



Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Universidad de Buenos Aires

## **Estudio de sistemas nanométricos basados en lecitina como vehículos de oligonucleótidos en el tratamiento del cáncer de mama**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
Área Química Biológica

Lic. Gándola Yamila

Directora: Dra. González Lorena

Co-Directora: Dra. Carlucci Adriana

Lugar de Trabajo: Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB), UBA-CONICET.

Febrero 2015

Parte del presente Trabajo de Tesis Doctoral fue publicado en los siguientes trabajos científicos:

a) PUBLICACIONES en REVISTAS INTERNACIONALES con ARBITRAJE

Monteagudo, E., **Gándola Y.**, González L., Bregni C. & Carlucci A.M. (2012) Development, Characterization, and In Vitro Evaluation of Tamoxifen Microemulsions. Journal of Drug Delivery, Article ID 236713, 11 páginas. doi:10.1155/2012/236713.

Pérez S.E., **Gándola Y.**, Carlucci A.M., González L., Turyn D. & Bregni C. (2012). Formulation, Strategies, Characterization, and In Vitro Evaluation of Lecithin-Based Nanoparticles for siRNA Delivery. Journal of Drug Delivery, Article ID 986265, 9 páginas. doi:10.1155/2012/986265.

**Yamila B. Gándola**, Sebastián E. Pérez, Pablo E. Irene, Ana I. Sotelo, Johanna G. Miquet, Gerardo R. Corradi, Adriana M. Carlucci & Lorena Gonzalez. (2014) Mitogenic Effects of Phosphatidylcholine Nanoparticles on MCF-7 Breast Cancer Cells. BioMed Research International Volúmen 2014, Article ID 687037, 13 páginas. doi: 10.1155/2014/687037.

Sebastián Ezequiel Pérez\*, **Yamila Gándola\***, Adriana Mónica Carlucci, Lorena González. Development, Characterization and In Vitro Evaluation of Phosphatidylcholine-Sodium Cholate-Based Nanoparticles for siRNA Delivery to MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Aceptado bajo *minor revision*. Journal of Nanoparticle Research. \* **Contribución Igualitaria.**

b) CAPÍTULO en LIBRO

Innovative strategies for breast cancer therapy: concepts and applications, en E-book: The research and biology of cancer. Lorena González, Ezequiel Monteagudo, Sebastián E. Pérez, **Yamila Gándola**, Adriana M. Carlucci. Cervical, Breast and Prostate Cancer. ISBN: 978-1-922227-71-3. iConcept Press.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los Drs. Turyn y Bregni, por recibirme como integrante en sus respectivos grupos de investigación.

A Lore y Adriana, porque este camino empezó por y con ellas.

A Ana, Joha, Fer, Jorge, Mari, Euge, Romi, Caro, Vero, Vale, Lu (x2), Pablo; porque siempre estuvieron para ayudar y, seguramente de todos aprendí algo.

A los chicos de la Facu, los Biologuitos, los AGBT y a las chicas; fueron tantos los momentos que quedarán para siempre, que ni hace falta mencionar el por qué.

A Franco, Franquito, por todo y especialmente porque sin su ayuda durante la estresante etapa de escritura, la tesis hubiese quedado fatal.

A Lola, por qué no?

A mi familia.

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Cáncer de Mama</b>	<b>1</b>
I.1.1 Generalidades de la patología	1
I.1.2 Clasificación y Bases Moleculares del cáncer de mama	2
<b>I.2 Interferencia por RNA (iRNA) como Terapia</b>	<b>6</b>
I.2.1 Mecanismo y Moléculas gatillantes	6
I.2.2 iRNA como Terapia	11
I.2.3 Principales problemas de la aplicación del iRNA como Terapia	13
I.2.4 Sistemas de Transporte de los pequeños RNA de interferencia (siRNA)	16
<b>I.3 iRNA como Terapia para tratamiento del Cáncer de Mama</b>	<b>21</b>
I.3.1 Estado actual y perspectivas del uso de la tecnología del iRNA para el tratamiento del cáncer	21
I.3.2 Aplicaciones de la nanotecnología para el tratamiento del cáncer	24
<b>I.4 Lecitina como fuente natural de fosfatidilcolina para el diseño de sistemas nanoparticulados</b>	<b>26</b>
<b>I.5 Efectos Biológicos de sistemas nanoparticulados</b>	<b>30</b>
I.5.1 Antecedentes del estudio de los efectos biológicos de sistemas nanoparticulados	31
<b>II. HIPÓTESIS y OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>II.1 Construcción de la Hipótesis</b>	<b>36</b>
<b>II.2 Objetivos</b>	<b>37</b>
<b>III. MATERIALES y MÉTODOS</b>	<b>38</b>
<b>III.1 Materiales</b>	<b>38</b>
III.1.1 Reactivos	38
III.1.2 Línea Celular	39
<b>III.2 Métodos</b>	<b>39</b>
III.2.1 Mantenimiento de la línea celular en cultivo	39
III.2.2 Preparación de las Nanopartículas basadas en Fosfatidilcolina (NPCs)	40
III.2.3 Preparación de las Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio (NMs)	41
III.2.4 Características fisicoquímicas de las NPCs y NMs	42
III.2.5 Ensayos de unión de oligonucleótidos a NPCs y NMs	42
III.2.6 Ensayo de Determinación de la Viabilidad Celular	43
III.2.7 Ensayo de Incorporación de BromodeoxiUridina	44

III.2.8 Ensayos de captación intracelular de siRNA	45
III.2.9 Ensayos de transfección de siRNA	46
III.2.10 Evaluación de silenciamiento de Actina por marcación con Faloidina	47
III.2.11 Procedimiento de muestras para <i>Western Blotting</i> (WB)	48
III.2.12 <i>Western Blotting</i> (WB)	48
III.2.13 Evaluación de los efectos de NPCs y NMs sobre la expresión y activación de moléculas implicadas en señalización celular	49
III.2.14 Inmunofluorescencia del EGFR	50
III.2.15 Análisis Estadístico de los resultados	50

## **IV. RESULTADOS** 51

<b>IV.1 Sección I: Nanopartículas de Fosfatidilcolina (NPCs)</b>	51
IV.1.1 Caracterización <i>in vitro</i> de las NPCs como vehículos de siRNA	51
IV.1.1.1 <i>Propiedades fisicoquímicas de las NPCs</i>	52
IV.1.1.2 <i>Ensayos de unión NPCs-siRNA</i>	56
IV.1.1.3 <i>Ensayos de Citotoxicidad</i>	61
IV.1.1.4 <i>Ensayos de Captación intracelular del siRNA</i>	62
IV.1.1.5 <i>Ensayos de Silenciamiento</i>	64
IV.1.2 Estudio de los efectos biológicos de las NPCs sobre la línea MCF-7	65
IV.1.2.1 <i>Estudio de los efectos de las NPCs sobre la activación de cascadas de señalización implicadas en proliferación y supervivencia celular</i>	66
IV.1.2.2 <i>Estudio de los efectos de las NPCs sobre viabilidad y proliferación celular</i>	70
IV.1.2.3 <i>Estudio del efecto de las NPCs sobre la localización intracelular y contenido proteico de un receptor de membrana</i>	73
<b>IV.2 Sección II: Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio (NMs)</b>	77
IV.2.1 Caracterización <i>in vitro</i> de las NMs como vehículos de siRNA	77
IV.2.1.1 <i>Propiedades fisicoquímicas de las NMs</i>	78
IV.2.1.2 <i>Ensayos de unión NM-siRNA</i>	81
IV.2.1.3 <i>Ensayos de Citotoxicidad</i>	85
IV.2.1.4 <i>Ensayos de captación intracelular del siRNA</i>	88
IV.2.1.5 <i>Ensayos de Silenciamiento</i>	91
IV.2.1.6 <i>Estudio de las NMs como posibles vehículos de DNA plasmídico</i>	95
IV.2.2 Estudio de los efectos biológicos de las NMs sobre la línea MCF-7	99
IV.2.2.1 <i>Estudio de los efectos de las NMs sobre la activación de cascadas de señalización intracelular y viabilidad celular</i>	99
IV.2.2.2 <i>Estudio de los efectos del Colato de Sodio sobre la activación de cascadas de señalización intracelular y viabilidad celular</i>	102

## **V. DISCUSIÓN** 106

<b>V.1 Sección I: Nanopartículas de Fosfatidilcolina (NPCs)</b>	107
V.1.1 Caracterización y evaluación <i>in vitro</i> de las NPCs como vehículos de siRNA	107
V.1.2 Estudio de los efectos biológicos de las NPCs sobre la línea MCF-7	112
V.1.3 Estudio del efecto de las NPCs sobre la localización intracelular y contenido proteico de un receptor de membrana	115

<b>V.2 Sección II: Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio (NMs)</b>	118
V.2.1 Caracterización y evaluación <i>in vitro</i> de las NMs como vehículos de siRNA	118
V.2.2 Estudio de los efectos biológicos de las NMs sobre la línea MCF-7	123

## **VI. CONCLUSIONES**

129

<b>VI.1 Nanopartículas de Fosfatidilcolina (NPCs)</b>	112
---	-----

<b>VI.2 Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio (NMs)</b>	130
---	-----

<b>VI.3 Conclusiones generales</b>	131
------------------------------------	-----

## **VII. RESUMEN**

132

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

134

## ABREVIATURAS

AGO: proteína Argonauta

AKT: proteína kinasa B

BCA: ácido bicinconánico

BLBC: cáncer de mama simil basal

BRCA: proteína supresora del crecimiento de cáncer de mama

BSA: seroalbúmina bovina

Buffer: solución reguladora de pH (tampón)

°C: grados Celsius

cap: estructura caperuza (7-metilguanosina trifosfato)

CNTs: nanotubos de carbono

Cols: colaboradores

CYP: citocromo P450

DAG: diacilglicerol

DAGK: diacilglicerol kinasa

DNA: ácido desoxirribonucleico

dsRNA: RNA doble cadena

EDTA: ácido etilén diamino-tetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMT: transición epitelio-mesenquimal

ER: Receptor de Estrógeno

ERK: kinasas reguladas por señales extracelulares

FDA: administración de alimentos y medicamentos (de Estados Unidos)

g: fuerza gravitatoria específica

HEPES: ácido N-2-hidroxietil piperazin-N'-2-etano sulfónico

HER/ErbB: receptor de factor de crecimiento

HRP: peroxidasa de rábano picante

IBC: cáncer de mama inflamatorio

Ig: inmunoglobulina

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1

IR: receptor de insulina

iRNA: interferencia por RNA

JNK: quinasa del amino terminal de c-Jun

JAK: tirosinas quinasa Janus

kDa: kilodalton

MAPK: proteína kinasa activada por mitógenos

MEK: kinasa de MAPK/ERK

miRNA: micro RNA

mRNA: RNA mensajero

NFκB: factor nuclear κ B

nm: nanómetro

ns: no significativo

OMS: organización mundial de salud

PA: ácido fosfatídico

PBS: buffer fosfato salino

PC: fosfatidilcolina

PC-PLC: fosfolipasa C dependiente de fosfatidilcolina

pDNA: DNA plasmídico

PEG: polietilenglicol

PEI: polietilenimina

PI3K: fosfatidilinositol 3 kinasa

PLCγ: fosfolipasa C gamma

PLD: fosfolipasa D

PLGA: poli(dl-láctico-co-glicólico)

PLL: poli-L-Lisina

PR: Receptor de Progesterona

PTGS: silenciamiento génico post-transcripcional

p38: proteína de la familia de las MAPKs

p53: proteína supresora de tumores codificada por el gen tp53

QDs: puntos cuánticos

Ras: abreviatura de *Rat Sarcoma*; proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina

Raf: *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*; proteína río arriba de MEK

RISC: complejo de silenciamiento inducido por RNA

RNA: ácido ribonucleico

RNasas: enzimas degradadoras de RNA

ROS: especies reactivas del oxígeno

RSK: kinasa ribosomal S6

SEM: error estándar de la media

Ser: Serina

shRNA: RNA pequeños en horquilla

siRNA: pequeños RNA de interferencia

SNALP: partícula estable de lípidos y ácidos nucleicos

Thr: Treonina

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

TNBC: cáncer de mama triple negativo

TLR: Receptor tipo Toll

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

# **INTRODUCCIÓN**

## **I. INTRODUCCIÓN**

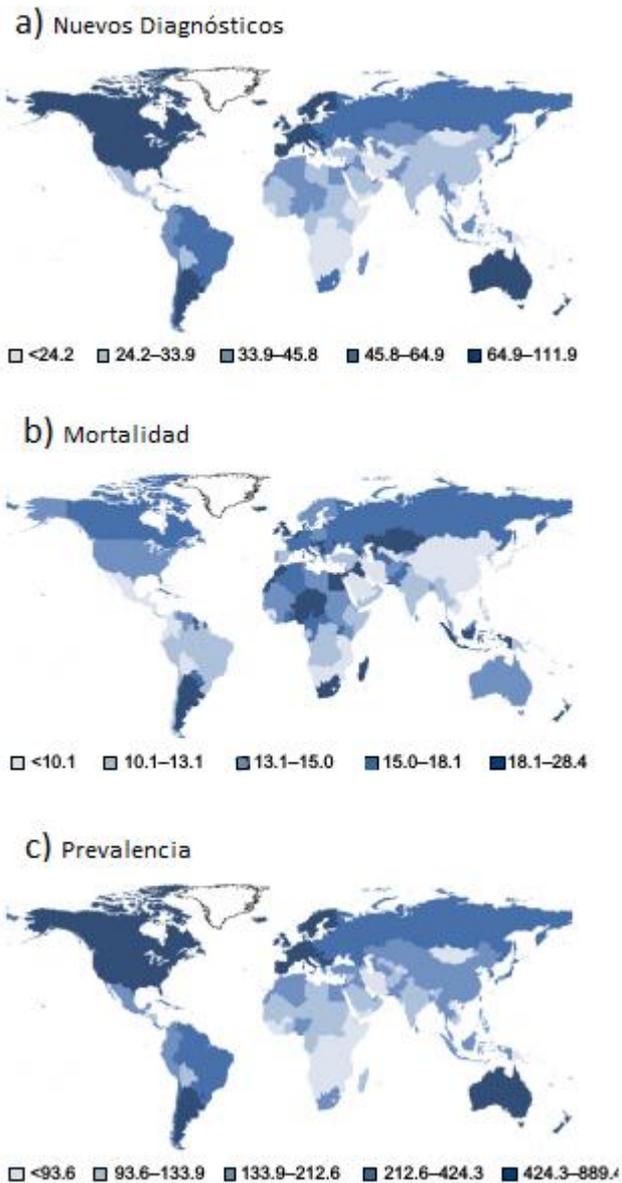
### **I.1 Cáncer de Mama**

#### **I.1.1 Generalidades de la patología**

El cáncer de mama es el segundo tipo más común de cáncer, la quinta causa de muerte en el mundo y la principal causa de muerte por cáncer entre mujeres. La incidencia del cáncer de mama a nivel mundial (figura 1) continúa en aumento. En particular, en Argentina es el tipo de cáncer más recurrente, reportándose un 32 % de los casos entre mujeres (Ferlay y cols., 2015).

En 2012, 1,7 millones de mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama a nivel mundial y más de 500.000 fallecieron como resultado de esta patología (Ferlay y cols., 2015). Usualmente las pacientes con cáncer de mama, fallecen debido a la metástasis a órganos vitales (Cummings y cols., 2014). En ciertos casos de cáncer de mama, el número de muertes por tumores cerebrales derivados de metástasis del tumor primario ha aumentado, ya que las drogas utilizadas para tratar el tumor primario no pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Gori y cols., 2007).

Al igual que el resto de los tipos de cáncer, el cáncer de mama es complejo y heterogéneo, pudiendo encontrar su origen en factores externos (como ser la radiación, compuestos químicos, organismos infecciosos), factores internos (mutaciones, sistema inmune, condiciones hormonales) o una combinación de factores. El factor de riesgo más importante es la presencia de una mutación inactivante de alguno de los genes asociados al cáncer de mama, como por ejemplo BRCA1 y 2 (genes supresores de tumores implicados en la reparación del DNA) o p53 (un factor de transcripción involucrado en la inducción de apoptosis debido a daño en el DNA). Se estima que estas mutaciones son las causante del 5% de todos los casos de cáncer de mama (Campeau y cols., 2008; Gao y cols., 2011).



**Figura 1:** Incidencia de cáncer de mama a nivel mundial. a) Nuevos casos y b) mortalidad cada 100.000 mujeres por año. c) Número estimado de mujeres vivas a los 5 años de realizado el diagnóstico. Las imágenes fueron tomadas de Ferlay J. y col. 2014.

### I.1.2 Clasificación y Bases Moleculares del cáncer de mama

Existen dos tipos principales de cáncer de mama, el **carcinoma ductal**, el más frecuente, y el **carcinoma lobulillar**. El carcinoma ductal es el que tiene su origen en los conductos que transportan la leche desde la mama hasta el pezón; el carcinoma lobulillar es aquel que comienza en las zonas de la mama que producen la leche, llamadas lobulillos.

Independientemente del tipo de cáncer o del origen del mismo, el comportamiento del tumor

depende de su biología subyacente, es decir del patrón de expresión de ciertos genes y proteínas que se sabe están implicados en el desarrollo y progresión del cáncer. Es por esta razón, que desde hace años, se investigan las bases moleculares de esta patología, y por lo cual surgió una clasificación del cáncer de mama en varios subgrupos, principalmente basada en la expresión de tres receptores (Perou y cols., 2000; Sorlie y cols., 2001). Estos son:

- i - Receptor de Estrógenos (ER)
- ii - Receptor de Progesterona (PR)
- iii - Receptor HER2

i – Receptor de Estrógenos:

Los estrógenos, hormonas responsables de las características sexuales femeninas, median procesos fisiológicos relacionados al crecimiento, diferenciación y fisiología del sistema reproductivo, pero además tienen efecto sobre hueso, hígado y el sistema cardiovascular. Existen tres de estas hormonas, la Estrona, el Estradiol y el Estriol, que llevan a cabo sus acciones mediante la unión y activación del Receptor de Estrógenos (May, 2014).

Altos niveles de estrógenos constituyen un factor de riesgo de contraer cáncer de mama, ya que el 70% de los casos de cáncer de mama post-menopáusicos son clasificados como ER+. Los tumores dentro de este subgrupo dependen, para crecer y proliferar, de los estrógenos, los cuales pueden ser captados de la circulación, aunque la principal fuente es la producción local por parte de fibroblastos indiferenciados del tejido mamario que rodean al tumor (Miller y cols., 2006).

Los niveles de expresión de la enzima Aromatasa suelen encontrarse aumentados en los tumores ER+ (Bulun y cols., 1993). Esta enzima es parte de la familia de enzimas del citocromo P450 (CYP) y tiene un rol fundamental en la biosíntesis de los estrógenos ya que participa de la conversión de androestenediona en estrona y de testosterona en estradiol (Van Asten y cols., 2014).

Dado que este subgrupo de tumores necesita de los estrógenos para proliferar, las empresas farmacéuticas han dedicado gran esfuerzo al desarrollo de fármacos con efectos anti-estrogénicos. Una de las estrategias comprende el empleo de inhibidores del receptor de estrógenos; entre ellos se encuentran el Tamoxifeno, el Raloxifeno o el Fulvestrant. En particular, el mecanismo de acción del Tamoxifeno involucra la unión al receptor de estrógenos provocando un cambio conformacional del mismo que interfiere con su capacidad de inducir la expresión de genes dependientes del ER (May, 2014). Otra alternativa terapéutica, fundamentalmente utilizada para mujeres post-menopáusicas, es la terapia basada en inhibidores de la enzima Aromatasa, como el Letrozol, el Anastrozol o el Exemestano, los cuales resultan en una disminución de los niveles de estrógenos (Burstein y cols., 2010; Czajka-Oraniec y cols.,

2010; Van Asten y cols., 2014).

#### ii - Receptor de Progesterona:

La Progesterona es una hormona esteroidea producida en los ovarios, es esencial para el desarrollo del tejido mamario, y también ejerce su acción sobre el cerebro, donde controla el comportamiento reproductivo.

El Receptor de Progesterona presenta 2 isoformas (A y B), actúa como un factor de transcripción activado por ligando, regulando la expresión génica mediante la unión directa o indirecta al DNA en sitios específicos. Ambas isoformas del PR son expresadas en respuesta a la activación del Receptor de Estrógenos (Nagai y cols., 2007), por lo que resulta complicado estudiar y diferenciar los efectos de la progesterona de otras hormonas como los estrógenos.

A diferencia de lo que ocurre para el caso del Receptor de Estrógenos, la importancia de la evaluación de los niveles de expresión del Receptor de Progesterona es muy discutida (Muller y cols., 2008; Olivotto y cols., 2004). La controversia es tal que algunos grupos de investigación llegan a poner en duda la existencia de tumores ER-/PR+ (De Maeyer y cols., 2008). A pesar de lo mencionado anteriormente, la Sociedad Americana de Oncología Clínica (EUA) continúa recomendando la evaluación de dicho receptor en los nuevos casos de cáncer de mama diagnosticados (Hammond y cols., 2010). Esto se debe a que existen numerosos reportes de los efectos antitumorales dados por la inhibición del receptor de progesterona (Giulianelli y cols., 2013; Lanari y cols., 2012; Poole y cols., 2006), como es el caso del fármaco Mifepristona, aunque en la práctica no se utilizan tratamientos antiprogestéricos (Goyeneche y cols., 2015).

#### iii - Receptor HER2:

El Receptor HER2 es una glicoproteína de membrana, con un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio intracelular con actividad Tirosina Kinasa. Pertenece a la familia de receptores ErbB, por lo que también se lo conoce como ErbB2.

Aproximadamente un 20% de los tumores mamarios se caracterizan por presentar una sobre-expresión del receptor HER2 (Miller y cols., 2014; Slamon y cols., 1989). Dado que la auto-fosforilación de HER-2 induce cascadas de señalización intracelulares que provocan la activación de genes relacionados con la proliferación celular (Dankort y cols., 2001), pacientes con tumores HER-2+ poseen un avance más agresivo de la patología, menor supervivencia y peor pronóstico (Dankort y cols., 2001; Slamon y cols., 1987).

El tratamiento de este tipo de tumores suele basarse en la administración del anticuerpo

monoclonal Trastuzumab, el cual reconoce el dominio extracelular del receptor HER2 e inhibe la proliferación de las células tumorales; o en inhibidores de su actividad tirosina kinasa, localizada en su dominio citosólico, como el Lapatinib (Sadeghi y cols., 2014).

En función de la expresión de estos tres tipos de receptores, el cáncer de mama es clasificado como hormono-dependiente (ER+/PR+) u hormono-independiente. Dentro de los tumores estrógenos-independientes existe un subtipo conocido como cáncer de mama triple negativo (TNBC - *Triple Negative Breast Cancer*), en los cuales no se expresa ninguno de los receptores antes mencionados. Aproximadamente un 15 % de los cánceres de mama corresponden a esta categoría (Chen y cols., 2009). El término Triple Negativo es usado para describir varios tipos de tumores de tejido mamario, como por ejemplo el cáncer de mama de tipo basal (BLBC - *Basal-Like Breast Cancer*) (Cheang y cols., 2009) y algunos tipos de tumores “raros” como el adeno-quístico (Khalifeh y cols., 2008). Por lo tanto, el grupo de los TNBC, no es cohesivo en cuanto a su biología; de hecho, dentro de los tumores BLBC se pueden encontrar otros 5 subgrupos de acuerdo a su perfil de expresión génica (Kreike y cols., 2007). Más del 80% de los tumores con mutaciones en el gen BRCA-1 pertenecen a este subgrupo (Chen y cols., 2009). Debido a la falta de ER, PR y HER-2, los pacientes con TNBC no responden a las terapias hormonales actuales. El tratamiento en uso hoy en día es la quimioterapia estándar.

Durante el desarrollo del tejido mamario, otras 2 hormonas son necesarias, el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF - *Epidermal growth factor*) y el Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 (IGF-1 - *Insulin like Growth Factor type I*) (Haslam y cols., 1993; Ruan y cols., 2005); estos factores promueven la proliferación de diversos tipos celulares y el receptor de EGF (EGFR) es estrictamente necesario para la expresión del PR (Ankrapp y cols., 1998), lo que sugiere intercomunicación entre dichos receptores. Además, está reportado que la pérdida de la expresión de PR en tumores ER+ está asociada a la sobre-expresión del EGFR (Rimawi y cols., 2010).

La familia del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico incluye 4 receptores transmembrana, con un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio tirosina-quinasa intracelular: EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4. Las principales vías de señalización intracelular activadas por éstos son las de PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*), Ras (abreviatura de *Rat Sarcoma* - proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina)-Raf (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* - proteína río arriba de MEK)-MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*), y PLC $\gamma$  (*Phospholipase C gamma*) (Brand y cols., 2011).

La activación del EGFR induce proliferación, adhesión y movilidad celular, invasión y angiogénesis. La sobre-expresión del receptor, su activación constitutiva o la desregulación de las vías de señalización que induce pueden promover la formación de tumores, contribuir a la generación de nueva vasculatura en los mismos o incluso facilitar la metástasis, por lo que los tumores con alteraciones en la señalización del

EGFR están asociados a un mal pronóstico. De hecho, la sobre-expresión de EGFR se encuentra frecuentemente en los tumores TNBC y los de tipo inflamatorio (IBC - *Inflammatory Breast Cancer*), siendo ambos muy agresivos (Burness y cols., 2010).

Está reportado que en varios tipos de tumores, las alteraciones del EGFR ocurren en un estadio avanzado de la enfermedad en el cual se cree que es dicho receptor el encargado de promover la migración celular e invasión. Recientemente, se encontró que el EGFR promueve la transición de un fenotipo epitelial polarizado a uno mesenquimal, proceso conocido como transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Masuda y cols., 2012). Se cree que dicho proceso está implicado en el desarrollo del tejido mamario normal, pero también en la progresión de tumores. La vía de Ras-ERK, la cual puede ser gatillada por la fosforilación y consecuente activación del EGFR, también está implicada en la regulación de la EMT, la invasión y metástasis tumoral. La activación de las proteínas conocidas como RSK (*ribosomal S6 kinase*) mediada por ERK induce movilidad e invasión en células de cáncer mesenquimales (Masuda y cols., 2012).

Dado que la expresión aberrante del EGFR ha sido fuertemente ligada a la etiología de diversos tipos de tumores, gran esfuerzo se ha hecho con el fin de lograr inhibir la actividad de este receptor. Cetuximab y Panitumumab, anticuerpos que reconocen el dominio extracelular de unión a ligando del receptor, y Gefitinib o Erlotinib, inhibidores de la actividad tirosina kinasa del EGFR, son algunos ejemplos de los fármacos diseñados y utilizados en ciertos cánceres (Brand y cols., 2011).

Dada la enorme variedad molecular o biológica que presentan los tumores, muchos de ellos no pueden ser encasillados en alguno de los grupos antes mencionados, o aunque sí presenten alguna de esas características, no responden o no se comportan de la misma manera. Además, el fracaso de los tratamientos estándar o la pérdida de eficacia a largo plazo evidencian la necesidad de nuevas herramientas terapéuticas, como por ejemplo la interferencia por RNA.

## **I.2 Interferencia por RNA (iRNA) como Terapia**

### **I.2.1 Mecanismo y Moléculas gatillantes**

La interferencia mediada por RNA (iRNA - *RNA interference*) es un mecanismo de regulación de la expresión génica conservado en prácticamente todos los organismos eucariotas; incluyendo hongos, plantas, protozoos, invertebrados y vertebrados. Este mecanismo generalmente utiliza moléculas de RNA doble cadena de entre 21 y 29 nucleótidos, para generar el silenciamiento selectivo de la expresión de

genes específicos, en base a la homología de secuencia entre el pequeño RNA doble cadena y el gen blanco.

El fenómeno de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS - *PostTranscriptional Gene Silencing*) mediado por RNA de interferencia fue descubierto inicialmente por Fire y colaboradores en 1998, quienes demostraron la capacidad de moléculas de RNA doble cadena (dsRNA - *double stranded RNA*) para inducir silenciamiento génico al introducir directamente dsRNAs purificados en el organismo *Caenorhabditis elegans* (Fire y cols., 1998). Los investigadores inyectaron RNA doble cadena correspondiente a un segmento de 742 nucleótidos del gen *unc22*, que codifica para una proteína involucrada en el control de la función y la estructura muscular, en el cuerpo de nematodos adultos, observando en estos organismos un fenotipo correspondiente a la disminución de la actividad de *unc22*. Independientemente, investigaciones realizadas en diversos organismos (plantas, animales y hongos) llegaron a conclusiones similares y convergieron en un nuevo paradigma de la regulación de la expresión génica.

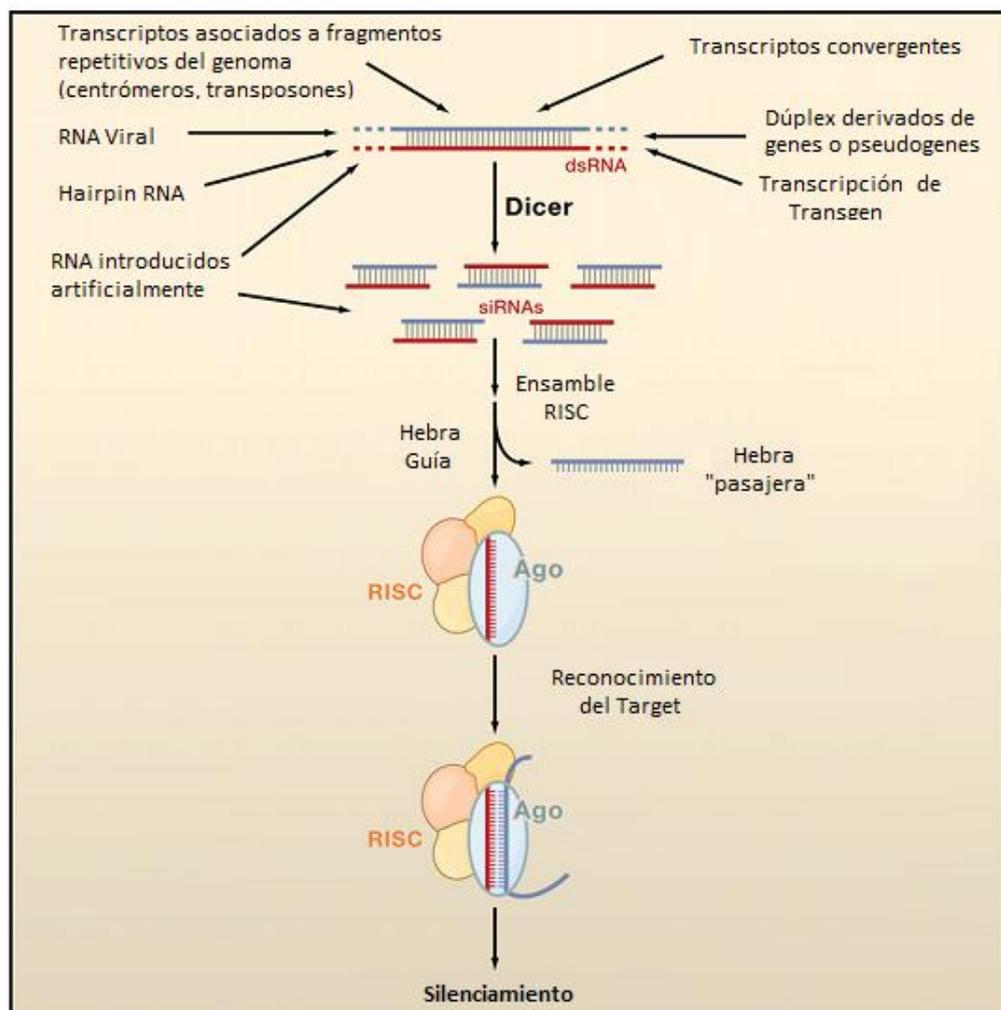
El iRNA, es entonces gatillado por moléculas de dsRNA largas que son detectadas por una ribonucleasa tipo III (RNAsa tipo III) específica de dsRNA, llamada Dicer (figura 2). Esta endonucleasa es capaz de clivar los dsRNAs en fragmentos de RNA doble cadena más pequeños con extremos 3' protuyentes de 2 o 3 nucleótidos, conocidos como pequeños RNA de interferencia (siRNA - *small interfering RNA*) (Bernstein y cols., 2001; Hammond y cols., 2000).

El papel de estos siRNA en el mecanismo de interferencia por RNA fue confirmado por los ensayos realizados por los grupos de Elbashir y de Zamore (Elbashir y cols., 2001; Elbashir y cols., 2001; Zamore y cols., 2000). Elbashir y cols., demostraron que RNAs sintéticos de entre 21 y 23 nucleótidos eran capaces de guiar la degradación de RNA mensajeros (mRNA) homólogos en sistemas libres de células. Por su parte, el grupo de Zamore realizó ensayos en los que separó fracciones de dsRNA procesado y no procesado y demostró que sólo las fracciones que presentaban siRNA eran capaces de llevar a cabo la degradación del RNA mensajero homólogo en sistemas libres de células de *Drosophila melanogaster*.

La actividad nucleasa, encargada de la degradación secuencia específica de los mRNA blancos, fue purificada e identificada como un gran complejo ribonucleoproteico (~160 kDa) llamado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC - *RNA-Induced Silencing Complex*) (Hammond y cols., 2000). Una de las piezas principales de este complejo son las proteínas Argonauta (AGO), las cuales forman su núcleo catalítico (Hammond y cols., 2001). En humanos, hay ocho proteínas pertenecientes a la familia de Argonautas, sin embargo sólo Argonauta2 (AGO2) posee un dominio catalítico para la degradación de RNA (Liu, 2004).

En el proceso de silenciamiento mediado por RNA, los pequeños RNAs son cargados en el complejo RISC, a través de interacción directa con la proteína AGO2. La hebra sentido del siRNA es clivada

por acción de AGO2, y luego es removida y degradada. La hebra antisentido es cargada en el complejo RISC, activándolo (Rand y cols., 2005). Una vez activado RISC, la hebra antisentido cargada en el mismo sirve de guía para la búsqueda de su mRNA complementario; el reconocimiento siRNA-mRNA provoca el clivaje del mRNA (figura 2). El sitio de clivaje del mensajero blanco, queda ubicado a aproximadamente 10 nucleótidos del extremo 5' del siRNA, alineado con el dominio de endonucleasa de AGO2 (dominio PIWI). AGO2 cataliza la ruptura del enlace fosfodiéster del mRNA blanco y luego libera los fragmentos del RNAm clivado, los cuales son finalmente degradados, resultando en el silenciamiento del gen blanco y la disminución de los niveles de su proteína correspondiente (Martinez y cols., 2004; Schwarz y cols., 2004). El complejo activado RISC-siRNA puede ser reciclado durante varias rondas de silenciamiento génico, lo cual es importante al considerar un posible uso terapéutico de este mecanismo (Hutvagner y cols., 2002).



**Figura 2:** Orígenes de los siRNAs. Esquema mostrando cómo diferentes transcritos pueden adoptar estructuras de tipo dsRNA y ser procesadas por Dicer para dar lugar a los siRNAs. Estas moléculas poseen una hebra guía (roja) que es mantenida en el complejo RISC, y otra llamada pasajera (azul) que será degradada. Imagen adaptada de Carthew RW. Y cols., 2009.

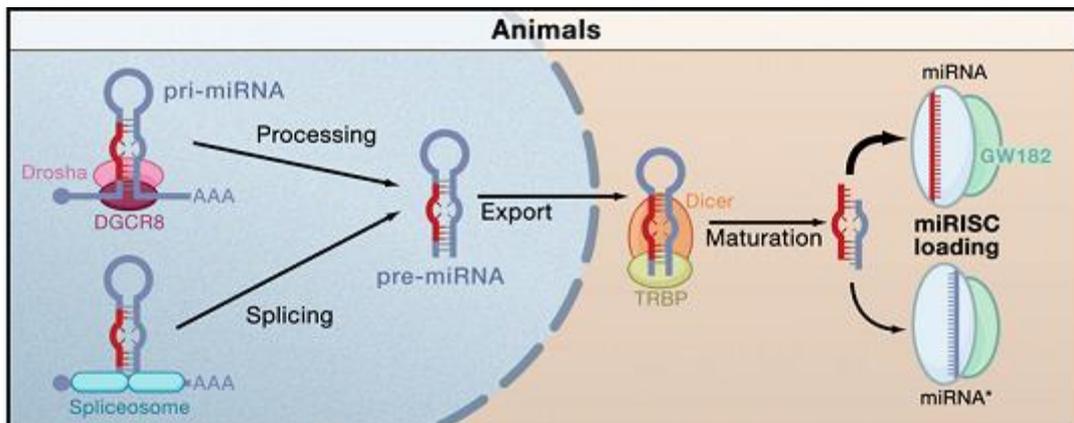
La degradación de mRNA, no es el único camino que puede tomar el silenciamiento mediado por siRNA. Cuando la complementariedad entre el RNA mensajero blanco y la hebra antisentido en el complejo RISC no es total, en lugar de darse la degradación de la molécula de mensajero blanco, se bloquea su traducción. A diferencia del primer proceso, este efecto puede ser ejecutado por cualquiera de las cuatro proteínas AGO descritas en mamíferos. Se cree que ambos procesos son fundamentalmente independientes, aunque pueden superponerse en ciertas situaciones (Carthew y cols., 2009).

Si bien el mecanismo de silenciamiento, una vez detectado el RNA doble cadena pequeño (de 21 a 29 nucleótidos), es el mismo independientemente del origen del RNA gatillante, usualmente se distinguen dos tipos de moléculas de dsRNA centrales en este mecanismo; el **micro RNA (miRNA)** y el **siRNA**. Actualmente se acepta la visión de los miRNAs como reguladores de genes endógenos y los siRNA como mecanismo de defensa ante la presencia de ácidos nucleicos foráneos (Carthew y cols., 2009). La diferencia entre ambas moléculas básicamente está dada por su origen.

Los **miRNAs** son codificados por el propio genoma del organismo; transcritos por la RNA polimerasa II, son poliadenilados y contienen en su extremo 5' la estructura cap (7-metilguanosina trifosfato) (Graves y cols., 2012; Krol y cols., 2004). Como resultado de la transcripción se obtiene un pri-microRNA más largo, que necesita de dos pasos de procesamiento para dar lugar al miRNA maduro (Bartel, 2004), (figura 3, (Carthew y cols., 2009)). El primer paso ocurre en el núcleo, requiere de la formación de una estructura tipo horquilla en el pri-microRNA, la cual es reconocida por una nucleasa de la familia de RNasas III conocida como Drosha, la cual cliva el transcripto dando lugar al pre-microRNA (figura 3). Alternativamente, aunque no usual, pueden generarse pre-microRNAs mediante splicing evitando el primer paso de procesamiento (Okamura y cols., 2007; Ruby y cols., 2007). El segundo paso requiere de la exportación del pre-microRNA al citoplasma, donde la enzima Dicer cliva el extremo que se encuentra como RNA simple cadena, generando el miRNA maduro (figura 3).

Las secuencias exógenas que dan origen a los **siRNA** pueden ser tanto de DNA como de RNA (Ipsaro y cols., 2015), generalmente provenientes de transgenes, transposones, infecciones virales o de la transfección artificial de RNA bicatenario (figura 2). El silenciamiento génico inducido por transgenes y transposones se da cuando los mismos poseen una secuencia antisentido que al ser transcrita genera RNA doble cadena por complementariedad de secuencia con RNA del propio transgen o con RNA de un gen endógeno. El silenciamiento gatillado por una infección viral, suele darse cuando el virus posee su genoma compuesto por RNA doble cadena o cuando genera RNA doble cadena durante su ciclo infectivo. Por último, en el caso del dsRNA que es introducido artificialmente dentro de la célula, éste puede ser de cadena larga o directamente pueden introducirse los siRNAs de 21-23 nucleótidos que serán cargados en el complejo RISC. En el caso de transfectarse cadenas largas de RNA bicatenario, este será reconocido por

la proteína Dicer y clivado para dar los pequeños RNA.

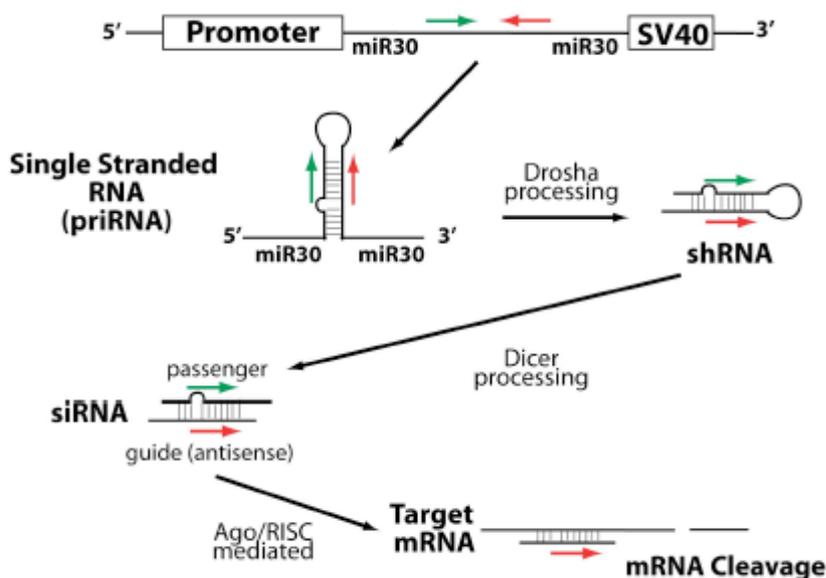


**Figura 3:** Biogénesis de los microRNA. El pri-microRNA transcrito en el núcleo es procesado por Drosha dando lugar al pre-microRNA, que es exportado. En el citoplasma es reconocido por Dicer y clivado generando el microRNA maduro. Imagen tomada de Carthew RW. Y cols., 2009.

Tiempo después del descubrimiento del mecanismo por el cual se interfiere, en menor o mayor medida con la expresión de ciertos genes, surgieron estrategias de biología molecular para tratar de imitar los miRNAs y que demostraron lograr un aumento en la duración del silenciamiento por RNA de interferencia. Estas moléculas se denominaron RNA pequeños en horquilla (shRNA - *short hairpin RNA*); consisten en vectores de expresión que luego de ser transcritos generan una molécula de RNA doble cadena por apareamiento intracatenario con un bucle o *loop* en un extremo, de forma tal de imitar la estructura que adopta un pre-miRNA o un miRNA maduro. Como se muestra en la figura 4, los shRNAs son sintetizados a partir de una sola hebra que codifica una secuencia sentido (19 nt), seguido de 5-10 nt que forman la estructura de *loop* y la secuencia antisentido complementaria de 19-29 nt. La hebra es clonada dentro del vector de expresión, el vector es introducido a la célula y el shRNA es transcrito mediante un promotor eucariótico de polimerasa III. Los shRNAs son entonces procesados por Dicer para producir los siRNAs (Paddison y cols., 2002).

En células de mamíferos, se observa que al utilizar moléculas de miRNA endógenas, miRNA artificiales o shRNAs se obtienen niveles de silenciamiento muy similares. Dependiendo de la complementariedad de secuencia que tenga la molécula de dsRNA que sea cargada en RISC, se puede lograr la degradación de un RNA mensajero o el bloqueo de la traducción; de esta forma se puede diseñar un siRNA de forma tal que tenga un apareamiento imperfecto y lograr el mismo efecto que un miRNA (Carthew y cols., 2009). Esto demuestra que el mecanismo de silenciamiento no depende del origen de la

molécula gatillante y podría ser la explicación de efectos “off-target” (se verá en la sección I.2.3).



**Figura 4:** Procesamiento de los shRNAs. La transcripción de la secuencia insertada en el vector generará un RNA simple cadena que semejará un pri-miRNA, el cual será procesado por las proteínas Drosha y Dicer. Imagen tomada de [wiki.zfin.org/display/prot/RNAi+for+Zebrafish](http://wiki.zfin.org/display/prot/RNAi+for+Zebrafish).

## I.2.2 iRNA como Terapia

En teoría, se pueden diseñar siRNAs para cualquier gen de interés, basados sólo en la secuencia del RNA mensajero. Este potencial ilimitado ha convertido a la tecnología de RNAi, en la estrategia más utilizada para el estudio de la funcionalidad de un gen específico mediante disminución de su expresión y análisis del fenotipo resultante, estrategia conocida como *KnockDown*. Otro aspecto importante es el potencial que brinda este mecanismo para el tratamiento de diversas patologías humanas que sean causadas por uno o más genes, como serían defectos genéticos, enfermedades virales, desórdenes autoinmunes y cáncer (Aagaard y cols., 2007).

