



## CIENCIAS BIOMÉDICAS

### Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

# Nanoportadores para transfección de ácidos nucleicos y aplicaciones biotecnológicas

Fidel Antonio Castro Smirnov <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1988-6599>

Bernard S. López <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5088-0155>

Sandrine Ragu <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9023-8770>

Elodie Dardillac <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2069-8309>

Eduardo Ruiz Hitzky <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4383-7698>

Pilar Aranda <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2196-0476>

Olivier Piétrement <sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0018-7202>

Fernando Guzmán Martínez <sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7612-1488>

David Adame Brooks <sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5973-1268>

Jean Rémi Bertrand <sup>7</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0570-1661>

Jeanne Ayache <sup>7</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3733-2132>

Eric Le Cam <sup>7</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6832-6117>

<sup>1</sup> Universidad de las Ciencias Informáticas. La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Instituto Cochin, INSERM U1016, UMR 8104 CNRS, Universidad de Paris, Francia

<sup>3</sup> Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC), España

<sup>4</sup> Laboratorio Interdisciplinario Carnot de Bourgoña, CNRS UMR 6303, Universidad de Bourgoña, Francia

<sup>5</sup> Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas (INSTEC), La Habana, Cuba

<sup>6</sup> Centro de Biofísica Médica (CBM), Universidad de Oriente (UO), Santiago de Cuba, Cuba

<sup>7</sup> Instituto de Cancerología Gustave-Roussy (IGR), Paris, Francia

\* Autor para la correspondencia: [fide@uci.cu](mailto:fide@uci.cu); [fsmirnov@yahoo.com](mailto:fsmirnov@yahoo.com)

## RESUMEN

### Palabras clave

Nanomateriales; sepiolita; ADN; células; transfección

**Introducción.** Este trabajo se centró en la síntesis, caracterización físicoquímica, evaluación de su bioactividad y aplicaciones biomédicas de nuevos nanomateriales biohíbridos. La sepiolita es un silicato natural nanofibroso que presenta atractivas características como nanoportador para la liberación de ácidos nucleicos en células, entre otras aplicaciones innovadoras en el área de las ciencias de la vida y de la biotecnología. **Métodos.** La caracterización físico-química y evaluación biológica de los biohíbridos fue realizada usando procedimientos y técnicas novedosas, incluyendo entre otras AFM, TEM, microscopía confocal, TLVM, FTIR, Potencial Zeta, UV-vis, FACS, Western-blot, RT- qPCR. **Resultados.** Se obtuvieron nuevos biohíbridos mediante ensamblado de ácidos nucleicos con nanofibras de sepiolita. Se propusieron sus mecanismos de internalización y respuesta celular. Demostramos que la sepiolita es un nanoportador prometedor para la transferencia estable no-viral de ADN plasmídico en bacterias, células de mamíferos y humanas, con eficiencia optimizada. Debido a su capacidad de anclar varias biomoléculas, la sepiolita constituye también un nanoportador para la vectorización simultánea de diferentes moléculas biológicas, incluyendo proteínas, nucleasas y anticuerpos. Adicionalmente, obtuvimos nuevos protocolos para aumentar significativamente la eficiencia de transformación bacteriana, y para la extracción de ADN de



bacterias, mediante métodos rápidos, seguros y económicos que no requieren la preparación de células competentes, representando una ventajosa alternativa a los costosos *kits* comerciales. En conclusión, la sepiolita es un producto de bajo costo, baja toxicidad y fluorescencia natural, con facilidad y conveniencia en métodos de síntesis de biohíbridos sepiolita/ADN, con posibilidad de aumentar su eficiencia de transfección, que junto a potenciales desarrollos futuros, representa una atractiva nanoplataforma para aplicaciones en nanomedicina y nanobiotecnología.

