

## **NUEVOS MATERIALES BIOHÍBRIDOS COMO NANO-PORTADORES DE ÁCIDOS NUCLEICOS, Y SUS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

**UNIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Universidad de las Ciencias Informáticas.

**AUTOR PRINCIPAL:** Fidel Antonio Castro Smirnov<sup>1,2</sup>

**OTROS AUTORES:** Oscar Edgar Rodriguez Hoyos<sup>2</sup>, Fernando Guzmán Martínez<sup>2</sup>, Olivier Piétrement<sup>3</sup>, Pilar Aranda<sup>4</sup>, Bernard S. Lopez<sup>3</sup>, Eduardo Ruiz- Hitzky<sup>4</sup>, Eric Le Cam<sup>3</sup>, Jean-Rémi Bertrand<sup>3</sup> y Jeanne Ayache<sup>3</sup>.

**INSTITUCIONES:** <sup>1</sup> Universidad de las Ciencias Informáticas, La Habana, Cuba. <sup>2</sup> Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas, La Habana, Cuba. <sup>3</sup> Instituto de Cancerología Gustave- Roussy, Paris, Francia. <sup>4</sup> Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, España.

### **AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:**

Fidel Antonio Castro Smirnov

Dirección: Ave 26 No. 525 e/ Zapata y 35, Nuevo Vedado, Plaza de la Revolución. La Habana 10600.

Correo: [fide@uci.cu](mailto:fide@uci.cu), [fsmirnov@yahoo.com](mailto:fsmirnov@yahoo.com).

Teléfono: 7 835 8200.

### **RESUMEN:**

El presente trabajo se enmarca en un nuevo campo de investigación multidisciplinar ubicado en el estado del arte de la Nanobiotecnología y la Nanomedicina. Concretamente, se centró en la síntesis, caracterización físico – química – biológica y aplicaciones biotecnológicas de nuevos nanomateriales biohíbridos, como parte de estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades de origen genético. Como resultado de este trabajo, se obtuvieron nanomateriales basados en la adsorción de ácidos nucleicos (ADN y ARN) en nanofibras minerales de origen natural (sepiolita), dando lugar a nuevos bionanocomposites. Estos materiales biohíbridos obtenidos fueron sometidos a una profunda caracterización usando técnicas y metodologías novedosas, identificándose que el ADN se adsorbe de manera reversible y eficiente en nanofibras de sepiolita, a través de los grupos silanoles de la sepiolita mediante interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, puentes

de cationes, y fuerzas de Van der Waals. Se observó que la sepiolita puede ser internalizada de manera espontánea por células eucariotas, y se identificaron los mecanismos endocíticos y no endocíticos predominantes de internalización celular. Estos bionanocomposites se utilizaron como un nuevo vector génico para transferir de manera estable ácidos nucleicos en líneas celulares cancerígenas, y se diseñaron estrategias que permitieron incrementar significativamente la eficiencia de transfección. Por primera vez se reporta que las nanofibras de sepiolita constituyen una plataforma para la vectorización de diferentes moléculas biológicas en células mamíferas, con el objetivo de reparar o silenciar un gen defectuoso, o incorporar una nueva función genética.

Como parte de este trabajo se establecieron varios métodos novedosos que han dado lugar a 3 aplicaciones de patentes. Se defendió una tesis doctoral en ciencias biológicas en el Instituto de Cancerología Gustave-Roussy en Paris. Se publicaron 4 artículos internacionales, siendo aceptado el más reciente en Scientific Reports de la Revista Nature. Fue seleccionado para presentarse como Conferencia Invitada en 8 importantes eventos científicos internacionales (con sus respectivas publicaciones), y doce conferencias invitadas en universidades y centros de investigación en Cuba y en el exterior.

## COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

### Introducción

La transferencia de ADN a organismos biológicos se enmarca en el estado del arte de la nanobiotecnología, y constituye un importante reto para la búsqueda de estrategias novedosas en terapia génica y/o para el desarrollo de nuevos modelos biológicos, con gran interés tanto para investigaciones básicas como aplicadas a la medicina y la biotecnología. La búsqueda de nuevos vectores génicos utilizando nanomateriales biohíbridos, también llamados bionanocomposites, forma parte del desarrollo de estrategias para la

transferencia génica no viral<sup>1</sup>. La presente investigación se enmarca en el desarrollo de enfoques prometedores para el tratamiento de enfermedades genéticas, enfermedades cardiovasculares, SIDA, enfermedad de Alzheimer, y varios tipos de cáncer. En este trabajo se presenta la síntesis y caracterización físico-química-biológica de nuevos bionanocomposites, en los que el ADN se adsorbe sobre nanofibras de una arcilla mineral: la sepiolita. Además, se presentan por primera vez nuevos protocolos para la utilización de estos compuestos como vectores génicos para la transferencia de ácidos nucleicos a células de mamíferos.

### Resultados y discusión

***Internalización espontánea de la sepiolita en células mamíferas.*** La sepiolita es un silicato natural magnésico hidratado de morfología micro-nanofibrosa, cuya fórmula teórica general es:

$\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH},\text{F})_4(\text{H}_2\text{O})_{4,8}\text{H}_2\text{O}$ . La naturaleza de la superficie de la sepiolita, que muestra extensas superficies cargadas negativamente, junto con su morfología, hace de la sepiolita una nanoplataforma potencial para la co-transfección de diferentes tipos de moléculas activas. De hecho, se ha demostrado que la sepiolita es capaz de interactuar con polisacáridos, lípidos, proteínas y virus, dando lugar a una amplia variedad de bionanocomposites.

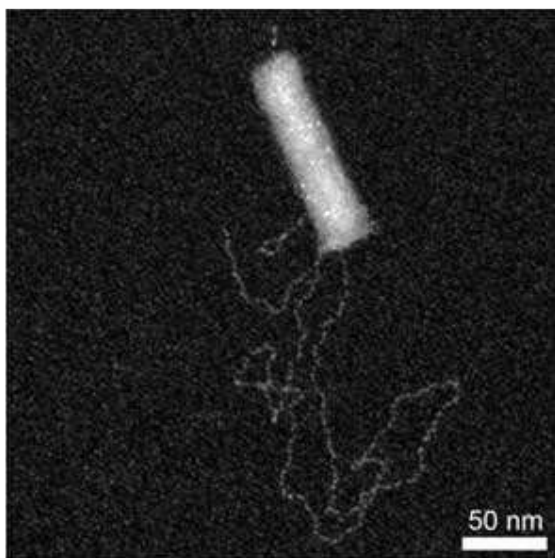
Un primer análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) permitió determinar la distribución del tamaño de las fibras. La anchura media fue de 15 nm y aproximadamente 80% de las fibras presentan una longitud entre 200 nm y 400 nm. Por lo tanto, el tamaño sub-micrométrico combinado con la baja toxicidad descrita de las fibras de sepiolita, la hace potencialmente adecuada para el acceso intracelular en células mamíferas. Se determinaron las concentraciones de trabajo (de 1 a 10 ng/□l) de suspensiones *in-vitro* de sepiolita no tóxicas en distintas líneas celulares. Además, se observó que la sepiolita tiene una gran fluorescencia natural estable (en verde excitación a 488 nm y emisión entre 498 nm y 530 nm; en rojo excitación a 532 nm y emisión entre 542 nm y 685 nm). Al tomar ventaja de esta fluorescencia, es posible seguir su incorporación espontánea en distintas células eucariotas.

Se realizó el análisis por microscopía confocal laser y se confirmó la incorporación celular espontánea de la sepiolita por células V79, utilizando microscopía de vídeo por lapso de tiempo. La citometría de flujo (FACS) nos permitió establecer una cinética de incorporación: 45% y 55% de las células se volvían fluorescentes, después de las 6 horas y después de 24 horas, respectivamente, producto de la internalización de sepiolita fluorescente. Se encontró por TEM que en el citoplasma las fibras de sepiolita estaban rodeadas por membranas o endosomas, lo que sugiere la entrada por endocitosis. Se observaron particularmente estructuras de endocitosis y macropinocitosis convencionales en la unión membrana/sepiolita. También se observó que algunas fibras de sepiolita no estaban rodeadas por membranas endosomales, lo que sugiere una vía alternativa para la endocitosis en la internalización de sepiolita (inserción directa). Mediante análisis por FACS se determinó cuantitativamente la implicación de la macropinocitosis y la endocitosis mediada por clatrina en presencia de inhibidores cloroquina y amiloride. Mientras que la cloroquina reduce sólo el 20% de la internalización de sepiolita en las células, el amiloride la inhibe en un 50%, mostrando que uno de los mecanismos principales de internalización celular de la sepiolita es la macropinocitosis, lo cual resulta consistente con las observaciones previas usando el TEM.