Para el caso del cáncer, si bien drogas basadas en inhibidores y anticuerpos monoclonales han dado buenos resultados en la lucha contra dicha patología, muchos blancos importantes son difíciles de inhibir usando estas estrategias y en muchos casos se desarrolla resistencia a algunos de estos fármacos. La especificidad que se puede lograr mediante la secuencia del siRNA sería muy difícil de lograr con una droga o hasta con una terapia basada en anticuerpos monoclonales (Weihua y cols., 2008).

Company	Drug	Delivery route	Target	Vehicle	Disease	Phase	Status
Santaris	SPC3649 (LNA)	SC	miR-122	Naked LNA	HCV	Ila	Ongoing
Opko Health	Bevasiranib	IVT	VEGF	Naked siRNA	AMD/DME	III	Terminated
Allergan/Sirna	AGN-745	IVT	VEGF-R1	Naked siRNA	AMD	II	Terminated
Quark/Pfizer	PF-655	IVT	RTP801	Naked siRNA	AMD/DME	II	Completed
Quark Pharma	QPI- 1007	IVT	Caspase 2	Naked siRNA	NAION	I	Ongoing
TransDerm/IPCC	TD101	Intralesional injection	KRT6A(N171K)	Naked siRNA	Pachyonychia Congenita	Ib	Completed
Sylentis	SYL040012	Ophthalmic drops	ADRB2	Naked siRNA	Intraocular Pressure	II	Ongoing
Sylentis	SYL1001	Ophthalmic drops	TRPV1	Naked siRNA	Dry eye syndrome	I	Ongoing
ZaBeCor	ExcellairTM	Inhalation	Syk kinase	unknown	Asthma	II	Ongoing
Alynlam/Cubist	ALN-RSV01	Nebulization or intranasal	RSV Nucleocapsid	Naked siRNA	RSV	Ilb	Ongoing
Marina Biotech	CEQ508	Oral	Beta catenin	tkRNAi in E. Coli	FAP/ colon cancer	I	Ongoing
Silenseed Ltd	siG12D LODER	EUS biopsy needle	KRASG12D	LODER polymer	PDAC	I	Ongoing
Tekmira	TKM-ApoB	IV	Apo B	SNALP	Hypercholesterolemia	I	Terminated
Tekmira	TKM-PLK1	IV	PLK1	SNALP	Solid tumors	I	Ongoing
Alynlam/Tekmira	ALN-VSP02	IV	KSP and VEGF	SNALP	Solid tumors	I	Completed
Alynlam	ALN-TTR01	IV	TTR	SNALP	TTR-mediated amyloidosis (ATTR)	I	Ongoing
University Duisburg	Bcr-Abl siRNA	IV	Bcr-Abl	Anionic liposome	CML	I	Completed
Silence Therapeutics	Atu027	IV	PKN3	siRNA-lipoplex	Advanced solid cancer	I	Ongoing
Quark Pharma	I5NP	IV	P53	Naked siRNA	AKI and DGF	II	Ongoing
Calando Pharma	CALAA-01	IV	RRM2	Cyclodextrin nanoparticle, TF, and PEG	Solid tumors	I	Ongoing
Gradalis Inc.	FANG vaccine	Ex vivo IV	Furin and GM-CSF	Electroporation	Solid tumors	II	Ongoing
Duke University	iPsiRNA	Ex vivo intradermal injection	LMP2, LMP7, MECL1	Transfection	Metastatic melanoma	I	Ongoing
City of Hope/Benitec	Tat/Rev shRNA	Ex vivo transplant	HIV Tat and Rev	Lentivirus	HIV	0	Ongoing

**Tabla 1:** Drogas basadas en la tecnología de RNAi en fase clínica. En la tabla se muestran algunos ejemplos de drogas que se encuentran aún en ensayos clínicos ("completed" o "ongoing") y que han sido cancelados ("terminated"). Tabla tomada de Burnett J.C. y Rossi J.J. 2013.

En la tabla 1 se pueden ver algunos ejemplos de drogas basadas en la tecnología del iRNA, que se encuentran en etapa de ensayos clínicos (Burnett y cols., 2012). Si bien se presentan sólo algunos ejemplos, la preponderancia de drogas en fases tempranas sobre fases más avanzadas es muy común de encontrar, e incluso las pruebas que han sido canceladas en fases iniciales también son muy frecuentes. En el año 2014, a la farmacéutica Tekmira le fue concedida la aprobación apresurada o *fast-track* de la droga TKM-Ebola, basada en la tecnología de iRNA. Esto significa que se le permite a la farmacéutica realizar los ensayos clínicos siguiendo protocolos distintos, lo que podría implicar la aprobación definitiva de la droga en menor tiempo. Además, al no contarse con una droga alternativa aprobada, se permite el uso de la TKM-Ebola en estudio, en pacientes con infección avanzada de dicho virus, debido a razones humanitarias. Después de más de una década desde su descubrimiento, y miles de millones de dólares invertidos en investigación sobre la interferencia por RNA, no existe hasta el momento una droga basada en esta tecnología, aprobada por la entidad regulatoria de medicamentos de los Estados Unidos, la FDA (*Food & Drug Administration*), que haya completado los estudios clínicos.

Por lo tanto, si bien la aplicación terapéutica de los siRNAs es muy promisoría en cuanto a la posibilidad de silenciar en forma eficiente y específica un gen blanco, es evidente que para poder llegar a su amplia utilización, varias barreras o problemas deben ser sobrellevados.

### 1.2.3 Principales problemas de la aplicación del iRNA como Terapia

Los efectos inespecíficos (también conocidos como **efectos “off-target”**), la **toxicidad** y la **baja estabilidad en circulación** son los principales obstáculos a superar para lograr la aplicación terapéutica del mecanismo de interferencia por RNA.

Se entiende como **efecto off-target** al silenciamiento de un gen (o un grupo de genes) que no constituye el blanco específico deseado. En 2003, Jackson y colaboradores demostraron que en la práctica, el ideal de especificidad alcanzada con la estrategia del RNAi no era tal. Mediante el uso de *microarrays*, analizaron los perfiles de expresión del mRNA de células humanas transfectadas con siRNA, y encontraron que además de disminuir los niveles del gen blanco, descendían los niveles de expresión de otros genes por tener su mRNA hasta un mínimo de 11 nucleótidos complementarios al siRNA (Jackson y cols., 2003). Algunos años más tarde, Jackson demuestra que el efecto inespecífico está dado, principalmente, por la homología con 6 o 7 nucleótidos en una zona particular de la secuencia del siRNA llamada región semilla (Jackson y cols., 2006). Teniendo en cuenta que sólo se necesitaría una homología con 6-7 nucleótidos para lograr la degradación de la molécula blanco, los miRNAs también podrían estar

sujetos a esta degradación *off-target*, lo que conllevaría a consecuencias indeseables aún mayores. Además, se deben considerar los efectos sobre la represión de la traducción, es decir, si solo se analizara el perfil de expresión de los mRNA, se estaría dejando de lado el silenciamiento debido a represión traduccional (Aagaard y cols., 2007).

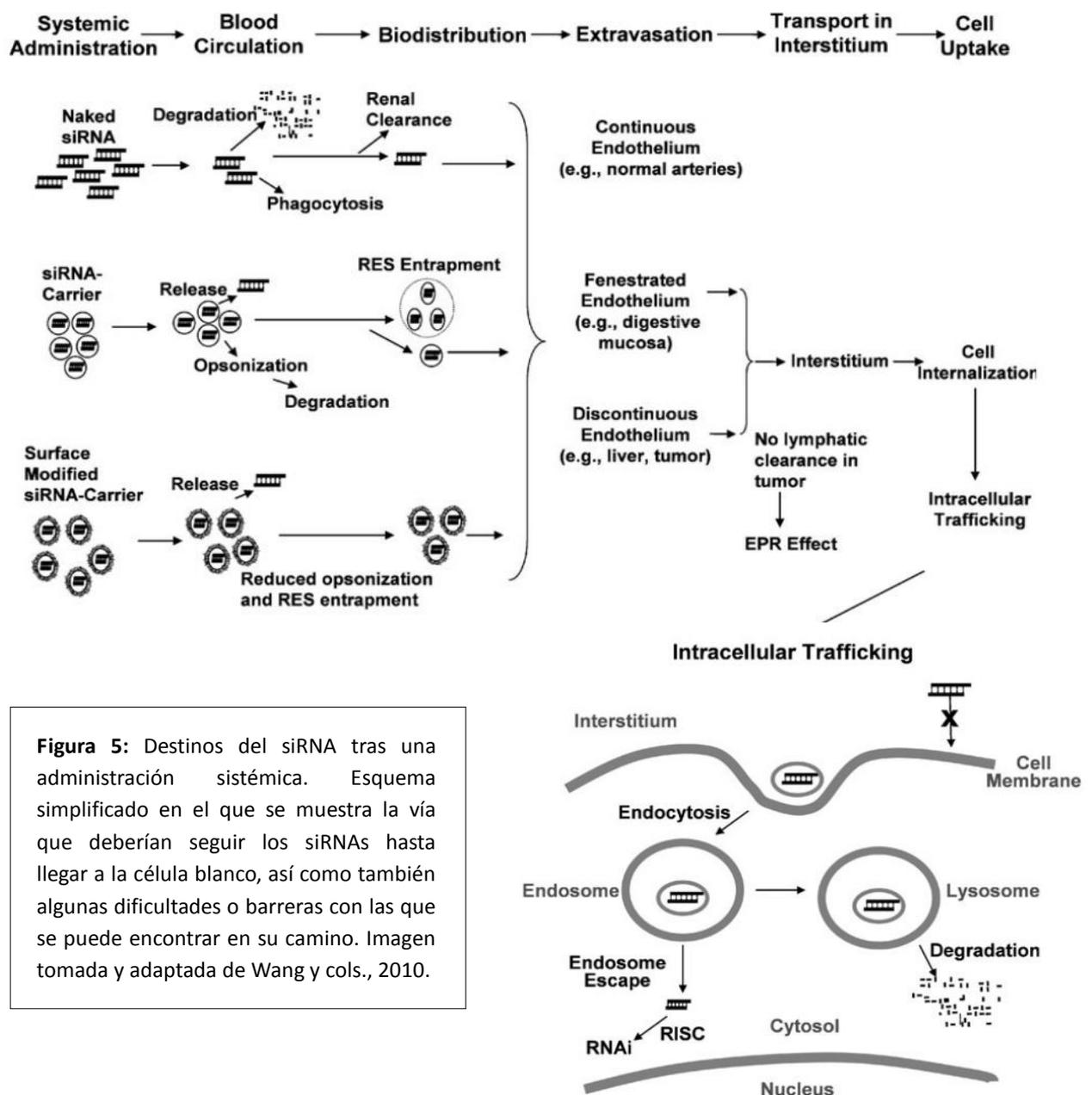
A la hora de diseñar un siRNA, los posibles efectos sobre los perfiles de expresión proteica deben ser analizados exhaustivamente. Si bien en principio el efecto *off-target* parecería muy difícil de predecir y evitar, se cree que los avances en bioinformática y en el conocimiento sobre los mecanismos de la interferencia por RNA lograrían, eventualmente, controlar o erradicar este problema.

En cuanto a la **toxicidad** asociada al empleo de siRNAs, varios estudios demostraron la capacidad de estas moléculas de desencadenar una respuesta inmune fundamentalmente mediada por interferones o por TLRs (*Toll-Like Receptor*) (Gavrilov y cols., 2012). Kleinman y colaboradores propusieron que el siRNA es capaz de activar el receptor TLR3, ampliamente asociado a la respuesta inmune innata, en tejido ocular (Kleinman y cols., 2012; Kleinman y cols., 2008). Este receptor sería capaz de detectar moléculas de RNA doble cadena largas, independientemente de su secuencia nucleotídica (Alexopoulou y cols., 2001). Por otro lado, Judge AD y colaboradores demostraron que, en sangre humana, la toxicidad sí es dependiente de la secuencia e identificaron motivos putativos inmuno-estimulatorios (Judge y cols., 2005).

En cuanto al último de los principales obstáculos mencionados, la **baja estabilidad en circulación**, se debe principalmente a la degradación del siRNA por la acción de nucleasas plasmáticas, pero además a la eficiente eliminación por filtración glomerular y a la fagocitosis mediada por células del sistema inmune (Bumcrot y cols., 2006). En la figura 5 se puede ver un esquema de los pasos que tiene que seguir el siRNA desde el sitio de administración al sitio de acción (Wang y cols., 2010). Tomando como ejemplo el caso de una inyección intravenosa, lo que ocurre es que el siRNA es distribuido a través de la circulación sanguínea pero al mismo tiempo empieza a ser eliminado. La eliminación podría darse por la actividad de nucleasas, filtración glomerular, fagocitosis, opsonización, entre otros, dependiendo de cómo se encuentre el siRNA al momento de ser inyectado. Una vez en las cercanías de un órgano, el siRNA extravasa al intersticio, y es transportado hasta la célula blanco. Esto explica el muy bajo tiempo de vida media en circulación, de entre minutos a una hora. Cabe destacar además, que generalmente el mecanismo por el cual el dúplex es internalizado es la endocitosis, lo cual a su vez conlleva otro inconveniente, el siRNA debe ser capaz de escapar de la vía de degradación endo/lisosomal, quedar libre en el citoplasma celular, ser reconocido y cargado en el complejo RISC para así poder mediar su acción (Whitehead y cols., 2009).

En principio, podrían considerarse dos estrategias para la administración de siRNA con fines terapéuticos: se podría administrar el siRNA desnudo, o introducir el siRNA en sistemas (virales o no

virales) que protejan al dúplex de la degradación y medien su llegada a la célula blanco. El siRNA desnudo, como ya mencionamos, es extremadamente inestable en circulación, por lo que podría ser utilizado en estrategias de aplicación local, aunque también la entrada a la célula sería una dificultad dadas las cargas opuestas entre la membrana celular y el siRNA. Existen reportes de silenciamiento de un gen blanco con una estrategia localizada, como por ejemplo la inhalación intranasal o la aplicación directa en el tejido ocular (Wang y cols., 2010). En cuanto a los sistemas de vehiculización de siRNA, varias estrategias han surgido en los últimos años con el fin de lograr la protección de la molécula luego de administrada y para mejorar su llegada al blanco celular.



**Figura 5:** Destinos del siRNA tras una administración sistémica. Esquema simplificado en el que se muestra la vía que deberían seguir los siRNAs hasta llegar a la célula blanco, así como también algunas dificultades o barreras con las que se puede encontrar en su camino. Imagen tomada y adaptada de Wang y cols., 2010.

#### **I.2.4 Sistemas de Transporte de los pequeños RNA de interferencia (siRNA)**

Como se mencionó anteriormente, es prácticamente imposible que los siRNA desnudos puedan ser administrados en forma sistémica y que lleguen intactos y en concentración adecuada al órgano blanco. Debido a este hecho, fue que se diseñaron diversas estrategias para lograr que el siRNA pueda llegar a su sitio de acción. Básicamente, hay dos grandes categorías de sistemas de vehiculización: los vectores virales y los no virales.

##### **i – Vectores virales:**

Fueron los primeros en ser estudiados y propuestos como método de vehiculización de oligonucleótidos, tanto de siRNA como de DNA. Estos vectores suelen ser virus modificados para que no resulten patogénicos, son comúnmente llamados virus recombinantes. Para poder utilizarlos, se debe clonar el ácido nucléico terapéutico, que en este caso sería del tipo shRNA, en el genoma del virus bajo el control de los promotores Pol II o Pol III (Castanotto y cols., 2009). La principal ventaja de esta estrategia es que una sola dosis o administración podría gatillar la expresión del shRNA terapéutico durante un tiempo prolongado.

Vectores basados en Lentivirus han resultado exitosos en varios sistemas; Brummelkamp TR y colaboradores lograron una supresión estable de la tumorigenicidad mediante el uso de este tipo de sistemas (Brummelkamp y cols., 2002), y los grupos de Raoul C y de Ralph GS lograron retardar el desarrollo de un tipo de esclerosis y aumentar la supervivencia en un modelo animal (Ralph y cols., 2005; Raoul y cols., 2005).

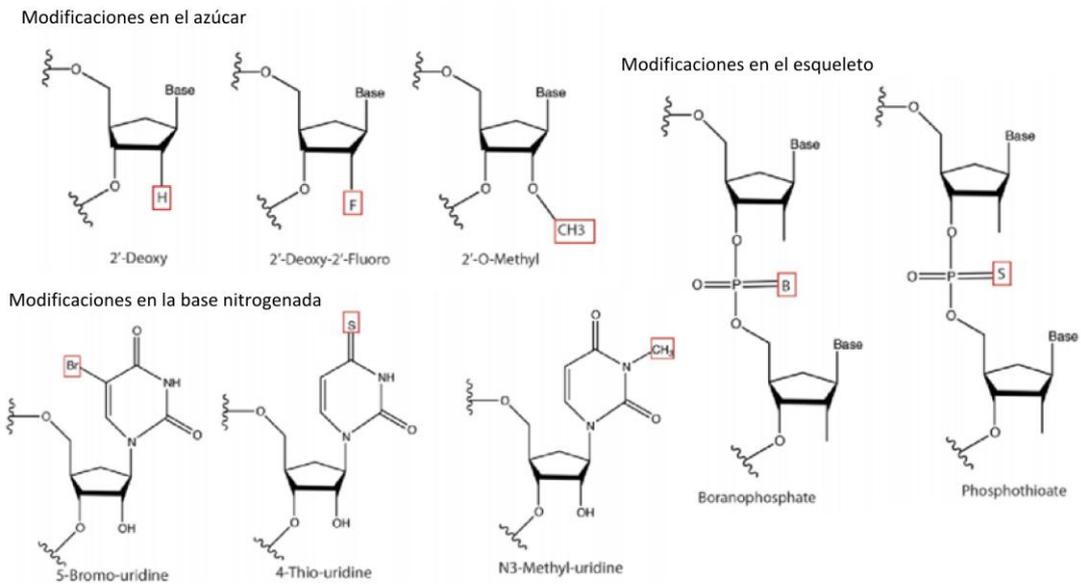
Los vectores virales más empleados en terapia génica son los basados en adenovirus, debido a que en general pueden infectar un gran número de tipos celulares con una muy alta eficiencia de expresión del transgen y porque no requieren de la integración del material génico en el hospedador. Varios tipos de adenovirus disparan una muy potente respuesta inmune al ser introducidos en un organismo, tanto contra la propia cápside del virus como contra proteínas virales que se expresan como consecuencia de la infección (Worgall y cols., 1997; Yang y cols., 1994). Esta alta inmunogenicidad ha resultado especialmente útil en las inmunoterapias contra el cáncer, las cuales se basan en disparar y potenciar los mecanismos inmunológicos para que desencadenen una respuesta efectora eficaz contra células tumorales. Se ha demostrado que la administración de adenovirus que expresen antígenos asociados a tumores (AAT), induce una respuesta inmune específica contra dichos antígenos (Boon y cols., 1994; Hirschowitz y cols., 1998).

Evolutivamente, los virus se han convertido en los vehículos más eficientes a la hora de transferir material genético a células eucariotas, por lo que los sistemas de vehiculización basados en vectores virales suelen ser altamente eficientes. Si bien estos vectores fueron genéticamente modificados para hacerlos seguros, la preocupación en cuanto a su bioseguridad sigue existiendo. Principalmente, dicha preocupación está centrada en la posibilidad de un incremento espontáneo de la virulencia, la patogenicidad y/o la alergenicidad del virus modificado, comparada con la cepa parental; así como de un escape del vector al medio ambiente (Baldo y cols., 2013). Por esta razón, actualmente se pretende sustituir los sistemas basados en vectores virales por vehículos sintéticos biocompatibles y seguros, que al mismo tiempo posean una alta eficiencia para la vehiculización del material genético.

## ii – Vectores No virales:

Esta categoría implica una gran y variada cantidad de sistemas y puede a su vez subdividirse en dos estrategias de vectorización: la **modificación química** de los siRNA y la utilización de **métodos de vectorización no viral más complejos**.

Las **modificaciones químicas** suelen ser incluidas en el diseño de un siRNA sintético. Se estudiaron distintos tipos de modificaciones químicas en diferentes partes de la molécula de siRNA con el objeto de prolongar la vida media de estas moléculas y aumentar su captación celular (Figure 6, (Gavrilov y cols., 2012)). La adición de fosforotioatos o la sustitución de la ribosa 2' por fluoro-pirimidinas u O-metilos, aumenta la resistencia del siRNA sin perjudicar la actividad de silenciamiento (Morrissey y cols., 2005; Yang y cols., 2012). En particular, la presencia de un grupo 2'-O-metilo en la hebra pasajera del siRNA puede suprimir la activación de los receptores Toll-Like, previniendo así la activación de la respuesta inmune innata (Robbins y cols., 2007). También hay reportes de modificaciones que no sólo protegen al siRNA aumentando su estabilidad en suero, sino que también aumentan su actividad (Bramsen y cols., 2011; Dowler y cols., 2006; Snead y cols., 2013) o que resultan en el bloqueo de la actividad dada por la hebra pasajera reduciendo la posibilidad de efectos *off-target* (Peacock y cols., 2011; Watts y cols., 2007). Otras modificaciones, como el agregado de ácido láurico, ácido litocólico o derivados de colesterol, favorecen la captación celular, uno de los problemas asociados al uso del siRNA como terapia (Lorenz y cols., 2004).



**Figura 6:** Modificaciones químicas del siRNA. La figura muestra algunos ejemplos de las posibles modificaciones químicas sobre el azúcar, la base nitrogenada o grupo fosfato del siRNA. Imagen tomada y adaptada de Garilov K. y Saltzman WM. 2012.

Entre los **métodos de vectorización no viral que utilizan estrategias más complejas**, los sistemas que más comúnmente se pueden encontrar son sistemas basados en lípidos, sistemas basados en polímeros y sistemas basados en materiales inorgánicos. Gran parte de estos sistemas comprenden estructuras con dimensiones en el rango nanométrico.

- Sistemas basados en Lípidos.

Estos sistemas han sido ampliamente estudiados para la vehiculización de oligonucleótidos y dentro de ellos, los lípidos catiónicos han sido los más analizados y utilizados. Los lípidos catiónicos forman parte de vehículos que son cotidianamente utilizados en transfecciones de siRNA o DNA plasmídico *in vitro*, aunque *in vivo* tienen baja eficiencia y presentan toxicidad. En cambio, los vehículos formulados con lípidos neutros presentan menos efectos tóxicos y una mejor farmacocinética (Lee y cols., 2013).

Las estructuras que podemos encontrar dentro de este grupo son muy variadas, las más representativas son los liposomas, aunque también se pueden encontrar emulsiones, complejos con polímeros (poliPLEXOS) y/o lípidos catiónicos (conocidos como lipo-poliPLEXOS y lipopleXOS, respectivamente) y las nanopartículas con lípidos sólidos (González, 2014). Los liposomas consisten en una o múltiples capa/s de fosfolípidos con un interior que puede ser hidrofílico o acuoso (Weyermann y

cols., 2004). Los lipoplexos y los poli-lipoplexos son complejos electrostáticos formados por el oligonucleótido y un lípido catiónico para los primeros y, para los poli-lipoplexos se agrega un polímero. Ambos han sido probados como vectores de ácidos nucleicos; los lipoplexos mostraron una eficiencia de transfección de siRNA aceptable *in vitro*, pero no dieron buenos resultados para vehiculización *in vivo*, además de haber exhibido toxicidad dependiente de la dosis y baja estabilidad en condiciones fisiológicas (Li y cols., 2007). Otro sistema, los SNALP (*Stable Nucleic Acid Lipid Particle*) contienen una mezcla de lípidos, seleccionados con la intención de minimizar los posibles efectos tóxicos. Los componentes clave son un lípido catiónico y un lípido *helper* con una cubierta de PEG (PoliEtinElGlicol). El PEG le confiere a la partícula un exterior neutro e hidrofílico que evita la fagocitosis por parte del Sistema Retículo Endotelial; el lípido catiónico favorece la internalización celular y el lípido neutro el escape endosomal (Lammers y cols., 2012). En cuanto al escape endosomal, existen casos en los que se utilizaron sistemas lipídicos sensibles a pH para lograr una eficiente descarga del siRNA en el citoplasma celular (Malamas y cols., 2013).

- Sistemas basados en Polímeros:

Aunque los sistemas descritos anteriormente son los más frecuentemente utilizados, los vectores basados en polímeros resultan muy promisorios ya que presentan como ventajas particulares que pueden otorgar estabilidad y liberación controlada del oligonucleótido; además de compartir con los lipoplexos las características de poder encapsular cantidades elevadas de material genético, la posibilidad de co-encapsular distintas moléculas, y el potencial de modificar sus superficies para favorecer su estabilidad y el direccionamiento a un tipo celular particular.

Los sistemas basados en polímeros pueden clasificarse en dos categorías generales: sistemas basados en polímeros naturales como ciclodextrina, quitosano y atelocolágeno, y sistemas basados en polímeros sintéticos como polietilenimina (PEI), poli(dl-láctico-co-glicólico) (PLGA), poli-L-Lisina (PLL) y dendrímeros (Lee y cols., 2013).

Las ciclodextrinas son polímeros catiónicos naturales generados por digestión bacteriana de la celulosa. Pueden asociarse con RNA doble cadena y pueden ser funcionalizadas para dirigir su distribución tisular. Los sistemas basados en el polisacárido natural quitosano aprovechan las ventajas dadas por la biocompatibilidad del polímero, sus propiedades mucoadhesivas y resistencia a las nucleasas.

La PEI es un polímero catiónico extensamente estudiado para la vehiculización de siRNA (Urban-Klein y cols., 2005). La asociación con las moléculas de siRNA lo protegen de la degradación por RNAsas y facilitan la captación celular del complejo PEI:siRNA por endocitosis. Sin embargo, su uso *in vivo* se ha

visto limitada por su toxicidad celular (Moghimi y cols., 2005).

El PLGA es un copolímero de ácido glicólico y ácido láctico. Las ventajas de su uso como carrier de oligonucleótidos radica en la estabilidad de los complejos formados, su eficiente captación celular, biodegradabilidad, baja toxicidad y la posibilidad de asociar moléculas que permitan el direccionamiento celular de las nanopartículas; sin embargo, estos polímeros no facilitan la liberación del siRNA en el medio intracelular y el escape endosomal (Singha y cols., 2011).

Los sistemas basados en Poli-L Lisina (PLL) logran la internalización del siRNA dentro de la célula mediante endocitosis, siendo su principal problema la liberación del dúplex al citoplasma (Kozielski y cols., 2013).

Los dendrímeros son polímeros altamente ramificados que pueden ser diseñados para formar estructuras esféricas nanométricas, tienen una gran disponibilidad de grupos funcionales que permiten su asociación a oligonucleótidos y/o moléculas destinadas a estabilizar o direccionar las nanopartículas (Taratula y cols., 2009).

- Sistemas basados en materiales inorgánicos:

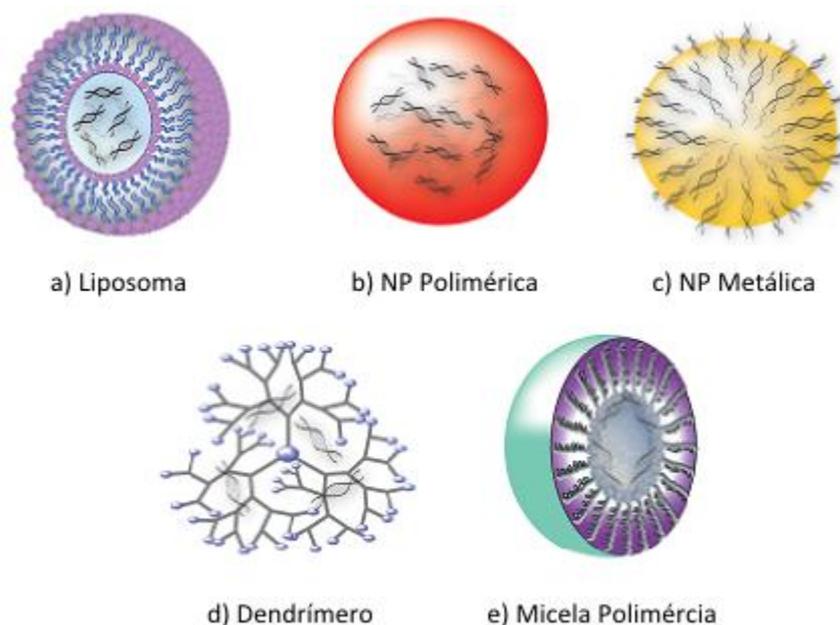
Un gran número de nanopartículas inorgánicas han sido propuestas como potenciales sistemas de vehiculización de siRNA. Las nanopartículas de Oro (AuNPs) son un ejemplo dentro de las NPs inorgánicas; las mismas resultan atractivas dado que presentan baja citotoxicidad, sus características físicas son fácilmente modificables y mayormente presentan una alta eficiencia de silenciamiento (Kozielski y cols., 2013).

Los Quantum Dots (QDs) también son nanopartículas inorgánicas semiconductoras muy empleadas, que no sólo pueden ser utilizadas como vehículos de oligonucleótidos, sino también como fluoróforos; por esta razón, son extremadamente útiles para estudiar los mecanismos de internalización de estas NPs *in vitro* (Derfus y cols., 2007; Subramaniam y cols., 2012).

Por su parte, los nanotubos de carbono (CNT) constituyen otro sistema innovador dentro de esta categoría, con propiedades químicas y físicas interesantes para su uso como vehículo de fármacos o de material genético. Un hecho interesante es que se ha evidenciado que debido a su estructura alargada, los CNTs son capaces de atravesar la membrana plasmática fácilmente, mediante un mecanismo independiente al de endocitosis; adicionalmente, no causarían citotoxicidad y/o muerte celular (Pantarotto y cols., 2004).

En síntesis, existe una gran variedad de sistemas propuestos para la vehiculización de agentes terapéuticos, cada uno con ventajas y desventajas particulares. En la siguiente figura se muestra un

esquema simplificado de algunos de los nanovehículos mencionados (Gavrilov y cols., 2012).



**Figura 7:** Sistemas basados en lípidos, polímeros y materiales inorgánicos. En esta figura se esquematizan algunos ejemplos de nanovehículos de siRNA que utilizan polímeros. Imagen tomada y adaptada de Garilov K. y Saltzman WM. 2012.

El hecho de que se hayan propuesto tantos sistemas para la vehiculización de moléculas terapéuticas a través de sistemas nanoparticulados denota la importancia de estos nuevos desarrollos en la industria farmacéutica. En la actualidad, una de las tendencias en el desarrollo de vehículos eficientes y seguros, es el uso de lípidos neutros debido a que son biocompatibles, biodegradables y no inmunogénicos, características deseables en un carrier, aunque la selección del sistema a utilizar dependerá principalmente de la vía de administración y del tipo celular blanco (Bruno, 2011; Kapoor y cols., 2012).

### **I.3 iRNA como Terapia para el tratamiento del Cáncer de Mama**

#### **I.3.1 Estado actual y perspectivas del uso de la tecnología del iRNA para el tratamiento del cáncer**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, causando 8,2 millones de defunciones en el año 2012 (datos OMS, Febrero 2014). Teniendo en cuenta que además se prevé que el número de diagnósticos anuales aumente de 14 a 22 millones en las próximas dos décadas, se comprende la gran necesidad de nuevas terapias contra esta patología.

La estrategia del RNA de interferencia resulta sumamente interesante para el tratamiento del cáncer, dado el potencial y la especificidad de la técnica, además de la reducción de los efectos secundarios comparada con la quimioterapia (Mansoori y cols., 2014). Sin embargo, la principal ventaja que presentaría una terapia basada en iRNA es la posibilidad de inhibir, de forma simultánea, varios genes implicados en proliferación tumoral (Bora y cols., 2012). Además, muchos de los genes involucrados en la patogenia y desarrollo del cáncer son tradicionalmente denominados como “*nondruggable*” (Fauman y cols., 2011), es decir que no podrían ser modulados *in vivo* por un fármaco.

Como se mencionó anteriormente, el cáncer de mama es la afección más diagnosticada en mujeres. Gracias al avance en los tratamientos y a las técnicas de diagnóstico temprano se ha conseguido un aumento significativo en la tasa de supervivencia de pacientes en los primeros estadios de la patología. Sin embargo, para los casos de pacientes con tumores que han hecho metástasis o recurrentes, se necesita del desarrollo de tratamientos nuevos y efectivos. Si bien se desarrollaron varios inhibidores o anticuerpos monoclonales para dicho tratamiento, son relativamente pocos los casos en los que han sido exitosos, tal vez debido a la heterogeneidad y la inestabilidad genética propia de los tumores. Por lo tanto, la identificación de blancos terapéuticos, así como también el análisis de la combinatoria de varios blancos oncogénicos podrían ser clave para los tratamientos contra el cáncer de mama.

Desde su descubrimiento, la tecnología de RNA de interferencia fue considerada como potencialmente aplicable a cualquier gen blanco, y en cualquier tipo celular, por lo que se convirtió en una herramienta muy interesante para la búsqueda de posibles blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer (Aharinejad y cols., 2007). Teniendo en cuenta que las bases moleculares de los tumores son muy diversas y que además, la resistencia a drogas o tratamientos actuales es una de las mayores preocupaciones de los médicos oncólogos, la versatilidad que sugiere un tratamiento basado en interferencia por RNA sería ideal en casos de tumores resistentes, en los cuales se necesitaría cambiar de blanco terapéutico de forma rápida, y además para poder lograr tratamientos personalizados (Shen y cols., 2013). Así es como numerosos siRNAs dirigidos a distintas moléculas implicadas en proliferación, migración celular, angiogénesis y desarrollo de resistencia a quimioterapéuticos clásicos fueron propuestos como posibles alternativas terapéuticas por sí mismas o en combinación con dichos antineoplásicos en los últimos tiempos (tabla 2, (Mansoori y cols., 2014)) (Lv y cols., 2014; Yhee y cols., 2015). Como se mencionó anteriormente, una ventaja adicional del uso de siRNA para el tratamiento del cáncer es la posibilidad de administrar varias moléculas de siRNA destinadas a distintos blancos

moleculares del tumor al mismo tiempo. El análisis de esta posibilidad es abordada activamente hoy en día en lo que respecta al tratamiento del cáncer de mama (Penzes y cols., 2014).

Company	Drug	Target	Vehicle	Disease	Phase
Calando Pharmaceuticals	CALAA-01	RRM2	Cyclodextrin nanoparticle, TF, and PEG	Solid tumors	I
Silence Therapeutics AG	Atu027	PKN3	siRNA-lipoplex	Advanced solid cancer	I
Anylam Pharmaceuticals	ALN-VSP02	VEGF, KSP	SNALP	Solid tumors	I
Silenseed Ltd.	siG12D LODER	KRAS	LODER polymer	PDAC	I
Sataris Pharma and Enzon Pharmaceuticals	EZN-2968	HIF-1, survivin	Nacked	Advanced solid tumor or lymphoma	I
Tekmira	SNALP-PLK1	PLK1	SNALP	Solid tumors	I
Duisburg University	Bcr-Abl siRNA	Bcr-Abl	Anionic liposome	CML	
Gradalis Inc.	FANG vaccine	Furin and GM-CSF	Electroporation	Solid tumors	I
Duke University	iPsiRNA	LMP2, LMP7, MECL1	Transfection	Metastatic melanoma	I
Polish academy of sciences	ATN-RNA	Tenascin-c	Nacked	Astrocytic tumor	I

**Tabla 2:** Drogas basadas en la tecnología del iRNA en fase clínica para el tratamiento del cáncer. Se puede apreciar que las drogas se encuentran en la primera fase, lo cual pondría en evidencia los problemas del uso de esta estrategia en sistemas *in vivo*. Tabla tomada de Mansoori B. y cols., 2014.

Más del 63 % de las estrategias basadas en terapia génica actualmente en etapa de ensayos clínicos, están propuestas para el tratamiento del cáncer; sin embargo aún no existe en el mercado ningún producto que emplee una estrategia de terapia génica, que haya finalizado los ensayos clínicos y conseguido aprobación, para tratar el cáncer en general, y por ende, el cáncer de mama (McCarthy y cols., 2014). Se ha comprobado el potencial terapéutico del silenciamiento de diversos blancos, mediante el silenciamiento de la expresión génicas en múltiples líneas celulares, xenogramas, modelos animales e incluso en pacientes con metástasis en piel (Gao y cols., 2011; McCarthy y cols., 2014; Wang y cols., 2006; Yang y cols., 2013); pero según bibliografía, todavía resta mucho para su aplicación clínica debido a las múltiples barreras existentes.

Si bien la llegada de las moléculas gatillantes de silenciamiento, de forma segura y eficiente, a las células blanco en sistemas *in vivo* es uno de los principales problemas para la aplicación de una terapia basada en iRNA, se han propuesto distintos sistemas nanoparticulados para abordar este problema; existiendo hoy día varias tecnologías que están siendo evaluadas en ensayos clínicos (tabla 2).

### **I.3.2 Aplicaciones de la nanotecnología para el tratamiento del cáncer**

Los avances en el campo de la nanotecnología aplicada al cáncer prometen sobrellevar algunas de las limitaciones que poseen los tratamientos actuales. La utilización de sistemas nanoparticulados para vehicular agentes antitumorales permite una farmacocinética superior, mayor estabilidad en circulación asociada a una mejora en su biodistribución y captación celular (Aslan y cols., 2013).

Actualmente se pueden encontrar diversos criterios para definir cuándo un sistema es nanoparticulado, o cuándo una partícula es una nanopartícula. En general se entiende como nanoescala a dimensiones comprendidas entre unos pocos nanómetros y 1  $\mu\text{m}$ . Existen clasificaciones que comprenden como nanopartícula a cualquier objeto con una, dos y/o tres de sus dimensiones físicas, en el rango nanométrico; esto se debe a que, generalmente, cuando una partícula tiene por lo menos una de sus dimensiones en la nanoescala, el material adquiere propiedades nuevas (Tinkle y cols., 2014). Sin embargo, en bibliografía se puede encontrar una definición similar a la anterior, pero restringiendo la nanoescala a valores menores a los 100 nm (Johnston y cols., 2012). Las normas ISO de nanotecnología toman en cuenta ambas clasificaciones, teniendo en cuenta el tamaño, sin restringirlo a los 100 nm, pero también la aparición de propiedades distintas a las del material de origen ([www.iso.org/iso/iso\\_technical\\_committee?commid=381983](http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee?commid=381983)).

Si bien suele pensarse a la nanotecnología como una disciplina nueva, la historia de las nanopartículas se remonta a los años 50, cuando el grupo de Jatzkewitz y colaboradores desarrollaron la primera droga conjugada a un polímero (Jatzkewitz, 1954). En 1972 se desarrolló una nanopartícula basada en albúmina (Scheffel y cols., 1972) que serviría de base para que años más tarde se diseñara la droga Abraxan, utilizada hoy en día en el tratamiento del cáncer de mama (Gradishar y cols., 2005). El Abraxan es una suspensión inyectable de Paclitaxel unido a albúmina, con un tamaño de partícula promedio de 130 nm. Anteriormente, debido a su hidrofobicidad, la droga era administrada solubilizada en Cremophor<sup>®</sup>, aunque este solvente puede causar reacciones alérgicas y neutropenia (Gradishar y cols., 2005). Otro ejemplo es el Doxil<sup>®</sup>, la formulación liposomal de la Doxorubicina; esta droga administrada de forma intravenosa posee como efecto secundario afecciones cardíacas, mientras que Doxil<sup>®</sup> reduce los efectos secundarios manteniendo su acción antitumoral (Batist y cols., 2001).

Otra ventaja considerable de la utilización de sistemas nanoparticulados es la posibilidad de sobrellevar la resistencia a una droga dada por bombas de eflujo (Kirtane y cols., 2013). La mayor parte de las drogas entran a la célula por difusión a través de la membrana por lo que son inmediatamente susceptibles a ser activamente bombeadas hacia el exterior nuevamente. En cambio, las nanopartículas, debido a su tamaño, no son capaces de ingresar por simple difusión sino que son endocitadas, lo cual

facilita la llegada de la droga a la región perinuclear y por lo tanto al sitio de acción.

Entre los casos de sistemas nanoparticulados propuestos para la vehiculización de oligonucleótidos se pueden encontrar básicamente 2 tipos, según sean dirigidos de forma pasiva o activa a la célula blanco.

#### - Vehiculización (*targeting*) pasiva

Se entiende como *targeting* pasivo cuando la superficie del sistema nanoparticulado no contiene modificaciones ni ligandos que lo dirijan hacia un tipo celular particular, sino que sólo aprovecha el efecto conocido como EPR (*Enhanced Permeation and Retention*). Este efecto consiste en la acumulación de una droga o una partícula en el microambiente tumoral y fue descubierto en 1986 por el grupo de Matsumura y Maeda (Matsumura y cols., 1987). Se debe a la vasculatura anormal que es característica en los tumores. Los espacios entre las células endoteliales suelen ser mayores a los 200 nm, comparados con los 10 a 50 nm en la vasculatura normal, ello sumado a la falta de drenaje linfático, producen el mencionado efecto de EPR (Iyer y cols., 2006).

Algunos ejemplos de sistemas que utilizan este tipo de *targeting* son el TKM-PLK-1<sup>®</sup> de Farmacéuticos Tekmira y el ALN-VSP02<sup>®</sup> de Alnylam. TKM-PLK-1<sup>®</sup> consiste en un siRNA específico contra la kinasa PLK1, implicada en la progresión del ciclo celular, por lo que logra la supresión del crecimiento y metástasis del tumor en modelos murinos de cáncer de mama subtipo HER2+ (Yao y cols., 2012). ALN-VSP02<sup>®</sup> es el primer producto que propone el bloqueo de 2 blancos de forma simultánea; consiste en un oligo específico contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor) y otro contra la proteína Kinesina, perteneciente a la clase de “proteínas motor” asociadas a microtúbulos, siendo clave en funciones como el transporte intracelular y en procesos como mitosis y meiosis (Shen y cols., 2013). Ambos sistemas utilizan vectores lipídicos con un lípido catiónico como componente central, poseen alta capacidad de encapsulación de las moléculas de RNA y presentan un tamaño pequeño y uniforme. Otro ejemplo es el Atu027<sup>®</sup> de Silence Therapeutics, que consiste en un siRNA contra la proteína kinasa N3, encapsulado en un liposoma preparado con una mezcla de lípidos catiónicos y fusogénicos, éste ha completado la fase I de análisis clínicos (Tomado de [www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00938574?term=atu027&rank=1](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00938574?term=atu027&rank=1)).

#### - Vehiculización (*targeting*) activa

En este caso la superficie de las nanopartículas tiene otras moléculas unidas, que pueden

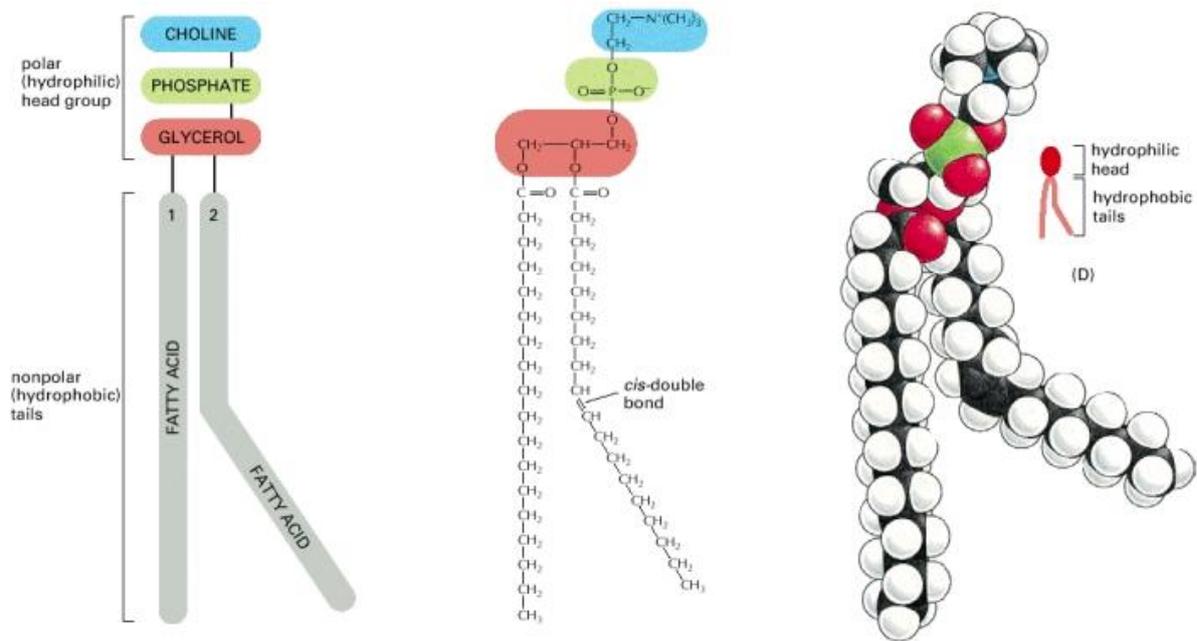
interactuar específicamente con las células blancas, pudiendo así lograr un direccionamiento del sistema nanoparticulado a un tipo celular determinado. El nanosistema CALAA-01® de la farmacéutica Calando, fue el primero en entrar a estudios clínicos proponiendo un *targeting* activo. Está compuesto por un siRNA específico para la subunidad M2 de la reductasa de ribonucleótidos, encapsulado en una partícula de ciclodextrina que tiene unido en su superficie un ligando del receptor de transferrina. Dado que dicho receptor se encuentra sobre-expresado en muchas células tumorales, se logra así el direccionamiento antes mencionado (Bellocq y cols., 2003). Durante los ensayos clínicos se demostró acumulación del oligo en el interior celular y un efectivo y específico silenciamiento de la expresión del gen (Shen y cols., 2013).