## Nanocarriers for nucleic acids transfection and biotechnological applications

### ABSTRACT

**Introduction.** This paper focuses on the synthesis, physicochemical characterization, bioactivity evaluation, and innovative applications of new biohybrid nanomaterials. Sepiolite is a nanofibrous natural silicate that represents a very attractive nanocarrier for nucleic acids delivery into cells, among other innovative applications in life sciences and biotechnology. **Methods.** The physicochemical characterization and the bioactivity evaluation of biohybrids were performed using advanced techniques and procedures, including AFM, TEM, Confocal Microscopy, TLVM, FTIR, Z-potential measurements, UV-vis, FACS, Western blot, RT-qPCR, among others. **Results.** New biohybrids were obtained, based on the assembly of nucleic acids with sepiolite nanofibers. The mechanisms of cell internalization and response to sepiolite exposure were proposed. We demonstrated that sepiolite is a promising nanocarrier for the non-viral and stable transfer of plasmid DNA into bacteria, mammalian and human cells, with an optimized efficiency. Due to its ability to bind various biomolecules, sepiolite could be used as a nanocarrier for the simultaneous vectorization of diverse biological molecules, including proteins, nucleases and antibodies. In addition, we obtain new protocols for both, strongly improving bacterial transformation efficiency, and to extract plasmids from bacteria, in a rapid, convenient and inexpensive method that doesn't require competent cell preparation, representing an advantageous alternative to onerous commercial kits. As a conclusion, Because of the low cost of sepiolite, its low toxicity, its natural fluorescence, the ease and convenience of sepiolite/DNA synthesis methods, the possibilities of improving the transfection efficiency and additional enticing future developments, sepiolite represents a very attractive nanoplatform for potential applications in nanomedicine and nanobiotecnology.

### Keywords

Nanomaterials; sepiolite; DNA; cells; transfection

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos nanoportadores basados en materiales biohíbridos para la transferencia no viral de genes (transfección génica) constituye una aproximación prometedora para el tratamiento de desórdenes genéticos, enfermedades cardiovasculares, VIH, Alzheimer, esclerosis múltiple y cáncer. <sup>(1-4)</sup>

La ingeniería del genoma constituye una atractiva perspectiva para la terapia génica y para el desarrollo de nuevos modelos biológicos, de interés para investigaciones tanto académicas y aplicadas en agronomía, biotecnología y medicina. Estas estrategias están basadas en la transferencia estable de ADN en células de mamíferos y humanas. Una limitación que presentan los métodos convencionales de tipo

viral, físicos o químicos, es que pueden transferir sólo ADN. Por otro lado, para posibles aplicaciones nanomédicas como liberación controlada y dirigida de fármacos, al igual que la edición dirigida del genoma, se hace necesaria la transferencia simultánea de varias biomoléculas junto a los ácidos nucleicos, como nucleasas o anticuerpos que puedan reconocer antígenos de membrana específicos. <sup>(5)</sup>

Entre el amplio grupo de minerales de arcilla, la sepiolita es un silicato natural hidratado de magnesio, microcristalino y de morfología nanofibrosa, cuyas particularidades físico-químicas como alta superficie específica, actividad superficial y elevada micro/nano porosidad, la hacen capaz de interactuar con diferentes biomoléculas como polisacáridos, lípidos, proteínas y virus, dando lugar a una amplia variedad de biona-

nocompositos<sup>(6)</sup> En los últimos años se ha investigado la sepiolita y su aplicación como un atractivo nanoportador para la vectorización no viral de múltiples moléculas biológicas debido a sus dimensiones nanoescalares, y a su morfología fibrosa.

De esta última ventaja podrían surgir preocupaciones para la salud humana por posibles efectos similares a los asbestos. No obstante, dada la naturaleza superficial muy diferente entre ambos minerales fibrosos la sepiolita no presenta la toxicidad carcinogénica típica del amianto (asbestosis).<sup>(7)</sup> Estas inquietudes revisten especial importancia por su presencia ambiental en suelos y depósitos naturales, así como por el amplio empleo de la sepiolita en usos domésticos e industriales, procesos de descontaminación ambiental, formulaciones farmacéuticas y más recientemente en sus potenciales usos en materiales avanzados y nanotecnología. De esta manera, la posible toxicidad de la sepiolita es un aspecto crucial<sup>(8)</sup> que fue estudiada con todo rigor en el presente trabajo, investigándose por primera vez los mecanismos moleculares, que confirman las condiciones de uso aptas para la salud.

Una cuestión importante en nanobiología representa descifrar los mecanismos de internalización y de respuesta celular de la sepiolita, así como el estudio riguroso de su potencial citotoxicidad, para su uso como nanoportador seguro en el campo de la salud.<sup>(3)</sup>

En el presente trabajo se estudiaron las interacciones entre la sepiolita y diversos ácidos nucleicos, bacterias, células de mamíferos cancerígenas y humanas. Se sintetizaron nuevos materiales biohíbridos que fueron sometidos a una rigurosa caracterización físico-química y evaluación biológica, a la vez que se evaluaron sus potencialidades para la transferencia de ADN y ARN en células, para la extracción y purificación de ADN de bacterias, entre otras atractivas e innovadoras aplicaciones biomédicas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Transfección de ácidos nucleicos con nanoportadores basados en sepiolita

