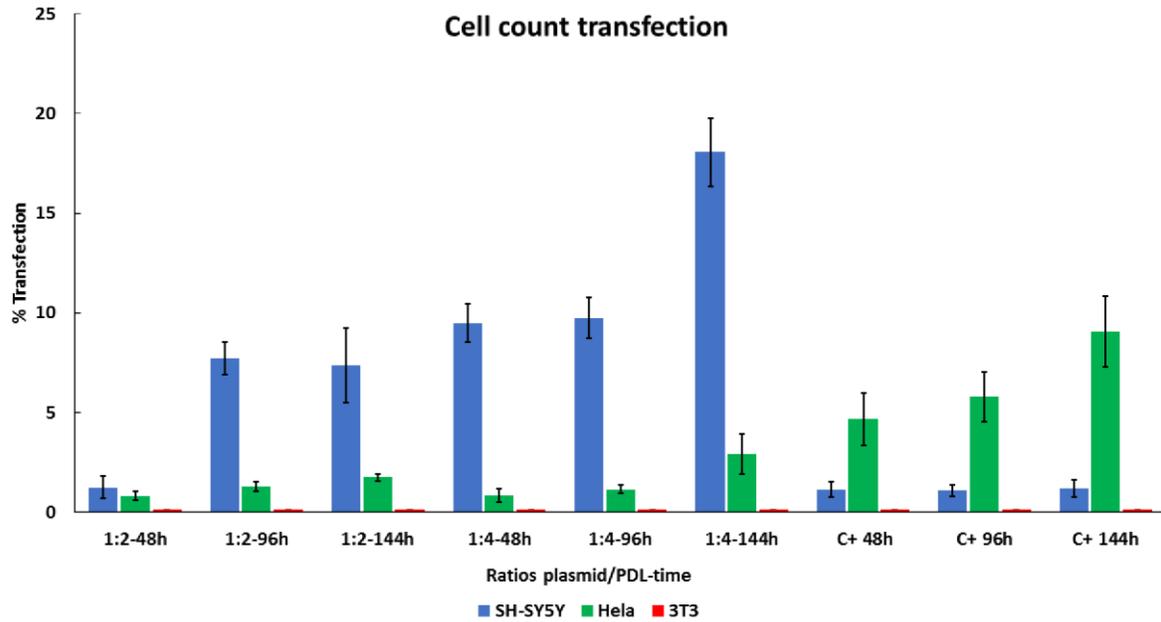


Figure 5. Percentage of transfection in each cell line by cell count. Results are expressed as EGFP positive cells/total counted cells number counting at least 500 nuclei of each sample. Data are represented by mean \pm SD of three distinct experiments.