#### **I.4 Lecitina como fuente natural de fosfatidilcolina para el diseño de sistemas nanoparticulados**

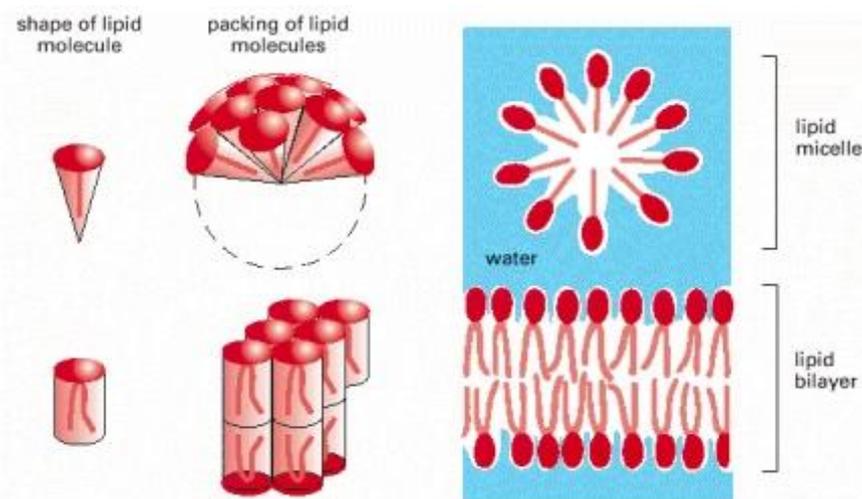
La Lecitina es un compuesto natural emulsificante ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y alimenticia. Puede ser extraída de la yema de huevo y de oleaginosas como la soja. Su principal constituyente es la fosfatidilcolina. Debido a que la lecitina está compuesta mayormente por fosfatidilcolina, los términos “lecitina” y fosfatidilcolina” suelen ser usados indistintamente (Phillips y cols., 1968; Trotta y cols., 2002).

La Fosfatidilcolina (PC - *PhosphatidylCholine*) es un fosfolípido, compuesto por una molécula de colina y una de glicerol, y un grupo fosfato que constituyen lo que se conoce como “cabeza polar”; dicha fracción hidrofílica está unida a una “cola” compuesta por dos ácidos grasos, que conforman la sección hidrofóbica del fosfolípido (figura 8). Los ácidos grasos unidos a la molécula de glicerol son variables; en mamíferos se suele encontrar un ácido graso saturado en la posición 1 y uno insaturado en la posición 2. La fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante en animales, el primer constituyente de la membrana celular (mayormente ubicada en la parte externa de la bicapa) y es el principal fosfolípido presente en el plasma en circulación, formando parte de lipoproteínas (Bruce, 2002).

La estructura de la molécula de fosfatidilcolina y su naturaleza anfifílica, derivan en la formación espontánea de agregados en un ambiente acuoso, de forma tal de agrupar las colas hidrofóbicas entre sí expulsando las moléculas de agua. Dependiendo de la forma del fosfolípido, hay dos tipos de agregados o conformaciones que pueden adquirir, micelas o bicapas (figura 9) (Bruce, 2002). Estos re-arreglos son energéticamente más favorables ya que disponen las cabezas polares hacia el ambiente acuoso, y las colas hidrofóbicas hacia el interior evitando el contacto con las moléculas de agua.



**Figura 8:** Molécula de fosfatidilcolina. En esta figura se muestra la estructura de la PC mediante un esquema, su fórmula y un modelo de sus átomos en el espacio. Pueden apreciarse las partes que componen la fosfatidilcolina y el quiebre en su estructura dado por la insaturación de uno de sus ácidos grasos. Imagen tomada de Alberts B. y cols., 2002.



**Figura 9:** Empaquetamiento de moléculas de fosfolípido en un ambiente acuoso. Dependiendo de la forma del fosfolípido se pueden formar estructuras de tipo micelar (parte superior de la imagen) o de tipo de bicapa lipídica (parte inferior). Imagen tomada de Alberts B. y cols., 2002.

El principal rol de la fosfatidilcolina es mayormente estructural, formando parte de la membrana celular (y aportando fluidez a la misma), aunque también tiene un rol importante en señalización intracelular. Este rol está en realidad mediado por los segundos mensajeros derivados de la



utilizan como relleno de cápsulas que contienen fármacos pobremente solubles en agua (Bowtle y cols., 2011). En dermato-farmacia, el organogel conocido como PLO (*Pluronic® Lecithin Organogel*) es usado eficientemente para obtener penetración transdérmica de varios fármacos, aprovechando la propiedad de la lecitina de desorganizar ligeramente la estructura de la piel (Almeida y cols., 2012).

Un hito importante de la Tecnología farmacéutica lo constituyó el uso de las emulsiones lipídicas inyectables, sistemas con un tamaño de glóbulo < a 500 nm, que han sido usados por décadas como fuente de energía, vitaminas y ácidos grasos para su administración a pacientes hospitalizados a través de formulaciones de nutrición parenteral. A raíz de este éxito se observó luego un fuerte interés en desarrollar emulsiones como carriers de drogas poco solubles para su administración por la vía endovenosa. Dentro de los fármacos representativos que hoy se comercializan bajo esta modalidad farmacéutica se pueden citar: el Palmitato de dexametasona (corticoide), el Propofol (anestésico), el Axetil flurbiprofeno (anti-inflamatorio no esteroideo) que contienen lecitina de huevo y el Diazepam (sedante y relajante muscular) conteniendo fosfolípidos de huevo (Hippalgaonkar y cols., 2010).

Varias formulaciones actualmente comercializadas que contienen lecitina son las Micelas Mixtas compuestas por fosfolípidos de soja y sales de colato; las cuales pueden constituir sistemas nanoparticulados y generalmente son usadas para administración endovenosa de fármacos. Son usadas como solubilizadoras de drogas pobremente solubles como i) Valium® conteniendo el ansiolítico Diazepam; ii) Cernevit® mezcla vitamínica que se da como suplemento y iii) Konakion® que vehiculiza a la vitamina K.

Las Micelas mixtas fueron propuestas como vehículo de otros fármacos con diferentes propiedades fisicoquímicas. En los '90 se demostró que la vehiculización de la Anfotericina B en micelas mixtas de lecitina de huevo y derivados del colato mostraban mayor actividad antifúngica *in vitro* que la formulación comercializada en ese momento (Brajtburg y cols., 1994). Más recientemente Liu y cols. prepararon nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con Micelas Mixtas de colato de sodio y fosfatidilcolina de soja para vehiculizar insulina; lograron obtener nanopartículas de excelente estabilidad física, con un alto grado de empaquetamiento de la insulina y que al mismo tiempo lograban conservar la integridad del péptido (Liu y cols., 2007).

Por último, la fosfatidilcolina también es un componente excluyente de los liposomas, Myocet® la forma liposomal de la Doxorubicina usado para el cáncer de mama metastásico, tiene como componentes a fosfatidilcolina de huevo y colesterol (van Hoogevest y cols., 2014).

## I.5 Efectos Biológicos de sistemas nanoparticulados

En los últimos años la rama de la ciencia conocida como “nanociencia”, ha presentado una rápida expansión en cuanto al número de nanosistemas desarrollados y propuestos para aplicaciones biológicas y médicas, aunque también para aplicaciones industriales. Parte de este gran interés se debe a que la manipulación de materiales, orgánicos o inorgánicos, a nivel nanométrico da lugar a compuestos con propiedades ópticas, mecánicas, eléctricas, etc, novedosas y distintas a las del material de origen (Ramrakhiani, 2012).

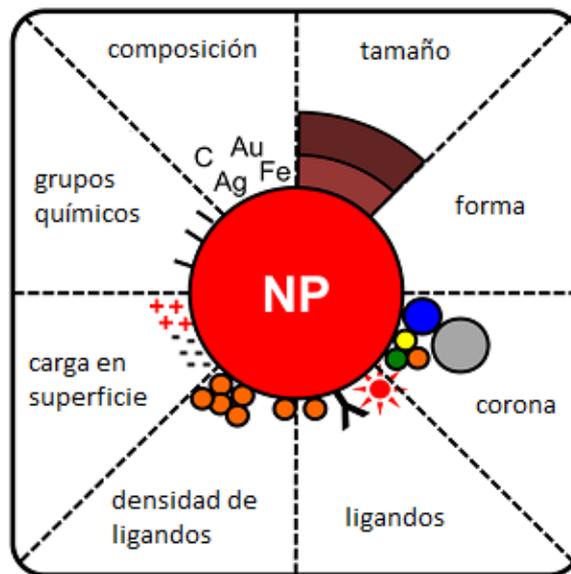
Una característica de los sistemas nanoparticulados es su marcada reactividad, la cual podría provocar o explicar la toxicidad asociada a los mismos. Los mecanismos por los cuales las nanopartículas ejercen sus efectos biológicos o toxicidad son mayormente desconocidos, y el desarrollo de la rama de la ciencia que aborda el estudio de las nanobiointeracciones es todavía muy incipiente. Esta rama de la nanobiociencia, incluye el estudio de la toxicidad y efectos biológicos de los nanomateriales, que aunque estén compuestos por materiales inertes, como por ejemplo el oro, adquieren nuevas propiedades en dimensiones nano.

Si bien el conocimiento sobre los mecanismos de nanotoxicidad y los efectos biológicos de las nanopartículas es escaso, actualmente se reconocen ciertos factores como los más importantes a tener en cuenta (Ai y cols., 2011) (figura 11, (Rauch y cols., 2013)); estos son:

- **Tamaño.** Este factor es determinante en la absorción de las nanopartículas. Se estima que las partículas con un tamaño menor a los 100 nm son absorbidas por el tejido linfático, entre los 100 y 300 nm por las células del epitelio intestinal y los sistemas con un tamaño mayor a los 500 nm no pueden trasvasar al sistema circulatorio. Además, es importante resaltar que las partículas de muy pequeño tamaño tienen una mayor relación superficie/volumen, lo cual podría explicar su mayor reactividad.
- **Grupos químicos en la superficie.** El tipo de grupos expuestos en la superficie serán los que entren en contacto con el microambiente celular, por lo que estarán relacionados con los posibles efectos biológicos, siendo el más común la activación o generación de especies reactivas del Oxígeno (ROS). A su vez, la polaridad de los grupos presentes en la superficie también influirán en la absorción intestinal de la partícula, siendo sólo las partículas hidrofóbicas absorbidas.
- **Dosis.** En general se acepta que a mayores concentraciones de las nanopartículas, mayores son los efectos de las mismas, siendo las cantidades dependientes de las características de la partícula.

- **Forma.** No sólo el tamaño y las características de la superficie de las nanopartículas son importantes. Gratton y col demostraron en células Hela la importancia del factor morfológico en la captación celular (Gratton y cols., 2008).

Recientemente, muchas investigaciones científicas han resaltado la importancia del estudio de las interacciones entre los sistemas nanoparticulados y las células, debido a la amplia variedad de respuestas biológicas que genera dicha interacción.



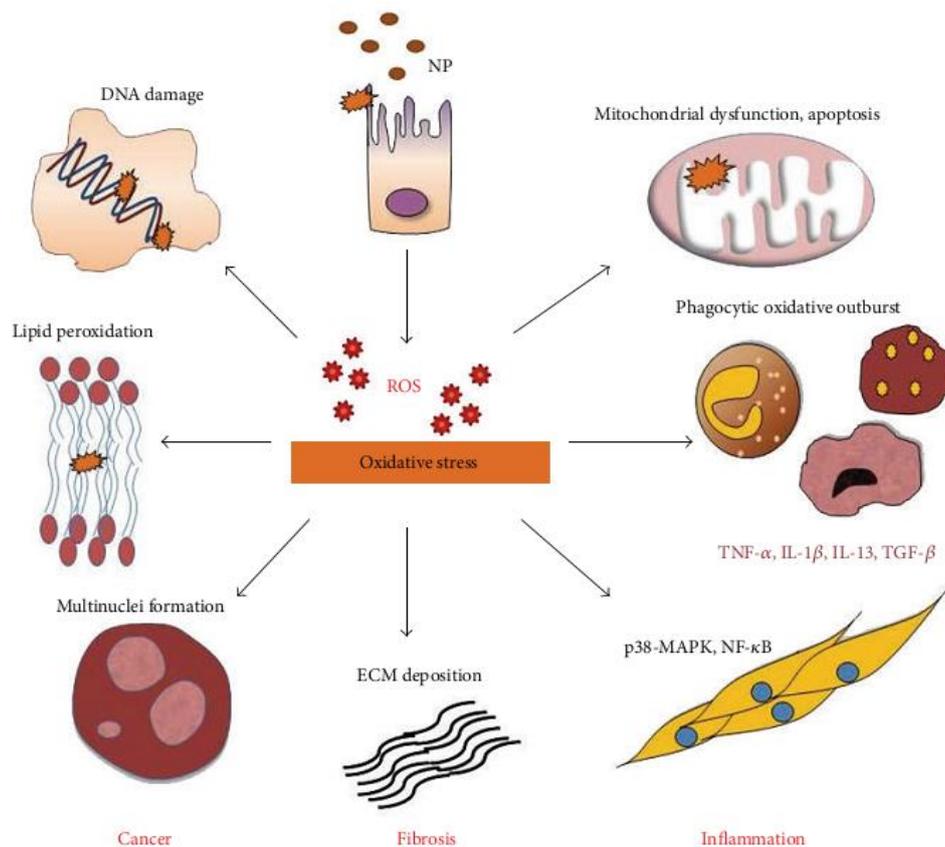
**Figura 11:** Principales factores causantes de citotoxicidad y efectos biológicos. Esquema resumiendo las principales características de los sistemas nanoparticulados que pueden afectar la respuesta celular. Imagen tomada y adaptada de Rauch J. y cols., 2013.

### I.5.1 Antecedentes del estudio de los efectos biológicos de sistemas nanoparticulados

Células expuestas a sistemas nanoparticulados muestran alteraciones en el ciclo celular, inflamación, apoptosis, entre otras respuestas (Thach y cols., 2013). Dichas alteraciones son consecuencia de cambios en la regulación de la expresión y/o activación de mediadores intracelulares. Vertegel y colaboradores evidenciaron cambios en la estructura de la enzima lisosima y, por lo tanto en su actividad, cuando la proteína está en contacto con nanopartículas de sílica. Estos cambios serían dependientes del tamaño de las partículas (Vertegel y cols., 2004). Los lípidos, presentes en membranas y segundos mensajeros, pueden adsorberse alrededor de las nanopartículas, provocando también alteraciones en la

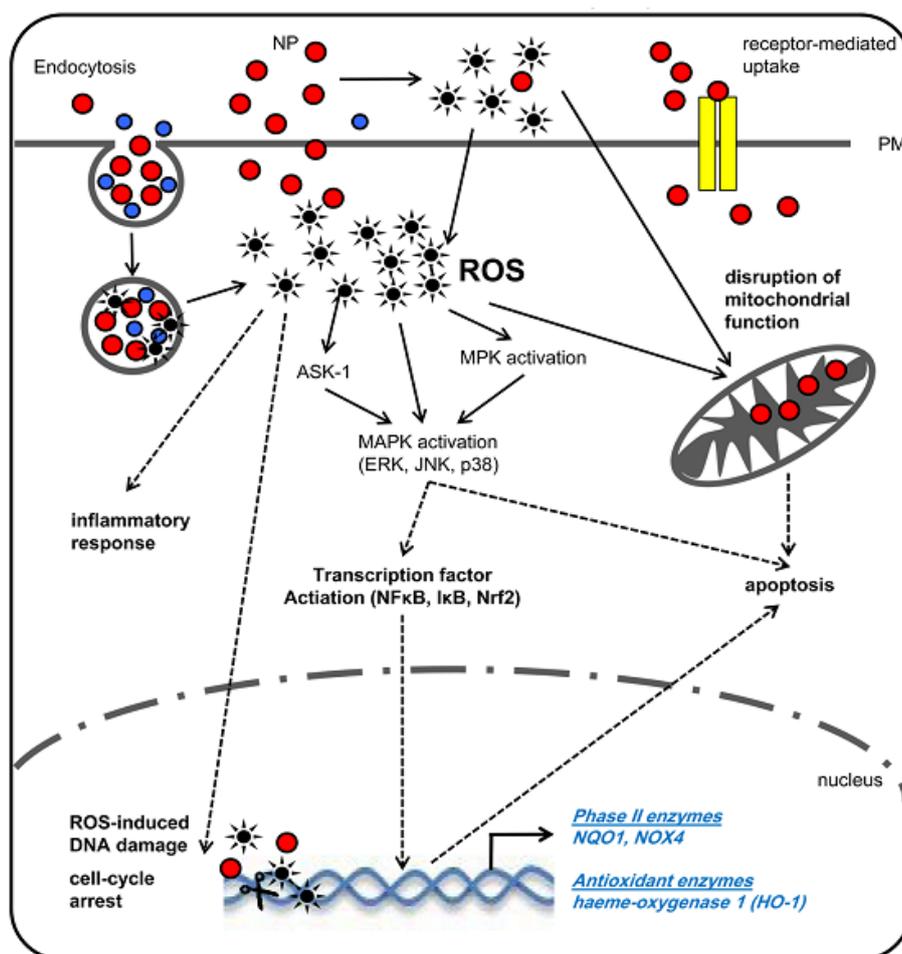
homeostasis celular (Nazarenus y cols., 2014).

También es muy común la generación de toxicidad; Docter D. y colaboradores analizaron los efectos de nanopartículas de sílica sobre la línea celular Caco-2 y encontraron que los efectos tóxicos son dependientes del tamaño de las partículas y de la dosis a la cual se administran; además, evidenciaron un efecto protector dado por la corona de proteínas alrededor de la nanopartícula (Docter y cols., 2014). Los efectos tóxicos pueden estar dados por estrés oxidativo mediante especies reactivas del Oxígeno (ROS). Este mecanismo puede gatillarse debido a las características propias de la nanopartícula como su superficie o su composición, que suelen provocar tanto la producción de radicales libres como la depleción de agentes antioxidantes, lo cual a su vez puede derivar en daño al DNA, peroxidación de lípidos y fibrosis (Nazarenus y cols., 2014). Además, de la interacción de las nanopartículas con las células también puede desencadenarse estrés oxidativo; en este caso generalmente se evidencia activación del sistema NADPH oxidasa, apoptosis mitocondrial, alteración de la homeostasis del Calcio y la disminución de enzimas antioxidantes (Manke y cols., 2013), procesos que también resultan en la activación de vías de señalización intracelular, expresión de citoquinas pro-inflamatorias y de factores de transcripción (figura 12, (Manke y cols., 2013)).



**Figura 12:** Efectos citotóxicos causados por estrés oxidativo. En la figura se puede ver un esquema ilustrando los posibles efectos de las nanopartículas mediadas por ROS; entre ellos se encuentran daño al DNA, peroxidación lipídica, inflamación, fibrosis, apoptosis, etc. Imagen tomada de Manke A. y cols., 2013.

Varios estudios han demostrado que la interacción de algunos sistemas nanoparticulados con las células puede desencadenar la activación de proteínas miembros de la vía de señalización de las MAP Kinasas, como ERK 1/2, JNK y p38 (proteína de la familia de las MAPKs) (Eom y cols., 2010; Manna y cols., 2012) (figura 13, (Rauch y cols., 2013)), aunque el mecanismo subyacente no es conocido. Guyton y colaboradores evidenciaron dicha señalización como clave para la protección de la célula frente al estrés oxidativo (Guyton y cols., 1996).

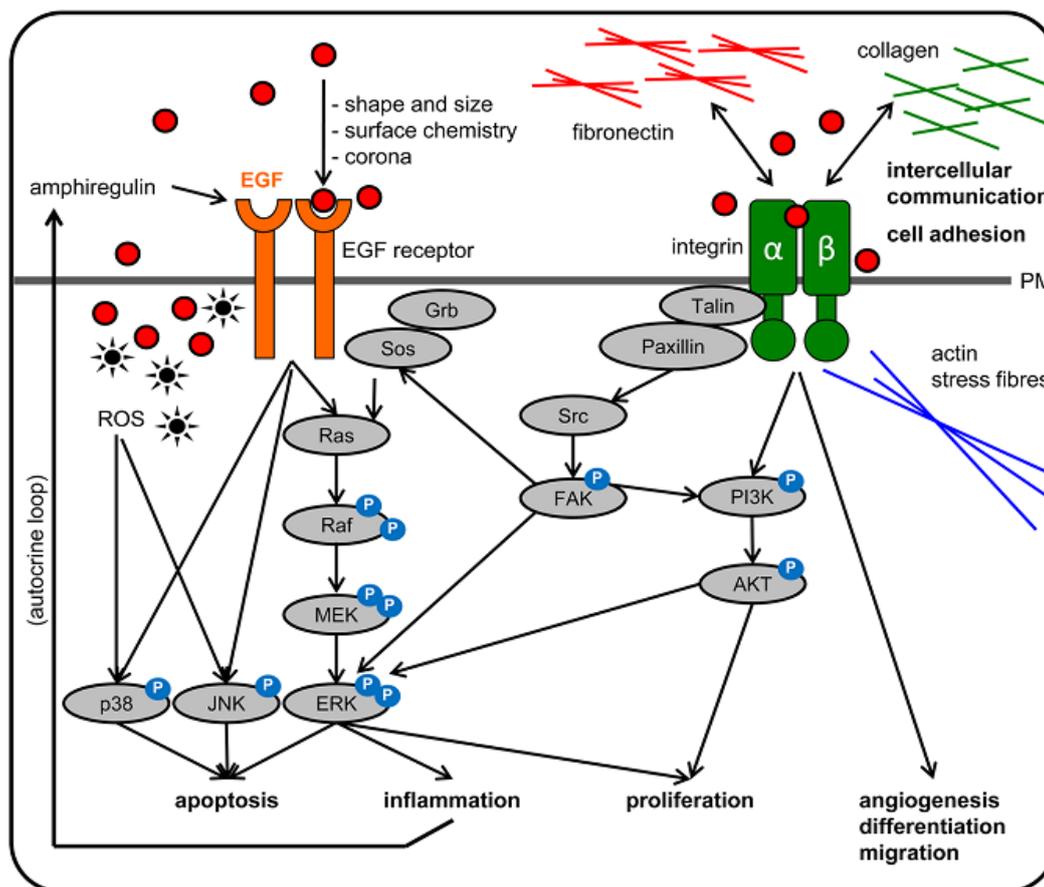


**Figura 13:** Estrés oxidativo desencadenado por sistemas nanoparticulados. Diversas formulaciones de nanopartículas han demostrado gatillar citotoxicidad mediada por ROS, dada por la activación de vías de señalización asociadas a estrés tal como la vía de las MAP Kinasas (ERK, JNK, p38). Las nanopartículas se esquematizan en círculos rojos y las ROS como estrellas negras. Imagen tomada de Rauch J. y cols., 2013.

La activación de la vía MAPKs puede estar mediada por receptores de membrana o deberse a la acción directa del sistema redox sobre las mismas; por ejemplo ASK-1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*), kinasa río arriba de JNK y p38, en condiciones de estrés oxidativo es capaz de oligomerizar y activarse

(Nagai y cols., 2007). También puede verse afectada la actividad de proteínas fosfatasa de las MAPKs debido a la oxidación de residuos cisteína claves, lo cual puede provocar tanto la inactivación sostenida de las MAPKs (Rauch y cols., 2013) como la activación mantenida de la vía de JNK (Kamata y cols., 2005). A su vez, factores de transcripción como NFκB (*Nuclear Factor κ B*), susceptibles a cambios redox, pueden provocar cambios en la actividad de MAPKs (figura 13, (Rauch y cols., 2013)).

Además de alterar la activación de moléculas implicadas en señalización intracelular, los sistemas nanoparticulados pueden causar daños al DNA mediados por estrés oxidativo o por mecanismos aún desconocidos independientes de la generación de ROS. Muller y colaboradores destacan la importancia de evaluar el potencial carcinogénico de sistemas basados en nanotubos de carbono (Muller y cols., 2008); Onuma y colaboradores evidenciaron el potencial oncogénico de nanopartículas de óxido de titanio, mediante la conversión de un fibrosarcoma benigno en células malignas dada por la generación de ROS (Onuma y cols., 2009).



**Figura 14:** Señalización intracelular gatillada por sistemas nanoparticulados. Diversas nanopartículas han demostrado interacción con receptores celulares tales como el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e integrinas, provocando proliferación celular, apoptosis, diferenciación y migración. Imagen tomada de Rauch J. y cols., 2013.

En cuanto a la interacción de los sistemas nanoparticulados con receptores de membrana, los efectos producidos se extienden más allá de la posible generación de ROS. Unfried y colaboradores describieron la activación del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de  $\beta$ 1-integrinas provocando proliferación celular mediada por la activación de la vía PI3K y AKT (Unfried y cols., 2008) (figura 14, (Rauch y cols., 2013)). Las integrinas son proteínas transmembrana, que median la adhesión celular y la comunicación célula-célula y entre la célula y su medio ambiente, y que tienen un rol importante en la señalización intracelular pudiendo desencadenar procesos de angiogénesis, migración y diferenciación (Harburger y cols., 2009).

Por otro lado, el grupo de Sydlik y colaboradores demostró que nanopartículas de carbón son capaces de activar al EGFR y, mediante la activación de integrinas, a ERK 1/2 (Sydlik y cols., 2006). También se ha reportado la activación de dichas proteínas por exposición de células del epitelio bronquial humano a nanopartículas provenientes de emisiones de motores diesel (Auger y cols., 2006; Blanchet y cols., 2004).

# HIPÓTESIS y OBJETIVOS

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### II.1 Construcción de la Hipótesis

Muchos de los agentes utilizados en el tratamiento del cáncer de mama resultan muy costosos, presentan serios efectos adversos y/o generan resistencia terapéutica (Dadla y cols., 2014; Hurvitz y cols., 2014). Por esto se han propuesto nuevas alternativas, entre ellas, la terapia génica basada en RNA de interferencia (iRNA). Si bien esta tecnología ha adquirido gran relevancia como posible tratamiento del cáncer (Mansoori y cols., 2014), la utilización de la misma con fines terapéuticos presenta importantes impedimentos, fundamentalmente en lo que hace a la vehiculización del material génico.

Los sistemas que han demostrado mayor eficiencia para vehiculizar oligonucleótidos a las células son los basados en virus modificados, pero debido a cuestiones de bioseguridad, en los últimos años se ha dedicado mucho esfuerzo a la búsqueda de vectores no virales. Los sistemas nanométricos presentan características que los posicionan como la alternativa más prometedora, para superar las limitaciones asociadas al transporte de oligonucleótidos para el tratamiento de tumores. Si bien numerosos y distintos sistemas nanométricos han sido propuestos, aún se está lejos de alcanzar la eficacia deseada, y además, las técnicas de preparación empleadas de estos nuevos sistemas de vehiculización generalmente involucran técnicas laboriosas, el uso de solventes orgánicos y la adición de surfactantes de biocompatibilidad limitada. Otro problema radica en la toxicidad de algunos componentes comúnmente empleados para el diseño de sistemas de vehiculización no viral; en este sentido, últimamente se ha reorientado la investigación hacia el uso de lípidos neutros y de polímeros biocompatibles y biodegradables.

La lecitina, constituye un extracto lipídico compuesto en un alto porcentaje por fosfatidilcolina, fosfolípido neutro y biocompatible, con amplias aplicaciones en la industria farmacéutica como componente de liposomas, micelas mixtas y emulsiones submicrómicas (Bottle y cols., 2011; Liu y cols., 2007).

La Hipótesis de este trabajo sostiene que sistemas nanométricos basados en lecitina pueden ser caracterizados y estudiados como vehículos de oligonucleótidos, sin dejar de lado sus efectos biológicos, con el fin de proponerlos como base tecnológica factible de optimización, para el tratamiento de patologías tumorales como el cáncer de mama.

Se podría argumentar que con varios agentes terapéuticos propuestos en los últimos años, los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* muchas veces no tienen un correlato con los observados luego *in*

*vivo*. Por lo que la Hipótesis también sostiene que, si el estudio de las formulaciones es exhaustivo y criterioso, éste puede ser considerado una herramienta clave durante el desarrollo racional de futuros sistemas farmacéuticos.

Actualmente el desarrollo con enfoque farmacéutico/biológico en paralelo, sigue siendo la modalidad de trabajo más apropiada, no sólo porque constituye la práctica habitual en laboratorios de I+D en la industria, sino también por la orientación que promueven las entidades regulatorias internacionales.

## **II.2 Objetivos**

El objetivo general del presente trabajo de Tesis fue evaluar formas farmacéuticas nanométricas basadas en lecitina, como posibles vehículos de oligonucleótidos en una línea celular de cáncer de mama. Estos estudios pretenden evaluar la capacidad de los sistemas de unir y vehiculizar oligonucleótidos, de activar el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), así como también estudiar los efectos biológicos de los nanovehículos sobre el modelo experimental utilizado.

El diseño experimental se llevó adelante en paralelo al desarrollo racional farmacéutico que condujo a la optimización de: i) Nanopartículas basadas en fosfatidilcolina y, ii) Nanopartículas mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio. Estas nanopartículas fueron diseñadas para vehiculizar oligonucleótidos a una línea celular de cáncer de mama. El trabajo incluyó el estudio de los efectos de las distintas composiciones de los nanovehículos sobre la capacidad de unión de siRNA y/o pDNA, la citotoxicidad, el ingreso celular y la capacidad de mediar PTGS. También se analizaron los efectos sobre la expresión de receptores y vías de señalización relacionados con promoción y progresión tumoral.

El presente trabajo propone un estudio detallado, desde el punto de vista biológico, de este tipo de formulaciones de elaboración sencilla y con excipientes ampliamente utilizados, con la intención de correlacionar composición, microestructura y comportamiento biológico.

# **MATERIALES** **y MÉTODOS**

### III. MATERIALES y MÉTODOS

#### III.1 MATERIALES

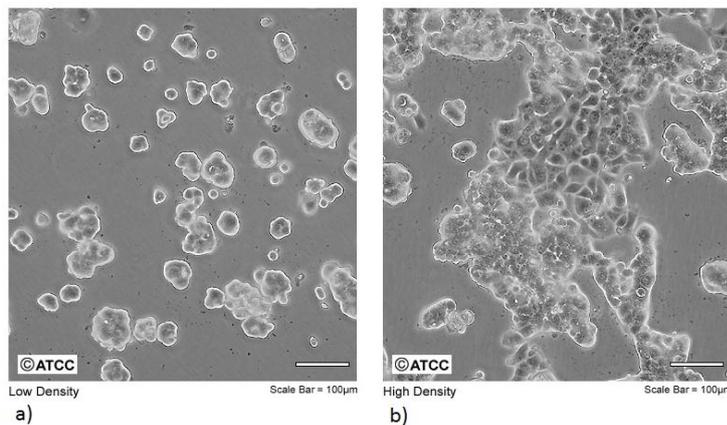
##### III.1.1 Reactivos

- Reactivos adquiridos en Sigma-Aldrich (Missouri, USA): Seroalbúmina bovina, Trizma base, HEPES, Tween 20, Tritón X-100, dodecilsulfato de sodio (SDS), glicina, persulfato de amonio, aprotinina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ortovanadato de sodio, 2-mercaptoetanol, marcadores de peso molecular (MWM), Faloidina, colato de sodio. Anticuerpo anti-actina. Reactivo Hoescht (Bisbenzimidide H 33258).
- Materiales adquiridos de Bio-Rad Laboratorios (California, USA): Equipos para SDS-PAGE Mini Protean 3 Cell, los reactivos acrilamida, bis-acrilamida y N, N, N', N'- tetrametil-etilendiamina (TEMED).
- Materiales adquiridos en Scie Plas Limited (Southam, Inglaterra): Equipo de electrotransferencia en condiciones semisecas modelo V20-SDB.
- Materiales adquiridos de Electric Healthcare Biosciences (Nueva York, USA): Membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Películas para detección de quimioluminiscencia Amersham Hyperfilm.
- Insumos adquiridos de Cell Signaling Technology Inc. (Massachusetts, USA): Anticuerpos policlonales anti-pS473Akt, anti-Akt, anti-pS2448mTOR, anti-mTOR (7C10), anti-pT202/Y204E Erk1 y 2, anti-Erk1 y 2, anti-pMEK1/2 y anti-MEK1/2.
- Insumos adquiridos de Santa Cruz Biotechnology Laboratories (California, USA): Anticuerpos policlonales anti-EGFR; y los anticuerpos secundarios unidos a la enzima HRP (peroxidasa de rábano picante) anti-IgG de conejo.
- Reactivos adquiridos de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA): Kit para medición de concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) y Reactivo ECL-Plus (Pierce Protein Research Products, Illinois, USA); Antibiótico PenStrep (10.000 U/ml Pen – 10.000 ug/ml) y Glutamina, (GIBCO). El medio de cultivo DMEM y OptiMEM (GIBCO). Los oligonucleótidos: Stealth™ RNAi siRNA Actin Positive Control, BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red Fluorescent Control, fluorescein-labeled dsRNA BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo y el reactivo de transfección Lipofectamin® RNAiMAX (Invitrogen, CA, United States).
- Insumos adquiridos en Jackson ImmunoResearch (Baltimore, USA): Anticuerpo anti Inmunoglobulina de conejo conjugado al fluoróforo Cy3.

- Insumos adquiridos de Natocor (Córdoba, Argentina): suero fetal bovino.
- Materiales adquiridos de Lipoid Ludwigshafen (Alemania): Fosfatidilcolina (Phospholipon® 90G).
- Materiales de Takara Clontech (Japón): plásmido pEYFP-N1.

### III.1.2 Línea Celular

La Línea Celular MCF-7 (ATCC® HTB-2™) proviene de American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). Originalmente, fue obtenida de una efusión pleural proveniente de una mujer caucásica de 69 años con carcinoma ductal invasivo. Las células son adherentes, de tipo epitelial. Esta línea mantiene características de epitelio mamario diferenciado, incluyendo la capacidad de responder a estrógenos.



**Figura 15:** Imagen de la línea celular MCF-7 en cultivo; fue obtenida del catálogo de especificaciones del proveedor. En a) se observa la morfología cuando las células están en baja densidad, mientras que en b) se muestran a una alta densidad.

## III.2 Métodos

### III.2.1 Mantenimiento de la línea celular en cultivo

La línea celular MCF-7 fue mantenida en medio esencial mínimo de cultivo DMEM suplementado con bicarbonato de sodio (2,4g/L), suero fetal bovino (SFB) previamente deplegado por calentamiento a 56°C durante 30 min (10% final), antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 mg/ml) y glutamina (2 mM). Las líneas celulares fueron incubadas en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, a 37°C y 5% de CO<sup>2</sup> en una atmósfera húmeda, realizando subcultivos periódicamente para mantener las células en cultivo o para su amplificación según los requerimientos.

### III.2.2 Preparación de las Nanopartículas basadas en Fosfatidilcolina (NPCs)

Se prepararon las nanopartículas de fosfatidilcolina (NPCs) mediante su dispersión en cuatro diluyentes distintos (tabla 3).

Diluyentes
Agua destilada
Glicerol 2,76 % p/p
Buffer Acetato (50 mM) pH 5
Buffer Fosfato (66 mM) pH 7

**Tabla 3:** Diluyentes utilizados en la preparación de las nanopartículas de fosfatidilcolina 2 % (p/v). Los buffers fueron isotonzados por adición de cloruro de sodio (NaCl) según método White-Vincent.

En primer lugar, la Fosfatidilcolina (Phospholipon® 90G) fue dispersada en el diluyente correspondiente mediante el uso de un agitador magnético termostatzado a 60°C, con el objetivo de obtener una buena hidratación. A continuación, las soluciones fueron mezcladas durante 2 minutos, con un mezclador de alta velocidad (Ultra-Turrax T25 basic, IKA Werke, Staufen, Germany) a 13.000 rpm manteniendo la temperatura, y posteriormente sonicadas a 20 KHz durante 10 minutos.

Es necesario destacar que, como desde un principio se planteó la evaluación de factibilidad de administración de estas dispersiones por vía endovenosa, dos aspectos fueron tenidos en cuenta antes de empezar con el desarrollo experimental propiamente dicho: i) la isotonzación de cada una de las dispersiones con el plasma sanguíneo y ii) la posibilidad de esterilizar a las dispersiones propuestas.

Para que cada una de las dispersiones cumpla con la condición de isotonicidad se hizo una adaptación de la Técnica de White-Vincent. Se calculó su osmolaridad total considerando el aporte osmótico de la masa de fosfatidilcolina usada más el correspondiente aporte osmótico del medio utilizado. En los casos en que la osmolaridad final de una formulación fuese menor a la plasmática se calculó la cantidad necesaria de ClNa para llevar a isotonicidad, cantidad que se disolvió en el medio correspondiente previo a la dispersión de la fosfatidilcolina.

En cuanto a la esterilización, se sometió a cada una de las dispersiones a un proceso de autoclavado a 121°C durante 15 minutos con el objetivo de evaluar si los cambios observados para las formulaciones esterilizadas con respecto a las que no habían sufrido este proceso eran significativos en cuanto a su aspecto macroscópico y citotoxicidad.

### III.2.3 Preparación de las Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio (NMs)

Para la obtención de las Nanopartículas mixtas (NMs) se utilizó Fosfatidilcolina (Phospholipon® 90G) y la sal biliar Colato de Sodio. Se prepararon 4 relaciones distintas fosfolípido: sal biliar (tabla 4), en 3 diluyentes distintos que se muestran en la tabla 5.

Relación PC:SC	[PC]		[SC]	
	mM	%	mM	%
1:1	17	1,29	17	0,71
1:2	12,5	0,95	25	1,05
1:4	8	0,62	32	1,38
1:8	5	0,39	38	1,61

**Tabla 4:** Relaciones fosfatidilcolina:colato de sodio a las cuales se prepararon las Micelas Mixtas, expresadas en unidades de molaridad o porcentaje (p/v).

Diluyentes
Agua destilada
Buffer Acetato (50 mM) pH 5
Buffer Fosfato (66 mM) pH 7,4

**Tabla 5:** Diluyentes utilizados en la preparación de las Micelas Mixtas. Los buffers fueron isotonzados por adición de cloruro de sodio (NaCl) según método White-Vincent.

El método de obtención de las Nanopartículas Mixtas es similar al utilizado para las nanopartículas de fosfatidilcolina. Se dispersaron ambos componentes en el diluyente correspondiente mediante un agitador magnético termostatzado a 60°C y la hidratación se completó utilizando un Ultra-Turrax; posteriormente se sonicó a 20 KHz durante 10 minutos en una adaptación del método propuesto por Sznitowska (Sznitowska y cols., 2008). Las NMs fueron luego filtradas a través de filtros Millipore PTFE 0,45-µm para así lograr una reducción y homogenización del tamaño de las partículas formadas y se conservaron selladas dentro de viales de vidrio color caramelo para disminuir la acción degradativa del oxígeno atmosférico y de la luz.

### III.2.4 Características Físico-Químicas de las NPCs y NMs

La morfología de las partículas obtenidas fue evaluada mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) (Philips EM 301 y Zeiss 10-CTEM) y de Barrido (SEM) (Zeiss, Barrido Supra 40) en el Centro de Microscopía Electrónica LANAIS de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (UBA) y en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. La TEM sobre las nanopartículas de fosfatidilcolina fue realizada en el LANAIS mientras que para las nanopartículas mixtas se llevó a cabo en el CMA.

Para la Microscopía de Transmisión (TEM) una gota de la muestra a analizar fue depositada, durante 1 minuto y 30 segundos sobre la rejilla de muestreo, la cual es de cobre y está recubierta por una película de Carbono. Luego, el exceso de líquido fue retirado mediante un papel de filtro. A continuación, la rejilla fue teñida con una solución 1 % de Acetato de Uranilo durante 30 segundos, y el exceso fue también removido mediante un papel de filtro. Se dejó secar la grilla a temperatura ambiente en un sector libre de polvo. Como blanco se empleó una grilla teñida con la misma solución de Acetato de Uranilo.

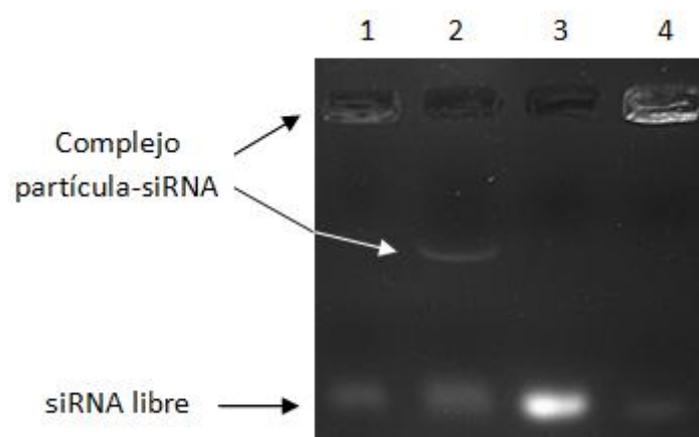
Para el análisis por Microscopía de Barrido, se depositó una gota de la muestra sobre una placa de Silicio, se la dejó secar y se la recubrió con una delgada capa de oro.

El tamaño de las partículas fue determinado mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) usando un ZetaSizer (Malvern Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK). Para la medición, las partículas fueron obtenidas por ultra-centrifugación (Eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemania) a 13.000g durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron descartados y las nanopartículas resuspendidas en agua destilada. Las mediciones se realizaron a 25 °C y colectando la luz a 173 °C. Cada corrida se compuso de 12 mediciones. Se aplicaron valores de 0,89 cP y 1,33 de viscosidad e índice de refracción, respectivamente, de las soluciones. La movilidad electroforética de las muestras fue medida mediante el mismo instrumento y los valores de potencial Z fueron calculados según la ecuación de Smoluchowski (Smoluchowski, 1916).

### III.2.5 Ensayos de unión de oligonucleótidos a NPCs y NMs

Con el fin de analizar la capacidad de las preparaciones obtenidas de unir oligonucleótidos (siRNA y pDNA), se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de agarosa, conocidos como EMSA (*Electroforesis Mobility Shift Assay*). Los mismos consisten en incubar a

temperatura ambiente la preparación correspondiente (nanopartícula de PC o NM) con el oligonucleótido durante 20 minutos, período en el cual se forma el complejo entre las nanopartículas y los oligonucleótidos. Posteriormente, la mezcla se somete a electroforesis en geles de agarosa 1% (p/V), preparados por disolución de la agarosa en una solución reguladora de pH Tris-Acetato con Bromuro de Etidio 0,5 ug/ml, con el fin de separar y poner en evidencia el material génico asociado a las nanopartículas (detección a menor distancia de migración) y el que permanece libre (detección a mayor distancia de migración) (figura 16). La detección del oligonucleótido libre y complejado se llevó a cabo exponiendo los geles de agarosa a la luz UV. Las fotos fueron tomadas utilizando un transiluminador G-Box/EF-E (Syngene, Synoptics, Inglaterra).