A partir de 2017 fueron reportados nuevos resultados obtenidos con el uso de citometría de flujo, microscopías de fluorescencia y confocal, TEM (siglas en inglés de Transmission Electron Microscopy o microscopía electrónica de transmisión) y TLVM (siglas en inglés de Time-Lapse Video Microscopy o videomicroscopía confocal por lapso de tiempo), que detallaban los mecanismos endocíticos y no endocíticos de internalización celular espontánea de la sepiolita y de los biohíbridos sepiolita/ADN en células de mamífero y cancerígenas humanas, constituyendo la macropinocitosis el mecanismo de entrada principal propuesto.<sup>(9)</sup>

Uno de los resultados más importantes descritos en esta última publicación, fue la estrategia de optimización de la eficiencia de transfección mediante sepiolita/ADN, que involucraba la incubación previa de las células con inhibidores de endocitosis.

La transfección implica múltiples pasos, incluida la unión celular, la internalización y la liberación al núcleo de las células. La cloroquina, una base débil que puede penetrar rápidamente la membrana plasmática, se acumula en vesículas ácidas y aumenta el pH del compartimento ácido.<sup>(10)</sup> La prevención de la acidificación del endosoma inhibe posteriormente la acción de enzimas hidrolíticas, como proteasas y nucleasas.<sup>(11)</sup> Además, la cloroquina causa inflamación y ruptura de las vesículas endosomales, aumentando la presión osmótica asociada al compartimento ácido.<sup>(12)</sup> Debido a que la cloroquina puede neutralizar el compartimento ácido e inducir la ruptura de vesículas endocíticas, se ha reportado por otros métodos que la adición de cloroquina aumenta la eficiencia de la transferencia de ácidos nucleicos.<sup>(11,13)</sup>

Desafortunadamente, la cloroquina también inhibe la internalización de moléculas endógenas bloqueando la vía de la endocitosis mediada por clatrina (CME, siglas en inglés de clathrin-mediated endocytosis). Por lo tanto, durante la exposición a la cloroquina, la eficiencia de la transfección debe de ser la resultante del equilibrio de 2 procesos opuestos, la potencial inhibición de la internalización celular por CME frente a la alteración del endosoma y protección contra la degradación de nucleasas. Sin embargo, en nuestro caso, la cloroquina afectó moderadamente la eficiencia de internalización de la sepiolita (solo la redujo en un 20 %).

Curiosamente, al investigar la eficiencia de la transfección después de la incubación previa de células con cloroquina, se determinó que el tratamiento con cloroquina conduce a un aumento de 200 veces en la eficiencia de transfección en células U2OS humanas (Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells),<sup>(9)</sup> comparada con la prueba de concepto previamente reportada<sup>(2)</sup>. Sorprendentemente, la eficiencia de transfección optimizada en nuestro trabajo (con sepiolita sometida a ultrasonidos más la incubación previa de las células con cloroquina) fue cercana a la que se utilizó con el jet PEI (siglas en inglés de polyethyleneimine), el producto comercial clásico derivado de la polietilenimina.

### La sepiolita como nanoportador para extracción y purificación de ADN

En una primera etapa del presente trabajo se reportó el primer análisis detallado de las interacciones físicas entre la sepiolita y las moléculas de ADN.<sup>(2)</sup> Fue demostrado que es posible modular la eficiencia en su ensamblado con sepiolita mediante procesos de adsorción reversible de diferentes

tipos de estos ácidos nucleicos (plásmidos, genómicos, y oligonucleótidos de simples y dobles cadenas) sobre la sepiolita, y que el ADN previamente adsorbido se puede recuperar preservando la estructura y actividad biológica del ADN. (1-3)

De igual manera, fueron estudiadas las interacciones físicas entre las nanofibras de sepiolita y las membranas celulares bacterianas, que fueron visualizadas y estudiadas mediante TEM. Estas interacciones dan lugar a protocolos de descontaminación bacteriana usando sepiolita. (14)

En consecuencia, teniendo en cuenta los 2 resultados descritos anteriormente, las interacciones sepiolita/bacteria y sepiolita/ADN dan lugar a 2 aplicaciones biotecnológicas (14): i) aumento de la eficiencia de transferencia de ADN en bacterias, y ii) extracción y purificación de plásmidos del ADN de las bacterias.