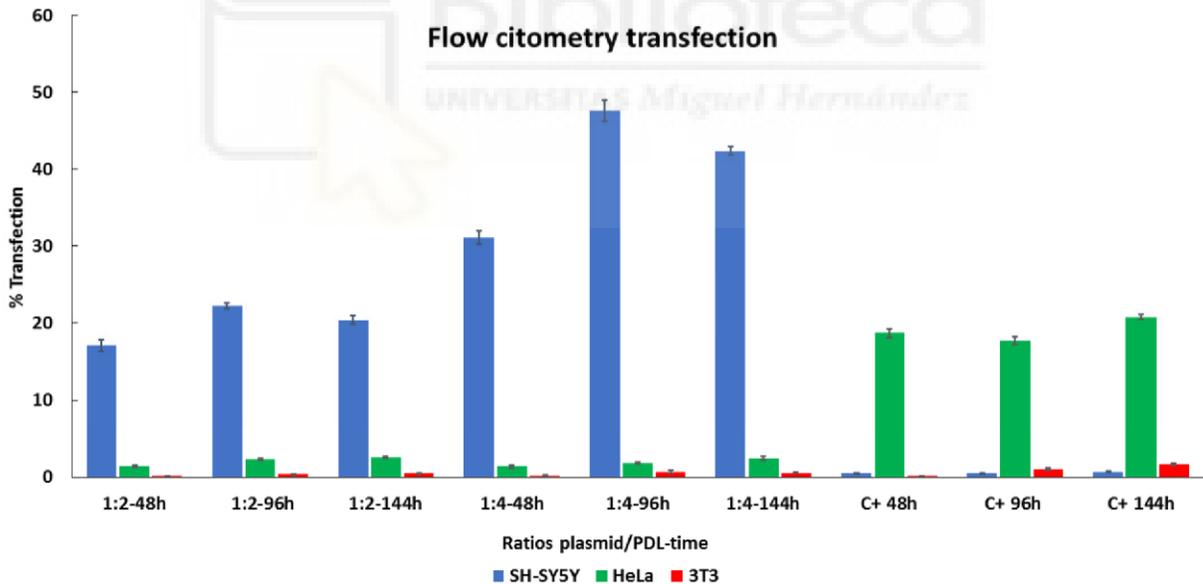


Figure 6. Comparing EGFP expression between PDL and lipofectamine determined by flow cytometry. SH-Sy5Y, HeLa, and 3T3 cells were treated three times (48, 96 and 144 h) with two different ratios of plasmid/PDL (ratio 1:2 and ratio 1:4) and with lipofectamine as a positive control (C+). Data are represented by mean \pm SD of three distinct experiments.

4. Discussion

This study shows the capacity for PDL to package and protect pDNA from potential nucleases normally found in blood serum [45] and act as a preferential vehicle of genetic material to SH-SY5Y human neuroblastoma cells when compared to HeLa and 3T3 cells. Neuroblastoma is one

of the most common types of tumors in childhood, with a low recovery rate and high mortality levels [37,38]. Although several approaches and strategies for treatment have been developed for this tumor, the results obtained so far have been limited, and this has prompted us to investigate alternative therapies. Gene therapy has been proposed as a potential tool for treating neuroblastoma [39], but the efficiency of generic transfection reagents *in vitro* such as lipofectamine and Turbofectin is generally less than 5% [46]. Our results also confirm very low transfection ratios with lipofectamine; hence, there is a clear need to develop more effective gene transfer systems for neuroblastoma cells, and PDL could open a new path in this field.

As arginine is the amino acid residue most abundant in the TAT peptide [47], the majority of studies have focused on arginine-based CPPs as a transport vehicle for genetic material or drug molecules [47,48]. Most of the literature that describes lysine-based CPPs as transporter report some sort of linkage between another compound to the L-form. To date, even less exists in the literature in respect to the D-form, which is a commercial compound normally used to treat surfaces for cell attachment [29] as a nonviral vector for gene transfer [28]. Nonetheless, our results demonstrate that PDL can also act as a nonviral vector and that consecutive treatments are well tolerated by cells and have an additive effect for transfections.

We confirmed that PDL can transfect the plasmid reporter EGFP with high affinity in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y with higher efficiency when compared to HeLa and 3T3. When we compared PDL with lipofectamine, a widely used gene delivery reagent for cell transfections, we observed up to 98 times more transfection rates. This increase surpasses results also reported for TurboFectin 8.0, a preferred DNA carrier in SH-SY5Y cells [46]. This opens interesting possibilities for the exploration of different CPP D-form variants as vectors for gene therapy-based treatments or as carriers for other types of cargoes such as drugs or molecules for image diagnosis. PDL presents a possible alternative to viruses as a vector overcoming the size limitation in plasmid size incorporation they present [39]. The ratio of plasmid/PDL in which we observed expression and the lowest toxicity was 1:2. Increasing the ratio to 1:4 yielded higher expression but resulted in less viability in culture. However, further studies are necessary to check if the drop in viability we observed at ratio 1:4 may be due to cytotoxic or a cytostatic process. More efforts also need to be carried out to determine the mechanisms involved in the cell type preference for SH-SY5Y with PDL, in comparison to HeLa and 3T3 cells, and whether this specificity can be capitalized on and transferred to other cell types.

Our methodology of replacing all the old medium every 48 h with fresh medium and adding a new plasmid–PDL mix each time appears to avoid possible D-lysine toxicity. These consecutive additive transfections appear to be well tolerated by cells and exhibit more accumulative expression when compared to lipofectamine. We chose this experimental design to simulate possible long-term treatments *in vivo*. Most *in vitro* transfection times range from 1 [49] to 48 h [50], with 4 h being the most commonly used [7,51]. Our results suggest that this method of changing the medium every 2 days and reapplying fresh DNA–PDL complex could be adapted for *in vivo* purposes. In our, *in vitro* assay, we were unable to test viability past 9 days since our cell lines reached the limit of confluence. For *in vivo* use, a balance would need to be determined between the least toxic ratio of plasmid–PDL, which can be administered and tolerated for prolonged periods of time. We observed *in vitro* that repetitive doses of PDL result in increased expression and are concentration dependent. This, however, also directly influences cell viability with longer exposure to PDL at higher concentrations resulting in less viability. The preference for PDL uptake by SH-SY5Y cells also opens the possibility for further studies into its use at higher concentrations to target these cells detrimentally.