**Síntesis de los bionanocomposites basados en sepiolita y ADN (Sep/DNA).** Con el fin de demostrar la utilización de la sepiolita como un vector de ADN, se mostró que el ADN en realidad podría unirse espontáneamente a la sepiolita (hasta 80 □g de ADN adsorbidos por cada mg de sepiolita), a través del análisis de isotermas de adsorción utilizando la espectrometría UV-vis. Se demostró que los cationes polivalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , espermidina y espermina) estimulan fuertemente la adsorción de ADN de manera

correlacionada directamente a la valencia de los cationes, llegándose hasta cerca de 300 µg de ADN adsorbidos por cada mg de sepiolita en presencia de cationes tetravalentes (espermina). Se observó que la mayoría de las moléculas de ADN son absorbidas instantáneamente, lo que sugiere un predominio de las interacciones electrostáticas y por puente de hidrógeno entre la sepiolita y el ADN. Para estudiar los cambios de la carga eléctrica superficial del bionanocomposite debido a la presencia de cationes multivalentes y el ADN, se determinó el potencial zeta mediante un análisis electrocinético. Se realizó la caracterización para diversas conformaciones de ADN: ADN lineal genómico (promedio 300 bp) que contienen secuencias complejas (ADN de esperma de salmón), plásmido circular (5,7 kb), ADN lineal de cadena doble (dsDNA 15 bp), y ADN lineal de cadena simple (ssDNA 15 nt). El análisis utilizando la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) confirmó que la interacción del ADN con la sepiolita era a través de los grupos silanoles externos de la sepiolita.

Los análisis usando TEM y microscopía de fuerzas atómicas (AFM) mostraron que las fibras de sepiolita se recubrieron con ADN en su superficie exterior (Figura 1).



**Figura 1.** Imagen del bionanohíbrido sepiolita/ADN usando TEM<sup>ii</sup>.

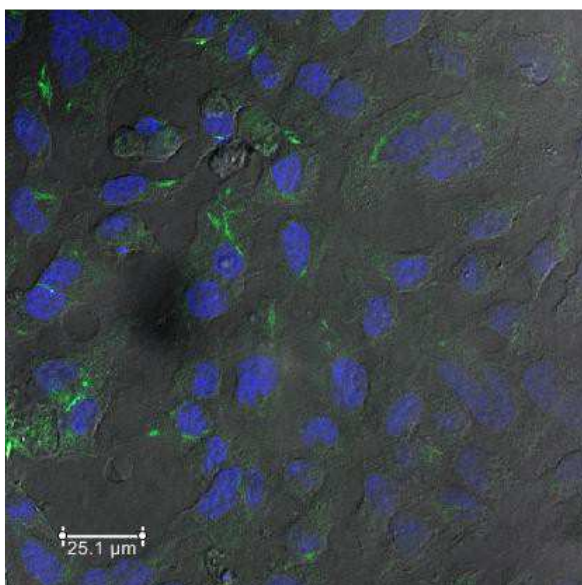
Luego se comprobó la reversibilidad del proceso de adsorción del ADN sobre la sepiolita, es decir, se comprobó la posibilidad de recuperar ADN previamente adsorbido sobre la sepiolita. Para ello se resuspendió el bionanocomposite en ácido etilendiamintetraacético (EDTA), que es un agente quelante de iones metálicos. El desplazamiento y secuestro de poli-cationes favorecedores de la unión de ADN en sepiolita, permitió la recuperación del

ADN previamente adsorbido por puente de cationes. Se estimó por electroforesis la calidad de un plásmido de ADN recuperado por resuspensión con EDTA: la distribución de las diferentes isoformas de ADN (lineal superenrollado, círculo abierto) no se modificó durante el proceso de adsorción a la sepiolita. Esto demuestra que la sepiolita no afecta la calidad biológica del ADN y que el método de incubación con un agente quelante puede ser considerado como un nuevo método para la extracción y purificación de ADN, mucho más económico que otros sistemas comerciales.