En un estudio reciente demostramos que el pre-ensamblaje del bionanocomposite sepiolita/DNA como paso previo al método de transformación bacteriana basado en el denominado efecto Yoshida aumenta de manera significativa la eficiencia de transferencia de ADN. Se trata de un método rápido, seguro y barato que no requiere la preparación de células competentes, evitando por tanto el requisito de preparar o comprar bacterias competentes. Mediante la combinación de diferentes mejoras en nuestro protocolo, obtuvimos una eficiencia de transformación de un millón de transformantes por microgramo de ADN en bacterias gramnegativas (*Escherichia coli*). Aunque esta eficiencia es ligeramente menor que la obtenida mediante el uso de productos comerciales usando bacterias competentes, es en gran parte suficiente para la mayoría de aplicaciones relacionadas en biología molecular, representando una buena alternativa a los mismos por la economía de tiempo y recursos financieros.

Por otro lado, la extracción y purificación de ácidos nucleicos constituyen pasos críticos para diversos protocolos de gran importancia, de ahí el interés en disponer de métodos que permitan la separación extractiva de ácidos nucleicos de un determinado medio biológico. En nuestro caso, se consiguen estos procesos con una gran eficiencia, obteniendo ADN o ARN con un alto grado de pureza. Existen métodos comerciales caros basados en la adsorción de plásmidos empleando diversos tipos de resinas de afinidad.

Gracias a un protocolo diseñado en el presente trabajo, (14) fue posible extraer y purificar de manera eficiente el ADN (plásmidos pUC19 que fueron amplificados en bacterias XL2 de *Echerichia coli*) al incubar con sepiolita el lisado bacteriano (en este paso los plásmidos se adsorben en la superficie de la sepiolita), recuperándose posteriormente el ADN previamente adsorbido aplicando una solución de EDTA. La eficiencia de extracción fue de 78,9 µg por cada 20 ml de cultivo de

bacteria en saturación. El índice de pureza fue calculado por la relación  $A_{260}/A_{280}$  (absorbancia a 260 nm para el ADN frente a la absorbancia a 280 nm para proteínas), que para el ADN extraído fue de 1,7. Este resultado, comparado con el valor de 1,8 como relación ideal se considera un buen índice de pureza. Mediante electroforesis, se comprobó que la fracción en el ADN extraído de las diferentes isoformas de los plásmidos, como superenrollados (plásmidos de alta calidad) versus círculos abiertos y lineales (plásmidos alterados) no fue modificada, resultando similares al plásmido pUC19 inicial. La mayor parte de los plásmidos extraídos eran superenrollados (indicador de alta calidad), lo que demuestra que la extracción con sepiolita no alteró la estructura del plásmido. La calidad biológica del plásmido extraído fue confirmada por la digestión con una enzima de restricción. El hecho de que ésta última cortó de manera eficiente el ADN, indicó que el ADN extraído con sepiolita posee suficiente calidad biológica para futuros experimentos de aplicación en biología molecular.

### Aspectos citotxicológicos de la sepiolita

En nuestro trabajo demostramos mediante TEM que el 80 % de las nanofibras de sepiolita provenientes de los yacimientos de Vallecas-Vicalvaro cerca de Madrid, tenían entre 200 nm y 400 nm de largo, con una longitud máxima de 800 nm (en muestras previamente sometidas a irradiación ultrasónica). (2) Igualmente se pudo visualizar mediante TLVM la exclusión espontánea de estas nanofibras de la célula. (9) De acuerdo con las capacidades de exclusión ya reportadas, (2,5) también pudimos confirmar, (9) por experimentos de toxicidad celular, que a la concentración y dosis que adoptamos en nuestros experimentos de transfección del ADN, la sepiolita no es tóxica. Estos primeros estudios de toxicidad se realizaron en células humanas U2OS, mostrando que a 50 ng·µL<sup>-1</sup> las nanofibras no afectaban la viabilidad celular a las 24 horas de contacto, incrementándose la toxicidad al doble de esta concentración. Sin embargo, a las concentraciones utilizadas en los experimentos de transfección (10 ng·µL<sup>-1</sup>), la sepiolita no exhibe toxicidad celular.