According to size classification, peptides are defined as anything between 2 and 60 amino acids [52,53], while proteins are classed as anything larger [21], but there is not an official border between peptide and protein size. The commercially available PDL we use forms different size fragments, ranging from 70 to 150 amino acids, and therefore is classed as a protein. Hence, we cannot strictly define it as a CPP. We, therefore, suggest placing it in its own category and have coined it a cell-penetrating protein (CPro).

In seeking alternative transfection vectors [54], the most important features are high transduction capacity, persistent chronic transfection, low toxicity, and inexpensive production costs. Here, we demonstrate that PDL serves as an alternative nonviral vector that possesses the aforementioned requirements and can transfect mammalian cells.

In this study, we transfected cells with varying fragment sizes of PDL (70–150 amino acids). Further investigation needs to be carried out to determine if in this size range there is a fragment size that interacts optimally with plasmids or drug compounds. Additional testing in different plasmid sizes also needs to be performed to fully evaluate its potential as an all-purpose nonviral transfecting reagent.

Building on the results, we have seen with PDLs preferential uptake with DNA in neuroblastoma cells that it would be interesting to evaluate its capacity to transport RNA through the cell membrane. This would open new possibilities to target using siRNAs certain genes related to neuroblastomas such as MYCN, which is overexpressed in more than 25% of high-risk diagnosed patients [55,56]. Other candidates for targeting include the ST8SIA1 and B4GALNT1 genes, which are directly involved in the synthesis of GD2 [57,58], a glycosylated lipid molecule belonging to the class of glycosphingolipids, which are involved in the adhesion of cancerous cells to the extracellular matrix.

These preliminary results show that PDL is a promising candidate as a vehicle in gene therapy with preferential uptake by SH-SY5Y cells, opening further possibilities to explore its use for the treatment of human neuroblastoma.

Author Contributions: Conceptualization, M.S.-M., E.F.; Methodology, M.S.-M., G.M.-N., E.F.; Formal analysis: M.S.-M., G.M.-N., A.B.-Z., L.H., E.F.; Supervision, E.F.; Writing original draft, M.S.-M., Writing, review and editing, M.S.-M., G.M.-N., A.B.-Z., L.H., E.F., Funding acquisition, E.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been supported in part by grants RTI2018-098969-B-100 and AC19/00009 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, by Grant PROMETEO/2017/060 from Generalitat Valenciana (Spain), by H2020 FET Open grant NeuraVIPeR and by the Bidons Egara Research Chair of the University Miguel Hernández.

Data Availability Statement: Data can be available upon request from the authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wirth, T.; Parker, N.; Ylä-Herttuala, S. History of gene therapy. *Gene* **2013**, *525*, 162–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. High, K.A.; Roncarolo, M.G. Gene Therapy. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 455–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Thorne, B.; Takeya, R.; Vitelli, F.; Swanson, X. Gene Therapy. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2018**, *165*, 351–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Anguela, X.M.; High, K.A. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu. Rev. Med.* **2019**, *70*, 273–288. [[CrossRef](#)]
5. Thomas, C.E.; Ehrhardt, A.; Kay, M.A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 346–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Al Qtaish, N.; Gallego, I.; Villate-Beitia, I.; Sainz-Ramos, M.; Lopez-Mendez, T.B.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; Soto-Sánchez, C.;