**Transferencia de ácidos nucleicos en el núcleo de células mamíferas.** Se

observó en primer lugar que la sepiolita es capaz de transferir de manera muy eficiente el pequeño ARN de interferencia (siRNA FTIC labeled) en células cancerígenas de humano (células de sarcoma A673). Con el fin de probar la capacidad del bionanocomposite para transferir ADN en células mamíferas, se sintetizó un bionanocomposite (Sep/ADN) con el plásmido pCMV que codifica un gen que confiere resistencia a las células al antibiótico G418. La eficiencia de la transferencia de ADN en las células se midió entonces mediante la selección de colonias de células resistentes a G418 después de la exposición de las células a Sep/pCMV. Posterior a 10 días de incubación de las células con el antibiótico G418, se observó la presencia de numerosas colonias resistentes, lo que demuestra la capacidad de la sepiolita de transferir de forma estable un ADN exógeno en células mamíferas como V79 (célula de hámster) o células de osteosarcoma U2OS (humanos).

Posteriormente, se comprobaron nuevas estrategias para elevar la eficiencia de transfección de ADN mediada por sepiolita. Con el fin de desagregar con mayor eficiencia las fibras de sepiolita, se aplicó ultrasonido sobre la suspensión de sepiolita, obteniendo sepiolita sonicada (SSEP). Nuevos bionanocomposites fueron sintetizados con el mencionado plásmido y la sepiolita sonicada (SSEP/ADN) y posteriormente incubados en células mamíferas (Figura 2).



**Figura 2.** Imagen de microscopía confocal láser del bionanocomposite basado en sepiolita sonicada y ADN (con fluorescencia verde), internalizado en células V79 (los nucleos celulares presentan fluorescencia azul)<sup>iii</sup>.

Sorprendentemente, el efecto del ultrasonido sobre la sepiolita estimula dos órdenes de magnitud la eficiencia de transfección en células humanas. De hecho, el número de colonias transfectantes alcanzó 350 por  $\mu$ g de ADN. Se midió además la eficiencia de transfección SSEP/ADN con previa incubación de

las células con cloroquina o amiloride, que pueden favorecer el escape endosomal de las nanofibras. Mientras que el amiloride no produce un efecto significativo, la previa incubación de las células con cloroquina estimuló la eficiencia de transfección en un factor de 3 en células humanas. Estos datos indican que en las células humanas y usando el bionanocomposite SSEP / ADN, la cloroquina favorece el escape endosomal más eficazmente que la inhibición de la internalización del bionanocomposite, por tanto incrementa a su

vez la eficiencia de transfección llegando a 900 colonias resistentes por cada  $\mu$ g de ADN.

**Conclusiones y perspectivas.** Debido al bajo costo, sencillez, viabilidad, conveniencia de los métodos de síntesis descritos en este trabajo, y prometedores desarrollos futuros, los bionanocomposites basados en sepiolita ofrecen una nueva y atractiva nanoplataforma para la transferencia de ácidos nucleicos en células mamíferas y particularmente 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 co-transfección de más de una cadena de ADN, conjuntamente con proteínas o anticuerpos monoclonales, lo cual potencia las perspectivas 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 varias enfermedades de origen genético.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- i Ruiz-Hitzky E. *et al.* Advanced biohybrid materials based on nanoclays for biomedical applications. Proc. SPIE 8548, Nanosystems in Engineering and Medicine, 85480D, doi:10.1117/12.999995 (2012).
- ii Castro-Smirnov, F.A. *et al.* Physical interactions between DNA and sepiolitenanofibers, and potential application for DNA transfer into mammalian cells.”*Sci Rep.*6, 36341, doi: 10.1038/srep36341 (2016).
- iii Castro-Smirnov, F.A. Physicochemical characterization of DNA-based bionanocomposites using nonafibrous clay minerals : biological applications. Thèse de doctorat en Biophysique. Paris 11. <https://www.theses.fr/2014PA112260> (2014).