La baja toxicidad de la sepiolita en comparación con los asbestos resulta extraordinariamente ventajosa para diversas aplicaciones de este silicato natural. Realmente, la potencial toxicidad de la sepiolita representa un aspecto clave, tanto en lo que respecta a preocupaciones de tipo ambientales, ya que la sepiolita está presente en suelos y depósitos naturales, así como por sus usos domésticos e industriales, en procesos de descontaminación ambiental, y más recientemente en sus potenciales usos en formulaciones farmacéuticas y biomédicas, materiales avanzados y nanotecnología. Debido a que al igual que los asbestos, la sepiolita puede generar el mencionado efecto Yoshida y teóricamente provocar roturas en

el ADN del genoma bacteriano, se han sospechado posibles riesgos carcinogénicos mediante la extrapolación de los efectos observados en bacterias a las células de mamíferos. <sup>(15)</sup> Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, es posible rebatir estas extrapolaciones que podrían corresponder a sobreinterpretaciones: <sup>(14)</sup> En este sentido, debe tenerse en cuenta que el tamaño medio de las bacterias es 50 veces más pequeño que el de las células de mamíferos y que por lo tanto, la relación de tamaño sepiolita/células es muy diferente en el caso de células humanas. Este hecho es muy importante para que las nanofibras puedan alcanzar cualquier compartimento de la célula, como por ejemplo el núcleo celular que contiene el ADN, evitando procesos de rotura y alteraciones genéticas.

La localización y organización del ADN es completamente diferente en células bacterianas y células de mamíferos, esto es en células procariotas *versus* eucariotas:

- Las bacterias son procariotas, lo que significa que no contienen un núcleo, estando el ADN localizado en el citoplasma y, con frecuencia unido a la membrana; por lo tanto, es directamente accesible y potencialmente alterable por la fricción con las nanofibras;
- los mamíferos poseen células eucariotas, lo que significa que contienen un núcleo en el que está ubicado el genoma en los cromosomas; por lo tanto, para atacar directamente el ADN, en este caso las nanofibras de sepiolita deben penetrar en el núcleo celular, lo que no sería inmediato debido a las diferencias de tamaños. Además, los mamíferos han desarrollado mecanismos de protección tanto a nivel celular como del organismo;
- en las dosis utilizadas para la transfección de ADN, la sepiolita (sin fricción) no (o apenas) afecta la viabilidad de las células humanas; <sup>(5,9)</sup>
- además, en caso de que la sepiolita pudiera internalizarse espontáneamente, las células también podrían proceder a su expulsión; <sup>(9)</sup>
- Aparte de estos hechos basados en mecanismos de interacción a nivel celular y molecular, la exposición por inhalación al polvo de sepiolita en ratones no produjo fibrosis ni aumentó la incidencia de tumores. <sup>(16)</sup> Por otro lado, existen estudios epidemiológicos de trabajadores expuestos continuamente al polvo de sepiolita durante varios años que no presentan índices fuera de la estadística en problemas particulares de salud. <sup>(7)</sup>

En ensayos toxicológicos *in vitro* e *in vivo*, así como estudios epidemiológicos, se concluyó que la sepiolita procedente de la Cuenca del Tajo (España), no presenta efectos comparables a los asbestos en relación a los riesgos para la

salud. <sup>(7,17,18)</sup> La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, de la Organización Mundial de la Salud) no clasifica la sepiolita como peligrosa o cancerígena. Concluyendo, los riesgos potenciales de roturas de ADN en el genoma bacteriano potencialmente producidos por sepiolita no se pueden extrapolar de bacterias a células de mamíferos ni humanas. <sup>(7,8,14)</sup>

## Respuestas celulares a la exposición de sepiolita a nivel molecular

En nuestra contribución más reciente, abordamos 3 mecanismos de respuesta de las células humanas al estrés producido por la internalización de nanofibras de sepiolita a nivel molecular. Mostramos que las células responden a la exposición a sepiolita, induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la expresión de citocinas inflamatorias. Esto demuestra que las células son capaces de detectar la presencia de sepiolita y de responder a la misma. De manera sorprendente, la exposición a la sepiolita no altera la distribución del ciclo celular, y no desencadena ni el programa de respuesta al daño del ADN, ni la apoptosis, lo que sugiere que estas fibras no asaltan significativamente el material genético en células de mamíferos. <sup>(8)</sup>

## Otras aplicaciones innovadoras de bionanoplateformas basadas en sepiolita

La transferencia de ADN mediada por nanoportadores basados en sepiolita es controlable y económica para lograr una transfección de eficiencia razonable, aspecto en el que nuestro proyecto se encuentra actualmente en progreso. Además, las características intrínsecas de la sepiolita nos permiten visualizar perspectivas atractivas para el desarrollo de nuevas y elaboradas estrategias de transferencia de ADN. <sup>(5)</sup>