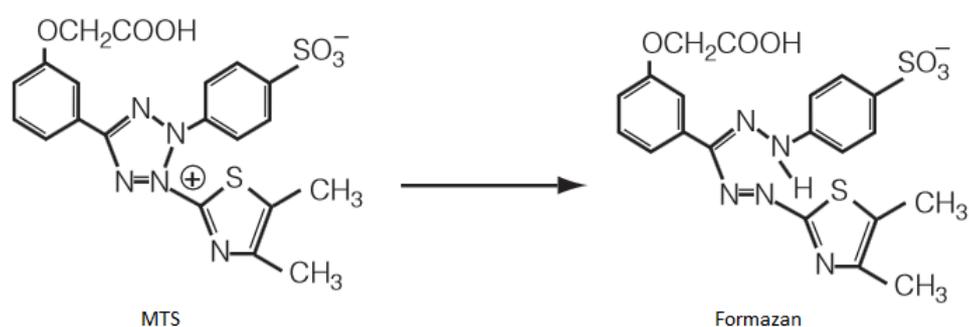
**Figura 16:** Imagen de Electroforesis en gel de agarosa, a modo de ejemplo de los ensayos de EMSA utilizados para evaluar la capacidad de los vehículos diseñados de unir oligonucleótidos. En la calle 1 se sembró un vehículo que forma complejos con el siRNA de gran tamaño, quedando retenidos en el punto de siembra; en la calle 2 se observa otro vehículo cuyos complejos son de menor tamaño, por lo que tienen movilidad en el gel; en la calle 3 se sembró sólo el siRNA a modo de control negativo; por último en la calle 4, se utilizó el reactivo comercial Lipofectamina que utilizamos luego como control positivo.

En todos los casos se utilizó como control positivo la incubación de un reactivo comercial (Lipofectamina siRNAMAX) con el oligonucleótido correspondiente según el caso; y como control negativo se sembró en el gel el oligonucleótido sólo con el *loading buffer*.

### III.2.6 Ensayo de Determinación de la Viabilidad Celular

Para evaluar el posible efecto citotóxico de las nanopartículas de fosfatidilcolina y de las

nanopartículas mixtas, se evaluó viabilidad celular tras la incubación de las mismas con la línea celular MCF-7, en diversas condiciones experimentales. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo basado en la reducción de un compuesto de tetrazolium (CellTiter 96 AQueous Nonradioactive Cell Proliferation Assay (MTS), Promega). Este ensayo se basa en la conversión del compuesto MTS a formazán (figura 17); la cual estaría mediada por la enzima succinato dehidrogenasa presente en las células vivas. Esta conversión se refleja en un cambio de la coloración del medio, que se mide a una longitud de onda de 490 nm.



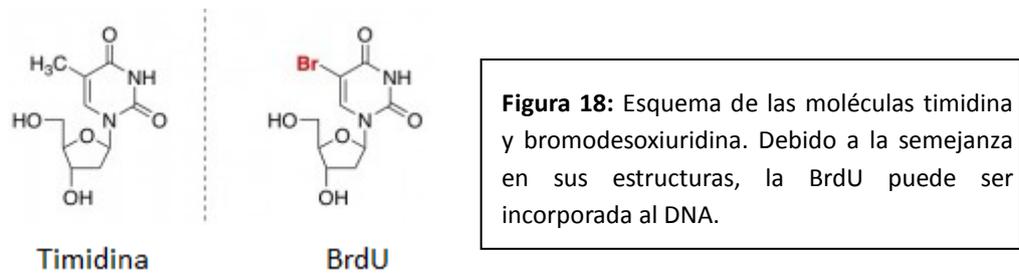
**Figura 17:** Esquema de la reacción de conversión del reactivo MTS a Formazan, utilizada en los ensayos de medición de citotoxicidad.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos (Corning Costar, Fisher Scientific, USA), a una densidad de células de 10.000 células/pocillo. Luego de contar las células, éstas fueron sembradas en cada pocillo y mantenidas 24 hs en medio DMEM con 10 % de Suero Fetal Bovino (FBS - *Fetal Bovine Serum*) para lograr su adhesión a la superficie. Posteriormente, las células se incubaron con las distintas formulaciones durante distintos períodos de tiempo, transcurridos los cuales se procedió a la determinación de viabilidad celular. Para ello, las células fueron incubadas con el reactivo MTS durante 2 hs en estufa a 37 °C (previo cambio de medio con el fin de evitar posibles interferencias en la medición por la presencia de las nanopartículas en el sobrenadante de cultivo). La viabilidad celular remanente se determinó por medición de la absorbancia a 490 nm. Los resultados se expresaron en porcentajes tomando como 100 % el valor obtenido para los pocillos sin tratamiento (pocillos basales o control).

### III.2.7 Ensayo de incorporación de BromodeoxiUridina

La bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina), también conocida como BrdU, es un análogo

sintético de la Timidina. Está compuesto por una base pirimidínica, una ribosa y posee un grupo bromuro en posición 5 (figura 18). Debido a la similitud con el nucleótido timidina, la BrdU puede ser rápidamente incorporada al genoma de una célula durante la fase S del ciclo celular. Dado que este análogo sintético puede ser detectado por fluorescencia o anticuerpos monoclonales específicos (Gratzner, 1982), es que esta técnica es ampliamente utilizada para evaluar proliferación celular (Dolbeare, 1995).



En el presente trabajo de Tesis, la incorporación de BrdU se determinó mediante un ELISA (Muir y cols., 1990). Las células se sembraron en placas multiwell de 96 pocillos (Corning Costar, Fisher Scientific, USA) en medio DMEM con 10 % de Suero Fetal Bovino, a una densidad de 10.000 células/pocillo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera conteniendo 5 % CO<sub>2</sub> durante 24 hs. Posteriormente, las células se incubaron 48 hs con las nanopartículas en medio sin suero. La BrdU en concentración final 0,01M, se agregó a las células 16 hs antes de finalizar el período de incubación con las nanopartículas. Posteriormente, las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS), pH 7,0, se fijaron con etanol al 70% y se desnaturalizaron las proteínas mediante tratamiento con HCL 2M durante 10 minutos. La acidez del medio se neutralizó con buffer Trizma 0,1M pH 9,0 y las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-BrdU (50 uL/pocillo; 1 ug/mL final; Roche, USA) a 37°C durante 1 hora. Tras lavados con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano picante (HRP: *horseradish peroxidase*) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron y la BrdU incorporada se determinó por incubación con el sustrato cromogénico TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina). Los valores se expresaron en porcentaje respecto al control correspondiente a las células no tratadas.

### III.2.8 Ensayos de captación intracelular de siRNA

La capacidad de los vehículos diseñados de promover la captación celular de RNA bicatenario se evaluó mediante la observación por microscopía de fluorescencia de células transfectadas con siRNAs

marcados con un fluorocromo. Para estos ensayos se utilizaron moléculas de siRNA control, sin capacidad de silenciamiento, marcadas con un fluoróforo rojo (BLOCK-iT Alexa Fluor Red) o uno verde (BLOCK-iT Fluorescent oligo FITC). Por recomendación del proveedor de la Lipofectamina (Lipofectamine® RNAiMAX, Life Technologies) y considerando la línea celular a transfectar (MCF-7), las transfecciones se realizaron de forma reversa. Ello implica que primero se promueve la formación de los complejos entre el oligonucleótido y los vehículos en el pocillo donde posteriormente se agregan las células. Para esto, se colocaron cubreobjetos redondos en los pocillos de placas de 24 *wells*. Luego, se realizaron las diluciones de siRNA (10 nM final) en 100 ul de OptiMEM en cada pocillo. A continuación se agregó 1 ul de Lipofectamina o distintos volúmenes de los vehículos a ensayar, según corresponda. Las mezclas se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, período en el cual se forman los complejos entre los vehículos y el siRNA. Como control positivo de la transfección se vehiculizó el siRNA con Lipofectamina (siguiendo instrucciones del producto) y como control negativo del ensayo, las células fueron incubadas con el siRNA marcado solo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 400 ul de medio DMEM 10 % FBS (sin antibiótico) conteniendo 50.000 células. Se dejaron las placas en estufa a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> durante 18 hs, luego de las cuales se retiró el medio de transfección y se lavó cada pocillo con PBS 1X. Por último, las células se fijaron con paraformaldehído 2 %, se montaron con líquido de montaje conteniendo Hoescht (2 ug/ml) para la tinción de los núcleos celulares (según corresponda) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Leica DM 2000).

### **III.2.9 Ensayos de transfección de siRNA**

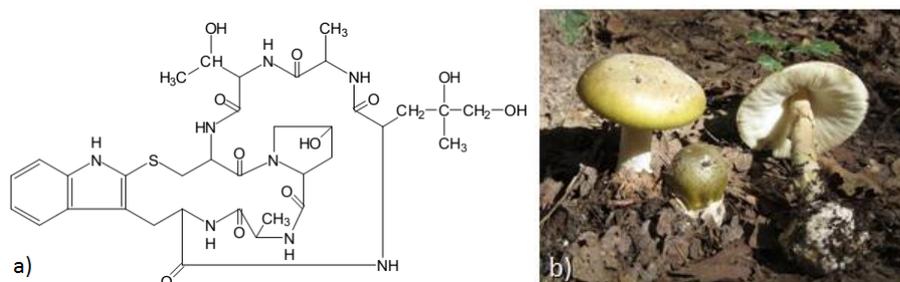
Para poder evaluar si el siRNA transfectado inhibe la traducción de un gen blanco eficientemente, células MCF-7 fueron transfectadas con siRNA control positivo anti-actina (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) o con un siRNA comercial anti-EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Estos ensayos se realizaron en placas de 24 wells o en placas de 35 mm según la técnica a utilizar para evaluar la transfección. Los procedimientos experimentales para la transfección fueron los mismos que los utilizados en los ensayos con siRNA fluorescentes. Sin embargo, en los ensayos de silenciamiento suelen utilizarse mayores cantidades de siRNA. Esto podría estar asociado a que para lograr la reducción de la proteína deseada se necesita una mayor potencia en el efecto, mientras que cuando se evalúa internalización simplemente se necesitan cantidades de siRNA que puedan ser detectadas por fluorescencia. La concentración final de siRNA fue de 120 nM, manteniendo una relación Lipofectamina:siRNA de 1:1,5. En todos los casos el tiempo de incubación con el medio de transfección fue de 24 hs. Luego de transcurrido dicho tiempo, se cambió el medio por medio completo (DMEM 10%

suero, con antibiótico), y se mantuvieron las células en estufa gaseada durante 48 hs más para que se efectivice el silenciamiento del gen de interés.

El silenciamiento de la expresión de actina se evaluó por tinción con faloidina marcada y por *Western Blotting* (WB) del solubilizado de las células transfectadas. El silenciamiento de la expresión del EGFR se evaluó solamente por WB.

### III.2.10 Evaluación de silenciamiento de Actina por marcación con Faloidina

Para poner en evidencia el silenciamiento de la expresión de actina se realizó la marcación con Faloidina-TRITC (Sigma Aldrich, Missouri, USA) de células transfectadas con siRNA anti-actina y controles. La Faloidina es una micotoxina obtenida del hongo *Amanita phalloides*, cuya estructura es un hepta-péptido-bicíclico que impide la despolimerización de filamentos de actina (figura 19). Esta molécula une la interfaz presente entre monómeros de actina consecutivos en los filamentos de actina F; de este modo, los estabiliza, disminuyendo la tasa de disociación en los extremos del microfilamento. Más aún, la faloidina inhibe la actividad hidrolasa de ATP de la actina F, redundando en una mayor estabilización de los microfilamentos.



**Figura 19:** Faloidina. Esquema representando la molécula de Faloidina (a); y fotografía del hongo *Amanita phalloides*, del cual es obtenida la micotoxina (b).

Luego de transcurridas las 48 horas tras la transfección con el siRNA anti-Actina (sección II.2.9), las células fueron lavadas con PBS 1X, fijadas en paraformaldehído 2 %, permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 0,5 % en PBS 1X durante 10 minutos y luego se incubaron con solución de bloqueo (Tritón X-100 0,1 %, BSA 2 % en PBS 1X) durante otros 10 minutos. La incubación con faloidina (2 ug/ml) se realizó durante 20 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente. Cabe destacar que entre cada paso se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X. Por último, las células fueron montadas con solución de

montaje conteniendo Hoescht (2 ug/ml) para la tinción de los núcleos celulares, y los resultados se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Leica DM 2000).

### **III.2.11 Procesamiento de muestras para *Western Blotting* (WB)**

Para todos los casos, la transfección fue realizada en placas de 35 mm conteniendo las células tratadas. El procesamiento de las muestras consiste en agregar 50 ul de buffer de solubilizado (tritón X-100 1% (P/V), Hepes 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sodio 100 mM, fluoruro de sodio 100 mM y ortovanadato de sodio 10 mM, PMSF 2 mM y aprotinina 0,032 unidades inhibitorias de tripsina, pH 7,4) en cada placa (sobre hielo), distribuyéndolo con la ayuda de una espátula de punta plana. Se incubó en presencia del buffer de solubilización durante 10 minutos y luego, utilizando también la espátula, se raspó la placa y se pasó el contenido a un eppendorf. Posteriormente, se homogenizó el contenido con pipeta y los solubilizados se dejaron reposar 10 minutos más, siempre manteniendo los tubos en hielo. Luego, las muestras se centrifugaron (Centrífuga Eppendorf refrigerada) a 15.000 g y 4 °C durante 40 minutos para separar el material insoluble. Terminada la centrifugación, se traspasó el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y se procedió a realizar la determinación de proteínas mediante el método de BCA (ácido bicinonínico - Smith y col. 1985). Finalmente, se prepararon las muestras de forma tal de obtener una concentración final de proteínas de 1 mg/ml, mediante la adición de agua destilada y solución de Laemmli 2X (1x final), y luego se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se guardaron a -20 °C hasta su utilización para *Western Blotting*.

### **III.2.12 *Western Blotting* (WB)**

Los solubilizados de las células fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente SDS (SDS-PAGE), utilizando equipos Mini Protean (Bio-Rad Laboratories). Se sembraron las muestras en geles de 6, 10 o 12 % (p/v) según el peso molecular de la proteína de interés. Una vez finalizada la corrida electroforética, se realizó la electrotransferencia hacia una membrana de PVDF, durante 1 hora, con un equipo Scie Plas Limited modelo V20-SDB en condiciones semi-secas, con una solución Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v), pH 8,3. Luego de la transferencia, las membranas fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo, formada por buffer T-TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0,02 %, pH 7,6) y seroalbúmina

bovina (BSA) 3 % (p/v), para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche, con agitación y a 4 °C. Al día siguiente, el anticuerpo primario fue recuperado y las membranas lavadas 3 veces durante 5 minutos con T-TBS. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) que reconoce el anticuerpo de la especie correspondiente al primer anticuerpo (anti-IgG de ratón o conejo) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. A continuación, se realizaron como mínimo 3 lavados de 15 minutos cada uno también con T-TBS y posteriormente un lavado con agua destilada. Finalmente, se realizó la incubación con el reactivo ECL Plus, el cual permite la reacción de quimio-luminiscencia entre la enzima HRP y el sustrato luminol presente en el reactivo. La señal se recogió en placas radiográficas que fueron reveladas, y las imágenes obtenidas se escanearon. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Gel-Pro analyzer 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EE.UU.)

Para poner en evidencia otras proteínas sobre la misma membrana de PVDF, se reincubaron las mismas con otros anticuerpos. Primero, las membranas fueron lavadas con acetonitrilo durante 10 minutos y luego incubadas en una solución que contiene Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 % p/v, 2-mercaptoetanol 100 mM (pH 6,7) durante 40 minutos a 50 °C. Posteriormente se las lavó, bloqueó e incubó con el anticuerpo primario como se describió anteriormente.

En el caso de la tinción de las membranas de PVDF con el colorante *Coomasie Blue*, la misma se realizó mediante la incubación de las membranas con una solución del colorante al 0,1 % durante 15 minutos, y luego se destiñeron con la solución decolorante (50 % metanol y 10 % ácido acético) durante 20 minutos. Finalmente fueron lavadas con agua destilada y escaneadas.

### **III.2.13 Evaluación de los efectos de NPCs y NMs sobre la expresión y activación de moléculas implicadas en señalización celular**

Para analizar el efectos de los vehículos estudiados en este trabajo de tesis (nanopartículas de fosfatidilcolina y mixtas) sobre la expresión de receptores celulares y la activación de mediadores intracelulares implicados en traducción de la señal, las células en cultivos fueron tratadas con los vehículos en distintas condiciones experimentales, posteriormente se procedió a la obtención de los solubilizados celulares y su análisis por *Western Blotting*, o a la fijación de las células y su estudio por inmunofluorescencia. Estos ensayos se realizaron sembrando 300.000 células en placas de plástico de 35 mm para los ensayos de WB o 40.000 células por pocillo en cubreobjetos colocados en placas multiwell de 24 pocillos. La incubación con los vehículos se realizó en presencia o ausencia de suero fetal bovino al

10%, durante 24hs. Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X y guardadas en freezer -80°C hasta su solubilización para preparar las muestras para *Western Blotting* (ver sección II.2.11), mientras que los cubreobjetos fueron inmediatamente procesados para inmunofluorescencia.

### III.2.14 Inmunofluorescencia del EGFR

Las células fueron lavadas con PBS 1X, fijadas en paraformaldehído 2 %, permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 0,5 % en PBS 1X durante 15 minutos y luego se incubaron con solución de bloqueo (Tritón X-100 0,1 %, BSA 2 % en PBS 1X) durante otros 30 minutos para disminuir la interacción inespecífica de los anticuerpos. Posteriormente, las células se incubaron con anticuerpos anti-EGFR durante 1h a 37°C, se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de conejo marcado con el fluorocromo Cy3 (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA). Tras lavados de 5 minutos para eliminar el anticuerpo secundario no unido, las células se incubaron con Hoechst 33258 (2 ug/ml) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) durante 10 minutos. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio y la señal fluorescente revelada en un microscopio de epifluorescencia (Leica DM2000) o en un microscopio de fluorescencia confocal (Olympus Fluoview FV1000) utilizando longitudes de onda de excitación de 473 nm para el Cy3 y 405 nm para el Hoesch. Al menos 10 campos fueron examinados y se tomaron imágenes representativas.

### III.2.15 Análisis estadístico de los resultados

Las muestras de las células tratadas con las nanopartículas y sus respectivos controles fueron analizadas en paralelo. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) del número de muestras indicado. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía seguido del test de Newman-Keuls de comparación múltiple. Se trabajó con el programa de estadística GraphPad Prism versión 4.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EE.UU.). Los resultados significativamente distintos al basal se indican con \*, con  $p < 0,05$ .

# **RESULTADOS**

## IV. RESULTADOS

### IV.1 Sección I: Nanopartículas de FosfatidilColina - NPCs

#### IV.1.1 Caracterización y evaluación *in vitro* de las NPCs como vehículos de siRNA

Las nanopartículas se diseñaron y prepararon en colaboración con la cátedra de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Como se menciona en la sección Materiales y Métodos, se realizaron dispersiones de fosfatidilcolina (PC) al 2 % (p/v) en cuatro diluyentes distintos (tabla 6).

Diluyentes
Agua destilada
Glicerol 2,76 % p/p
Buffer Acetato (50 mM) pH 5
Buffer Fosfato (66 mM) pH 7

**Tabla 6:** Diluyentes utilizados en la preparación de las nanopartículas de fosfatidilcolina.

Dado que el objetivo es utilizar las NPCs para la vehiculización de oligonucleótidos a la línea celular MCF-7 con el fin de lograr el silenciamiento de un gen blanco, se debe tener en cuenta que las preparaciones deben cumplir simultáneamente con 3 requisitos mínimos; éstos son: i- unir el oligonucleótido de interés en buena proporción, ii- no ser tóxicas para las células y iii- permitir la internalización del oligonucleótido de interés para efectivamente lograr el silenciamiento.

Teniendo esto en cuenta, en primer lugar se estudiaron las características físico-químicas de las nanopartículas obtenidas y, se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de unión de un siRNA comercial a las Nanopartículas de Fosfatidilcolina, a diferentes relaciones siRNA-NPCs. Luego, se evaluó la citotoxicidad de las nanopartículas sobre la línea celular de epitelio mamario tumoral MCF-7. Considerando las condiciones experimentales en las que se observó unión de oligonucleótido y los resultados de los ensayos de citotoxicidad, se diseñaron los ensayos para evaluar la capacidad de internalizar siRNA. Para ello, se evaluó por microscopia de fluorescencia la internalización, mediada por las NPCs, de un oligonucleótido doble cadena de RNA (dsRNA) marcado con un fluoróforo. Finalmente, en base a los estudios realizados de los sistemas de vehiculización, se seleccionaron las condiciones que

consideramos más favorables para evaluar la capacidad de efectivamente mediar el silenciamiento de un gen blanco.

Establecer las condiciones adecuadas para lograr la vehiculización de oligonucleótidos no suele ser un trabajo fácil, de hecho, tomando como ejemplo a un reactivo comercial usualmente utilizado para las transfecciones de siRNA, la Lipofectamina RNAiMAX (a la cual nos referiremos simplemente como Lipofectamina), los rangos de concentraciones en los que se deben probar el vehículo y el oligonucleótido son amplios, lo que resulta en una combinación de relaciones a ensayar considerable. En algunos casos se debe llegar a un compromiso entre lograr un efecto de silenciamiento aceptable y perder viabilidad celular.

#### **IV.1.1.1 Propiedades Físico-Químicas de las NPCs**

La caracterización morfológica de los vectores liposomales de siRNA ha ayudado a entender la estructura relativa, la orientación de las moléculas de siRNA y el ensamblado de los complejos. Se ha visto que estas características pueden influenciar la estabilidad del complejo tanto *in vitro* como *in vivo*, que pueden afectar su endocitosis (Desigaux y cols., 2007) y también impactar sobre su biodistribución. La bibliografía recomienda usar Técnicas de Microscopía de Transmisión Electrónica Criógena (crio-TEM) y Microscopía Electrónica de Fractura por Congelamiento para realizar estos estudios.

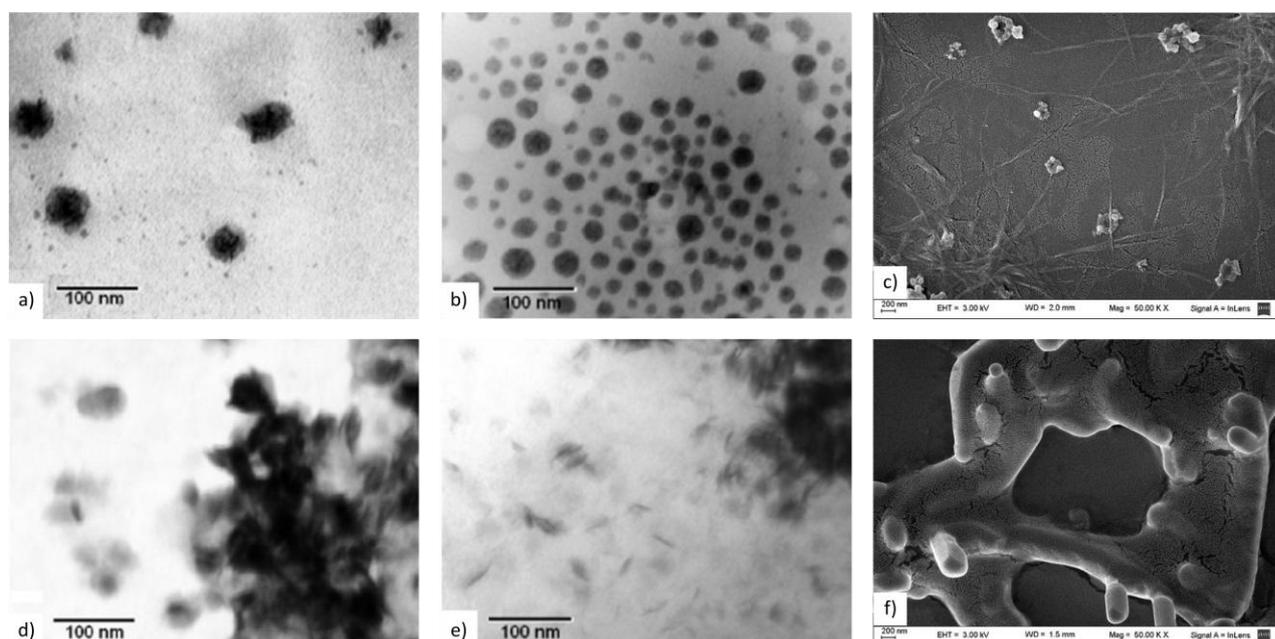
Considerando que las NPCs del presente trabajo son vectores basados en lípidos y que se forman por auto-ensamble de los mismos en distintos medios, resulta apropiado estudiar a través de las Microscopías Electrónicas disponibles en nuestro país: Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y de Barrido (SEM), la morfología y tamaño de las NPCs vacías y cargadas con siRNA, en los distintos diluyentes usados (figura 20).

Se debe tener en cuenta que la información que da SEM explora la superficie de la imagen punto por punto, al contrario que la TEM, que examina una gran parte de la muestra cada vez. Por otro lado, la SEM tiene menor resolución pero produce imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto. También se debe considerar que para utilizar TEM debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores a un par de miles de angstroms y muchas muestras se transforman en este proceso, ya que pueden perder el agua de hidratación o las moléculas orgánicas se pueden volatilizar o reaccionar. En SEM es necesario que las muestras sean conductoras, por eso se aplica un baño metálico de oro con el riesgo de que en las muestras no conductoras se produzca una acumulación de carga, lo que puede dar lugar a imágenes falsas.

A pesar de no ser TEM y SEM las técnicas más recomendables, la experiencia demostró que las imágenes obtenidas a través de las mismas pueden ser correlacionadas con distintas propiedades fisicoquímicas de los sistemas y esto determinó su utilidad; habida cuenta, también, que se considera que la optimización de la formulación en base a la caracterización morfológica, puede ser útil ya que sirve para demostrar la correlación entre la morfología del lipoplexo y su eficiencia de transfección (Kapoor y cols., 2012).

A continuación se muestran los resultados de las microscopías para las NPCs preparadas en buffer acetato pH 5 y buffer fosfato pH 7 (figura 20). Las preparaciones realizadas en glicerol 2,76 % (p/p) y en agua no fueron analizadas por TEM y SEM, dado que se descartaron en base a los resultados de los ensayos de unión a siRNA, realizados en forma paralela a estas microscopías (ver sección IV.1.1.2).

Si bien para ambas preparaciones se observaron partículas de tamaño nanométrico, las mismas presentaron diferencias en cuanto a su forma y distribución (figura 20). En el caso de las nanopartículas obtenidas por dispersión de fosfatidilcolina en buffer acetato pH 5, se observó una forma esférica uniforme y partículas mayormente aisladas (figura 20 a y b), mientras que las nanopartículas dispersadas en buffer fosfato pH 7 presentaron una forma irregular, con sectores en los que las partículas eran alargadas o cilíndricas, y con tendencia a agruparse entre sí (figura 20 d y e).



**Figura 20:** Imágenes representativas de los estudios de Microscopía Electrónica de las NPCs preparadas por dispersión en los buffers acetato pH 5 vacías (a) y las mismas NPCs cargadas con siRNA a N/P = 8000 (b y c); NPCs preparadas por dispersión en buffer fosfato pH 7 vacías (d) y cargadas con siRNA a N/P = 8000 (e y f). Las imágenes a), b), d) y e) corresponden a la Microscopía de Transmisión, mientras que las c) y f) corresponden a la Microscopía de Barrido.

El tamaño de las nanopartículas también se estimó mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*) (tabla 7). Nuevamente, se realizó este ensayo sólo para las NPCs preparadas en buffer acetato pH 5 y buffer fosfato pH 7.

Según los resultados obtenidos mediante esta técnica, las NPCs presentan tamaños que van desde los 180–250 nm. Los tamaños obtenidos en micrografías fueron menores que los estimados usando DLS. Esto es entendible considerando que esta última técnica determina el tamaño midiendo el movimiento de las partículas debido al movimiento Browniano. Por lo tanto, este tamaño es en realidad el de las partículas más el de toda la capa acuosa circundante que se mueve junto a ellas. En contraste, el tamaño resultante de las micrografías estima sólo el correspondiente a la partícula (Cui y cols., 2006).

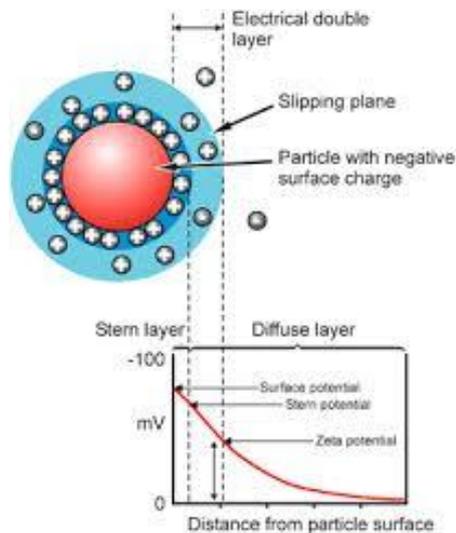
Diluyente	Tamaño diam. (nm)	Potencial Z (mV)
B. Acetato pH 5	232,7 ± 19,6	13,8 ± 2,1
B. Fosfato pH 7	189,1 ± 11,9	-40,3 ± 3,0

**Tabla 7:** Tamaños de partícula y valores de Potencial Z obtenidos para las NPCs 2% (p/v) preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7. Se muestran los resultados expresados como la media ± su desvío estándar (n=4).

La caracterización fisicoquímica de las nanopartículas también contempló la determinación del Potencial Z de las mismas (tabla 7). Todas las nanopartículas tienen una carga neta asociada que atrae iones de signo contrario, que quedan firmemente adheridos a su superficie formando una capa monomolecular de contraiones llamada capa fija o de Stern. Los demás iones del medio se distribuyen en distintos niveles de acuerdo a la carga de la nanopartícula, formando la capa difusa o de Gouy-Chapman (figura 21). Hay un punto de la capa difusa donde la carga de la nanopartícula no se hace sentir más, se lo llama punto de electroneutralidad. La resultante de la capa difusa es de la misma magnitud pero de signo contrario a la capa fija. Como no se puede medir la carga de la nanopartícula, se estima la diferencia de potencial que hay entre la zona de separación de la capa fija y de la capa difusa y el punto de electroneutralidad. A ese potencial se lo denomina Potencial Z y es la verdadera estimación de la carga de la nanopartícula; propiedad que tiene incidencia sobre la capacidad de las nanopartículas de unir oligonucleótidos, sobre sus interacciones con la membrana celular y su citotoxicidad.

En cuanto al Potencial Z, los valores obtenidos para las nanopartículas preparadas en buffer acetato pH 5 resultaron positivos, mientras que para las NPCs obtenidas con el buffer fosfato pH 7 como diluyente, fue negativo (tabla 7). Este resultado era previsible, y puede ser explicado teniendo en cuenta

los cambios en la proporción de carga, de las diferentes formas cargadas de las cabezas polares zwitteriónicas de la fosfocolina en los diferentes pH, y de la organización conformacional de las moléculas resultantes.



**Figura 21:** Esquema ilustrativo de la carga superficial de una nanopartícula. Se muestra una partícula con carga neta negativa, su capa de contraiones (Stern) y su capa difusa (Gouy-Chapman) y la consecuente representación del Potencial z asociado a la misma. Imagen tomada de [www.scai.uma.es/servicios/aqcm/eel/eel.html](http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/eel/eel.html)

Luego, las NPCs fueron cargadas con siRNA a diferentes proporciones (relación N/P) y evaluadas con respecto a tamaño medio y Potencial Z (tabla 8). La relación N/P implica la proporción en la que se preparan los complejos teniendo en cuenta las cargas negativas aportadas por los grupos fosfato (P) del siRNA, y las cargas positivas presentes en la molécula que se utilizará como vehículo, en nuestro caso, la fosfatidilcolina. Esta molécula aporta la carga positiva debido al grupo amonio cuaternario (N) que posee.

Los resultados obtenidos mostraron que a medida que la relación N/P disminuye, el tamaño de partícula tiende a disminuir ligeramente. Estas diferencias podrían deberse al cambio en las interacciones electrostáticas presentes en la cabeza polar de la fosfatidilcolina cuando es agregado el siRNA.

Los valores de Potencial zeta de las partículas al unir siRNA presentaron variaciones con respecto a las vacías. Las preparadas en buffer acetato pH 5, mostraron los mayores cambios, pasando de valores positivos a negativos; mientras que los valores para las formuladas en buffer fosfato pH 7, se mantuvieron negativos. En ambos casos, se observó que a medida que la relación N/P disminuye, la carga superficial de estos complejos toma valores de potencial más negativos. Esto indicaría que la ubicación del siRNA en la partícula podría ser principalmente superficial.

Las evaluaciones de tamaño medio, y distribución de tamaño, son parámetros de la formulación que dan indicios acerca de la homogeneidad de los sistemas. El índice de polidispersión (Pdl) de una formulación refleja el rango de especies de nanopartículas presentes cerca del tamaño medio deseado; se prefieren nanopartículas de tamaño uniforme con un Pdl < 0,2. De esta manera, los cambios en el tamaño medio de partícula y en el Pdl pueden ser usados como indicadores de estabilidad a largo plazo (Kapoor y cols., 2012).

Diluyente	Relación N/P	Tamaño diam. (nm)	Pdl	Potencial Z (mV)
Buffer Acetato pH 5	8000	364,9 ± 35,4	0,452	-35,5 ± 2,7
	4000	384,5 ± 51,5	0,280	-54,4 ± 5,2
	2000	303,2 ± 1,40	0,185	-59,1 ± 3,1
	1000	252,5 ± 19,8	0,263	-59,7 ± 2,2
	100	196,9 ± 14,1	0,398	*
Buffer Fosfato pH 7	8000	371,5 ± 36,3	0,463	-41,3 ± 1,9
	4000	375,5 ± 27,1	0,484	-58,4 ± 3,4
	2000	343,4 ± 25,7	0,470	-61,4 ± 2,6
	1000	328,2 ± 61,9	0,448	-63,1 ± 3,0
	100	271,5 ± 28,2	0,463	*

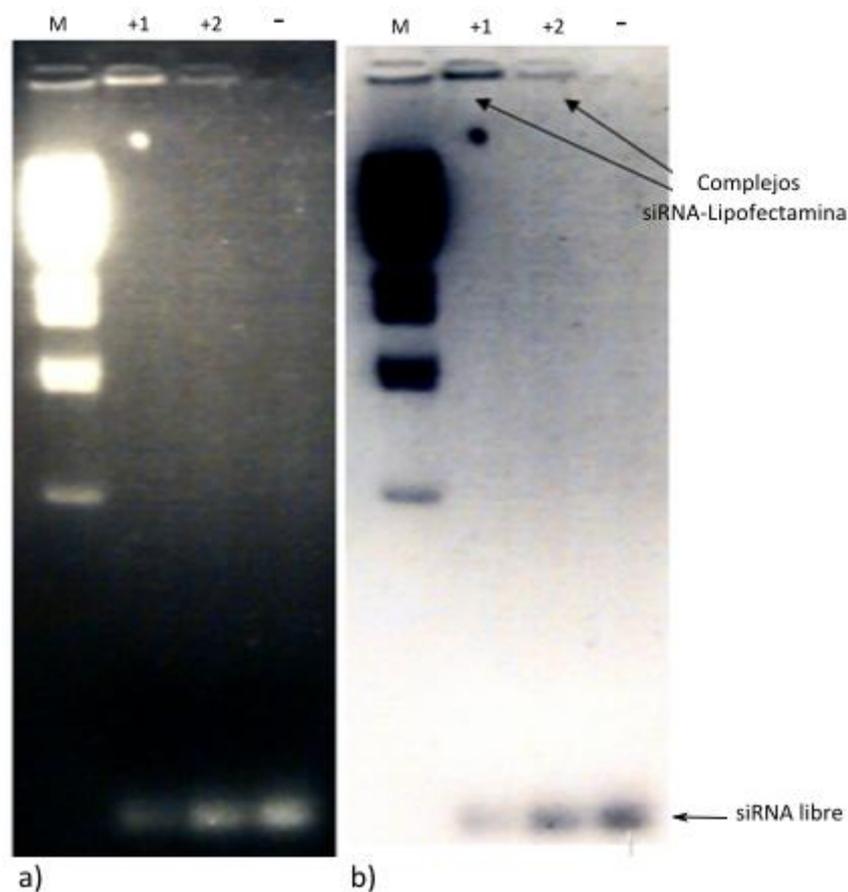
**Tabla 8:** Tamaño medio de partícula y Potencial Zeta de las NPCs dispersadas en Buffer Acetato pH 5 y Buffer Fosfato pH 7, cargadas con siRNA en diferentes relaciones N/P. Los resultados se informan como valor medio ± desvío estandar (n=4). (Pdl: índice de polidispersión en la medición). \*: indeterminado, baja relación señal/ruido.

#### IV.1.1.2 Ensayos de unión NPCs-siRNA

Con el propósito de evaluar la capacidad de las Nanopartículas de Fosfatidilcolina de unir oligonucleótidos, se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de agarosa, conocidos como EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Esta técnica implica el retardo de la movilidad del oligonucleótido unido respecto al libre, permitiendo así evidenciar en qué casos se da la formación de los complejos entre las nanopartículas y el siRNA (ver Materiales y Métodos). Antes de realizar la corrida electroforética, el oligonucleótido y los sistemas de vehiculización son incubados en distintas relaciones N/P durante un tiempo determinado para que se formen los complejos. Para el cálculo de esta relación se consideraron las cargas negativas aportadas por los grupos fosfato (P) del siRNA, y las cargas positivas aportadas por el grupo amonio cuaternario de la fosfatidilcolina (N) constituyente de las NPCs. Como control negativo del ensayo se analizó la migración electroforética del siRNA solo. Como control positivo, el siRNA se incubó con Lipofectamina RNAiMAX, un reactivo comercial utilizado para la transfección de siRNA a células de mamíferos, al cual nos referiremos siempre como Lipofectamina.

En primer lugar, se realizó un ensayo control para establecer las condiciones experimentales

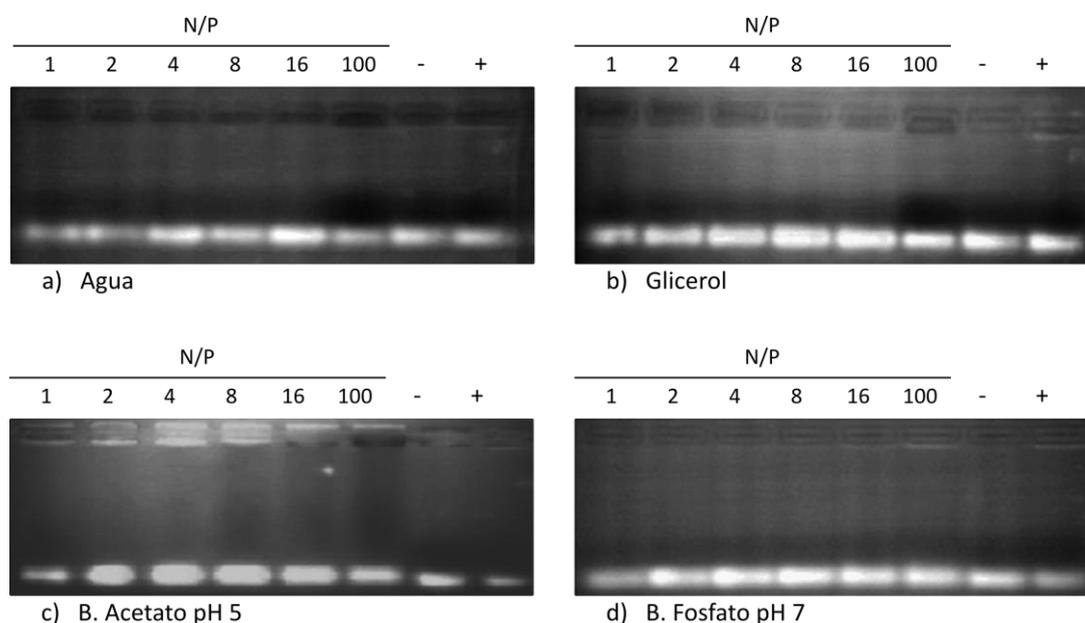
adecuadas, para poner en evidencia la unión del oligonucleótido por parte del vehículo utilizado como control positivo. Se probaron dos relaciones de siRNA:Lipofectamina (1:2,8 y 1:1,4), manteniendo constante la cantidad del dúplex. Los resultados de este ensayo demostraron claramente cómo el siRNA libre, dado su pequeño tamaño, migra prácticamente con el frente de corrida, mientras que el siRNA complejo es retenido en el punto de siembra (figura 22). El siRNA incubado con la mayor cantidad de Lipofectamina es retenido, y por ende complejo, más eficientemente, por lo que esta segunda relación siRNA:Lipofectamina fue seleccionada como control positivo para los posteriores ensayos.



**Figura 22:** Imágenes representativas del ensayo control de EMSA. Se probaron 2 relaciones de siRNA-Lipofectamina (1:2,8 en calle +<sub>1</sub> y 1:1,4 en calle +<sub>2</sub>). También se sembraron marcadores de DNA (M), y el siRNA solo como control negativo (-). Los resultados se visualizaron mediante un transiluminador, se muestra una fotografía directa representativa (a), y la misma imagen con los colores invertidos (b), para mejorar el contraste y visualizar mejor las bandas.

Habiendo establecido las condiciones del ensayo de EMSA para el tratamiento control, se inició el análisis de la capacidad de unión de siRNA por las nanopartículas de PC con valores bajos de relaciones N/P. La figura 23 muestra los resultados del ensayo EMSA para las Nanopartículas de Fosfatidilcolina preparadas en agua (a), glicerol (b), buffer acetato pH 5 (c) y buffer fosfato pH 7 (d). Aquí se evidencia que

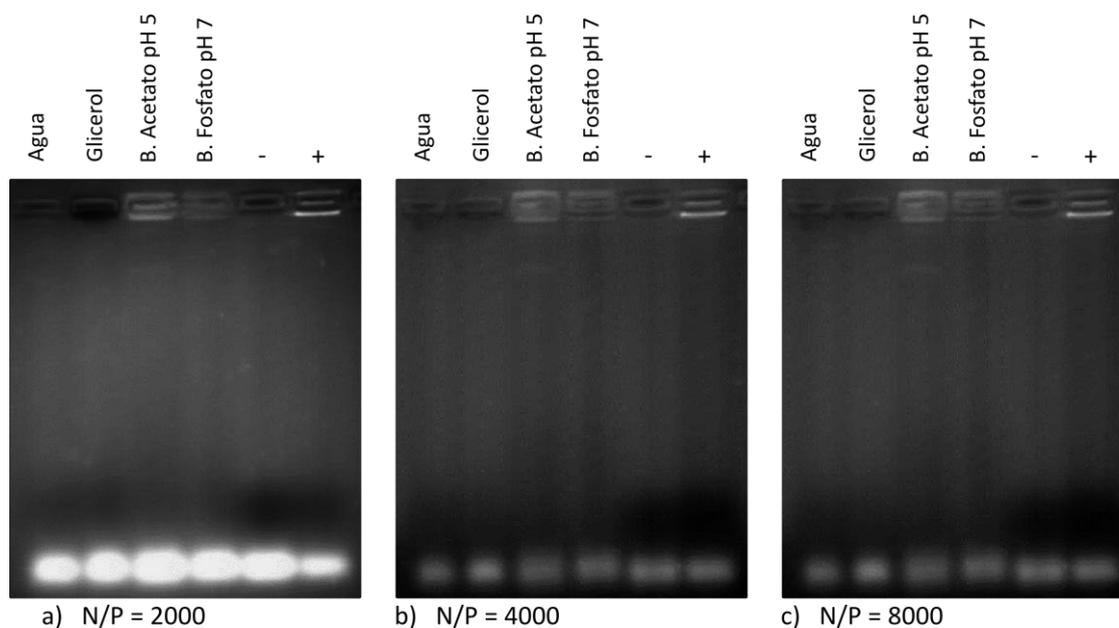
sólo hay formación del complejo NPCs-siRNA para las nanopartículas preparadas en los buffer acetato pH 5 y fosfato pH 7 (figura 23 c y d). También se puede observar que las nanopartículas preparadas en pH 5 logran unir siRNA a relaciones N/Ps relativamente bajas, a comparación de lo que se evidencia para las dispersadas en buffer pH 7, que forman complejos con los siRNA a partir de relaciones N/P = 100.



**Figura 23:** Imágenes representativas de los ensayos de EMSA. Se muestran los resultados obtenidos para las NPCs preparadas en Agua (a), Glicerol (b), Buffer Acetato pH 5 (c) y Buffer Fosfato pH 7 (d) a relaciones N/P bajas. El análisis se realiza en paralelo a controles negativo (-) y positivo (+).

Frente a estos resultados, se decidió ampliar el estudio de la capacidad de unión de oligonucleótidos por las nanopartículas de fosfatidilcolina a relaciones N/P mayores. Se realizaron los ensayos de unión de siRNA por las nanopartículas para las relaciones N/P 2000, 4000 y 8000. Se volvieron a evaluar las nanopartículas preparadas en agua y glicerol a fin de determinar si los resultados negativos obtenidos en el ensayo anterior se debieron a la baja relación N/P utilizada.