-
- Martínez-Navarrete, G.; Fernandez, E.; et al. Niosome-Based Approach for In Situ Gene Delivery to Retina and Brain Cortex as Immune-Privileged Tissues. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 198. [[CrossRef](#)]
7. Mashal, M.; Attia, N.; Martínez-Navarrete, G.; Soto-Sánchez, C.; Fernández, E.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; Puras, G.; Pedraz, J.L. Gene delivery to the rat retina by non-viral vectors based on chloroquine-containing cationic niosomes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2019**, *304*, 181–190. [[CrossRef](#)]
 8. Koren, E.; Torchilin, V.P. Cell-penetrating peptides: Breaking through to the other side. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 385–393. [[CrossRef](#)]
 9. Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010–16017. [[CrossRef](#)]
 10. Derossi, D.; Joliot, A.H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450. [[CrossRef](#)]
 11. Delcroix, M.; Riley, L.W. Cell-Penetrating Peptides for Antiviral Drug Development. *Pharmaceutics* **2010**, *3*, 448–470. [[CrossRef](#)]
 12. Guidotti, G.; Brambilla, L.; Rossi, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 406–424. [[CrossRef](#)]
 13. Farkhani, S.M.; Valizadeh, A.; Karami, H.; Mohammadi, S.; Sohrabi, N.; Badrzadeh, F. Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides* **2014**, *57*, 78–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 14. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 850–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 15. Nakase, I.; Akita, H.; Kogure, K.; Gräslund, A.; Langel, U.; Harashima, H.; Futaki, S. Efficient Intracellular Delivery of Nucleic Acid Pharmaceuticals Using Cell-Penetrating Peptides. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1132–1139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 16. Wu, Y.; Xie, G.; Xu, Y.; Ma, L.; Tong, C.; Fan, D.; Du, F.; Yu, H. PEP-1-MsrA ameliorates inflammation and reduces atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *J. Transl. Med.* **2015**, *13*, 316. [[CrossRef](#)]
 17. Liu, B.R.; Li, J.-F.; Lu, S.-W.; Lee, H.-J.; Huang, Y.-W.; Shannon, K.B.; Aronstam, R.S. Cellular Internalization of Quantum Dots Noncovalently Conjugated with Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 6534–6543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 18. Jain, M.; Venkatraman, G.; Batra, S.K. Cell-penetrating peptides and antibodies: A new direction for optimizing radioimmunotherapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 973–977. [[CrossRef](#)]
 19. Lehto, T.; Kurrikoff, K.; Langel, Ü. Cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9*, 823–836. [[CrossRef](#)]
 20. Eguchi, A.; Akuta, T.; Okuyama, H.; Senda, T.; Yokoi, H.; Inokuchi, H.; Fujita, S.; Hayakawa, T.; Takeda, K.; Hasegawa, M.; et al. Protein Transduction Domain of HIV-1 Tat Protein Promotes Efficient Delivery of DNA into Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26204–26210. [[CrossRef](#)]
 21. Agrawal, P.; Bhalla, S.; Usmani, S.S.; Singh, S.; Chaudhary, K.; Raghava, G.P.S.; Gautam, A. CPPsite 2.0: A repository of experimentally validated cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1098–D1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 22. Osman, G.; Rodriguez, J.; Chan, S.Y.; Chisholm, J.; Duncan, G.; Kim, N.; Tatler, A.L.; Shakesheff, K.M.; Hanes, J.; Suk, J.S.; et al. PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2018**, *285*, 35–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 23. Johnson, L.N.; Cashman, S.M.; Kumar-Singh, R. Cell-penetrating Peptide for Enhanced Delivery of Nucleic Acids and Drugs to Ocular Tissues Including Retina and Cornea. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2008**, *16*, 107–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 24. Laemmli, U.K. Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 4288–4292. [[CrossRef](#)]
 25. Wu, G.Y.; Wu, C.H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4429–4432. [[CrossRef](#)]
 26. Hu, Y.; Xu, B.; Ji, Q.; Shou, D.; Sun, X.; Xu, J.; Gao, J.; Liang, W. A mannosylated cell-penetrating peptide-graft-polyethylenimine as a gene delivery vector. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4236–4246. [[CrossRef](#)]
 27. Isaksson, K.; Akerberg, D.; Andersson, R.; Tingstedt, B. Toxicity and Dose Response of Intra-Abdominally Administered Poly-L-Alpha-Lysine and Poly-L-Glutamate for Postoperative Adhesion Protection. *Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur.* **2010**, *44*, 17–22. [[CrossRef](#)]