En primer lugar, mostramos que la sepiolita exhibe una fluorescencia natural y no requiere cualquier ingeniería adicional para injertar una sustancia química fluorescente exógena. Detectamos las siguientes longitudes de onda de emisión de la sepiolita: en verde, excitación a 488 nm y emisión de 498 nm a 530 nm; en rojo, excitación a 532 nm y emisión de 542 nm a 685 nm. Aunque la fluorescencia de la sepiolita es relativamente baja, es suficiente para ser detectada dentro de células de mamíferos por microscopía de fluorescencia y confocal láser, por FACS (citometría de flujo) o por tIvm. <sup>(3,6,9)</sup> Por lo tanto, esta fluorescencia natural detectable le confiere 2 interesantes ventajas a la sepiolita como nuevo nanoportador, que permiten seguimiento del destino intracelular de las fibras de sepiolita y del biohíbrido sepiolita/ADN en células de mamífero, incluyendo las humanas. Y finalmente, la selección exclusiva de las células que contienen el nanoportador usando la citometría de flujo, nos permitirá enriquecer la población de células transfectadas, y por ende elevar la eficiencia de transfección. <sup>(5)</sup>

Hemos reportado que la sepiolita puede transferir ADN de forma estable a células de mamíferos, y diseñado estrategias para elevar considerablemente la eficiencia de transfección. En algunas aplicaciones nanomédicas específicas de cotransferencia de ADN y proteínas debería previsiblemente constituir una ventaja significativa. Desafortunadamente, las cargas eléctricas de las proteínas son generalmente diferentes de las del ADN, por lo que no es fácil conseguir cotransferir ADN y proteínas por métodos convencionales. Dado que la sepiolita puede adsorber proteínas <sup>(19)</sup> y ADN, <sup>(2)</sup> esto allana nuevas vías para su posible uso como nano-co-portador simultáneo de ácidos nucleicos y proteínas. A continuación, se muestran 2 ejemplos que ilustran las ventajas de esta potencial tecnología. <sup>(5)</sup>

En terapias molecularmente dirigidas, se hace necesario que el nanoportador se dirija directamente y solo a células específicas (por ejemplo, células cancerosas), evitando internalizarse en células circundantes (por ejemplo, células sanas). La capacidad de unir proteínas debe permitir que la sepiolita se una a los anticuerpos que reconocen antígenos específicos de la membrana celular. El bionanocomposite resultante debe permitir la orientación selectiva del nanoportador a células que sobre-expresan el antígeno de membrana correspondiente. <sup>(5)</sup>

Por otro lado, la edición dirigida del genoma constituye un enfoque prometedor para la corrección *in situ* de un gen mutado mediante una molécula de ADN exógena, que conduce a la restauración de funciones genéticas normales. Tales estrategias se basan en la recombinación homóloga (HR). Desafortunadamente, la HR es ineficiente en células de mamíferos. Ya que la HR puede reparar rupturas de ADN de doble cadena (DSB, siglas en inglés de Double Strand Breaks), una estrategia prometedora para aumentar la frecuencia de la direccionalidad del nanoportador a un gen específico es la generación de un DSB en la secuencia objetivo. El desarrollo de nucleasas de secuencias específicas (*zinc finger*, TALE o la nucleasa sgRNA-Cas9) permite ahora que los DSB requeridos se generen en un lugar específico del genoma de los mamíferos. <sup>(20)</sup>

Varios estudios han señalado la viabilidad de tal enfoque, *ex vivo* en células madre humanas, células primarias y en el hígado de un modelo de ratón de hemofilia B, <sup>(21)</sup> proporcionando así una prueba de concepto para el tratamiento de enfermedades monogénicas por edición del genoma usando nucleasas diseñadas. Sin embargo, la liberación de un plásmido codificante de nucleasa podría resultar en una expresión crónica de nucleasa tras la integración del ADN plasmídico en el genoma celular. Esto puede, en definitiva, poner en peligro la integridad del genoma por escisión de nucleasa fuera de la secuencia diana. Tales limitaciones podrían ser evitadas transfiriendo la nucleasa bajo sus formas proteicas, que

podría cortar la secuencia diana solo una vez. Es importante destacar que la proteína nucleasa no puede integrarse en el genoma y debe ser degradada según su vida media, evitando así la expresión crónica. Por tanto, una estrategia prometedora sería la co-transfección simultánea de la molécula de ADN correctora y la nucleasa (proteína) en las células. Debido a que la sepiolita puede unirse tanto al ADN como a las proteínas, constituye por tanto un muy ventajoso nanoportador para la liberación simultánea de estos 2 tipos de moléculas biológicas. Una limitación potencial de tales estrategias podría ser la liberación de la proteína (nucleasa) de la sepiolita en la célula. Nuevos estudios son por tanto necesarios en el presente proyecto para abordar este punto.