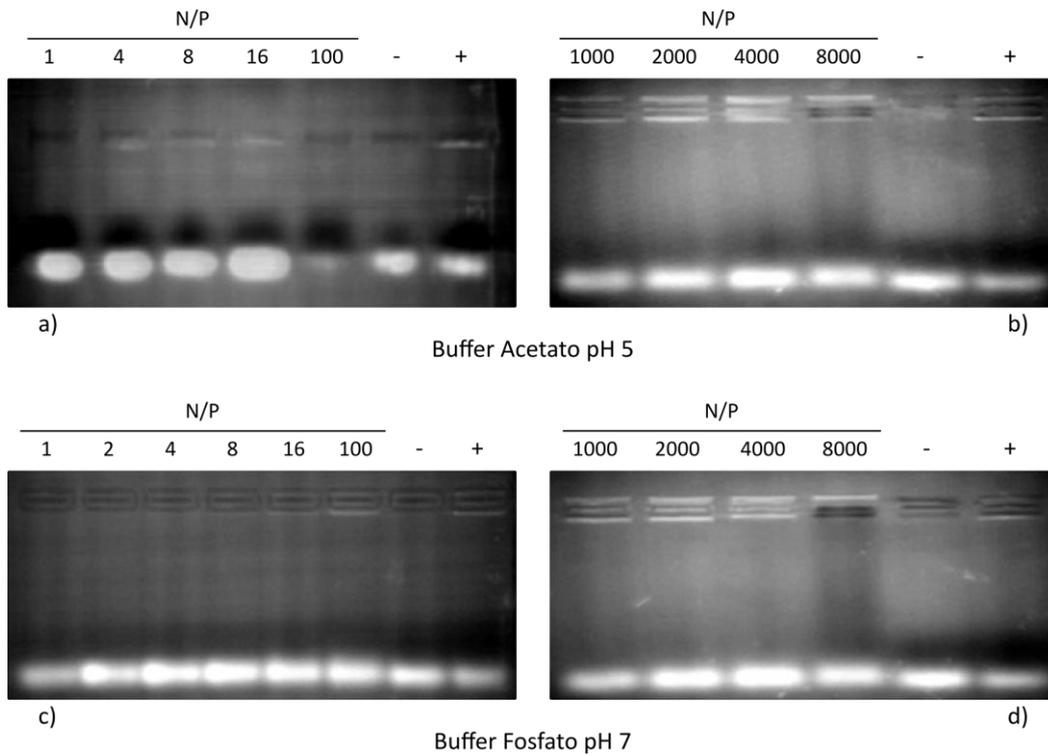
En los resultados para los ensayos de EMSA a N/Ps más altos (figura 24) sólo se logró evidenciar unión del siRNA a las nanopartículas preparadas en los buffer acetato pH 5 y fosfato pH 7. En coincidencia con los resultados de los estudios a relaciones N/P bajas, no se evidenció la formación de complejos entre el siRNA y las NPCs preparadas en agua y glicerol, a ninguna relación N/P ensayada.



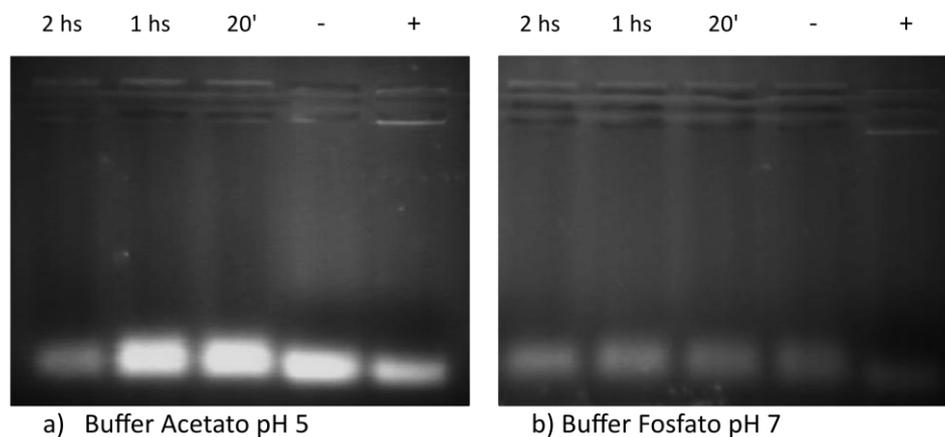
**Figura 24:** Imágenes representativas de los ensayos de EMSA. Se muestran los resultados obtenidos para las NPCs preparadas en Agua, Glicerol, Buffer Acetato pH 5 y Buffer Fosfato pH 7 a relaciones N/P altas, siendo 2000 (a), 4000 (b) y 8000 (c). El análisis se realiza en paralelo a controles negativo (-) y positivo (+).

A fin de comparar la capacidad de unión de siRNA de las NPCs preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7, se realizaron los ensayos de EMSA para cada formulación en un amplio rango de relaciones N/P (figura 25). Nuevamente, los resultados mostraron que a las NPCs dispersadas en buffer acetato pH 5, son capaces de unir siRNA a partir de N/Ps = 4 (figura 25 a), mientras que las dispersadas en buffer fosfato pH 7 recién lo hacen a N/P =100 (figura 25 c). Estos resultados, indicarían que las nanopartículas preparadas a pH 5 son más eficientes para unir oligonucleótidos. A relaciones N/P altas, ambas preparaciones parecen ser igualmente capaces de formar complejos con el siRNA.

Por último, cabe mencionar que se controló que la capacidad de unión de siRNA por las nanopartículas no variara si se incuban durante tiempos más prolongados. Para ello, se realizaron las incubaciones de las nanopartículas con el siRNA durante 2 hs, 1 h y 20 minutos, y se resolvieron los complejos formados mediante un ensayo de EMSA. Se mantuvo el tiempo de incubación para el control positivo en 20 minutos. Como se puede apreciar en la figura 26, corroboramos que a mayores tiempos de incubación no varía apreciablemente la capacidad de unión de siRNA por las nanopartículas de PC.



**Figura 25:** Imágenes representativas de los ensayos de EMSA. Se muestran los resultados obtenidos para las NPCs preparadas a pH 5, a relaciones N/P bajas (a) y altas (b); y los de las NPCs preparadas a pH 7, a relaciones N/P bajas (c) y altas (d). El análisis se realiza en paralelo a controles negativo (-) y positivo (+).



**Figura 26:** Imágenes representativas de los ensayos de EMSA. Se muestran los resultados obtenidos para las NPCs dispersadas en buffer acetato pH 5 (a) y buffer fosfato pH 7 (b), ambas a una relación N/P = 8000, utilizando diferentes tiempos de incubación para la formación de los complejos. El análisis se realiza en paralelo a controles negativo (-) y positivo (+).

En base a estos resultados pudimos concluir que las Nanopartículas de Fosfatidilcolina

preparadas tanto en agua como en glicerol, no presentan una capacidad de unión de siRNA aceptable. Esto indica que estas formulaciones no servirían para la vehiculización de oligonucleótidos, por lo que decidimos descartarlas para el resto del trabajo.

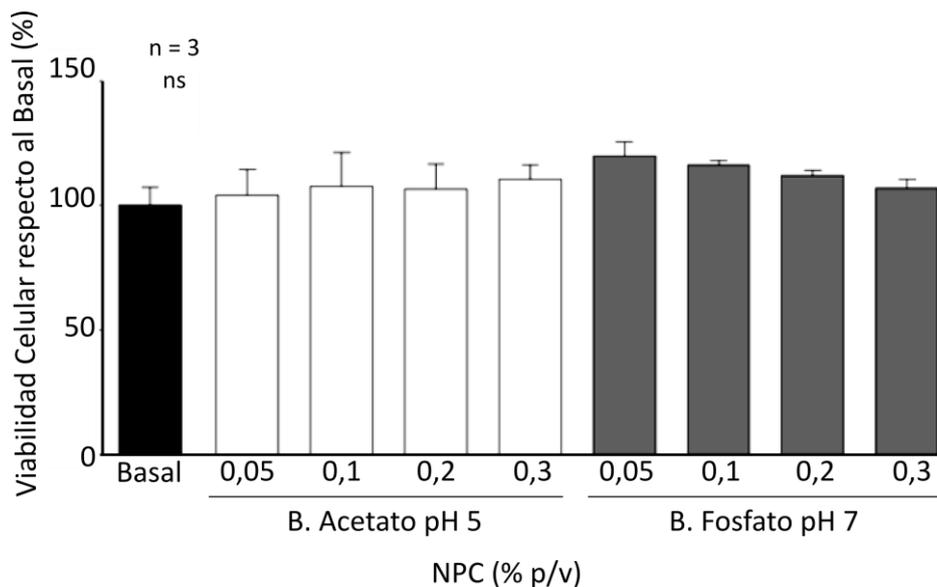
En cambio, las formulaciones preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7 son capaces de unir oligonucleótidos considerablemente, por lo que se decidió continuar el trabajo con estas nanopartículas, y utilizar relaciones N/P altas para los ensayos de transfección, dado que a estos valores se observa la mayor unión del siRNA.

Es importante remarcar que si bien se analizó una amplia variedad de relaciones N/Ps, en ningún caso se obtuvo una unión total del siRNA a las nanopartículas, lo que se evidenciaría por la desaparición de la banda correspondiente al siRNA libre. Sin embargo, este efecto tampoco se logró apreciar en todos los casos, con el reactivo comercial, Lipofectamina.

#### **IV.1.1.3 Ensayos de Citotoxicidad**

Como se mencionó anteriormente, la nula o baja toxicidad de los vehículos es un requisito fundamental en nuestro desarrollo. Por lo tanto, habiendo establecido los rangos de relaciones N/P para los cuales se obtienen los complejos NPCs-siRNA, evaluamos la citotoxicidad de las preparaciones obtenidas mediante la dispersión en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7. Con este fin, estudiamos la viabilidad celular de la línea MCF-7 tras la incubación con distintas concentraciones de las nanopartículas, mediante el ensayo de reducción del reactivo MTS. En todos los casos se utilizó como control células MCF-7 sin tratamiento, al que se le otorgó un valor relativo de viabilidad del 100 %. El rango de concentraciones de las nanopartículas evaluados se calculó en base a las relaciones N/P más adecuadas para la unión de siRNA, según los ensayos de EMSA realizados, y a las concentraciones de siRNAs recomendadas para ensayos de transfección.

Como se puede observar en la figura 27, los resultados obtenidos no evidenciaron efecto citotóxico de las NPCs a las concentraciones analizadas. Por lo tanto, se pudo concluir que al momento de definir las condiciones para los ensayos de silenciamiento, la citotoxicidad no sería un parámetro relevante, mientras la concentración final de las nanopartículas no exceda la estudiada en este punto.



**Figura 27:** Ensayo de citotoxicidad de las Nanopartículas de Fosfatidilcolina. Las nanopartículas fueron incubadas con las células MCF-7 en medio DMEM suplementado con suero 10%, durante 48hs. Posteriormente, se realizó el ensayo de determinación de la viabilidad celular con el reactivo MTS (ver sección Materiales y Métodos). Resultados expresados en porcentajes, tomando arbitrariamente como 100% los valores obtenidos para las células no tratadas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. EL análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls.

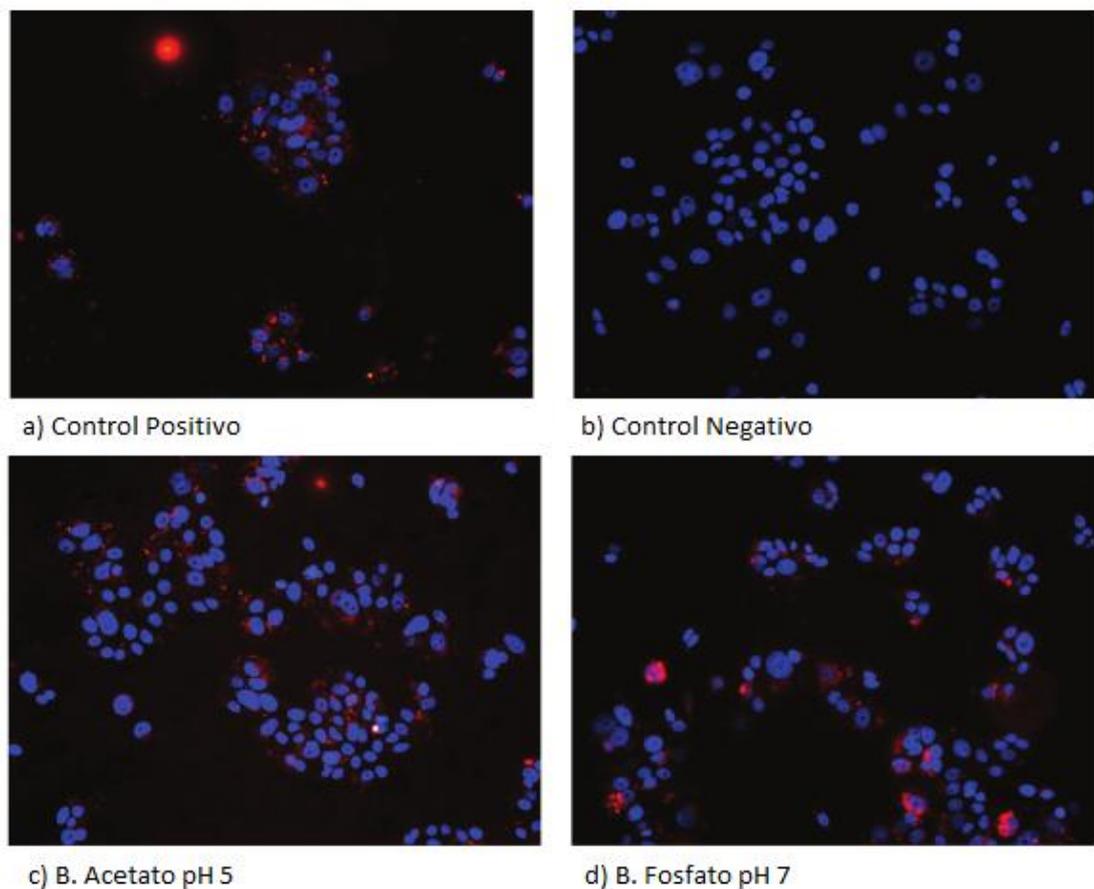
#### IV.1.1.4 Ensayos de Captación intracelular de siRNA

A continuación, se procedió a evaluar la capacidad de las Nanopartículas de Fosfatidilcolina para internalizar oligonucleótidos a la célula. Con este fin se realizaron ensayos de transfección utilizando un siRNA inespecífico, unido al fluorocromo Alexa Fluor Red (rojo). Dado que los resultados de EMSA sugerían una buena capacidad de unión a  $N/P = 8000$ , se formaron los complejos NPCs-siRNAs a dicha relación, con una concentración final de oligonucleótido de 10 nM (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor). Este siRNA no contiene una secuencia contra un gen blanco, si no que son moléculas de RNA bicatenario utilizados como control de la captación de siRNA por las células. Como control negativo se incubó el siRNA solo con la línea celular MCF-7, y como control positivo, se incubaron las células con el complejo Lipofectamina-siRNA.

Se estudió la internalización de los oligonucleótidos marcados mediante Microscopía de Fluorescencia (figura 28). Como era de esperarse, el tratamiento de las células con el siRNA solo, es decir sin estar asociado a un vehículo, no mostró marca detectable en el interior celular (figura 28 b).

Como se mencionó en la introducción, el siRNA desnudo, debido a su carga neta negativa y a su tamaño, difícilmente puede atravesar en forma eficiente la membrana celular e ingresar a la célula. Este control negativo se utilizó también para establecer los niveles basales (si es que hubiera) de autofluorescencia y/o de fluorescencia inespecífica, a partir de los cuales se analiza el resto de las condiciones ensayadas.

Se detectó marcación roja intracelular debida a la presencia del siRNA, tanto para la transfección con el reactivo comercial Lipofectamina (figura 28 a), como con las preparaciones obtenidas por nuestro grupo (figura 28 c y d). La marcación se observó fundamentalmente en el citoplasma celular, y en particular para las NPCs preparadas en buffer pH 7, los resultados sugerirían acumulación en la zona perinuclear. Este resultado nos indica que las nanopartículas obtenidas, efectivamente presentan capacidad de internalizar siRNA.



**Figura 28:** Captación celular de siRNA evaluada por Microscopía de Fluorescencia. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoescht (azul), el siRNA se evidencia en rojo. La línea celular fue incubada con siRNA-Lipofectamina (a), sólo con siRNA (b) y con los complejos formados entre las nanopartículas preparadas en buffer acetato pH 5 y el siRNA (c) o con los complejos formados entre las nanopartículas preparadas en buffer fosfato pH 7 y el siRNA (d), ambas a una relación N/P = 8000.

#### IV.1.1.5 Ensayos de Silenciamiento

Dado que la principal vía de internalización de siRNA complejo con lípidos o polímeros es la endocitosis (Wang y cols., 2010), estas moléculas pueden estar sujetas a degradación endosomal. Por lo tanto, la eficiencia de un vehículo para transfección no solo depende de su capacidad para favorecer la captación celular, sino también de su habilidad para permitir el escape de esta vía de degradación. Para completar el estudio de las Nanopartículas de Fosfatidilcolina como vehículos de siRNA, se evaluó si éstas son capaces de permitir el silenciamiento de la expresión de un gen blanco.

Se realizaron ensayos de transfección utilizando las NPCs obtenidas por disolución en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7, y un siRNA contra el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). Se eligió como blanco este receptor debido a su amplia asociación con tumores, y porque el objetivo último de esta línea de trabajo es la aplicación de nuevos vehículos de siRNA para lograr el silenciamiento de genes implicados en cáncer.

Como control positivo se realizó la transfección del siRNA anti EGFR utilizando como vehículo la Lipofectamina. Como control negativo se realizaron transfecciones de un siRNA *scramble* con las nanopartículas obtenidas por dispersión en buffer acetato pH 5 y en buffer fosfato pH 7. El siRNA *scramble* posee la misma composición nucleotídica que el siRNA específico, pero no su misma secuencia, por lo que no debería afectar la expresión del gen blanco. Además, se incluyó la condición basal, es decir las células sin tratar.

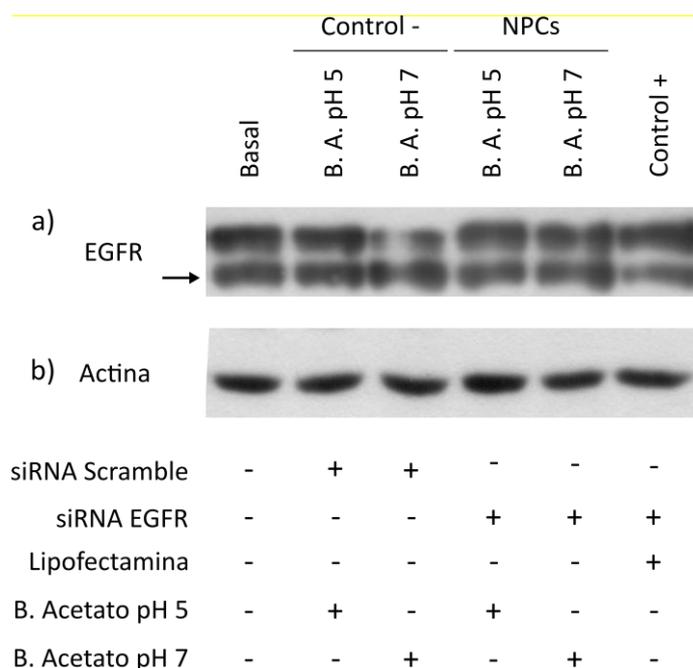
Si bien los resultados previos de internalización y de formación de complejos NPCs-siRNA sugerían utilizar valores de N/P = 8000, no se pudieron realizar los ensayos de silenciamiento en esas condiciones. Para desencadenar eficientemente el silenciamiento resultó necesario usar una concentración de siRNA mucho más alta que en los ensayos de internalización; y por lo tanto, para lograr una relación de N/P = 8000 en estos ensayos, la concentración final de nanopartículas excedería por mucho los valores no citotóxicos para estas formulaciones. De esta manera, se realizaron los ensayos de silenciamiento con relaciones N/P de 100 y 1000.

El silenciamiento mediado por siRNA de un gen blanco, se traduce en una disminución del contenido de la proteína específica producto de dicho gen. Por lo tanto, se evaluó el silenciamiento del gen de EGFR mediante la técnica de *Western Blotting* empleando un anticuerpo anti-EGFR (figura 29).

En la figura 29 a, se muestra un resultado de *Western blot* anti-EGFR, representativo de los ensayos de silenciamiento realizados a ambos N/Ps. En estos ensayos, sólo se logró una disminución reproducible en la expresión del EGFR para el control positivo, es decir, cuando la transfección se realizó utilizando Lipofectamina como vehículo. No se observaron diferencias apreciables en la expresión del

EGFR entre la condición basal, el control negativo y las células transfectadas con las nanopartículas diseñadas.

En base a estos resultados, podemos concluir que si bien las Nanopartículas de Fosfatidilcolina preparadas en buffer acetato pH 5 y fosfato pH 7, presentan la capacidad de unir siRNA y transportarlo hasta el interior de la célula, no resultaron eficientes para mediar el silenciamiento de un gen blanco en las condiciones ensayadas.



**Figura 29:** Ensayo representativo de *Western Blotting* para evaluar el silenciamiento de EGFR. a) *Western Blot* anti-EGFR. Se muestran los resultados para las condiciones basal, controles negativos y positivo, y las NPCs a una relación N/P = 1000 .b) Se utilizó un *Western blot* anti-actina como control de carga.

#### IV.1.2 Estudio de los efectos biológicos de las NPCs sobre la línea celular MCF-7

El uso de nanopartículas se ha propuesto para el desarrollo de biomedicinas innovadoras y con distintos fines industriales. Dado el amplio rango de aplicaciones y la exposición ambiental a las mismas, surgió últimamente el interés por estudiar los efectos que los nanomateriales producen sobre sistemas biológicos (Thach y cols., 2013). En particular, los sistemas propuestos en este estudio para vehiculización de oligonucleótidos tienen como principal constituyente la fosfatidilcolina (PC), la cual interviene en

señalización intracelular desde la membrana plasmática. La PC puede ser hidrolizada por la fosfolipasa D (PLD) o por la fosfolipasa C dependiente de PC (PC-PLC - *PhosphatidylCholine-dependent PhosphoLipase C*); produciendo, en ambos casos, mensajeros secundarios involucrados en diversas vías de señalización: el ácido fosfatídico (PA), producido por la hidrólisis vía PLD, y el diacilglicerol (DAG). El PA puede inducir proliferación y supervivencia celular a partir de la activación de las vías de señalización de las MAPKs y PI3K/AKT (Clem y cols., 2011); y también se une y activa a la proteína mTOR la cual interviene en distintos procesos celulares como transcripción, traducción de proteínas y crecimiento celular (Laplante y cols., 2012). El DAG está implicado en la activación de kinasas que inducen migración y proliferación celular como las MAPKs (Plo y cols., 2000).

Por todo lo expuesto, resulta interesante estudiar los efectos biológicos de las nanopartículas de PC sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Para ello, y considerando las implicancias biológicas de la fosfatidilcolina, se analizó la incidencia de estos sistemas sobre la activación de vías de señalización involucradas en el control del ciclo celular y supervivencia, sus efectos sobre proliferación celular y, sobre la localización intracelular de un receptor de membrana como es el EGFR.

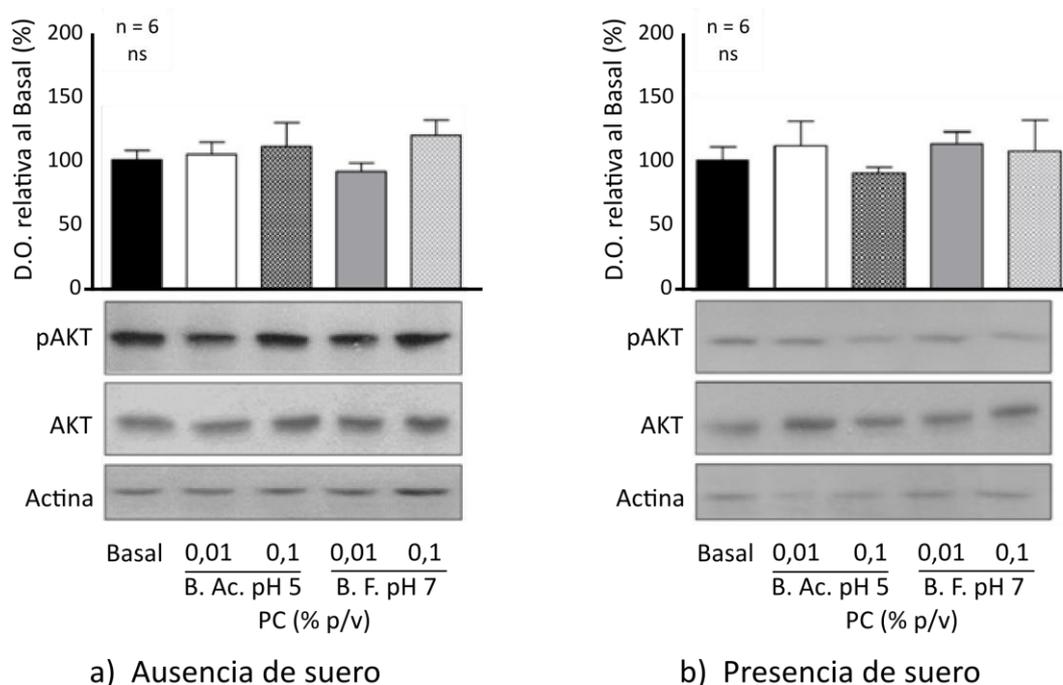
Considerando que las nanopartículas se proponen de como posibles vehículos de oligonucleótidos, los ensayos respecto a la actividad biológica de las mismas, se realizaron en condiciones semejantes a las que se usarían para transfecciones. En primer lugar, se utilizaron dos concentraciones finales de las NPCs en el medio de cultivo, comprendidas en el rango de su posible uso en ensayos de transfección *in vitro*: 0,01 y 0,1 % (p/v). Además, cabe destacar que estas concentraciones finales, fueron las utilizadas en los ensayos de silenciamiento de EGFR a N/Ps de 100 y 1000, respectivamente. Por otro lado, los estudios fueron analizados en presencia o ausencia de suero, puesto que esta es una condición variable según la línea celular a transfectar.

#### **IV.1.2.1 Estudio de los efectos de las NPCs sobre la activación de cascadas de señalización implicadas en proliferación y supervivencia celular**

Dado que las vías de AKT-mTOR y de las MAP Kinasas MEK 1/2 - ERK 1/2 están implicadas en proliferación, crecimiento y supervivencia celular y que, a su vez, son afectadas por los segundos mensajeros derivados de la metabolización de la PC, se decidió estudiar el grado de fosforilación y el contenido proteico de dichas proteínas tras el tratamiento de las células de cáncer de mama con las nanopartículas diseñadas. Para ello, las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con las NPCs en

concentración final 0,01 y 0,1 % (p/v) en medio con y sin suero. Transcurridas las 24 hs de incubación, las células se lavaron y los solubilizados celulares fueron preparados para su análisis por *Western Blotting*. Los resultados de estos ensayos, fueron luego, densitometrados, graficados y analizados estadísticamente, para facilitar su comparación (figuras 30 a 33).

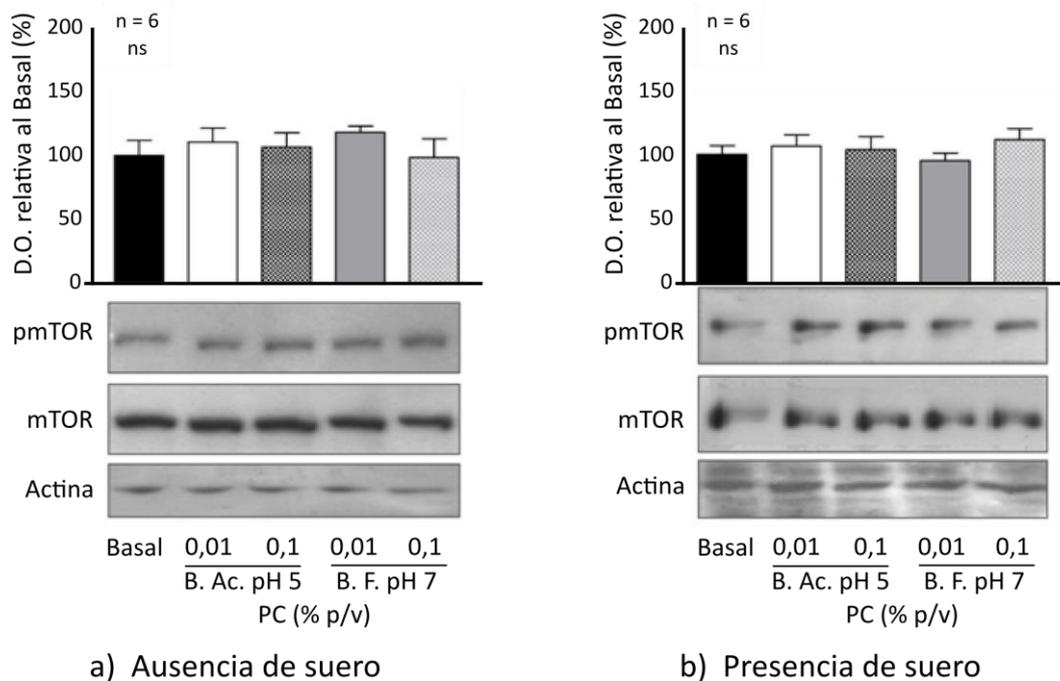
AKT es una Ser/Thr kinasa, cuya activación depende de la fosforilación en los residuos Treonina 308 y Serina 473. Se midieron los niveles de fosforilación de AKT Ser 473 (pAKT) y la concentración total de esta proteína en lo solubilizados celulares, mediante el uso de anticuerpos específicos anti-AKT y anti-pSer473AKT (figura 30). No se encontraron diferencias significativas para los niveles de fosforilación de AKT respecto al control Basal, al realizar la incubación de las células con las nanopartículas en presencia o en ausencia de suero. El contenido proteico de AKT tampoco se vio afectado por el tratamiento con las nanopartículas de PC.



**Figura 30:** Fosforilación y contenido proteico de AKT en las células tratadas con las Nanopartículas de PC. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con 0,1 y 0,01 % (p/v) de las NPCs preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7, en ausencia (a) o presencia (b) de suero. Se cuantificó la Densidad Óptica (D.O.) de cada calle; los resultados se muestran en porcentajes relativos al basal. Se representa la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls, para un n=6. (ns: no significativo).

La proteína mTOR es una Ser/Thr implicada en crecimiento celular que es activada por distintos factores de crecimiento vía AKT. Nuevamente se utilizaron anticuerpos específicos contra mTOR y contra

su estado fosforilado en Ser 2448 (pmTOR), en ensayos de *Western Blotting*. En concordancia con los resultados obtenidos para pAKT y AKT, los niveles de mTOR y pmTOR no resultaron significativamente distintos al basal en ninguna de las condiciones estudiadas (figura 31).

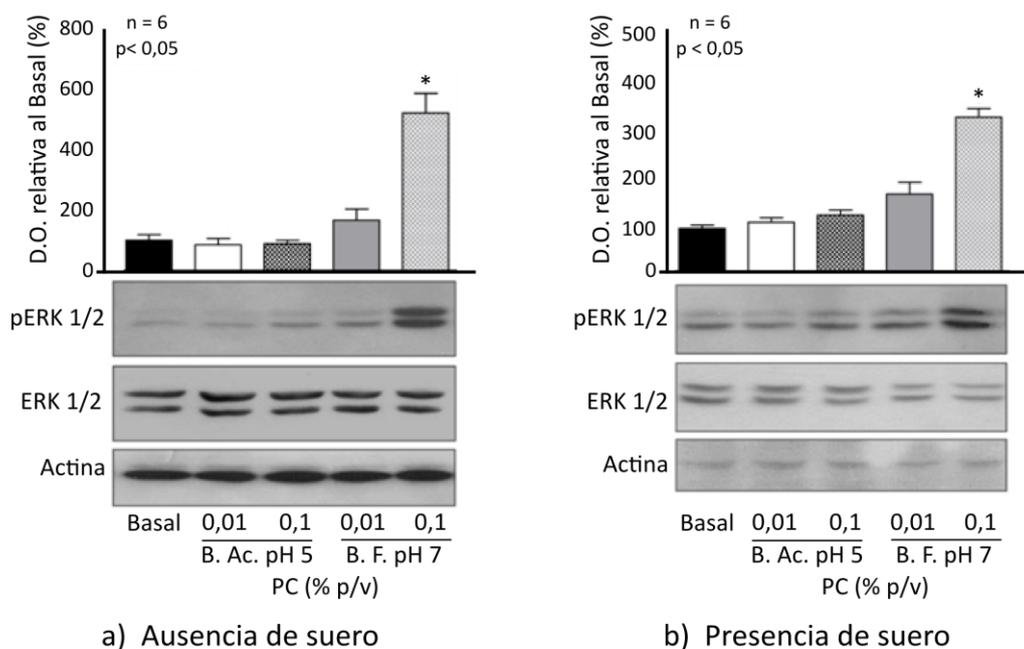


**Figura 31:** Fosforilación y contenido proteico de mTOR en las células tratadas con las Nanopartículas de PC. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con 0,1 y 0,01 % (p/v) de las NPCs preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7, en ausencia (a) o presencia (b) de suero. Se cuantificó la Densidad Óptica (D.O.) de cada calle; los resultados se muestran en porcentajes relativos al basal. Se representa la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls, para un n=6. (ns: no significativo).

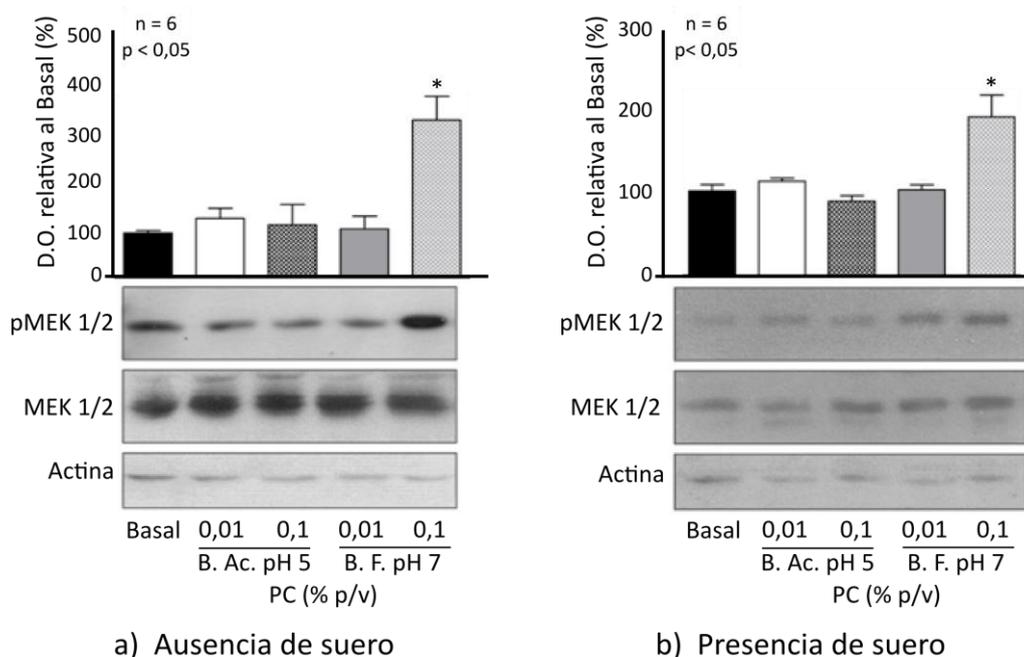
Por otro lado, la cascada de señalización Ras/Raf/MEK/ERK media la activación de efectores celulares involucrados en proliferación y diferenciación celular (Steelman y cols., 2004). Estas kinasas son activadas por segundos mensajeros que derivan de la metabolización de la fosfatidilcolina. Adicionalmente, se ha descrito la activación de la vía de las MAPKs por distintos sistemas nanoparticulados (Rauch y cols., 2013). Por lo tanto, a continuación se analizó la fosforilación y contenido proteico de MEK 1/2 y su sustrato ERK 1/2 tras incubación de las células con las nanopartículas de PC en medio sin suero o suplementado con el mismo (figuras 32 y 33).

En el caso de las proteínas MEK 1/2 y ERK 1/2, los resultados indican que sólo las nanopartículas de fosfatidilcolina preparadas en buffer fosfato pH 7, indujeron un aumento significativo de los niveles de fosforilación de dichas proteínas respecto al control (figuras 32 y 33). Este efecto se observó cuando las

células fueron incubadas con una concentración final de NPCs de 0,1 % (p/v), independientemente de la presencia o ausencia de suero en el medio. Es importante destacar que los niveles de fosforilación de ERK 1/2 (figura 32) mostraron una tendencia al aumento, aunque no resultaron significativamente distintos, cuando las células son tratadas con las mismas nanopartículas pero a una concentración final menor (0,01 % p/v). Los niveles proteicos de MEK 1/2 y de ERK 1/2 no mostraron variaciones, independientemente de la presencia o ausencia de suero.



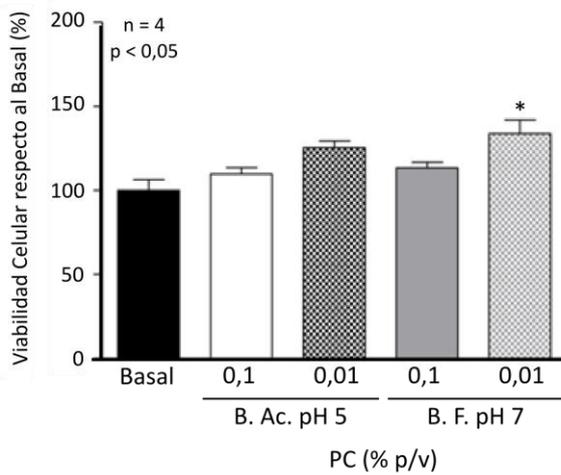
**Figura 32:** Fosforilación y contenido proteico de ERK 1/2 en las células tratadas con las Nanopartículas de PC. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con 0,1 y 0,01 % (p/v) de las NPCs preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7, en ausencia (a) o presencia (b) de suero. Se cuantificó la Densidad Óptica (D.O.) de cada calle; los resultados se muestran en porcentajes relativos al basal. Se representa la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls. Se indica con \* la diferencia significativa con respecto al Basal.



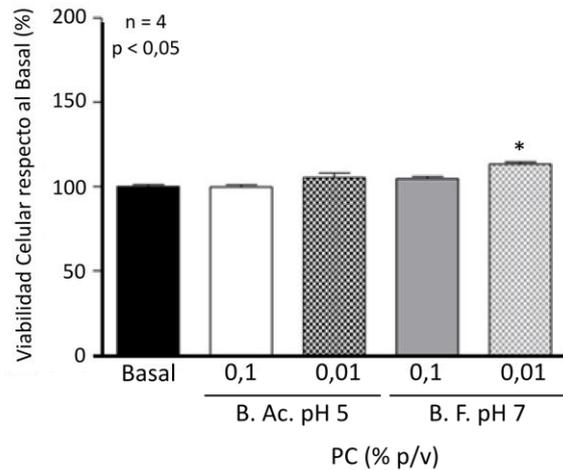
**Figura 33:** Fosforilación y contenido proteico de MEK 1/2 en las células tratadas con las Nanopartículas de PC. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con 0,1 y 0,01 % (p/v) de las NPCs preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7, en ausencia (a) o presencia (b) de suero. Se cuantificó la Densidad Óptica (D.O.) de cada calle; los resultados se muestran en porcentajes relativos al basal. Se representa la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls, para un  $n=6$ . Se indica con \* la diferencia significativa con respecto al Basal.

#### IV.1.2.2 Estudio de los efectos de las NPCs sobre viabilidad y proliferación celular

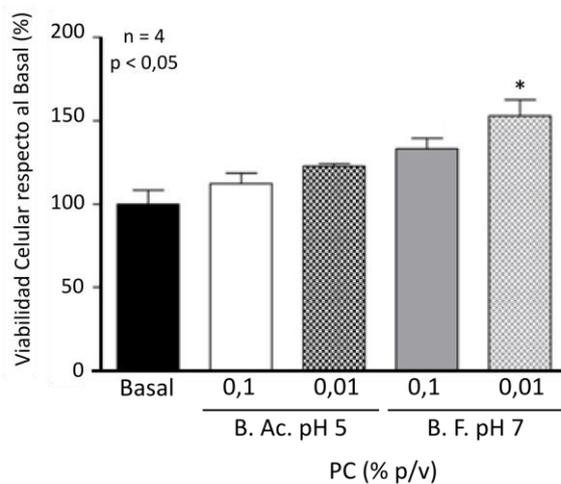
Considerando los resultados obtenidos para las fosforilaciones de ERK 1/2 y MEK 1/2 por las Nanopartículas de PC, y la ampliamente reportada implicancia de estas kinasas en proliferación celular, se evaluó el efecto de las nanopartículas de fosfatidilcolina sobre la viabilidad celular de la línea MCF-7 mediante el ensayo basado en la reducción de tetrazolium (ver M&M). Los ensayos se realizaron nuevamente tanto en presencia como ausencia de suero, pero en este caso además de evaluar la viabilidad a las 24 hs se estudió también a las 48 hs (figura 34).



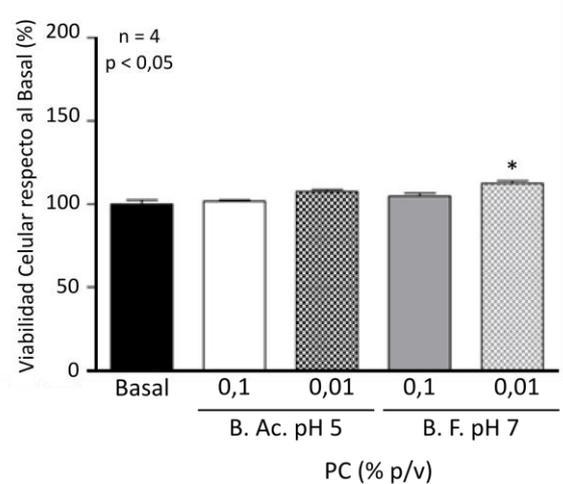
a) Ausencia de suero - 24 hs



b) Presencia de suero - 24 hs



c) Ausencia de suero - 48 hs



d) Presencia de suero - 48 hs

**Figura 34:** Viabilidad Celular de las células tratadas con las Nanopartículas de PC. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs (a y b) y 48 hs (c y d) con 0,1 y 0,01 % (p/v) de las NPCs preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7, en ausencia (a y c) o presencia (b y d) de suero. La viabilidad se evaluó mediante el ensayo basado en la reducción del MTS; los resultados se muestran en porcentajes relativos al basal. Se representa la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls, para un n=4. Se indica con \* la diferencia significativa con respecto al Basal.

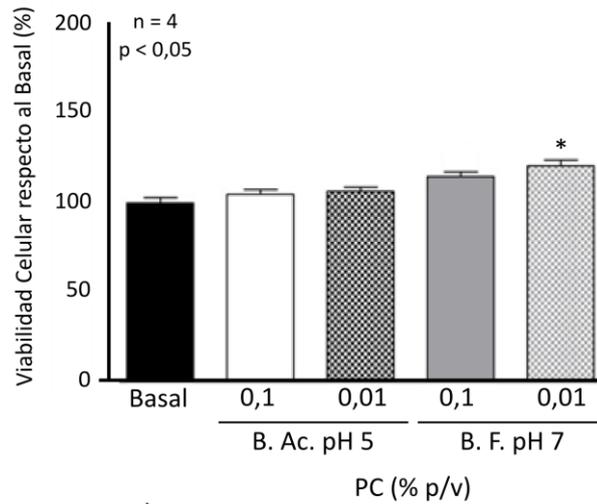
Los resultados obtenidos mostraron que al incubar las células con las nanopartículas dispersadas en buffer fosfato pH 7 al 0,1 % (p/v), se produjo un incremento significativo en la viabilidad celular, tanto en presencia como ausencia de suero y para ambos períodos de tiempo (figura 34). Cuando se trató a las células con las nanopartículas dispersadas en buffer acetato pH 5, a ambas concentraciones, o con las NPCs obtenidas en buffer fosfato pH 7 al 0,01 % (p/v), se obtuvo un leve aumento en la

viabilidad aunque no se alcanzó significancia estadística con respecto al basal.