-
28. Zhou, X.H.; Klibanov, A.L.; Huang, L. Lipophilic polylysines mediate efficient DNA transfection in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1065*, 8–14. [[CrossRef](#)]
 29. Kim, Y.H.; Baek, N.S.; Han, Y.H.; Chung, M.-A.; Jung, S.-D. Enhancement of neuronal cell adhesion by covalent binding of poly-D-lysine. *J. Neurosci. Methods* **2011**, *202*, 38–44. [[CrossRef](#)]
 30. Barrett, L.B.; Logan, A.; Berry, M.; Ying, W.; Gonzalez, A.M.; Baird, A.; Seymour, L.W. Targeted transfection of neuronal cells using a poly(D-lysine)-cholera-toxin b chain conjugate. *Biochem. Soc. Trans.* **1999**, *27*, 851–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 31. Barrett, L.B.; Berry, M.; Ying, W.-B.; Hodgkin, M.N.; Seymour, L.W.; Gonzalez, A.-M.; Read, M.L.; Baird, A.; Logan, A. CTb targeted non-viral cDNA delivery enhances transgene expression in neurons. *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 429–438. [[CrossRef](#)]
 32. Kim, T.-G.; Kang, S.-Y.; Kang, J.-H.; Cho, M.-Y.; Kim, J.-I.; Kim, S.-H.; Kim, J.-S. Gene Transfer into Human Hepatoma Cells by Receptor-Associated Protein/Polylysine Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 326–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 33. Mirmiran, A.; Schmitt, C.; Lefebvre, T.; Manceau, H.; Daher, R.; Oustric, V.; Poli, A.; Lacapère, J.-J.; Moulouel, B.; Puy, H.; et al. Erythroid-Progenitor-Targeted Gene Therapy Using Bifunctional TFR1 Ligand-Peptides in Human Erythropoietic Protoporphyrin. *Am. J. Hum. Genet.* **2019**, *104*, 341–347. [[CrossRef](#)]
 34. Konstan, M.W.; Davis, P.B.; Wagener, J.S.; Hilliard, K.A.; Stern, R.C.; Milgram, L.J.H.; Kowalczyk, T.H.; Hyatt, S.L.; Fink, T.L.; Gedeon, C.R.; et al. Compacted DNA Nanoparticles Administered to the Nasal Mucosa of Cystic Fibrosis Subjects Are Safe and Demonstrate Partial to Complete Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Reconstitution. *Hum. Gene Ther.* **2004**, *15*, 1255–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 35. Sela, M.; Zisman, E. Different roles of D-amino acids in immune phenomena. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1997**, *11*, 449–456. [[CrossRef](#)]
 36. Verdurmen, W.P.R.; Bovee-Geurts, P.H.; Wadhvani, P.; Ulrich, A.S.; Hällbrink, M.; van Kuppevelt, T.H.; Brock, R. Preferential Uptake of L- versus D-Amino Acid Cell-Penetrating Peptides in a Cell Type-Dependent Manner. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1000–1010. [[CrossRef](#)]
 37. Louis, C.U.; Shohet, J.M. Neuroblastoma: Molecular pathogenesis and therapy. *Annu. Rev. Med.* **2015**, *66*, 49–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 38. Ara, T.; Declerck, Y.A. Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 645–657. [[CrossRef](#)]
 39. Kumar, M.D.; Dravid, A.; Kumar, A.; Sen, D. Gene therapy as a potential tool for treating neuroblastoma—a focused review. *Cancer Gene Ther.* **2016**, *23*, 115–124. [[CrossRef](#)]
 40. Rubio-Zapata, H.A.; Rembao-Bojorquez, J.D.; Arango-Rodriguez, M.L.; Dupouy, S.; Forgez, P.; Martinez-Fong, D. NT-polyplex: A new tool for therapeutic gene delivery to neuroblastoma tumors. *Cancer Gene Ther.* **2009**, *16*, 573–584. [[CrossRef](#)]
 41. Chabner, B.A.; Roberts, T.G. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 65–72. [[CrossRef](#)]
 42. Lukashev, A.N.; Zamyatnin, A.A. Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives. *Biochem. Biokhimiia* **2016**, *81*, 700–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 43. Liang, W.; Gong, H.; Yin, D.; Lu, S.; Fu, Q. High-Molecular-Weight Polyethyleneimine Conjugated Pluronic for Gene Transfer Agents. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1094–1101. [[CrossRef](#)]
 44. Sørensen, S.J.; Sørensen, A.H.; Hansen, L.H.; Oregaard, G.; Veal, D. Direct Detection and Quantification of Horizontal Gene Transfer by Using Flow Cytometry and gfp as a Reporter Gene. *Curr. Microbiol.* **2003**, *47*, 129–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 45. Zagorovsky, K.; Chou, L.Y.T.; Chan, W.C.W. Controlling DNA–nanoparticle serum interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 13600–13605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 46. Martín-Montañez, E.; López-Téllez, J.F.; Acevedo, M.J.; Pavía, J.; Khan, Z.U. Efficiency of gene transfection reagents in NG108-15, SH-SY5Y and CHO-K1 cell lines. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2010**, *32*, 291–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 47. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836–5840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