## Conclusiones

Debido al bajo costo, sencillez, viabilidad, conveniencia de los métodos de síntesis descritos en este trabajo, y prometedores desarrollos futuros, los nanoportadores basados en sepiolita ofrecen una nueva y atractiva nanoplataforma para la transferencia de ácidos nucleicos en células de mamíferos y particularmente en células humanas, con potenciales aplicaciones en el campo de la nanomedicina y nanobiotecnología. Al tratarse de nanofibras y no nanopartículas como vector génico no viral, es posible lograr la cotransfección de más de una cadena de ADN, conjuntamente con proteínas o anticuerpos monoclonales, lo cual potencia las perspectivas de trabajo actuales y futuras de este nuevo nano-sistema, incluida la posible edición del genoma. Se prevé que como resultado de las patentes obtenidas y nuevas acciones de investigación en colaboración con instituciones cubanas, se utilicen en la práctica las bases metodológicas para su uso en ingeniería celular (producción de proteínas recombinantes para usos biomédicos, la generación de nuevos modelos transgénicos en animales y plantas, así como en la terapia génica y celular), y en nuevos tratamientos con impacto en diversas enfermedades particularmente oncológicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro Smirnov FA. Physicochemical characterization of DNA-based bionanocomposites using nonafibrous clay minerals: biological applications: Paris 11;2014.
2. Castro Smirnov FA, Piétrement O, Aranda P, Bertrand JR, Ayache J, Le Cam E, *et al.* Physical interactions between DNA and sepiolite nanofibers, and potential application for DNA transfer into mammalian cells. *Scientific reports*. 2016;6:36341.
3. Castro Smirnov FA, Rodríguez Hoyos OE, Guzmán Martínez F, Lopez BS, Piétrement O, Ayache J, *et al.* New biohybrid materials as nanocarriers of nucleic acids, and their biotechnological applications. *Biotechnología Aplicada*. 2017;34(3):3511-4.
4. Ruiz Hitzky E, Darder M, Wicklein B, Fernandes FM, Castro Smirnov FA, del Burgo MAM, *et al.* editors. *Advanced biohybrid materials based on nanoclays for biomedical applications*. *Nanosystems in engineering and medicine*; 2012: International Society for Optics and Photonics.

5. Piétrement O, Castro Smirnov FA, Le Cam E, Aranda P, Ruiz Hitzky E, López BS. Sepiolite as a new nanocarrier for DNA transfer into mammalian cells: proof of concept, issues and perspectives. *The Chemical Record*. 2018;18(7-8):849-57.
6. Ruiz Hitzky E, Darder M, Wicklein B, Castro Smirnov FA, Aranda P. Clay Based Biohybrid Materials for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Clays and Clay Minerals*. 2019;67(1):44-58.
7. Santaren J, Alvarez A. Assessment of the health effects of mineral dusts. The sepiolite case. *Industrial Minerals*. 1994;319:101-17.
8. Ragu S, Dardillac E, Brooks DA, Castro Smirnov FA, Aranda P, Ruiz Hitzky E, *et al.* Responses of human cells to sepiolite interaction. *Applied Clay Science*. 2020;194:105655.
9. Castro Smirnov FA, Ayache J, Bertrand JR, Dardillac E, Le Cam E, Piétrement O, *et al.* Cellular uptake pathways of sepiolite nanofibers and DNA transfection improvement. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-10.
10. Maxfield FR. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *Journal of Cell Biology*. 1982;95(2):676-81.
11. Cotten M, Längle Rouault F, Kirlappos H, Wagner E, Mechtler K, Zenke M, *et al.* Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(11):4033-7.
12. Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological reviews*. 2006;58(1):32-45.
13. Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P. Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Experimental cell research*. 1996;225(1):186-94.
14. Castro Smirnov FA, Piétrement O, Aranda P, Le Cam E, Ruiz Hitzky E, López BS. Biotechnological applications of the sepiolite interactions with bacteria: Bacterial transformation and DNA extraction. *Applied Clay Science*. 2020;191:105613.
15. González Tortuero E, Rodríguez Beltrán J, Radek R, Blázquez J, Rodríguez Rojas A. Clay- induced DNA breaks as a path for genetic diversity, antibiotic resistance, and asbestos carcinogenesis. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-10.
16. Wagner J, Griffiths D, Munday D. Experimental studies with pal-yorskite dusts. *Occupational and Environmental Medicine*. 1987;44(11):749-63.
17. Denizeau F, Marion M, Chevalier G, Cote MG. Absence of genotoxic effects of nonasbestos mineral fibers. *Cell Biology and Toxicology*. 1985;1(2):23-32.
18. Maisanaba S, Pichardo S, Puerto M, Gutiérrez Praena D, Cameán AM, Jos A. Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: a review. *Environmental research*. 2015;138:233-54.
19. Alcántara AC, Darder M, Aranda P, Ruiz Hitzky E. Zein-fibrous clays biohybrid materials. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2012;2012(32):5216-24.
20. Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*. 2013;31(7):397-405.
21. Anguela XM, Sharma R, Doyon Y, Miller JC, Li H, Haurigot V, *et al.* Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood*. 2013;122(19):3283-7.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