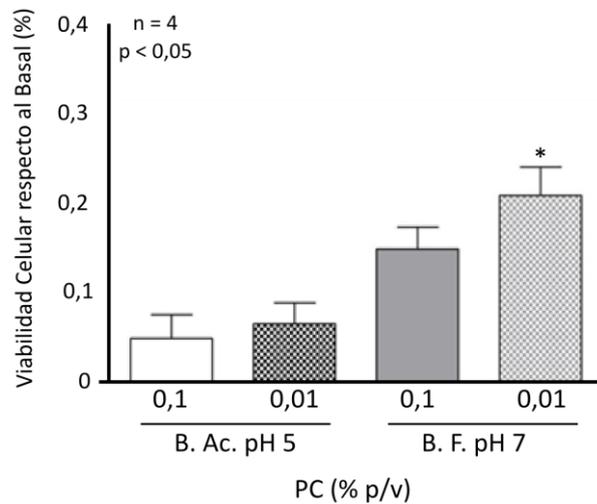
Con el fin de determinar si el aumento en la viabilidad celular observado, fue provocado por una inducción de la proliferación celular, se realizó el ensayo de incorporación de BromodeoxiUridina (BrdU) (ver M&M). Debido a la similitud estructural entre la timidina y la BrdU, esta puede ser incorporada en el nuevo material genético sintetizado. Mediante un anticuerpo específico anti-BrdU se cuantificaron los niveles incorporados de este compuesto, obteniendo así una estimación de la proliferación celular. Dado que en la figura 34 las mayores diferencias en viabilidad celular se observan para el ensayo realizado en ausencia de suero y durante 48 hs, se utilizaron estas mismas condiciones para este nuevo ensayo (figura 35).

En concordancia con los resultados obtenidos para la determinación de viabilidad celular, se observó un aumento en la proliferación celular cuando las células se trataron con las nanopartículas dispersadas en buffer fosfato pH 7 a la mayor concentración evaluada. Dicho aumento corresponde a un 20 % respecto a la condición basal (figura 35 b). Considerando que estos resultados correlacionan con los obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, podemos concluir que dicho aumento en la viabilidad efectivamente fue causado por un aumento en la proliferación celular.

Al comparar los resultados obtenidos mediante los ensayos de viabilidad y proliferación celular con los relativos al estudio de la activación de moléculas implicadas en señalización intracelular, se evidencia una correlación entre el aumento de los niveles de fosforilación de ERK1/2 y de MEK 1/2 y la inducción de proliferación celular cuando las células son tratadas con la mayor concentración evaluada de las NPCs preparadas en buffer pH 7. Podría entonces proponerse que la interacción de las nanopartículas dispersadas en buffer fosfato pH 7 (0,1% p/v) es capaz de inducir la activación de la vía MEK 1/2 - ERK1/2 induciendo proliferación celular.



a)



b)

**Figura 35:** Proliferación Celular de las células tratadas con las Nanopartículas de PC. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 48 hs con 0,1 y 0,01 % (p/v) de las NPCs preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7, en ausencia de suero. La proliferación celular se evaluó por incorporación de BrdU medida a través de un ELISA. Los resultados se muestran como incorporación de BrdU en porcentajes relativos al basal (a) y como inducción respecto al basal (b). Se representa la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls, para un  $n=4$ . Se indica con \* la diferencia significativa con respecto al Basal.

#### IV.1.2.3 Estudio del efecto de las NPCs sobre la localización intracelular y contenido proteico de un receptor de membrana

En la membrana plasmática los lípidos presentan mayor complejidad que la de un mero fluido

que contiene a las proteínas de membrana, de hecho la actividad de muchas proteínas de membrana es dependiente de los lípidos presentes en ella (Dodes Traian y cols., 2012). Si bien están todavía en estudio los mecanismos mediante los cuales cambios en las propiedades fisicoquímicas de la membrana provocan variaciones en la actividad de ciertas proteínas (Contreras y cols., 2011), se han evidenciado sitios específicos de unión fosfolípido-proteína de forma análoga a la interacción con un cofactor (Adamian y cols., 2011). Además, en ciertos casos, la actividad de una proteína puede estar condicionada a la presencia de determinado tipo de lípido en la membrana (Hoffmann y cols., 1994), ya que si se induce un cambio en la curvatura de la membrana plasmática éste a su vez puede provocar un cambio conformacional en la proteína que afecte su actividad biológica (Mouritsen, 2011). Teniendo esto en cuenta, nos propusimos evaluar los efectos de las nanopartículas de fosfatidilcolina sobre un receptor de membrana.

Dado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pertenece a una familia de receptores ampliamente caracterizada, y que incluso se ha propuesto como modelo para evaluar la interacción de nanopartículas con receptores de membrana (Kathawala y cols., 2015), decidimos estudiar dicho receptor.

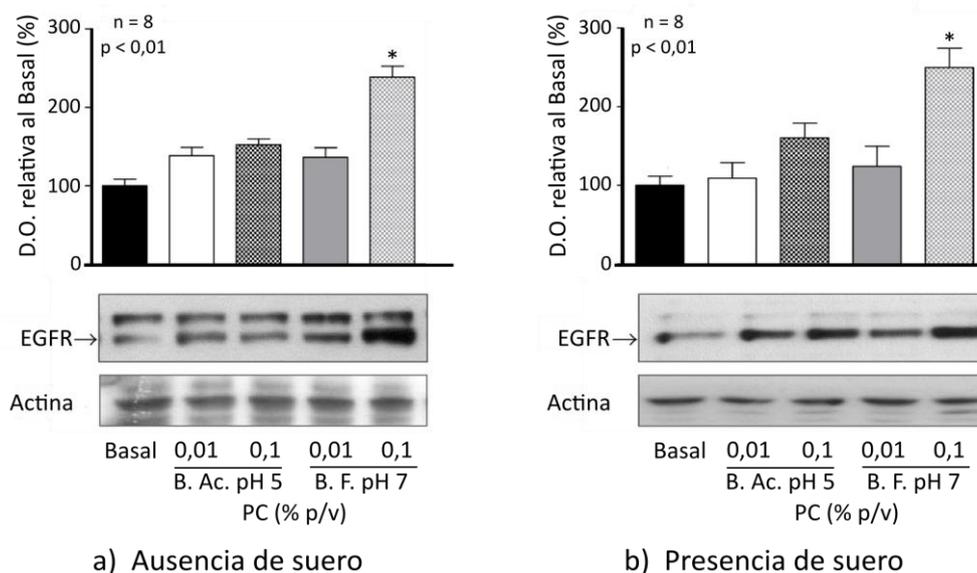
El tráfico endosomal del EGFR es crucial para determinar la duración y amplitud de la señalización gatillada por este receptor y para la activación de las MAPKs (Irwin y cols., 2011). Por lo tanto, la incubación de las células MCF-7 con altas concentraciones de las nanopartículas preparadas en buffer pH 7 podría ocasionar alteraciones en la membrana plasmática de las células, afectando el tráfico intracelular del EGFR y, en consecuencia, distintas vías de señalización.

Considerando la activación descrita de la vía de señalización MEK/ERK en la sección previa, fueron evaluados los niveles proteicos de EGFR tras la incubación con las NPCs por *Western Blotting* (figura 36). Se evaluó también la distribución intracelular del receptor mediante Microscopía de Epifluorescencia (figura 37 a y b) y por Microscopía Confocal (figura 37 c y d).

Como se puede observar en la figura 36, los resultados de *Western Blotting* mostraron un aumento significativo en los niveles proteicos de EGFR, sólo en el caso en que las células fueron incubadas con las nanopartículas obtenidas por dispersión en buffer fosfato pH 7 a una concentración final de 0,1 % (p/v), independientemente de la presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo.

Dado el aumento de los niveles proteicos de EGFR tras el tratamiento con las NPCs preparadas en buffer fosfato pH 7 a 0,1 % (p/v), se analizó si la distribución celular de este receptor también se veía

alterada en dicha condición. La localización del EGFR se estudió mediante el empleo de un anticuerpo primario anti-EGFR y el posterior reconocimiento de éste por un anticuerpo secundario unido a un fluoróforo, por Microscopía en células control (sin tratar) y tratadas con las NPCs preparadas en buffer fosfato pH 7 al 0,1% (p/v) (figura 37).



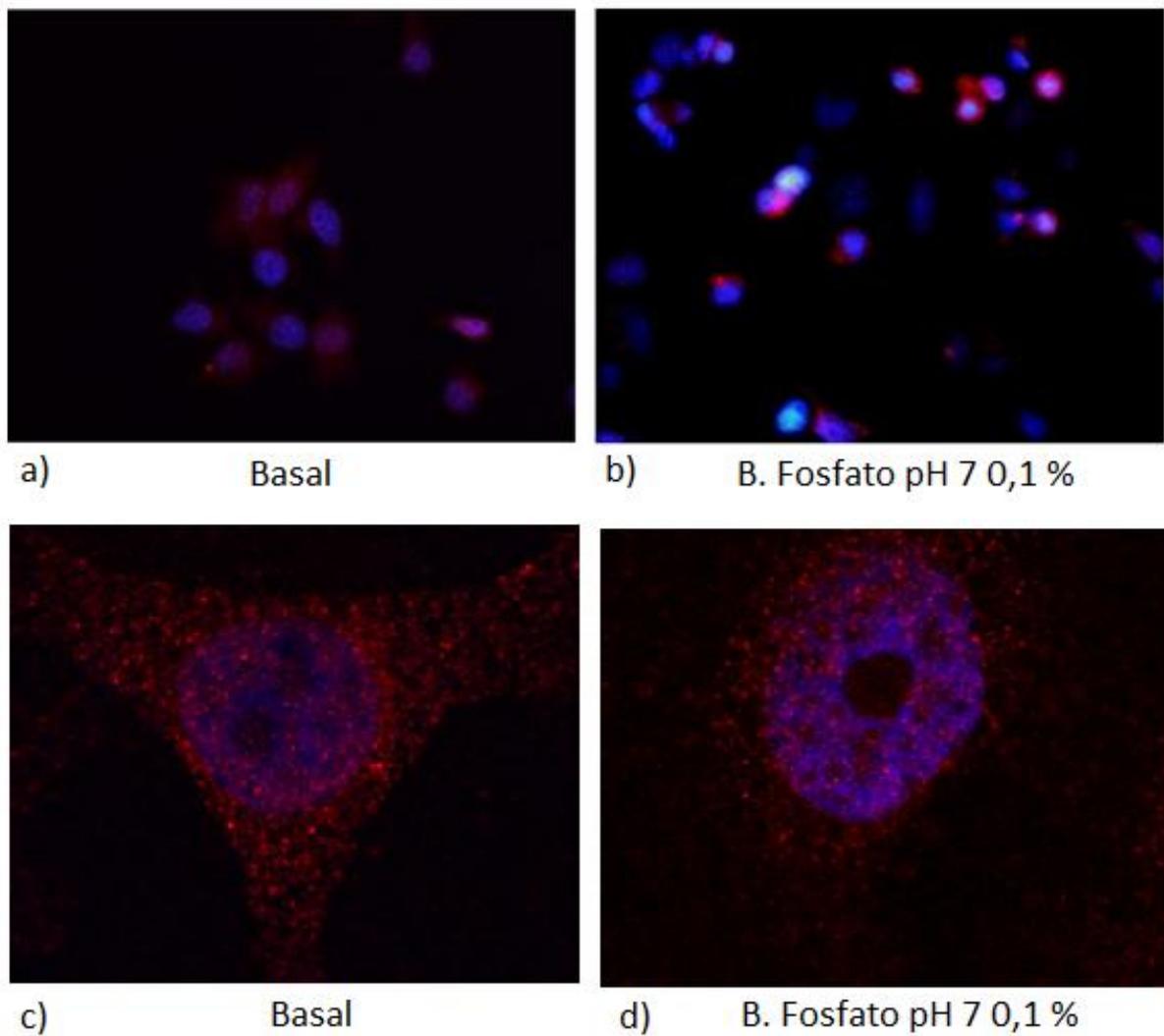
**Figura 36:** Niveles proteicos de EGFR en las células tratadas con las Nanopartículas de PC. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con 0,1 y 0,01 % (p/v) de las NPCs preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7, en ausencia (a) o presencia (b) de suero. Se cuantificó la Densidad Óptica (D.O.) de cada calle; los resultados se muestran en porcentajes relativos al basal. Se representa la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls, para un n=8. Se indica con \* la diferencia significativa con respecto al Basal.

Los resultados obtenidos por Microscopía de Epifluorescencia (figura 37 a y b), mostraron un cambio en la localización intracelular de EGFR en el tratamiento con la NPC. Mientras que en la condición basal se observó al receptor distribuido en todo el citoplasma, al tratar con las nanopartículas éste presentó una localización nuclear o perinuclear.

Se realizó también el análisis por Microscopía Confocal (figura 37 c y d). Mediante este ensayo se pudieron corroborar las diferencias en la localización de EGFR. Nuevamente, se observó la presencia de este receptor en o alrededor del núcleo sólo para el caso de las células tratadas con las Nanopartículas de PC (0,1% p/v, pH 7).

Por lo tanto, podemos concluir que el tratamiento de la línea celular MCF-7 con las nanopartículas preparadas en buffer fosfato pH 7, provoca un aumento en los niveles proteicos del

receptor de EGF, así como también alteraciones de su localización celular normal.



**Figura 37:** Localización celular del EGFR. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con 0,1 % (p/v) de las NPCs preparadas en buffer fosfato pH 7, en ausencia de suero. La distribución intracelular del receptor fue analizada por Microscopías de Epifluorescencia, objetivo 40x (apertura numérica 0.65) (a y b) y Confocal, objetivo de inmersión 60x (apertura numérica 1.35) (c y d).

## IV.2 Sección II: Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio - NMs

### IV.2.1 Caracterización y evaluación *in vitro* de las NMs como vehículos de siRNA

Las Nanopartículas Mixtas (NMs) suelen estar compuestas por fosfatidilcolina y sales biliares, entre otros componentes. Son capaces de incorporar cantidades muy apreciables de moléculas insolubles, por lo que han sido estudiadas como sistemas de liberación en Tecnología Farmacéutica y están disponibles hoy en el mercado para varios agentes terapéuticos diferentes (van Hoogevest y cols., 2014). Presentan ventajas farmacotécnicas como estabilidad termodinámica y la capacidad de reducir la inestabilidad de ciertos fármacos (Dangi y cols., 1998). Han sido evaluadas como sistemas para encapsulación de compuestos hidrofílicos como péptidos (Hendradi y cols., 2003) y proteínas (US *patent* 6017545 A), aunque hasta el momento no han sido utilizadas como vehículos de oligonucleótidos. Las nanopartículas mixtas desarrolladas por el grupo de trabajo están compuestas únicamente por fosfatidilcolina (PC) y colato de sodio (SC).

Al igual que para las Nanopartículas de Fosfatidilcolina, las NMs fueron preparadas en colaboración con la cátedra de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Las Nanopartículas Mixtas fueron preparadas mediante la dispersión de la fosfatidilcolina junto con la sal biliar colato de sodio, como se especifica en la sección de Materiales y Métodos. Se utilizaron 4 relaciones de fosfatidilcolina:colato de sodio (PC:SC) y se disolvieron en tres diluyentes distintos (tabla 9), resultando en 12 formulaciones a estudiar.

Relación PC:SC	[PC]		[SC]		Diluyentes
	MM	% (p/v)	mM	% (p/v)	
1:1	17	1,29	17	0,71	Agua destilada Buffer Acetato (50 mM) pH 5 Buffer Fosfato (66 mM) pH 7,4 b)
1:2	12,5	0,95	25	1,05	
1:4	8	0,62	32	1,38	
1:8	5	0,39	38	1,61	

**Tabla 9:** Concentraciones y diluyentes de las NMs. Se muestran las concentraciones a las cuales fueron preparadas las partículas (expresadas en mM y % p/p) para las 4 relaciones PC:SC (a), junto con los diluyentes utilizados en su elaboración (b).

Una vez obtenidas las preparaciones, se analizaron las características físico-químicas de las

mismas, y en paralelo se estudiaron como potenciales sistemas para la vehiculización de oligonucleótidos. Al igual que para las Nanopartículas de Fosfatidilcolina, se realizaron en primer lugar, los ensayos de unión de siRNA. Una vez establecidos los rangos a los cuales las NMs unen el RNA dúplex, se procedió a evaluar el efecto de las mismas sobre la viabilidad de la línea celular de epitelio mamario tumoral MCF-7. Luego se evaluó la capacidad de las distintas formulaciones de NMs de internalizar siRNAs marcados con fluorocromos y finalmente, se realizaron ensayos de silenciamiento de un gen blanco.

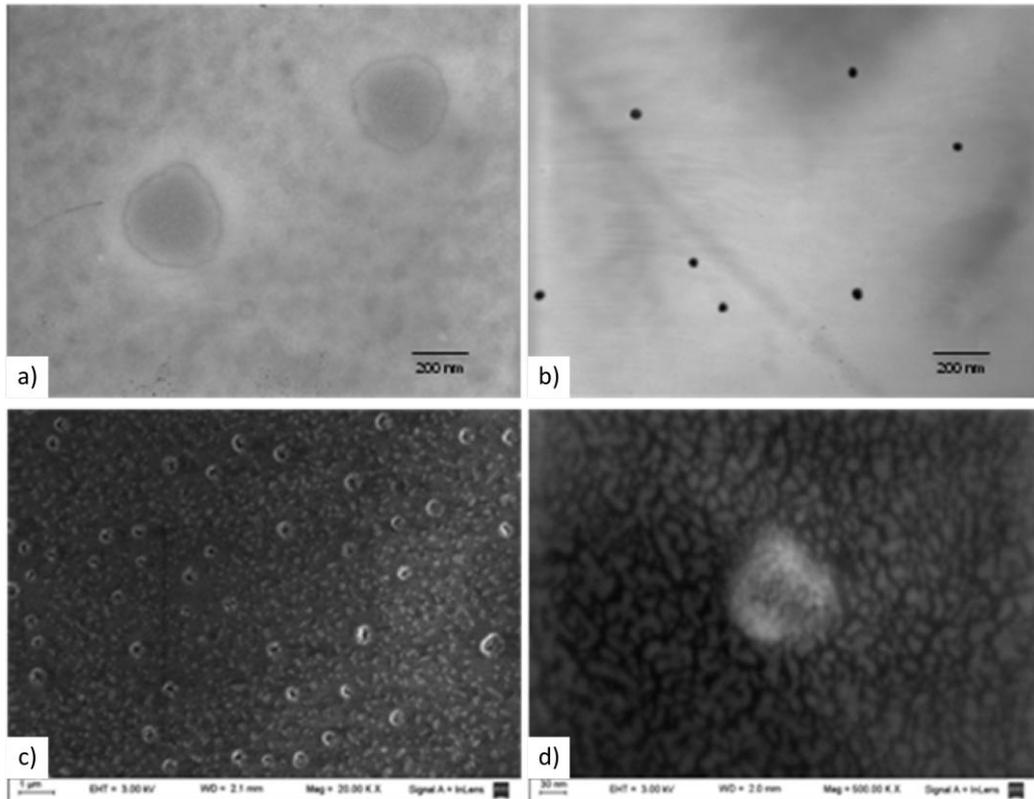
#### **IV.2.1.1 Propiedades Fisicoquímicas de las NMs**

Con el fin de analizar la forma y tamaño de las formulaciones de NMs preparadas, se las estudió por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y de Barrido (SEM) siguiendo el mismo criterio que para las NPCs.

Las imágenes mostradas en la figura 38 se corresponden con NMs obtenidas por disolución en buffer acetato pH 5 con relaciones PC:SC 1:1 y 1:8 y cargadas con siRNA a una relación N/P = 2000. Se decidió presentar las micrografías de dichas NMs porque éstas ejemplifican nanopartículas con la menor y la mayor relación de fosfatidilcolina:colato de sodio, respectivamente. Se consideraron también en esta elección los resultados de eficiencia de transfección que se comentarán más adelante, los cuales indicarían que las formulaciones a pH 5 serían las más eficientes.

Los estudios de las NMs por microscopía evidenciaron partículas con forma esférica cuyo tamaño disminuye a medida que aumenta la proporción de colato de sodio. La morfología esférica de las partículas fue semejante en todos los casos; sin embargo, como se ejemplifica en la figura 38 a y b, se pudo apreciar una diferencia en cuanto a la microestructura de las mismas. En el caso de las preparaciones con proporciones iguales de PC:SC, se observó una circunferencia exterior diferenciada del centro, es decir una estructura compatible con la de una vesícula; mientras que para las preparaciones con relación 1:8, se apreció una estructura pequeña y homogénea, concordante con una micela.

Las preparaciones obtenidas fueron también analizadas por Dispersión Dinámica de Luz (DLS- *Dynamic Light Scattering*), para determinar los tamaños y valores de potencial Z de las mismas.



**Figura 38:** Imágenes representativas de los estudios por Microscopía Electrónica de las Nanopartículas Mixtas con relación PC:SC de 1:1 (a y c) y 1:8 (b y d), preparadas por disolución en Buffer Acetato pH 5 y cargadas con siRNA (N/P = 2000). Las imágenes a) y b) corresponden a la TEM, mientras que las c) y d) corresponden a la SEM.

Al analizar los valores de tamaños obtenidos en los ensayos de DLS, se puede ver que para el caso de las NMs 1:1 en los 3 diluyentes, y para las 1:2 preparadas en agua y buffer acetato pH 5, los valores de tamaño medio se encuentran entre 80 y 150 nm. Mientras que para el resto de las preparaciones el tamaño fue menor a los 40 nm. Los resultados indicarían que las dimensiones de la partícula resultante dependen de la relación PC:SC, y en particular, que el aumento de la cantidad de la sal biliar provoca una disminución en el tamaño.

En el estudio morfológico de las NMs también se plantearon ciertas limitaciones, dadas por las características particulares de los métodos empleados. Se debe tener en cuenta que la información que explora cada microscopía es distinta, pero además, que el tratamiento realizado sobre las muestras en ambos casos, puede resultar en la alteración de las características de las mismas. Por otro lado, cuando se compara el tamaño medio obtenido por DLS y las micrografías, se pueden encontrar diferencias atribuibles al fundamento del método empleado en cada caso. También debe considerarse que las fotografías obtenidas por los análisis microscópicos representan solo algunos campos de la muestra,

seleccionados por el operador; mientras que la técnica DLS da un tamaño medio para toda la muestra.

La carga superficial de las partículas resultó negativa para todas las preparaciones (tabla 10), con valores que varían entre los -7 y -30,9 mV, y prácticamente todas presentaron un valor aún más negativo luego de ser cargadas con siRNA. Esto indicaría que en el caso de las NMs el siRNA también podría presentar una ubicación superficial en la nanopartícula, aunque más no sea en forma parcial.

Diluyente	Relación PC:SC	NMs vacías			NMs cargadas con siRNA		
		Tamaño diam. (nm)	Pdl	Potencial Z (mV)	Tamaño diam. (nm)	Pdl	Potencial Z (mV)
Agua	1:1	135,5 ± 2,0	0,272	-26,1 ± 1,6	143,2 ± 4,1	0,279	-37,8 ± 1,6
	1:2	126,8 ± 1,1	0,380	-30,9 ± 1,5	142,3 ± 3,7	0,237	-44,4 ± 2,1
	1:4	7,9 ± 0,1	0,432	-15,7 ± 4,2	17,4 ± 5,8	0,481	-23,6 ± 4,5
	1:8	6,6 ± 0,2	0,761	-8,1 ± 3,4	7,2 ± 0,2	0,705	-18,3 ± 0,8
Buffer Acetato pH 5	1:1	128,7 ± 1,9	0,284	-14,9 ± 0,7	104,9 ± 3,1	0,268	-21,3 ± 0,9
	1:2	103,9 ± 3,1	0,691	-15,8 ± 2,0	125,8 ± 1,5	0,135	-22,4 ± 2,7
	1:4	23,7 ± 0,7	0,204	-8,8 ± 8,1	22,7 ± 0,6	0,179	-16,0 ± 0,7
	1:8	56,3 ± 1,5	0,264	-8,7 ± 7,3	20,5 ± 0,5	0,066	-6,4 ± 1,1
Buffer Fosfato pH 7,4	1:1	122,3 ± 3,4	0,244	-18,3 ± 2,3	85,2 ± 3,4	0,231	-27,1 ± 1,8
	1:2	69,9 ± 3,7	0,424	-22,6 ± 3,6	23,1 ± 0,5	0,289	-11,5 ± 1,1
	1:4	21,9 ± 0,4	0,099	-8,9 ± 3,9	21,2 ± 0,9	0,312	-16,3 ± 1,5
	1:8	44,5 ± 4,5	0,321	-7,0 ± 2,2	39,2 ± 1,4	0,242	-18,7 ± 3,7

**Tabla 10:** Tamaños de partícula y valores de Potencial Z obtenidos para las Nanopartículas Mixtas según la relación PC:SC y sus diluyentes. Se muestran los resultados para las NMs vacías y cargadas con siRNA (N/P=2000), expresados como la media ± su desvío estándar (n=4). (Pdl: índice de polidispersión)

Cabe destacar, por otro lado, que las preparaciones mostraron diferencias macroscópicas en cuanto a la turbidez de las mismas. En la figura 39 se muestran las preparaciones de las NMs obtenidas donde se pueden apreciar estas diferencias. La mezcla de fosfolípidos con surfactantes, como es el caso de la fosfatidilcolina y el colato de sodio, provoca la formación de estructuras anfífilas, cuyas características dependen de las cantidades relativas de los componentes. A una alta relación fosfolípido:surfactante se obtienen pequeñas micelas, mientras que a relaciones bajas se forman vesículas del fosfolípido con algunas moléculas del surfactante incorporadas en la bicapa (Chen y cols., 2008).



**Figura 39:** Fotografía de las muestras de Nanopartículas Mixtas. De izquierda a derecha, las relaciones PC: SC 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 preparadas en (a) Agua, (b) Buffer Acetato pH 5 y (c) Buffer Fosfato pH 7,4.

En concordancia, Venneman y colaboradores han descrito el fenómeno conocido como “Transición vesícula-micela mixta”, que se da cuando la bicapa fosfolipídica es desintegrada para formar estructuras propias de micelas mixtas; estos autores señalaron que el paso de vesículas de fosfolípido al de micelas mixtas, por interacción con sales biliares, se da en el momento en que la concentración de estas últimas es cuatro veces superior a la del fosfolípido usado (Venneman y cols., 2002). Por lo tanto, se podría proponer que, las preparaciones obtenidas con bajas proporciones de colato de sodio presentan una estructura compatible con pequeñas vesículas unilamelares, mientras que al aumentar la cantidad de la sal biliar se obtienen micelas mixtas. Esto explicaría las diferencias macroscópicas que se mencionaron anteriormente. Así, en el presente trabajo se adoptó la denominación Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio, para designar en forma genérica a todas las composiciones estudiadas, sean estas vesículas o micelas mixtas.

Las NMs propuestas como sistemas de vehiculización, incluso aquellas que a criterio de Venneman debieran ser propuestas como vesículas (relaciones PC:SC 1:1 y 1:2), presentaron características de estabilidad física apropiadas. De hecho, no se observaron fenómenos de floculación de las NMs conservadas a 4°C, en el transcurso de un mes. Este hecho podría estar relacionado a los valores absolutos obtenidos de potencial z, ya que al superar en la mayoría de los casos los 15 mV, las fuerzas repulsivas dominantes entre las nanopartículas estarían aseguradas.

#### IV.2.1.2 Ensayos de unión NMs-siRNA

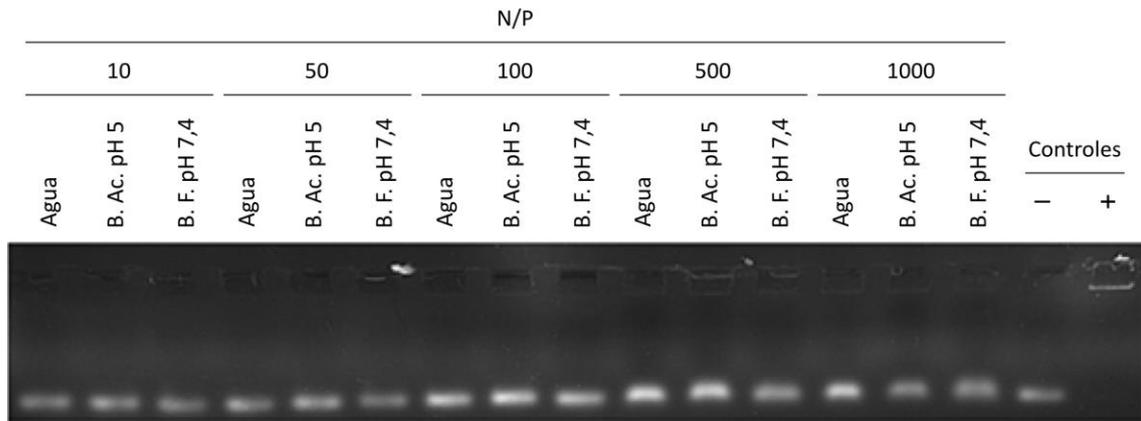
Nuevamente, se utilizó la técnica de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), para evidenciar

la formación de los complejos entre el siRNA y las Nanopartículas Mixtas. Para este ensayo, se incubaron el siRNA y los sistemas de vehiculización durante 20 minutos, a temperatura ambiente, y luego se realizó la electroforesis en geles de agarosa (ver M&M). Como control negativo del ensayo se analizó la migración del siRNA solo; como control positivo, el siRNA se incubó con la Lipofectamina.

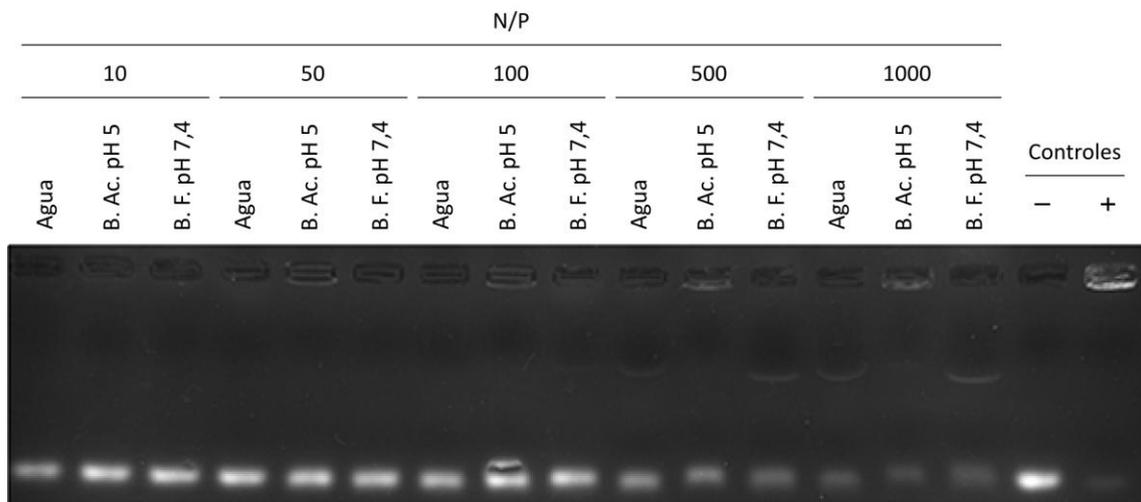
De forma análoga a los estudios de unión de siRNA para las NPCs, se ensayó la capacidad de unión de siRNA por las NMs a diferentes relaciones N/P. Para el cálculo de esta relación se consideraron las cargas negativas aportadas por los grupos fosfato (P) del siRNA, y las cargas positivas aportadas por el grupo amonio cuaternario de la fosfatidilcolina (N) constituyente de las nanopartículas mixtas. Las relaciones N/P seleccionadas fueron: 10, 50, 100, 500 y 1000 excepto para las NMs con relación PC:SC de 1:8. Dado que éstas últimas tienen una menor cantidad de PC, el volumen necesario para lograr un N/P=1000 era demasiado grande para ser sembrado en un gel de agarosa.

Como se puede ver en la figura 40 a, para las NMs con una relación 1:1 no se detectó la formación de complejos NMs-siRNA en el rango de N/P probados, independientemente del diluyente utilizado en su preparación. Por lo tanto, al no ser capaces de unir siRNA, las NMs 1:1 no serían promisorios vehículos de siRNA. Las NMs 1:2, en cambio, formaron complejos con el siRNA para las relaciones N/P de 100, 500 y 1000 (figura 40 b). También se detectó la formación de complejos de asociación entre las NMs 1:4 y 1:8 y el siRNA (figura 41). Esta asociación se verificó para las dos relaciones N/P más altas, aunque también se evidenció asociación del siRNA a las NMs 1:8 para la relación N/P = 100 (figura 41 b).

Por otro lado, se observó que los complejos formados por la asociación del siRNA con las NMs presentan una movilidad electroforética distinta a la de los complejos de las nanopartículas de PC. En aquel caso, los complejos no poseían movilidad electroforética y permanecían prácticamente en el punto de siembra; similar a lo observado con los complejos de Lipofectamina. En cambio, en el caso de las NMs, los complejos formados entre el siRNA y las NMs 1:2, 1:4 y 1:8 poseen una capacidad de migración intermedia entre el oligonucleótido solo y el complejo Lipofectamina-siRNA (figura 40 b y figura 41). Particularmente, los complejos de NMs 1:2 presentaron distinta movilidad electroforética según el diluyente (figura 40 b), mientras que los complejos formados por NMs 1:4 (figura 41 a) y por NMs 1:8 (figura 41 b), presentaron una alta movilidad electroforética en todos los casos.

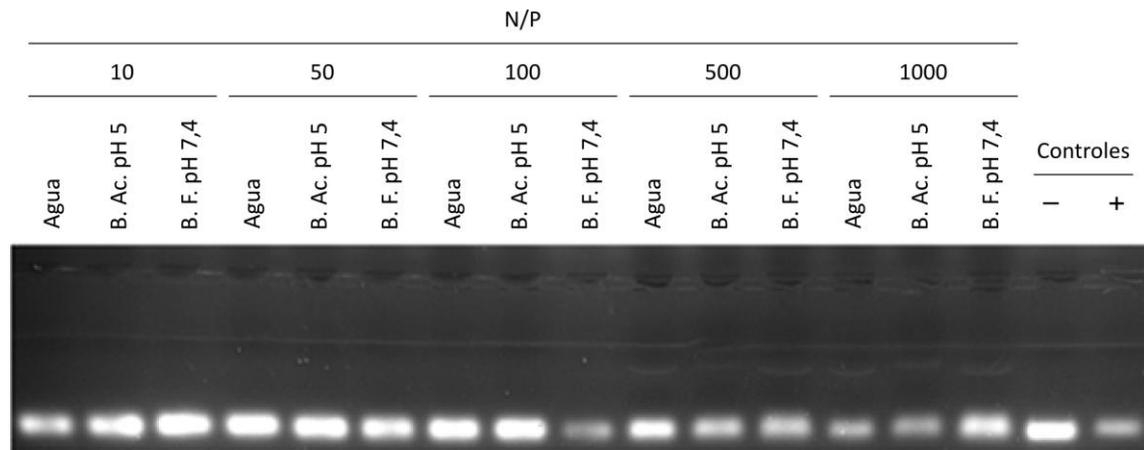


a) 1:1

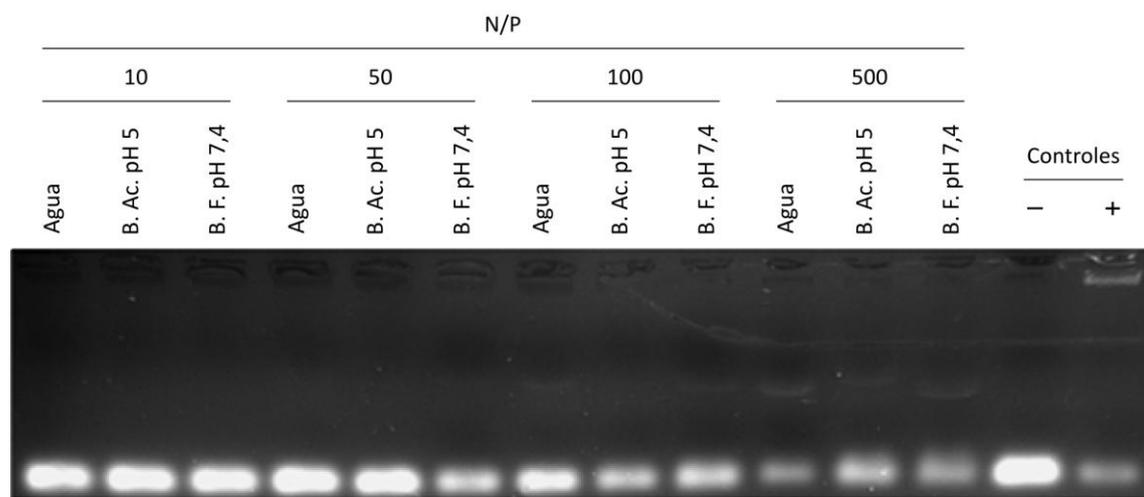


b) 1:2

**Figura 40:** Imágenes representativas de los ensayos de EMSA. Se muestran los resultados obtenidos para las muestras 1:1 (a) y 1:2 (b), para las relaciones N/Ps 10, 50, 100, 500 y 1000. Para cada relación N/P se respeta el orden de siembra, de izquierda a derecha: Agua, Buffer Acetato pH 5 y Buffer Fosfato pH 7,4. El análisis se realiza en paralelo a controles negativo (-) y positivo (+).



a) 1:4

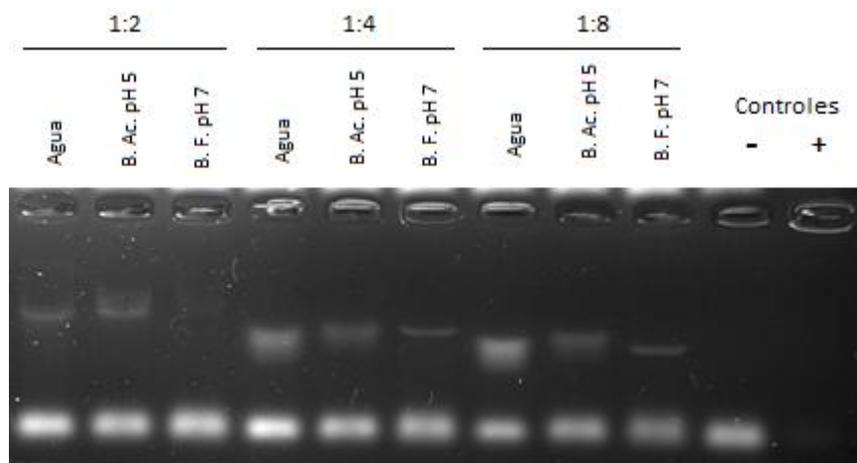


b) 1:8

**Figura 41:** Imágenes representativas de los ensayos de EMSA. Se muestran los resultados obtenidos para las muestras 1:4 (a) y 1:8 (b), para los N/Ps 10, 50, 100, 500 y 1000. Para cada relación N/P se respeta el orden de siembra, de izquierda a derecha: Agua, Buffer Acetato pH 5 y Buffer Fosfato pH 7,4. El análisis se realiza en paralelo a controles negativo (-) y positivo (+).

Para poder comparar mejor las diferencias respecto a la capacidad de unión de siRNA por las distintas formulaciones de NMs, y la movilidad electroforética de los complejos formados entre los vehículos y el siRNA, realizamos ensayos de EMSA a una misma relación N/P. Se seleccionó la relación N/P = 500, para este ensayo, ya que a esta relación se evidenció claramente la formación de complejos para las NMs 1:2, 1:4 y 1:8. Si bien la metodología no arroja datos cuantitativos, mediante este ensayo se observó que las nanopartículas mixtas 1:4 y 1:8 poseen una mayor capacidad de unión de siRNA (figura 42). Además, se pudo comprobar que los complejos presentan distancias de migración diferentes de acuerdo a la proporción PC:SC de las NMs, siendo mayor la movilidad electroforética de los complejos formados con las formulaciones con mayor proporción de colato de sodio. Dado que la migración de estos complejos en

los ensayos de EMSA depende principalmente del tamaño de los mismos, estos resultados indicarían que el tamaño de los complejos disminuye a medida que aumenta la proporción de colato de sodio en la formulación de las NMs; lo que a su vez, es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de DLS (tabla 10), para el tamaño de las NMs cargadas con siRNA.



**Figura 42:** Imagen representativa de los ensayos de EMSA comparativos para las NMs 1:2, 1:4 y 1:8 a un mismo N/P (500). En la misma se evidencia la variación en los tamaños de los complejos NM-siRNA formados. El análisis se realiza en paralelo a controles negativo (-) y positivo (+).

#### IV.2.1.3 Ensayos de Citotoxicidad

Luego de establecer los rangos de relaciones N/P en los que se forman complejos NM-siRNA, procedimos a evaluar si las preparaciones de las Nanopartículas Mixtas, en sí mismas, resultaban citotóxicas para la línea celular tumoral MCF-7. Con este fin, se realizó el ensayo de determinación de la viabilidad celular basado en el reactivo MTS (ver sección M&M), al igual que se hizo para las nanopartículas de fosfatidilcolina.

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron incubando durante 48 hs las células MCF-7 con las distintas formulaciones de las NMs, en un rango de concentraciones que abarcan posibles cantidades de uso requeridas en futuros ensayos de transfección con NMs. Este rango se estimó de acuerdo a las relaciones N/P más adecuadas para la unión de siRNA, según los ensayos de EMSA; y a las concentraciones de siRNAs recomendadas para ensayos de transfección. En todos los casos se utilizó como control células MCF-7 sin tratamiento, al que se le otorgó un valor relativo de viabilidad del 100 %.

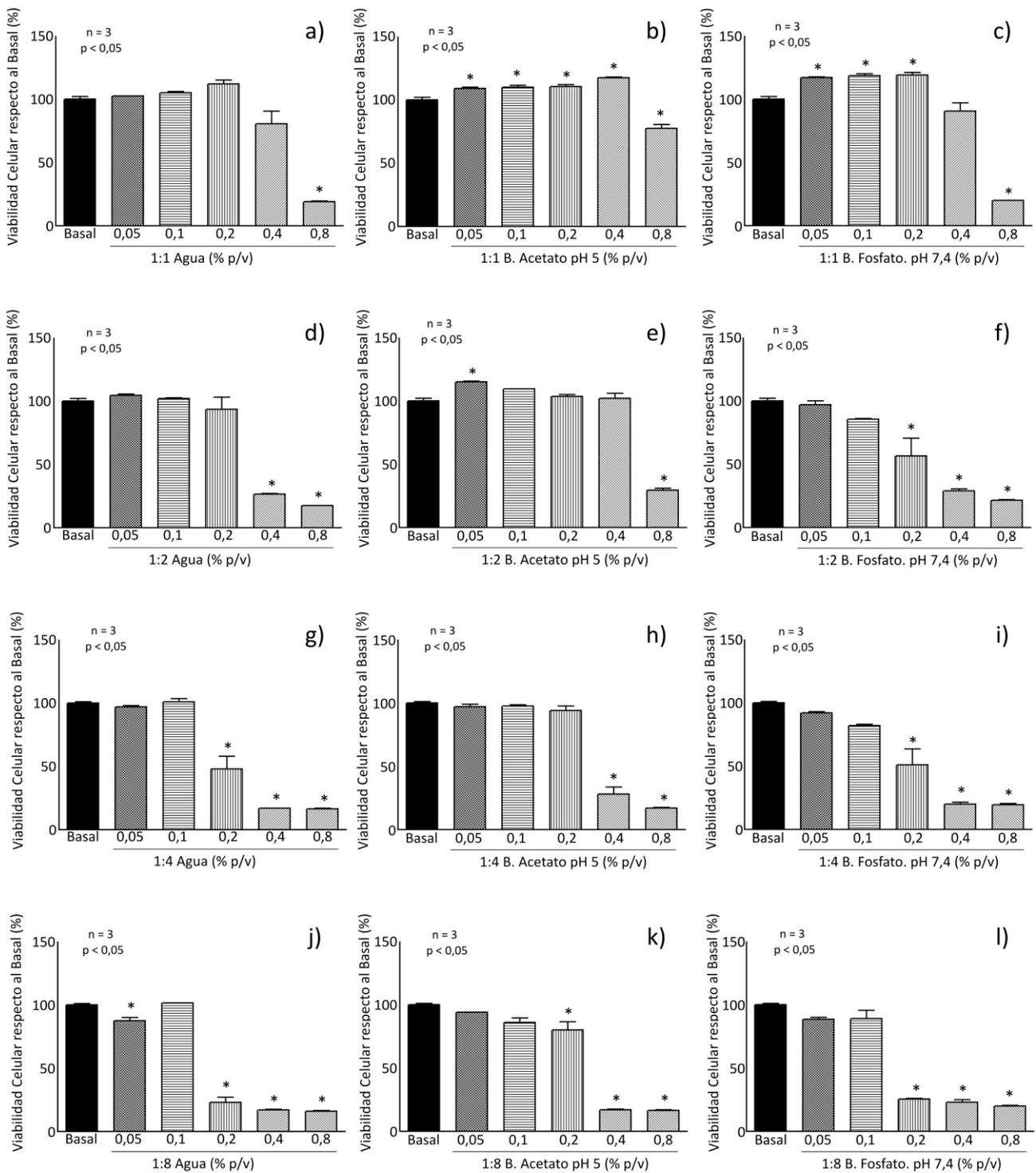
En la figura 43 podemos observar, en primer término, que la viabilidad celular disminuye para

todas las formulaciones de las NMs a medida que aumenta su concentración final en el medio de cultivo, siendo la concentración 0,8 % (p/v) altamente citotóxica para prácticamente todas las formulaciones. En segundo lugar, cuando se comparó la viabilidad celular de las NMs preparadas en el mismo diluyente se encontró que, a medida que aumenta la proporción de colato de sodio en la formulación, también aumenta la citotoxicidad. En este sentido, las NMs preparadas en un relación PC:SC 1:1 (figura 43 a, b, c) presentan una baja citotoxicidad ya que las células mantienen su viabilidad incluso cuando las NMs son incubadas en concentración 0,4 % (p/v); mientras que las NMs preparadas en relación 1:8 (figura 43 j, k, l) son las mas citotóxicas, dado que conservan niveles aceptables de viabilidad celular hasta concentraciones de las NMs del 0,05-0,1% (p/v). Finalmente, al analizar las formulaciones con una misma relación PC:SC pero dispersas en diferentes diluyentes, vemos que las NMs preparadas en buffer acetato pH 5 presentan una menor citotoxicidad.