-
48. Suzuki, T.; Futaki, S.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-rich Peptides. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2437–2443. [[CrossRef](#)]
 49. van de Wetering, P.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.; Hennink, W.E.; Storm, G. Comparative Transfection Studies of Human Ovarian Carcinoma Cells in Vitro, Ex Vivo and in Vivo with Poly(2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate)-Based Polyplexes. *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 156–165. [[CrossRef](#)]
 50. Sokolova, V.; Rojas-Sánchez, L.; Białas, N.; Schulze, N.; Epple, M. Calcium phosphate nanoparticle-mediated transfection in 2D and 3D mono- and co-culture cell models. *Acta Biomater.* **2019**, *84*, 391–401. [[CrossRef](#)]
 51. Mashal, M.; Attia, N.; Puras, G.; Martínez-Navarrete, G.; Fernández, E.; Pedraz, J.L. Retinal gene delivery enhancement by lycopene incorporation into cationic niosomes based on DOTMA and polysorbate 60. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2017**, *254*, 55–64. [[CrossRef](#)]
 52. Kalafatovic, D.; Giralt, E. Cell-Penetrating Peptides: Design Strategies beyond Primary Structure and Amphipathicity. *Molecules* **2017**, *22*, 1929. [[CrossRef](#)]
 53. Kardani, K.; Bolhassani, A. Cppsite 2.0: An Available Database of Experimentally Validated Cell-Penetrating Peptides Predicting their Secondary and Tertiary Structures. *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 166703. [[CrossRef](#)]
 54. Lentz, T.B.; Gray, S.J.; Samulski, R.J. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *48*, 179–188. [[CrossRef](#)]
 55. Marrano, P.; Irwin, M.S.; Thorner, P.S. Heterogeneity of MYCN amplification in neuroblastoma at diagnosis, treatment, relapse, and metastasis. *Genes Chromosomes Cancer* **2017**, *56*, 28–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 56. Schwab, M. Amplification of N-myc as a prognostic marker for patients with neuroblastoma. *Semin. Cancer Biol.* **1993**, *4*, 13–18. [[PubMed](#)]
 57. Doronin, I.I.; Vishnyakova, P.A.; Kholodenko, I.V.; Ponomarev, E.D.; Ryazantsev, D.Y.; Molotkovskaya, I.M.; Kholodenko, R.V. Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 58. Sorokin, M.; Kholodenko, I.; Kalinovsky, D.; Shamanskaya, T.; Doronin, I.; Konovalov, D.; Mironov, A.; Kuzmin, D.; Nikitin, D.; Deyev, S.; et al. RNA Sequencing-Based Identification of Ganglioside GD2-Positive Cancer Phenotype. *Biomedicines* **2020**, *8*, 142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Agradecimientos

Es imperativo nombrar a mi director de tesis Eduardo Fernández en primer lugar, ya que sin su apoyo y confianza nunca hubiera podido llevar a cabo este trabajo.

Mención especial también a mi cotutora de tesis Gema Martínez, que me ha exigido como siempre al máximo y que me ha hecho dar siempre lo mejor de mí, adquiriendo unas habilidades que de otra forma no hubiera sido posible.

Agradezco también a los técnicos Sonia, Juanma y Desi su ayuda siempre desinteresada y en general a toda la familia del departamento de neuroprótesis.

Sin el apoyo de mi familia, de mis padres y hermanas y sobre todo, mi esposa Isabel, y mis hijos Nadia y Akira nunca hubiera sido posible llegar hasta aquí. Gracias por vuestra ayuda. Os quiero.

Y por último agradezco a todos mis amigos la confianza depositada en mi cuando les conté que iba a empezar a estudiar pasados los 40, porque nunca dudaron de mí.