### Contribución de los autores

Conceptualización: Fidel Antonio Castro Smirnov, Bernard S. López, Eduardo Ruiz Hitzky, Pilar Aranda, Olivier Piétrement, Fernando Guzmán Martínez

Curación de datos: Fidel Antonio Castro Smirnov, Olivier Piétrement, David Adame Brooks, Sandrine Ragu, Elodie Dardillac, Jean Rémi Bertrand, Jeanne Ayache

Análisis formal: Fidel Antonio Castro Smirnov, Olivier Piétrement, David Adame Brooks, Sandrine Ragu, Elodie Dardillac, Jean Rémi Bertrand

Adquisición de fondos: Fidel Antonio Castro Smirnov, Bernard S. López, Eduardo Ruiz Hitzky, Pilar Aranda, Eric Le Cam

Investigación: Fidel Antonio Castro Smirnov, Olivier Piétrement, DAB, Sandrine Ragu, Elodie Dardillac, Jean Rémi Bertrand, Jeanne Ayache  
Metodología: Fidel Antonio Castro Smirnov, Bernard S. López, Eduardo Ruiz Hitzky, Pilar Aranda, Olivier Piétrement, Jean Rémi Bertrand, Jeanne Ayache

Administración del proyecto: Fidel Antonio Castro Smirnov, Bernard S. López, Eduardo Ruiz Hitzky, Eric Le Cam, Fernando Guzmán Martínez  
Recursos: Fidel Antonio Castro Smirnov, Bernard S. López, Eduardo Ruiz Hitzky, Pilar Aranda, Olivier Piétrement, Fernando Guzmán Martínez, Eric Le Cam

Software: Fidel Antonio Castro Smirnov, Olivier Piétrement, David Adame Brooks

Supervisión: Fidel Antonio Castro Smirnov, Bernard S. López, Eduardo Ruiz Hitzky, Pilar Aranda, Olivier Piétrement, Eric Le Cam, Fernando Guzmán Martínez

Validación: Fidel Antonio Castro Smirnov, Bernard S. López, Eduardo Ruiz Hitzky, Pilar Aranda, Olivier Piétrement

Visualización: Fidel Antonio Castro Smirnov, Eduardo Ruiz Hitzky, Pilar Aranda, Olivier Piétrement, David Adame Brooks, Bernard S. López

Redacción-borrador original: Fidel Antonio Castro Smirnov

Redacción-revisión y edición: Fidel Antonio Castro Smirnov, Eduardo Ruiz Hitzky, Pilar Aranda, Fernando Guzmán Martínez

### Financiación

Este proyecto ha recibido financiamiento de la Embajada de Francia en Cuba, de las instituciones francesas: Universidad Paris-Sud, La Ligue Nationale Contre le Cancer, ANR (Agence Nationale de la Recherche, ANR-14-CE10-0010-02), AFM-Téléthon and INCa (Institut National du Cancer, 2011-1-RT-01, 2011-1-PLBIO-09, 2013-1-PLBIO-14), y en España el CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), MINECO (proyectos MAT2012-31759 and MAT2015-71117-R), y EU COST Action MP1202.

### Cómo citar este artículo

Castro Smirnov FA. Nanoportadores para transfección de ácidos nucleicos y aplicaciones biotecnológicas. *An Acad Cienc Cuba [internet]* 2022 [citado en día, mes y año];12(2):e1156. Disponible en: <http://www.revistacuba.cu/index.php/revacc/article/view/1156>