Del total de las preparaciones de Nanopartículas Mixtas, las obtenidas con la relación PC:SC 1:1, resultaron ser menos citotóxicas; y en particular la preparada en buffer acetato pH 5 (figura 43 b), fue la que menor toxicidad presentó. Mientras que las preparaciones con relación 1:8, presentaron la mayor citotoxicidad (figura 43 j, k, l). En base a estos resultados, se decidió descartar las formulaciones de Nanopartículas Mixtas con la relación PC:SC 1:8, a pesar de que presentaron una buena capacidad de unión de siRNA a N/P = 500. Cabe destacar, que si bien podrían lograrse concentraciones menos tóxicas de las NMs 1:8 con relaciones N/P menores, la formación de complejos NMs-siRNA fue poco eficiente para relaciones N/P < 500.

Resulta importante remarcar, que los resultados obtenidos en estos ensayos de citotoxicidad, establecen un límite en las concentraciones máximas de NMs a utilizar en los ensayos de transfección.

En síntesis, la capacidad de formar complejos con el siRNA aumenta con la proporción de colato en la formulación de las NMs, pero también se incrementa su citotoxicidad. Considerando los ensayos de capacidad de unión de siRNA por las NMs y su citotoxicidad, se eligieron las NMs 1:2 y 1:4 preparadas en los tres diluyentes para evaluar su capacidad de vehicular oligonucleótidos a las células. Las formulaciones en relación PC:SC 1:2 presentan una capacidad de unión de siRNA apreciable y baja citotoxicidad y las NMs 1:4 presentan buena capacidad de carga de oligonucleótidos y citotoxicidad aceptable.



**Figura 43:** Ensayo de citotoxicidad. Las células MCF-7 fueron incubadas con las NMs, en un rango de concentraciones de entre 0,05% y 0,80% (p/v), en medio DMEM suplementado con suero 10%, durante 48hs. Posteriormente, se realizó el ensayo de determinación de la viabilidad celular con el reactivo MTS. Resultados expresados en porcentajes, tomando arbitrariamente como 100%, los valores obtenidos el basal. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. EL análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls. Se indica con \* la diferencia significativa con el basal ( $p < 0,05$ ).

#### IV.2.1.4 Ensayos de Captación Intracelular de siRNA

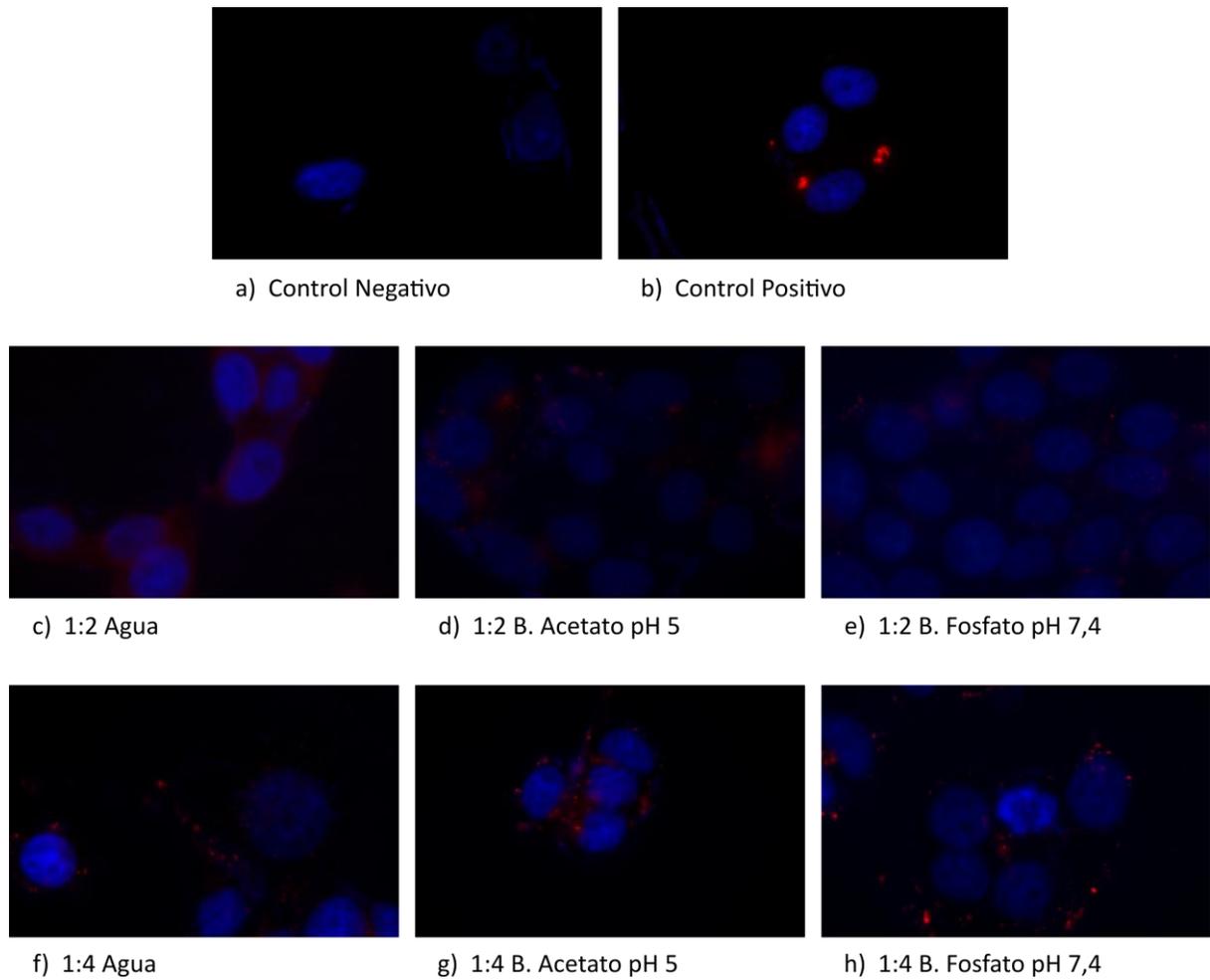
Una vez obtenidos los rangos de relaciones N/P a las cuales las Nanopartículas Mixtas unen siRNA, y las concentraciones máximas hasta las cuales las NMs no resultan citotóxicas, se diseñaron los ensayos de transfección para evaluar la capacidad de las NMs de vehicular el siRNA al interior celular. Con este fin, se utilizó un siRNA unido al fluorocromo Alexa Fluor Red (rojo) y otro siRNA marcado con FITC (verde), el cual además presenta una distribución nuclear (especificado por el proveedor), para luego analizar la internalización de estas moléculas por Microscopía de Fluorescencia (figuras 44 y 45). Ambos siRNAs son inespecíficos, no contienen una secuencia contra un gen blanco; son moléculas de RNA bicatenario utilizados como control de la captación de siRNA por las células, por lo que el efecto a evaluar es la acumulación o presencia de fluorescencia en la célula en lugar de la disminución de una proteína específica.

Estos ensayos se realizaron de forma similar a los realizados para las nanopartículas de fosfatidilcolina. Se empleó como control negativo células incubadas con el siRNA solo (es decir sin un vehículo) y, como control positivo, las células a las que se transfectó el siRNA con Lipofectamina. Se decidió realizar los ensayos de transfección del siRNA fluorescente a una relación N/P = 500, ya que los resultados de los ensayos de EMSA mostraron un grado de unión de siRNA similar para los N/Ps 500 y 1000 para las relaciones 1:2 y 1:4, y que a concentraciones mayores se observó un incremento de la citotoxicidad.

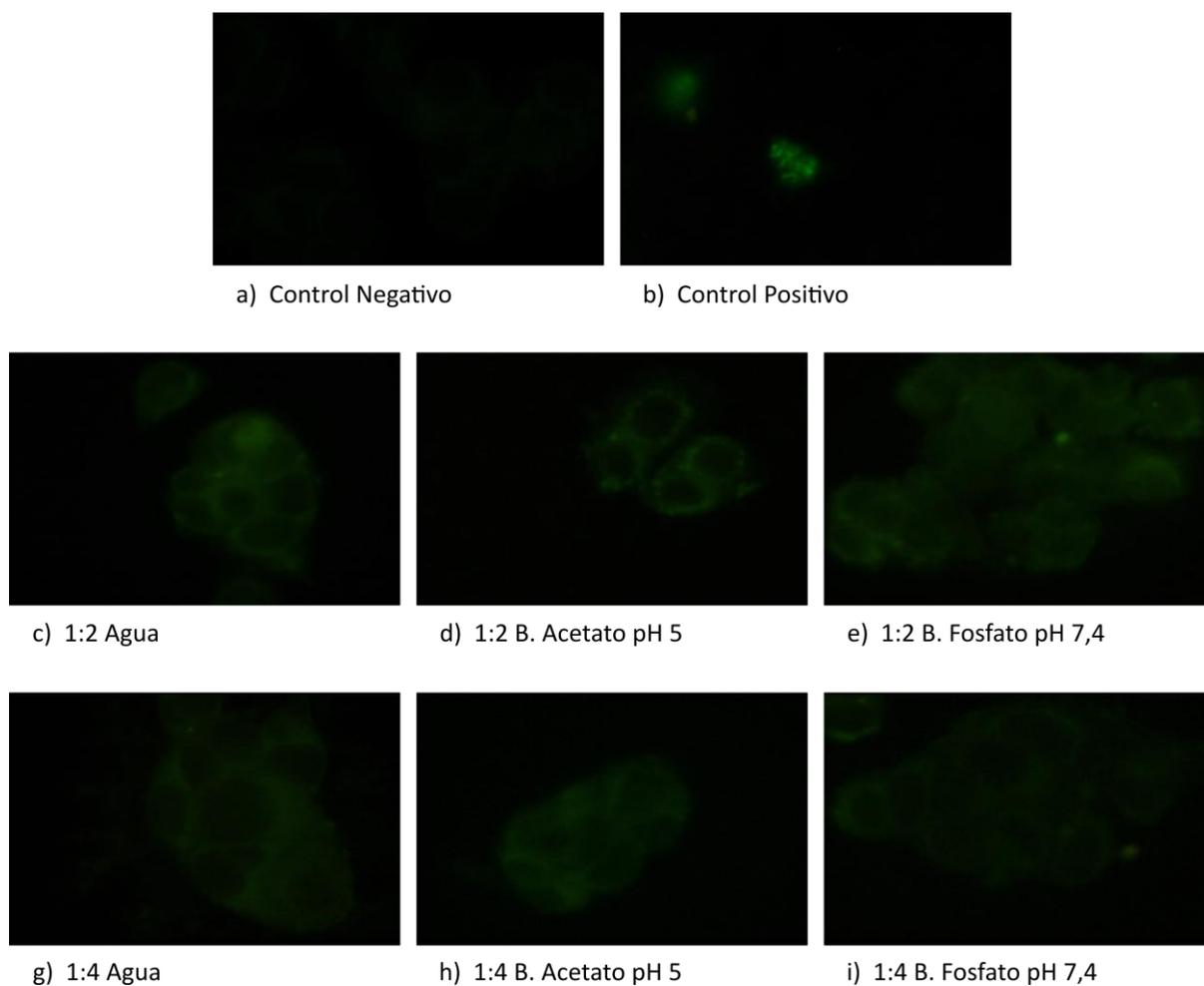
Para las células incubadas con el siRNA rojo, una vez finalizada la transfección, se realizó la tinción de los núcleos con Hoescht (azul), ya que esto facilita analizar la distribución intracelular del dúplex; mientras que en los ensayos en los que se empleó el siRNA verde, no se realizó la incubación con Hoescht para evitar la interferencia de ambos fluoróforos dada por su similar localización intracelular. Como era de esperarse, la incubación de las células con el siRNA solo, es decir sin un vehículo, no mostró marca detectable en el interior celular (figuras 44 a y 45 a). Los resultados de esta incubación fueron utilizados también para establecer los niveles basales (si es que hubiera) de auto-fluorescencia o fluorescencia inespecífica.

Tanto para la transfección con el reactivo comercial (figuras 44 b y 45 b) como con las formulaciones obtenidas por nuestro grupo (figuras 44 c-h y 45 c-h), sí se detectó marca roja o verde intracelular (según el dúplex utilizado en cada caso) debida a la presencia del siRNA. La internalización del oligonucleótido unido al fluorocromo Alexa Fluor Red (rojo) por las NMs 1:4 (figura 44 f-h) produjo una

marcación semejante (puntillado) a la obtenida cuando se utilizó Lipofectamina para vehicular el siRNA.



**Figura 44:** Captación celular de siRNA evaluada por Microscopía de Fluorescencia. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoescht (azul), el siRNA se evidencia en rojo. La línea celular fue incubada con el siRNA sólo (a), con los complejos Lipofectamina-siRNA (b), y con los complejos NMs-siRNA (c-h) a una relación N/P = 500. Se emplearon las NMs 1:2 (c-e) y 1:4 (f-h).



**Figura 45:** Captación intracelular de siRNA evaluada por Microscopía de Fluorescencia. Los núcleos celulares no fueron marcados, y siRNA se evidencia en verde. La línea celular fue incubada con el siRNA sólo (a), con los complejos Lipofectamina-siRNA (b), y con los complejos NMs-siRNA (c-h) a una relación N/P = 500. Se emplearon las NMs 1:2 (c-e) y 1:4 (f-h).

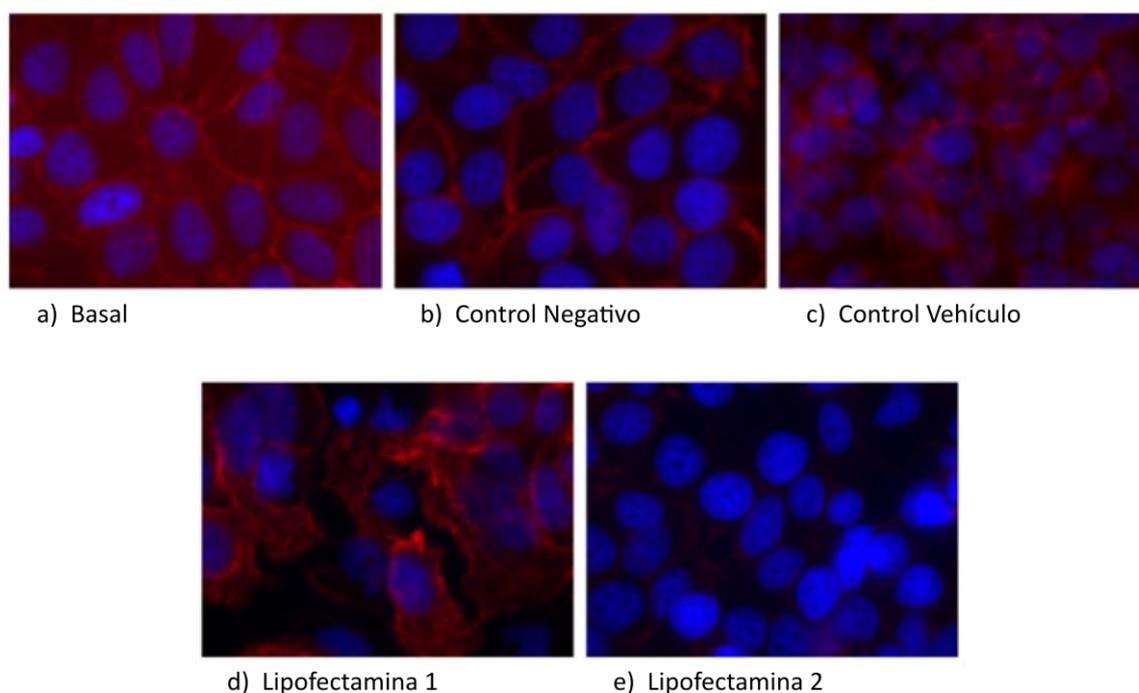
El análisis por Microscopía de Fluorescencia de estos ensayos de transfección permitió verificar la captación celular de RNA bicatenario vehiculizado por las NMs formuladas. Sin embargo, la metodología empleada no permitió realizar comparaciones cuantitativas en cuanto a la eficiencia de vehiculización entre las distintas formulaciones. Por lo tanto, al no poder concluir cuál de éstas resulta mejor para transfectar siRNA, se continuó con los ensayos de silenciamiento, usando las mismas preparaciones aquí ensayadas.

#### IV.2.1.5 Ensayos de Silenciamiento

Para completar el estudio de las condiciones para el empleo de Nanopartículas Mixtas como vehículo de transfección de siRNA, procedimos a evaluar su capacidad de silenciar la expresión de un gen *in vitro*. Para esto, se realizaron ensayos de transfección con siRNA específico contra un gen blanco. A diferencia de los ensayos realizados con las nanopartículas de fosfatidilcolina, decidimos utilizar un siRNA ampliamente usado y especialmente diseñado para ser utilizado como control positivo para ensayos de transfección (Stealth RNAi™ Actin siRNA Positive Control, Life Technologies). El mismo es un siRNA específico contra el gen de Actina. La abundancia de dicha proteína facilita su detección por Western Blot, y además, existe la posibilidad de detectarla mediante Microscopía de Fluorescencia, utilizando el ensayo de marcación con Faloidina (ver sección Materiales y Métodos).

En primer término, se establecieron las condiciones para evaluar el silenciamiento de actina por Microscopía de Fluorescencia. Para esto, se analizó el silenciamiento de dicha proteína tras la transfección del siRNA anti-actina con Lipofectamina (figura 46). Para este ensayo, se probaron dos concentraciones finales de siRNA (de 67 nM y 100 nM) que llamamos “Lipofectamina 1” y “Lipofectamina 2”, respectivamente (figura 46 d y e), manteniendo la relación siRNA:Lipofectamina 3:2 constante. Paralelamente, se realizaron tres controles: se realizó la marcación con faloidina de células que no recibieron ningún tratamiento para evaluar la condición basal de tinsión de actina (Basal - figura 46 a); se incluyó un control negativo, realizado mediante la incubación de las células con el siRNA sin vehículo (Control Negativo - figura 46 b); y un control del vehículo para descartar que la incubación de las células con la Lipofectamina pueda tener algún efecto sobre la marcación de la actina (Control Vehículo - figura 46 c).

Los resultados obtenidos por Microscopía de Fluorescencia evidenciaron diferentes niveles de marcación con faloidina, lo cual equivale a diferencias en el contenido de actina de las células. Como era de esperarse, se apreció la marcación de actina tanto en la condición basal (figura 46 a) como para los controles negativo y de vehículo (figura 46 b y c). En cuanto a las transfecciones realizadas con el reactivo comercial, pudo observarse una gran diferencia entre ambas condiciones; en la primera (figura 46 d) los niveles de marca con faloidina podrían ser considerados similares a las condiciones controles, mientras que para la condición en la que se utilizó una mayor concentración del oligonucleótido (figura 46 e) se puede apreciar una clara disminución de la marca fluorescente. Por lo tanto, se seleccionó la condición denominada “Lipofectamina 2” como control positivo, en la cual se evidencia una notable disminución en la cantidad de actina (figura 46 e).



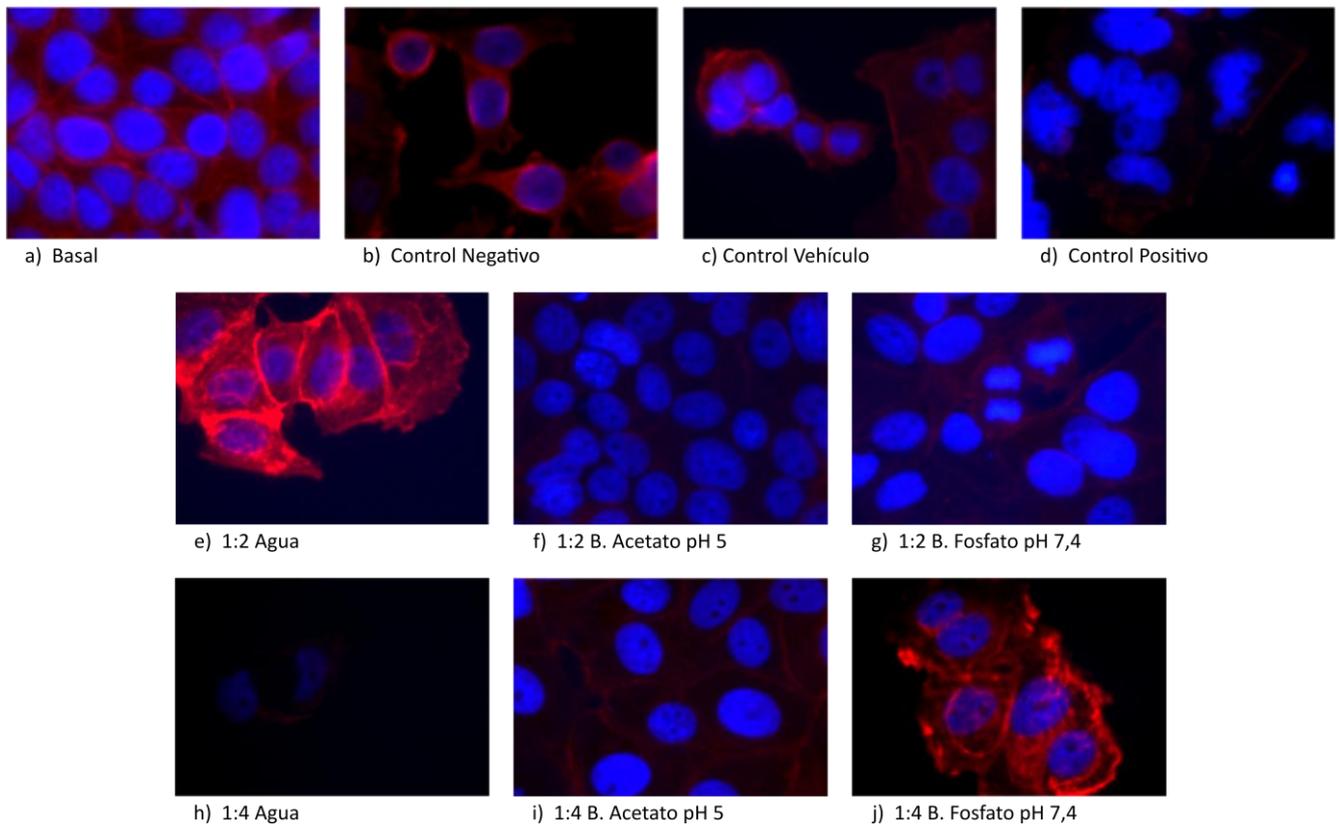
**Figura 46:** Selección de las condiciones a emplear como controles. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoesch; la marcación de actina se evidencia en rojo. Las células MCF-7 fueron no tratadas (a), incubadas con el siRNA solo (b), con la Lipofectamina sola (c), o con los complejos Lipofectamina-siRNA (d y e) en dos relaciones distintas.

Habiendo establecido las condiciones del ensayo de silenciamiento de actina evaluado por marcación con faloidina, se realizaron los ensayos de transfección, utilizando las formulaciones de NMs pre-seleccionadas en función de su capacidad de carga de siRNA, citotoxicidad y vehiculización de siRNA, para analizar su capacidad de efectivamente silenciar un gen blanco.

En la figura 47, se muestran los resultados obtenidos por Microscopía de Fluorescencia tras la transfección del siRNA anti-actina con las preparaciones de NMs 1:2 y 1:4, en sus tres diluyentes. Se utilizó como control positivo de este ensayo, la condición “Lipofectamina 2” analizada previamente (figura 47 d). Nuevamente, se volvieron a realizar los controles Basal, Control Negativo y Control de Vehículo (figura 47 a, b y c), de acuerdo a lo establecido en el ensayo anterior.

Para el control negativo no se observó efecto de silenciamiento, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en los ensayos de captación intracelular (figura 47 b); esto podría deberse a un efecto de degradación enzimática dado que el medio contiene suero, como así también a la repulsión electrostática del siRNA con la membrana celular. En cambio, con el control positivo, “Lipofectamina 2” sí se evidenció una clara disminución de la cantidad de actina (figura 47 d). Por otro lado, las condiciones Basal y Control de Vehículo no presentaron diferencias notorias en la intensidad de la marca con faloidina

(figura 47 a y c). Los efectos de las Nanopartículas Mixtas resultaron ser dependientes tanto de la relación PC:SC como del diluyente empleado en su preparación. Las NMs preparadas con una relación 1:2 mostraron un claro silenciamiento de actina, cuando se las prepara en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7,4 pero no al utilizar agua como diluyente (figura 47 e-g). Las NMs con relación PC:SC 1:4 mediaron la disminución del contenido proteico de actina al ser preparadas en agua y buffer acetato pH 5, pero no así al emplear buffer fosfato pH 7,4 (figura 47 h-j).



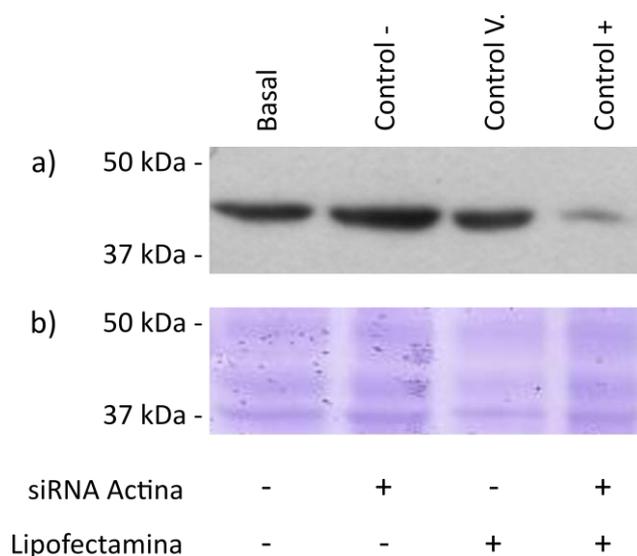
**Figura 47:** Microscopía de fluorescencia para evaluar el silenciamiento de actina. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoesch; la marcación de actina se evidencia en rojo. Las células MCF-7 fueron no tratadas (a), incubadas con el siRNA solo (b), con la Lipofectamina sola (c), o con el complejo Lipofectamina-siRNA (d); los complejos NMs-siRNA se realizaron con las NMs con relaciones PC:SC 1:2 (e, f, g) y 1:4 (h, i, j), en los tres diluyentes, a una relación N/P=500.

A continuación, se realizaron los mismos ensayos de transfección, pero esta vez para ser evaluados mediante la técnica de *Western Blotting*, utilizando un anticuerpo anti-actina. Para estos ensayos incluimos controles con un siRNA anti-Luciferasa, es decir un siRNA que no posee un target en las células utilizadas.

De forma similar a los ensayos de silenciamiento evaluados por faloidina, se realizó un ensayo previo para confirmar que la transfección del siRNA anti-actina con Lipofectamina, genera un silenciamiento capaz de ser evidenciado por *Western Blotting* anti-actina (figura 48 a).

Nuevamente, se realizaron los controles: Basal -células que no recibieron ningún tratamiento-, Control Negativo -células incubadas con el siRNA sin vehículo- y Control del Vehículo -células tratadas sólo con Lipofectamina-. El Control Positivo consistió en células transfectadas con Lipofectamina-siRNA anti-actina. Se presenta como control de carga de este ensayo la tinción con *Coomassie Blue* de la membrana de PVDF empleada para el *Blotting* (figura 48 b),

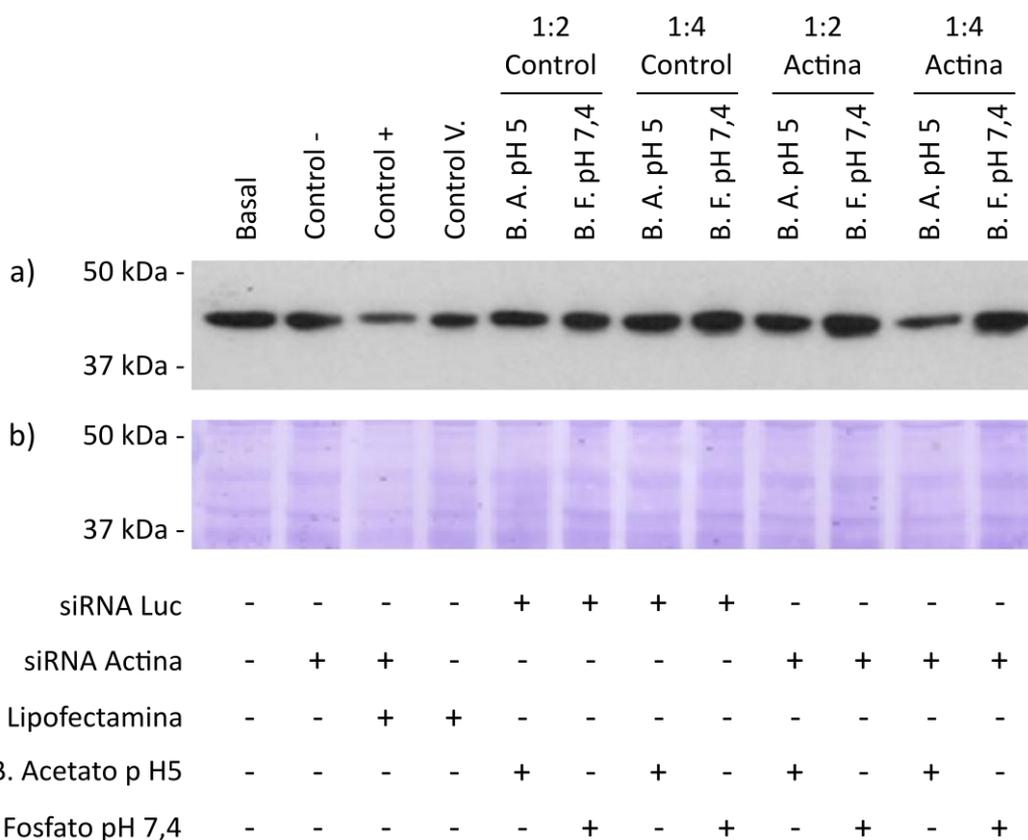
En la figura 48, se observa claramente que la única condición en la que disminuye el contenido de actina con respecto a los niveles basales, es el control positivo.



**Figura 48:** Ensayo de *Western Blotting* para evaluar el silenciamiento de actina con los controles. Se muestran los resultados para las condiciones basal, controles negativo, de vehículo y positivo, mediante un *Western Blot* anti-actina (a). También se muestra la tinción de la membrana de PVDF con el colorante *coomasie* a modo de control de carga (b).

Los ensayos de transfección para analizar el silenciamiento de actina por *Western Blotting* implican una cantidad apreciable del siRNA comercial por lo que se restringió el estudio a sólo algunas de las formulaciones. Particularmente se estudió la capacidad de silenciamiento de las formulaciones 1:2 y 1:4 preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7,4.

A continuación se muestran los resultados obtenidos por ensayos de *Western Blotting* anti-actina, donde puede observarse una disminución del contenido de actina en las células transfectadas con el siRNA vehiculizado por las NMs 1:4 preparadas en buffer pH 5, además del control positivo (figura 49 a).



**Figura 49:** Ensayo de *Western Blotting* para evaluar el silenciamiento de actina. Se muestran los resultados para las condiciones basal, controles y los complejos NMs-siRNA mediante un *Western Blot* anti-actina (a). También se muestra la tinción de la membrana de PVDF con el colorante *coomasie* a modo de control de carga (b).

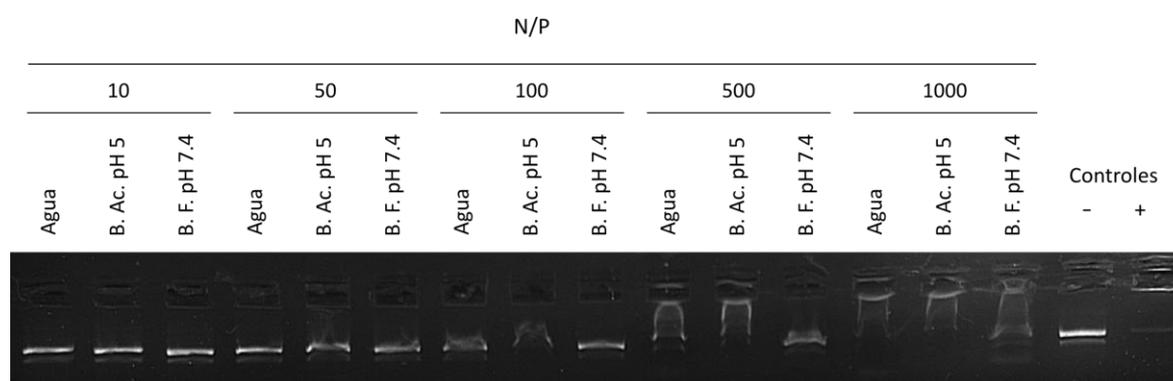
En síntesis, se evidenció la eficiencia de transfección y el silenciamiento de un gen blanco para distintas formulaciones. Si bien los resultados obtenidos por ambas metodologías (Inmunofluorescencia y Western blotting) no coincidieron para todas las formulaciones, se observó la disminución de los niveles de actina al utilizar las NM PC:SC 1:4 preparadas en buffer pH 5 para vehicular el siRNA, mediante las dos técnicas utilizadas.

#### IV.2.1.6 Estudio de las NMs como posibles vehículos de DNA plasmídico

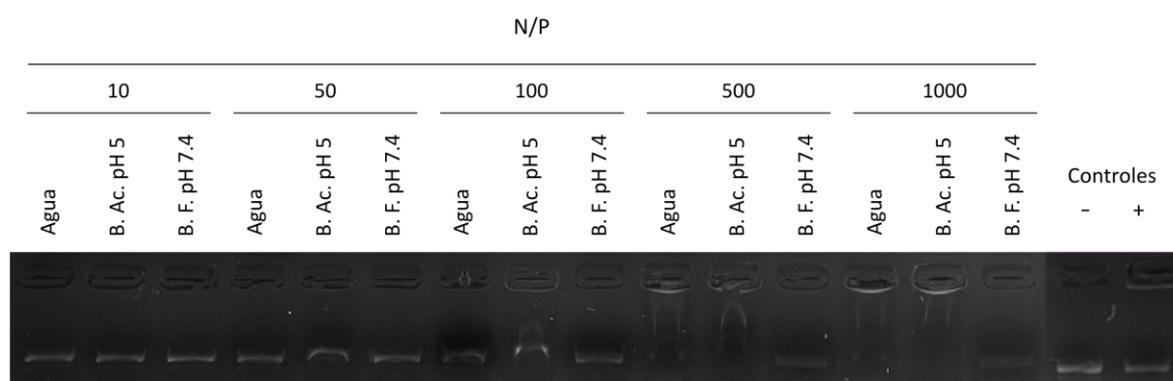
Como se mencionó en la introducción, las moléculas de siRNAs pueden ser introducidas a la célula por transfección transitoria de siRNAs sintéticos (Elbashir y cols., 2001; Oliveira y cols., 2003), o por transfección transitoria o estable de vectores que expresen oligonucleótidos de tipo shRNAs (Brummelkamp y cols., 2002). Por lo tanto, con el fin de analizar el uso de las formulaciones de

Nanopartículas Mixtas como vehículos de DNA plasmídico (pDNA), se estudió la asociación de pDNA a las NMs y su capacidad de transfección y expresión de un gen a partir del pDNA, en la línea celular MCF-7. En lugar de utilizar un vector que exprese un shRNA decidimos utilizar un plásmido que codifica para la proteína fluorescente amarilla (YFP), ya que de esta forma puede ser evaluada fácilmente la transfección y expresión de la proteína por Microscopía de Fluorescencia.

De forma similar a los estudios realizados con siRNA, se evaluó la capacidad de formación de complejos entre las NMs y el pDNA mediante ensayos de EMSA (figuras 50 y 51). Como controles se sembró el pDNA solo (control negativo) o previamente incubado con el reactivo comercial Lipofectamina (control positivo). La capacidad de unión de pDNA por parte de las Nanopartículas Mixtas fue evaluada en un rango de relaciones N/P de entre 10 y 1000, tomando en cuenta las cargas negativas aportadas por los grupos fosfatos del DNA (P) y las cargas positivas presentes en la fosfatidilcolina debido al grupo amonio cuaternario (N).



a) 1:1



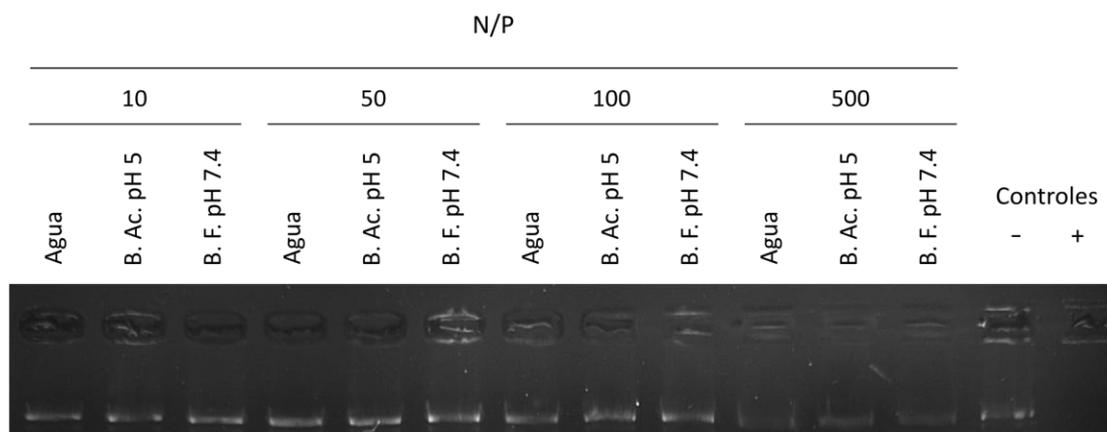
b) 1:2

**Figura 50:** Imágenes representativas de los ensayos de EMSA realizados para evaluar la capacidad de las NMs de unir pDNA. Se muestran los resultados obtenidos para las muestras 1:1 (a) y 1:2 (b), para los N/Ps 10, 50, 100, 500 y 1000. Para cada relación N/P se respeta el orden de siembra, de izquierda a derecha: Agua, Buffer Acetato pH 5 y Buffer Fosfato pH 7,4. El análisis se realiza en paralelo a controles negativo (-) y positivo (+).

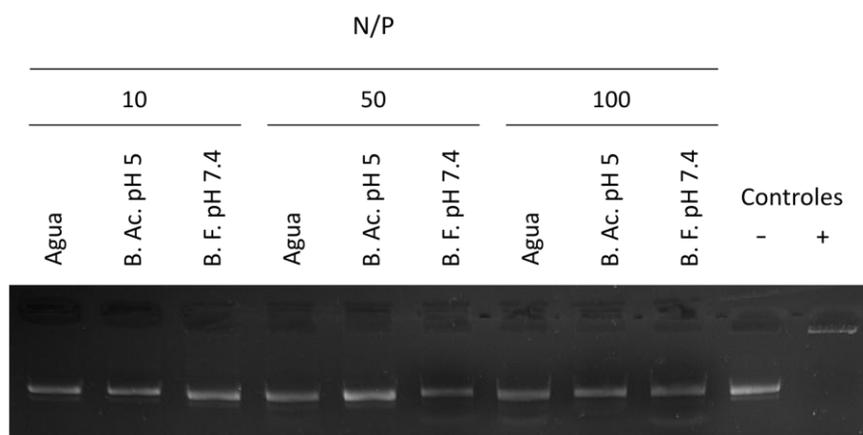
En la figura 50 se observa que las preparaciones de NMs 1:1 y 1:2 son capaces de unir el pDNA a

partir del N/P = 500. En cambio, las dos formulaciones con mayor proporción de colato de sodio (1:4 y 1:8) no formaron complejos con el plásmido para ninguna de las relaciones N/P evaluadas (figura 51).

La mayor eficiencia de unión de pDNA se observó para las preparaciones 1:1 cuando la relación N/P es de 1000. Por lo tanto se eligió esta condición para evaluar la capacidad de transfección del vector de expresión.



a) 1:4



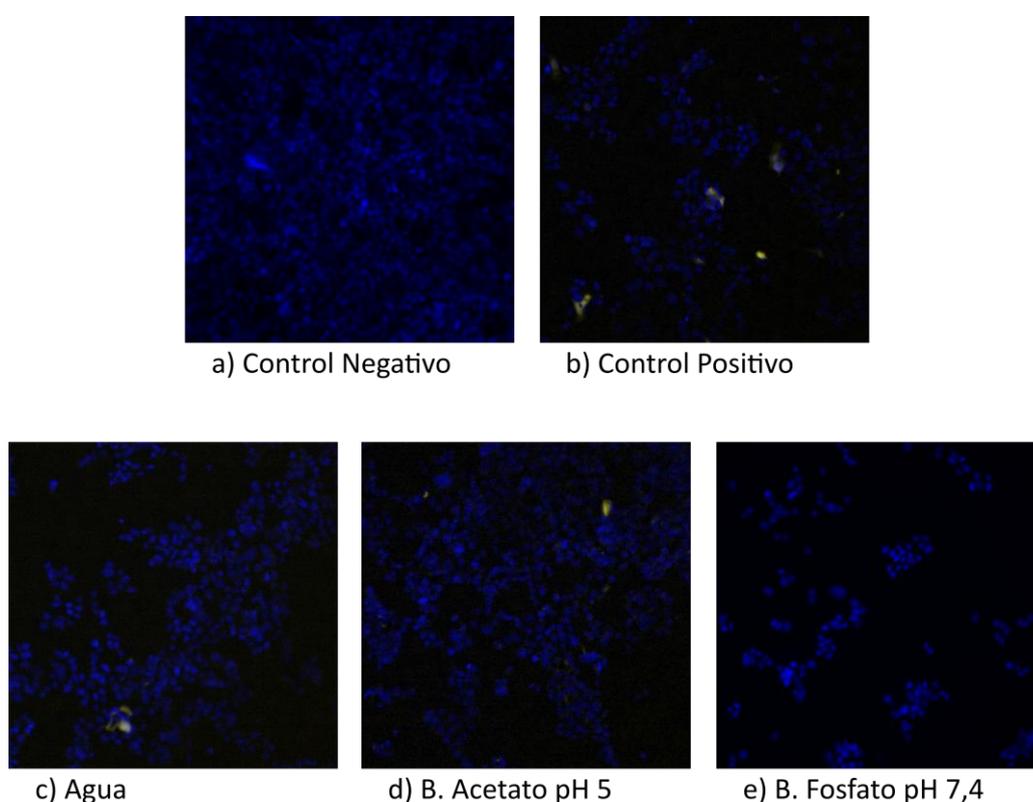
b) 1:8

**Figura 51:** Imágenes representativas de los ensayos de EMSA realizados para evaluar la capacidad de las NMs de unir pDNA. Se muestran los resultados obtenidos para las muestras 1:4 para los N/Ps 10, 50, 100, 500 (a) y para las 1:8 a N/Ps 10, 50 y 100 (b). Para cada relación N/P se respeta el orden de siembra, de izquierda a derecha: Agua, Buffer Acetato pH 5 y Buffer Fosfato pH 7,4. El análisis se realiza en paralelo a controles negativo (-) y positivo (+).

A continuación se evaluó la capacidad de las nanopartículas seleccionadas de vehiculizar el DNA plasmídico, mediante el estudio de la expresión de YFP por Microscopía de Fluorescencia (figura 52). Se realizaron los ensayos de transfección del vector de expresión de YFP (pYFP) con las formulaciones de NMs 1:1, preparadas en los 3 diluyentes, a un relación N/P = 1000. Como control negativo se realizó la

transfección con el plásmido sólo, es decir sin ser acompañado con un vehículo (figura 52 a); y como control positivo se utilizó el complejo Lipofectamina-pYFP (figura 52 b).

Los resultados obtenidos evidenciaron la expresión de la proteína fluorescente amarilla, cuando la transfección se realizó con las NMs preparadas en agua y en buffer acetato pH 5 (figura 52 c y d), pero no al utilizar las obtenidas en buffer fosfato pH 7,4 (figura 52 e). Cabe destacar, que las transfecciones se realizaron con 0,5 ug de pDNA, lo cual, para lograr una relación N/P = 1000, equivale a una concentración final de las NMs de 0,76 %. De acuerdo al análisis de citotoxicidad realizado previamente, esta concentración de partículas preparadas en buffer fosfato pH 7,4 presenta una alta toxicidad, lo cual explicaría la menor cantidad de células por campo observadas en la figura 52 e.



**Figura 52:** Microscopía de fluorescencia para evaluar la expresión de YFP. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoesch; la proteína se evidencia en amarillo. Las células MCF-7 fueron incubadas con el siRNA sólo (a - Control Negativo), con el complejo lipofectamina-siRNA (b - Control Positivo); o con los complejos NMs-pDNA con las NMs con relación PC:SC 1:1 a una relación N/P=1000 preparados en agua (c), buffer acetato pH 5 (d) y buffer fosfato pH 7,4 (e).

Los resultados obtenidos sugieren que las Nanopartículas Mixtas constituirían formulaciones adecuadas para ser estudiadas y optimizadas para su uso como vehículos de vectores que expresen shRNA con el fin de silenciar un gen blanco.

## **IV.2.2 Estudio de los efectos biológicos de las NMs sobre la línea celular MCF-7**

Como ya se mencionó en la introducción, se han descrito múltiples efectos de los sistemas nanoparticulados sobre los sistemas biológicos. Las Nanopartículas Mixtas constituyen una herramienta, que incluso es ampliamente utilizada en tecnología farmacéutica para distintas aplicaciones, como por ejemplo, para solubilizar sustancias hidrofóbicas o encapsular compuestos hidrofílicos. Dichas formulaciones, están compuestas por excipientes farmacéuticamente aceptables y biodegradables como lo son la fosfatidilcolina y el colato de sodio; los cuales son, a su vez, moléculas bioactivas.

Por lo tanto, considerando que las Nanopartículas Mixtas, propuestas en este trabajo de tesis como sistemas de vehiculización de oligonucleótidos para el tratamiento de cáncer, son sistemas nanoparticulados compuestos de fosfatidilcolina y colato de sodio (SC), surgió el interés por estudiar sus efectos biológicos y toxicidad.

### **IV.2.2.1 Estudio de los efectos de las NMs sobre la activación de cascadas de señalización intracelular y viabilidad celular**

Se ha reportado que las kinasas AKT y ERK 1/2 pueden ser activadas por ácidos biliares (Rao y cols., 2002; Von Roseninge y cols., 2011). Asimismo, en la sección IV.1.2.2 se describió que las Nanopartículas de Fosfatidilcolina resultaron capaces de inducir la activación de ERK 1/2 en ciertas condiciones experimentales. Dada la relevancia de estos mediadores celulares en proliferación celular y oncogénesis, se estudió su activación en células MCF-7 tras la incubación con las Nanopartículas Mixtas compuestas por fosfatidilcolina y colato de sodio, de forma similar a los ensayos realizados para las NPCs. Se midió el grado de fosforilación y contenido proteico de dichas kinasas, mediante ensayos de *Western Blotting*.

Si bien las formulaciones de Nanopartículas Mixtas más adecuadas para realizar las transfecciones de siRNA fueron las que presentan relación PC:SC de 1:2 y 1:4, realizamos los estudios de los efectos biológicos sobre el total de las preparaciones ya que la formulación con proporción 1:1 resultó ser eficaz para la transfección de DNA plasmídico, y las NMs PC:SC 1:8 podrían ser utilizadas para vehicular siRNA pero a bajas relaciones N/P.

La concentración final de las Nanopartículas Mixtas en estos ensayos fue de 0,1 % (p/v). Se eligió esta concentración teniendo en cuenta las relaciones N/P empleadas en los ensayos de transfección (tabla 11). En el caso de las preparaciones 1:1 se utilizó la relación N/P = 1000, y para las 1:2 y 1:4, la relación N/P = 500. Dado que no se realizaron ensayos de transfección con las NMs 1:8, se optó por tomar la concentración equivalente a un N/P = 100 debido a la citotoxicidad presentada a concentraciones mayores.

Concentración relativa de PC:SC en las NMs	Relación N/P en transfección	Concentración final de NMs (% p/v)
PC:SC (1:1)	1000	0,12
PC:SC (1:2)	500	0,09
PC:SC (1:4)	500	0,13
PC:SC (1:8)	100	0,04

**Tabla 11:** Concentraciones finales de las NMs en el medio de cultivo, utilizadas para los ensayos de transfección de siRNA para el caso de las preparaciones con relaciones PC:SC de 1:2 y 1:4, y de pDNA para el caso de las NMs 1:1. Para las preparaciones con relación 1:8 se tomó la concentración equivalente a un N/P = 100, aunque no se hayan utilizado para las transfecciones.

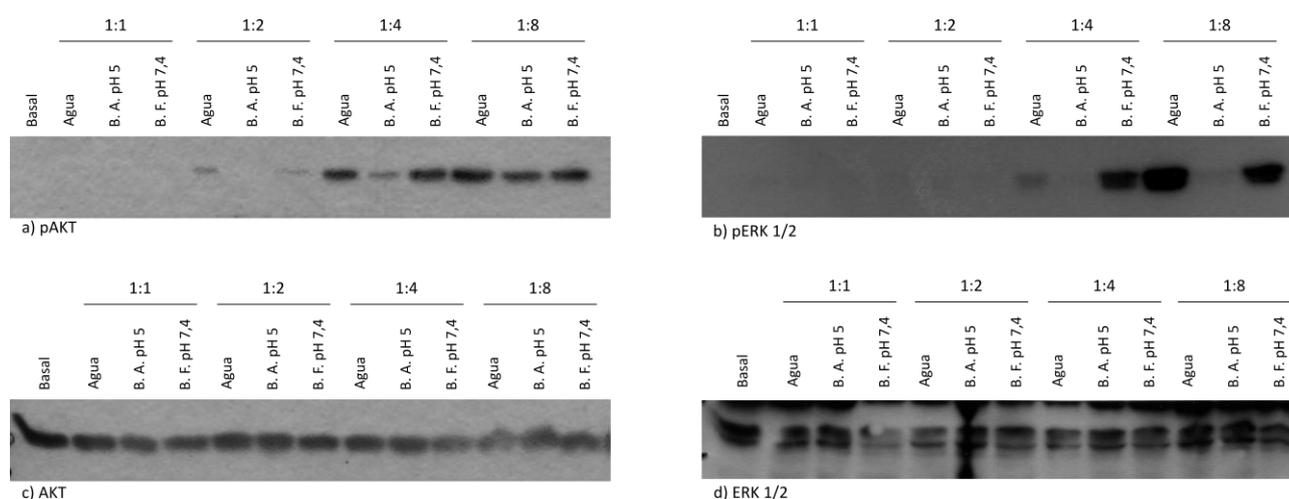
Teniendo en cuenta los valores mostrados en la tabla 11, se seleccionó la concentración final 0,1% (p/v) para todas las formulaciones, para facilitar la comparación de resultados entre las distintas partículas. Además, de esta forma, se obtendrían resultados independientes de las condiciones de transfección particulares evaluadas por nuestro grupo, pero dentro del rango de su posible uso para ensayos de transfección *in vitro*.

La figura 55 muestra los resultados de los ensayos de *Western Blotting* para evaluar el grado de fosforilación y contenido proteico de AKT y ERK 1/2, tras la incubación de las células MCF-7 con las NMs al 0,1 % (p/v), durante 24 hs y en medio sin suero.

Los resultados obtenidos evidenciaron que cuando la incubación se realiza con las preparaciones de Nanopartículas Mixtas con mayor proporción de colato de sodio, aumenta el grado de fosforilación en residuos activantes de las proteínas AKT y ERK 1/2 (figura 55 a y b), mientras que la cantidad de proteína total de ambas kinasas se mantiene constante (figura 55 c y d). Además, es interesante destacar la diferencia en el grado de fosforilación de AKT y ERK 1/2 entre las NMs, de acuerdo al diluyente de

preparación. Se observa que los niveles de fosforilación de ambas proteínas son mayores para las NMs preparadas en agua y buffer fosfato pH 7,4 con respecto a las dispersadas en buffer acetato pH 5, para una misma relación PC:SC.

Teniendo en cuenta estos resultados, y la relación que guarda la activación de las proteínas ERK 1/2 y AKT con los procesos de proliferación y supervivencia celular, se decidió estudiar el efecto de la incubación de las Nanopartículas Mixtas al 0,1 % (p/v) sobre la viabilidad celular. El ensayo se realizó en la línea celular MCF-7, utilizando el método basado en la reducción de tetrazolium o MTS, durante 24 hs en ausencia de suero.



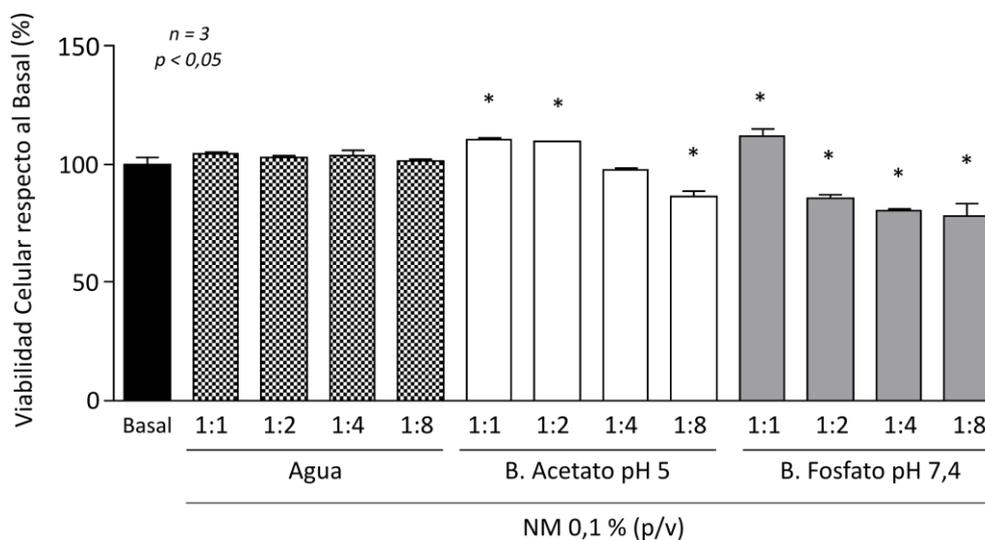
**Figura 55:** Fosforilación y contenido proteico de AKT y ERK 1/2 en las células tratadas con las Nanopartículas Mixtas. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con las NMs preparadas en los 3 diluyentes, al 0,1 % (p/v). Se muestran *Western Blots* representativos de las fosforilaciones de AKT (a) y ERK (b), y del contenido proteico (c y d respectivamente).

Los resultados evidenciaron que las Nanopartículas Mixtas con proporción PC:SC 1:1 preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7,4 y las 1:2 buffer acetato pH 5 provocaron un aumento significativo de la viabilidad celular (figura 56). Contrariamente, se observó un efecto citotóxico para las NMs 1:2, 1:4 y 1:8 preparadas en buffer fosfato pH 7,4 y para las 1:8 en buffer acetato pH 5. Cabe destacar que ninguna de las partículas dispersadas en agua tuvo efecto alguno sobre la viabilidad celular, independientemente de la relación PC:SC. Por lo tanto, la viabilidad no sólo estaría afectada por la proporción PC:SC, sino que dependería, además, del diluyente empleado en su preparación.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para la fosforilación de AKT y ERK, se puede ver que, contrariamente a lo esperado, no hay una correlación clara entre la activación de estas proteínas por las NMs 1:4 y 1:8 preparadas en agua y buffer fosfato pH 7, 4 y, en menor medida por las preparadas en

buffer acetato pH 5, y un aumento en la viabilidad celular.

Considerando que los mayores niveles de activación de las kinasas y de citotoxicidad de las Nanopartículas se dan, en mayor medida, para aquellas formulaciones con una mayor proporción de colato de sodio, se decidió evaluar los efectos de esta sal biliar por si misma sobre la línea celular MCF-7.



**Figura 56:** Viabilidad Celular de las células tratadas con las Nanopartículas Mixtas. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con 0,1 % (p/v) de las NMs preparadas en los tres diluyentes, en ausencia de suero. La viabilidad se evaluó mediante el ensayo basado en la reducción del MTS; los resultados se muestran relativos al basal. Se representa la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls, para un  $n=3$ . Se indica con \* la diferencia significativa con respecto al Basal ( $p < 0,05$ ).

#### IV.2.2.2 Estudio de los efectos del Colato de Sodio sobre la activación de cascadas de señalización intracelular y viabilidad celular

Se realizaron ensayos de *Western Blotting* incubando la línea celular MCF-7 con colato de sodio, para dilucidar la implicancia de la sal biliar *per se*, en la activación de las proteínas AKT y ERK 1/2 cuando las células fueron tratadas con las Nanopartículas Mixtas al 0,1 % (p/v).

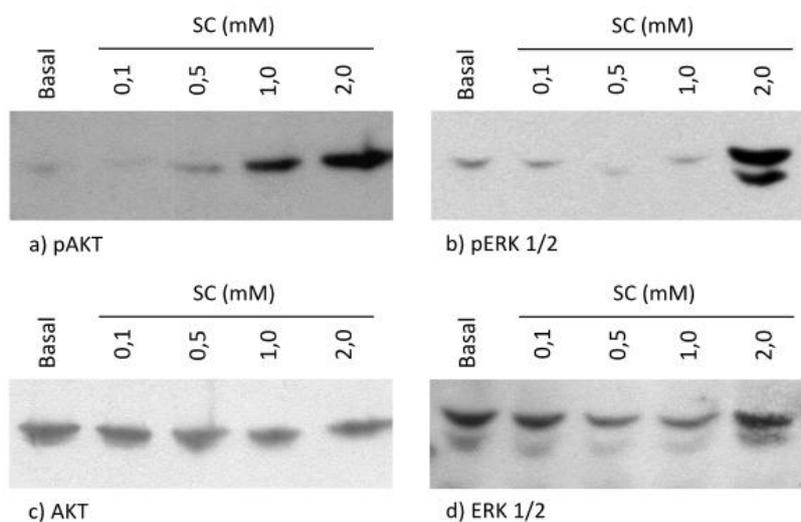
Teniendo en cuenta las concentraciones finales absolutas de colato de sodio, que se muestran en la tabla 12, se realizó una curva de concentraciones de la sal biliar (100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM y 2 mM) de forma tal de estar abarcando las utilizadas al incubar las células con las NMs al 0,1 % (p/v). El tratamiento se realizó por un período de 24 hs en ausencia de suero, y se evaluó el grado de activación de AKT y ERK

1/2 (figura 57).

Concentración relativa de PC:SC en las NMs	Concentración final absoluta de SC
PC:SC (1:1)	0,85 mM
PC:SC (1:2)	1,25 mM
PC:SC (1:4)	1,60 mM
PC:SC (1:8)	1,90 mM

**Tabla 12:** Concentraciones finales de colato de sodio (SC) en el medio de cultivo, para cada formulación de Nanopartículas Mixtas (NMs) utilizadas en los ensayos de *Western Blotting* de la sección IV.2.2.1.

Como se puede apreciar en la figura 57, cuando las células se incubaron con las concentraciones más altas de colato de sodio se produjo la activación de las proteínas AKT y ERK 1/2. Aunque no se observaron cambios en el contenido proteico de estas kinasas para ninguna concentración de colato de sodio ensayada.

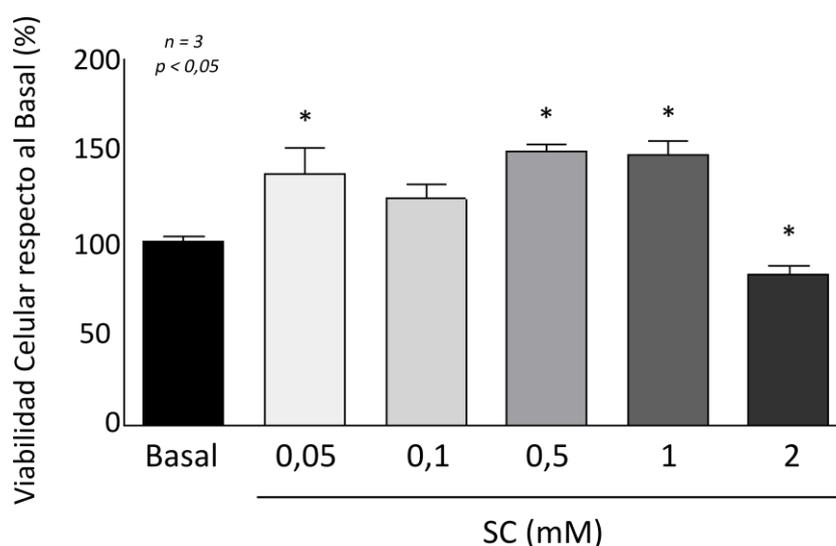


**Figura 57:** Fosforilación y contenido proteico de AKT y ERK 1/2 en las células tratadas con distintas concentraciones de colato de sodio. Se evaluaron los efectos de la incubación en medio sin suero durante 24 hs, de concentraciones crecientes de colato de sodio (0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mM de SC), sobre el grado de fosforilación de AKT y EKR 1/2 (a, b) y el contenido proteico de ambas kinasas (c y d).

Teniendo en cuenta estos resultados, de forma análoga a lo realizado con las NMs, se estudiaron

los efectos de la sal biliar sobre la viabilidad celular. El análisis se realizó mediante el ensayo basado en la reducción del tetrazolium, tras la incubación de la línea celular MCF-7 con concentraciones crecientes de colato de sodio, durante 24 hs en ausencia de suero.

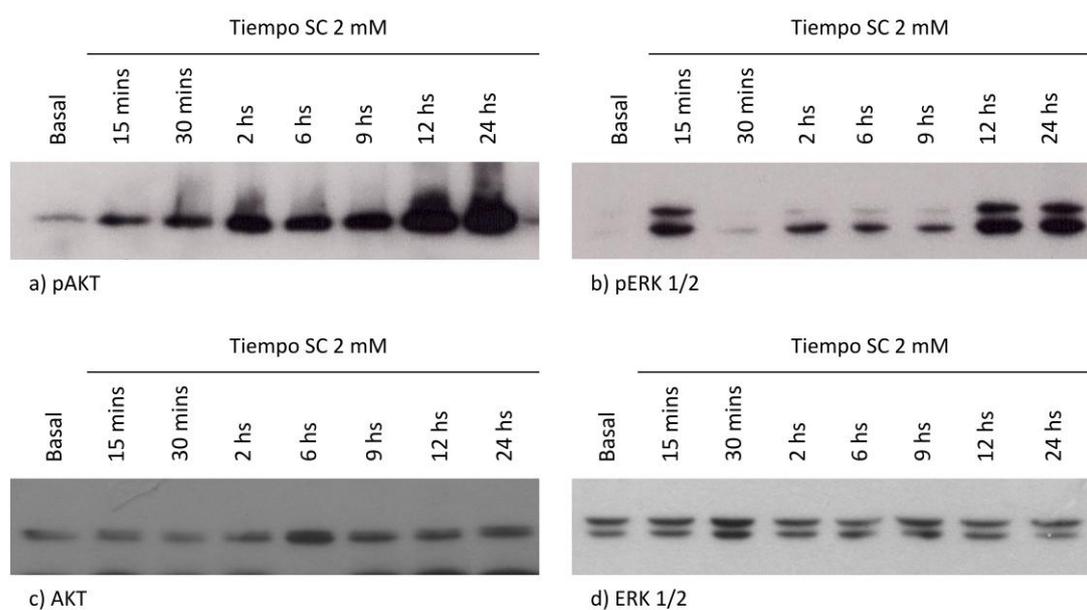
Los resultados obtenidos demostraron una disminución significativa de la viabilidad celular sólo cuando las células son tratadas con la mayor de las concentraciones de SC evaluadas (figura 58). Sin embargo, para las concentraciones menores, se observó un aumento en la viabilidad. Esta diferencia fue significativa ( $p < 0,05$ ) para los tratamientos con 0,05 mM, 0,5 mM y 1 mM de SC; y, aunque no resultó significativo para el tratamiento con 0,1 mM de SC, se observó una clara tendencia en este mismo sentido.



**Figura 58:** Viabilidad Celular de las células tratadas con distintas concentraciones de colato de sodio. Las células MCF-7 fueron incubadas durante 24 hs con concentraciones crecientes de colato de sodio (SC). La viabilidad se evaluó mediante el ensayo basado en la reducción del MTS; los resultados se muestran relativos al basal. Se representa la media  $\pm$  SEM. EL análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Newman-Keuls, para un  $n=3$ . Se indica con \* la diferencia significativa con respecto al Basal ( $p < 0,05$ ).

Si bien la activación de ambas kinasas está tradicionalmente asociada a una inducción de la viabilidad y proliferación celular, existen reportes en los que se evidencia que la activación sostenida de ERK 1/2 y/o de AKT puede provocar el arresto del ciclo celular y apoptosis (Chen y cols., 2014; Nikolakopoulou y cols., 2013). Por lo tanto, para estudiar la activación de dichas proteínas en el tiempo, se realizó una curva de estimulación con la sal biliar colato de sodio, a una concentración final de 2 mM. Las incubaciones de la línea celular MCF-7 con el colato de sodio se realizaron durante 15 y 30 minutos y 2, 6, 9, 12 y 24 horas, en medio de cultivo en ausencia de suero. Nuevamente, se analizó la fosforilación de ambas kinasas, así como el contenido proteico de las mismas por ensayos de *Western Blotting* (figura 59).

Como se puede observar en la figura 59 a, la incubación de las células con la sal biliar a una concentración de 2 mM, provocó un aumento progresivo de la fosforilación de AKT a medida que aumenta el tiempo del tratamiento. En cambio, al evaluar la fosforilación de ERK 1/2 (figura 59 b) se pudo ver una cinética de activación de tipo bifásica; se observó un aumento rápido a los 15 minutos, que desciende a prácticamente niveles basales a los 30 minutos y luego aumenta nuevamente hasta alcanzar los valores máximos a las 12 y 24 hs. El contenido proteico de estas kinasas no presentó diferencias notorias (figura 59 c y d).



**Figura 59:** Fosforilación y contenido proteico de AKT y ERK 1/2 en las células tratadas durante distintos tiempos con colato de sodio. Mediante *Western Blotting* se evaluaron los efectos del colato de sodio (SC) en medio sin suero, sobre la cinética de activación de dichas proteínas. Las células MCF-7 fueron incubadas con la sal biliar 2 mM, a tiempos crecientes. Se muestra el grado de fosforilación de AKT y ERK 1/2 (a, b) y el contenido proteico de ambas kinasas (c y d).

Por lo tanto, los altos niveles de fosforilación de AKT y ERK 1/2 inducidos por el colato de sodio, detectables a las 24 hs de incubación, podrían ser consecuencia de la activación sostenida en el tiempo de dichas kinasas y ello se asocia, al igual que para las NMs 1:4 y 1:8, con efectos citotóxicos sobre las células MCF-7.

# **DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

Entre los principales requerimientos de los tratamientos para el cáncer, se debe considerar que el agente terapéutico llegue al tumor en altas concentraciones, y que su vida media en el microambiente tumoral sea apropiada. Es por esta razón que resulta de primordial importancia el desarrollo de sistemas biocompatibles, que logren la vehiculización de la droga a su sitio de acción. Los sistemas nanoparticulados han sido extensamente estudiados y propuestos como vehículos de agentes terapéuticos, incluyendo los siRNAs, para el tratamiento de distintos tipos de tumores, dado que logran mejorar la biodisponibilidad, estabilidad *in vivo*, solubilidad, absorción y efectividad terapéutica del oligonucleótido (Díaz y cols., 2013).

El objetivo general del presente trabajo de Tesis fue estudiar dos sistemas nanoparticulados basados en lecitina para la vehiculización de oligonucleótidos, en particular de siRNA, a la línea celular de epitelio mamario tumoral MCF-7.

Considerando la importancia de lograr relacionar el comportamiento biológico de los sistemas nanoparticulados con las propiedades o características fisicoquímicas de los mismos, se realizaron estudios de microscopía electrónica y de dispersión dinámica de luz (DLS), para obtener información sobre los tamaños y morfologías de los sistemas desarrollados. En este sentido, también se realizaron mediciones del potencial Z, ya que el mismo proporciona información sobre la carga superficial de una partícula. La carga y el tamaño del sistema nanoparticulado podrían condicionar su interacción con las membranas celulares. Además, estos factores pueden ser utilizados para obtener información acerca de la estabilidad física de los sistemas.

La caracterización de las nanopartículas desarrolladas, respecto a su posible uso como vehículos de oligonucleótidos, implicó el estudio de su capacidad de unir siRNA y de su citotoxicidad; estudios en base a los cuales se pretendió optimizar las condiciones experimentales, para luego evaluar la capacidad de los sistemas de internalizar siRNA y mediar el silenciamiento de un gen blanco.

Por otro lado, dado que el objetivo final de esta línea de investigación es sentar las bases para el diseño de vehículos de siRNA biocompatibles y eficientes, pero exentos de efectos celulares no deseados, se estudiaron los efectos biológicos de los sistemas nanoparticulados desarrollados sobre la línea celular MCF-7. En particular, se evaluaron los efectos sobre viabilidad celular y sobre vías de señalización intracelular implicadas en proliferación.

## V.1 Sección I: Nanopartículas de FosfatidilColina - NPCs

### V.1.1 Caracterización y evaluación *in vitro* de las NPCs como vehículos de siRNA

El tamaño y forma de un sistema nanoparticulado destinado a la vehiculización de drogas son características fundamentales a determinar durante su diseño y caracterización, debido a que pueden condicionar su distribución *in vivo*, estabilidad, toxicidad y llegada al sitio blanco (Singh y cols., 2009). Es por ello que el tamaño y forma de las NPCs elaboradas se analizaron mediante microscopía electrónica, y se realizaron determinaciones por Dispersión Dinámica de Luz (DSL) para complementar los análisis de tamaño. Estos estudios demostraron efectivamente el tamaño nanométrico de las distintas formulaciones de las NPCs aunque la morfología observada difirió según el buffer de dispersión.

Las NPCs obtenidas a pH 5 mostraron una morfología esférica, pero irregular, con importante aglomeración inter-partícula. El tamaño medio observado fue menor a los 100 nm según los estudios de microscopía electrónica, mientras que los de DLS arrojaron valores de entre 200 y 250 nm, con un alto índice de poli-dispersión debido a la aglomeración mencionada. Como se explicó anteriormente, estas diferencias en las determinaciones de tamaño por ambas técnicas se deberían a restricciones metodológicas. El potencial Z de estas nanopartículas fue de alrededor de + 14 mV. Al cargar las partículas con siRNA se observó una forma más esférica, y una leve variación en los valores de tamaño medio, con una tendencia a disminuir con el agregado del oligonucleótido. Asimismo, los valores de potencial Z se volvieron negativos al formarse los complejos NPCs-siRNA.

El grupo de Silvander y colaboradores demostró, en condiciones experimentales similares a las empleadas en este trabajo, la formación de vesículas de fosfatidilcolina (Silvander, 1996). Por lo tanto, se puede proponer que las NPCs obtenidas a pH 5 forman vesículas bicapa, conteniendo medio dispersante en su interior, y que el alto grado de aglomeración se debe a que las vesículas no serían capaces de lograr una repulsión inter-partícula efectiva. Silvander también reportó que el agregado de un compuesto aniónico promueve la transición de las vesículas de fosfatidilcolina a una estructura micelar (Silvander, 1996). Si se considera que el grupo colina y el fosfato de la cabeza zwitteriónica de la PC pueden actuar en forma independiente, es posible que el oligonucleótido pueda establecer interacciones electrostáticas con la cabeza polar de la colina, y cambiar el radio de curvatura de la nanopartícula (Walter y cols., 2000). Entonces, el agregado de siRNA cambiaría tanto la fuerza iónica del medio como las interacciones en y con las partículas. Esto explicaría el cambio morfológico de las NPCs preparadas en buffer pH 5 hacia estructuras más esféricas, así como la disminución del tamaño observada a medida que disminuye la relación fosfatidilcolina:siRNA (menores relaciones N/P). El cambio de signo observado para el potencial Z

estaría indicando la nueva organización de los componentes, y que al menos algunas moléculas de siRNA se estarían ubicando en la superficie de la nanopartícula.

Por otro lado, las nanopartículas obtenidas a pH 7 mostraron un tamaño medio de entre 180 y 200 nm, exhibiendo también un error de medición relativamente alto. En este caso, se describieron estructuras más alargadas, con formas localmente cilíndricas tanto para las nanopartículas aisladas como para las floculadas. El potencial Z observado para estas partículas fue negativo. Al ser incorporado el siRNA se observó una conservación de la morfología tipo cilíndrica, aunque disminuyó significativamente el número y tamaño de los flóculos. Los valores de potencial Z se mantuvieron negativos, pero de mayor valor absoluto comparado con el de las partículas vacías.

Almgren y colaboradores estudiaron el fenómeno de auto-ensamble de la fosfatidilcolina en diferentes condiciones experimentales, y demostraron la presencia de estructuras hexagonales cilíndricas, y en algunos casos la coexistencia de éstas con vesículas y micelas (Almgren, 2000). Este podría ser el caso que se observa para la preparación de las NPCs en buffer pH 7; se justificaría así la morfología cilíndrica predominante y también la baja estabilidad física exhibida. Con el agregado de siRNA los valores de potencial Z se harían más negativos, debido a que la nueva organización adoptada permitiría, mediante la interacción con los grupos colina ahora expuestos, la unión del oligonucleótido.

Los estudios del grupo de Walter demostraron la influencia del pH y la fuerza iónica del medio sobre la estructura adoptada por parte de las partículas; por lo que el medio en el cual se prepararon las nanopartículas, sería el factor determinante de la estructura reportada. Los equilibrios de interacciones fisicoquímicas que se dan en las preparaciones a pH 5 y 7 serían muy diferentes entre sí, lo que a su vez, podría explicar las diferentes características fisicoquímicas observadas, y los distintos efectos biológicos.

Una característica fundamental de los sistemas propuestos como vehículos de oligonucleótidos es su capacidad de complejar las moléculas del material génico; es por ello que se inició la caracterización de las NPCs, como potencial vehículo de siRNA, mediante ensayos de unión del oligonucleótido. Estos estudios abarcaron todas las formulaciones diseñadas y se realizaron en diversas condiciones experimentales. Los sistemas nanoparticulados preparados en buffer acetato pH 5 o en buffer fosfato pH 7 resultaron capaces de unir el oligonucleótido, pero no aquellos dispersados en agua o glicerol. Esto es consecuente con el hecho de que el medio en el cual se prepararon las nanopartículas, condicione las interacciones fisicoquímicas.

Los resultados de los ensayos de EMSA mostraron la formación de complejos vehículo-siRNA para un amplio rango de relaciones N/P, y que la cantidad de oligonucleótido complejo es mayor a relaciones más altas. Cabe destacar que las nanopartículas preparadas en buffer acetato pH 5 fueron capaces de unir siRNA a partir de valores de N/P = 4, mientras que para aquellas dispersadas en buffer fosfato pH 7, la unión se logró recién a partir de valores de N/P = 100. Dados los valores de potencial Z

obtenidos, esto podría estar relacionado con una mayor disponibilidad a pH 5 de la colina perteneciente a la cabeza polar de la fosfatidilcolina.

Por lo tanto se pone en evidencia que mediante la optimización de parámetros, como el pH y la fuerza iónica, en la preparación de las nanopartículas, se pueden obtener sistemas capaces de unir oligonucleótidos eficientemente, sin la necesidad del agregado de surfactantes o lípidos catiónicos, que suelen ser citotóxicos.

La baja toxicidad de los sistemas nanoparticulados es uno de los requisitos necesarios para la implementación de estos sistemas en la clínica. Es por ello que la citotoxicidad de los sistemas propuestos es un parámetro a determinar en las fases tempranas de su desarrollo. Considerando los resultados obtenidos respecto a la capacidad de las nanopartículas de PC de unir siRNA, se analizó la citotoxicidad de aquellas preparadas en buffer pH 5 y pH 7 sobre la línea celular de epitelio mamario tumoral MCF-7. Los resultados evidenciaron que las nanopartículas de fosfatidilcolina propuestas no resultan tóxicas en el rango de concentraciones evaluado. Sin embargo, y como se discutirá con mayor profundidad en la sección siguiente, sí se observó una tendencia pro-proliferativa dependiente tanto de la concentración de las NPCs como del buffer utilizado para su dispersión.

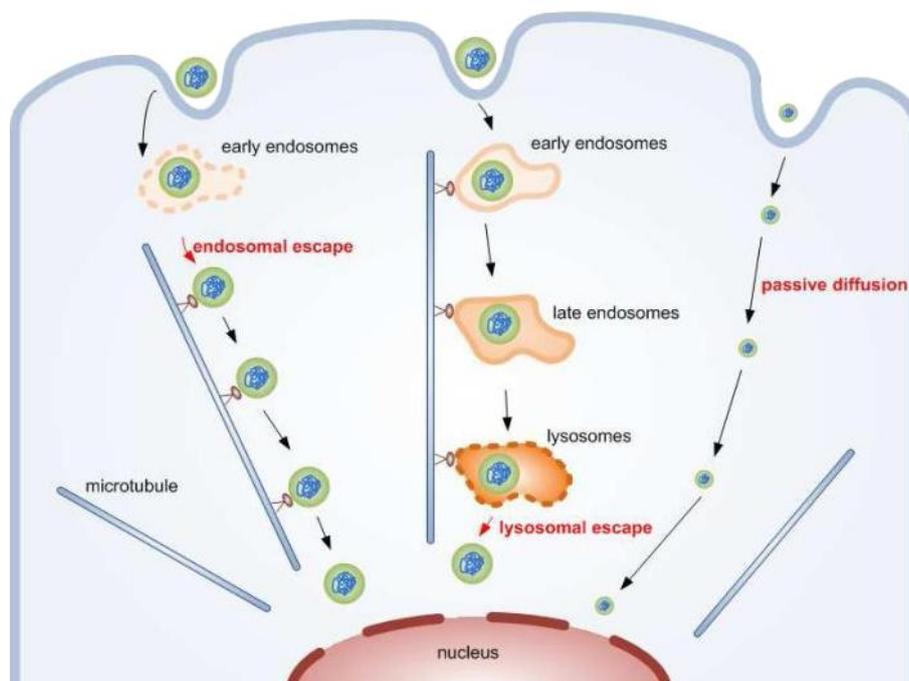
Otro requisito que los sistemas de vehiculización deben cumplir, es la de mediar la internalización del agente terapéutico al citoplasma celular para que éste pueda mediar su acción. Este aspecto fue evaluado mediante la transfección de un siRNA inespecífico unido a un fluorocromo, cuya presencia en el interior celular se determinó por Microscopía de Fluorescencia. La observación microscópica se realizó 18 hs posteriores a la transfección, ya que en este caso solo se evalúa la entrada a la célula del RNA bicatenario, no se requiere que el siRNA medie la disminución de una proteína blanco. Se corroboró la marca asociada a la presencia del oligonucleótido en el interior celular para los ensayos realizados con ambas preparaciones de las nanopartículas, y el control positivo realizado con el reactivo comercial. En todos los casos la marcación se evidenció como un puntillado, lo cual se asociaría a la internalización del siRNA encapsulado por las nanopartículas, reportado también por otros autores (Lavigne y cols., 2007). Sin embargo, siendo que el objetivo es evaluar la posibilidad de emplear estos vehículos para silenciar un gen blanco, demostrar la internalización del siRNA no es suficiente.

Generalmente, los vectores no virales ingresan a la célula mediante endocitosis (Kuhn y cols., 2014). La interacción de los sistemas de vehiculización nanoparticulados con regiones de la membrana enriquecidas, o no, en *lipid rafts* pueden determinar la vía para su captación endocítica, y su subsecuente destino celular (El-Sayed y cols., 2013). La endocitosis de nanopartículas implica la formación de endosomas tempranos que luego maduran a endosomas tardíos, los cuales finalmente se fusionan con los lisosomas para la degradación de las moléculas endocitadas. Para que el siRNA que ingresa al citoplasma

celular pueda incorporarse a la maquinaria de silenciamiento génico debe escapar esta vía de degradación endo-lisosomal. El escape endosomal se convierte entonces en un paso crítico. Muchos vectores de oligonucleótidos fueron diseñados para escapar rápidamente y así evitar la degradación lisosomal, aunque todavía es controversial en qué momento es conveniente que se dé la liberación del contenido hacia el citoplasma (Nguyen y cols., 2012).

En el caso de vehiculizar DNA plasmídico, la permanencia del oligonucleótido en el endosoma podría aumentar la eficiencia del proceso. Si el material genético fuera liberado rápidamente, durante la difusión pasiva del DNA desde la periferia hasta la región perinuclear, podría darse la degradación enzimática del mismo. En cambio, si el pDNA permaneciera lo suficiente dentro del endosoma, y escapara previo a la degradación lisosomal, estaría aprovechando el transporte activo hasta las cercanías del núcleo (figura 60) (Lechardeur y cols., 1999).

Por otro lado, si el oligonucleótido a transfectar fuera siRNA, idealmente éste debería ser liberado en las cercanías del complejo RISC. Si bien se ha hecho gran progreso en lo que respecta a la identificación y caracterización de los componentes de este complejo, poco se sabe sobre dónde específicamente en el citoplasma, se ensambla y es activado. De hecho, varios grupos han propuesto diferentes ubicaciones para RISC (Lee y cols., 2009; Sen y cols., 2005). Cabe destacar además que el sistema nanoparticulado en este punto debe ser capaz de liberar el siRNA, para que este pueda ser cargado en el complejo RISC y mediar su acción.



**Figura 60:** Transporte citoplasmático de sistemas de vehiculización. Se muestra un esquema simplificado de las posibles vías por las que el vector puede desplazarse por el interior celular. Imagen tomada y adaptada de Nguyen J y Szoka FC, 2012.

La posibilidad de controlar el escape endosomal mediante el diseño racional del sistema de vehiculización, debe tener en cuenta que recientemente se han descrito dos tipos o poblaciones de endosomas tempranos. Estos pueden clasificarse como dinámicos o estáticos, a los cuales pareciera estar ligado el destino de su contenido. Los endosomas dinámicos están asociados a microtúbulos por lo que presentan gran movilidad, y maduran a endosomas tardíos con mayor rapidez; mientras que los estáticos permanecen más tiempo en la periferia celular, y estarían relacionados con el mecanismo de reciclaje (Lakadamyali y cols., 2006). Resulta entonces indispensable realizar un análisis comprensivo de todos estos factores (escape de la degradación en lisosoma, sitio de acción intracelular, estabilidad en citoplasma), de manera tal de lograr una vehiculización eficiente.

De este modo, el hecho de que las NPCs resultaran capaces de internalizar el siRNA no necesariamente garantiza su éxito para lograr el silenciamiento post-transcripcional del gen blanco. Particularmente, a pesar de haber observado la internalización de siRNA inespecífico unido al fluorocromo, en los ensayos de silenciamiento no se logró observar la disminución del contenido proteico de EGFR.

Se ha descrito que la desestabilización de los endosomas es fundamental para que los vectores lipídicos promuevan el escape endosomal. Dicha desestabilización depende de interacciones entre los lípidos que forman parte del vector y aquellos constituyentes de la membrana de la vesícula endosomal (Nguyen y cols., 2012). En el caso de que la internalización de las NPCs sea por endocitosis, podría ocurrir que la naturaleza anfifílica de la fosfatidilcolina resulte ineficiente para desestabilizar la membrana de las vesículas endosomales, y por ende el siRNA no sea efectivamente liberado para incorporarse a la maquinaria de silenciamiento génico.

Por otro lado, cabe destacar que no se pudo evaluar la capacidad de silenciamiento en las mismas condiciones en las que se evaluó la internalización. La concentración de siRNA a utilizar, junto con la relación N/P, determinan las concentraciones de las nanopartículas en los ensayos de transfección. Como se mencionó en la sección de resultados correspondiente a las NPCs, la concentración de siRNA necesaria para lograr silenciamiento con los complejos Lipofectamina-siRNAs, fue elevada. Si se pretendiera realizar los ensayos de transfección considerando la relación N/P = 8000, la concentración de NPCs que debería usarse sería muy alta y estaría fuera del rango de citotoxicidad aceptable. Por esta razón fue que se decidió evaluar la capacidad de las Nanopartículas de PC a los N/P de 100 y 1000, relaciones en las cuales también se había comprobado la capacidad de las NPs de unir siRNA. Podría ocurrir que las cantidades de siRNA internalizadas a estas relaciones N/P no sean suficientes para lograr el silenciamiento del gen blanco.

Dado que el objetivo de nuestro trabajo comprende la evaluación de sistemas nanométricos

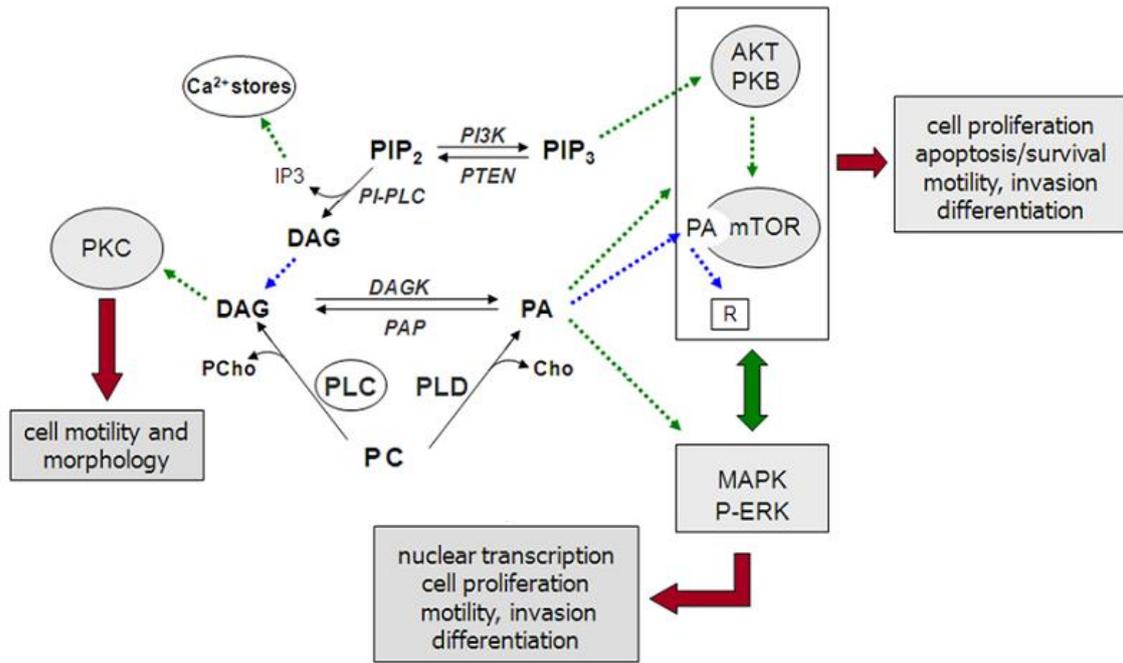
para ser utilizados como plataforma tecnológica de futuros desarrollos, sería necesario e interesante profundizar los estudios relativos al mecanismo de internalización de las NPCs y, probablemente, de degradación del siRNA.

### **V.1.2 Estudio de los efectos biológicos de las NPCs sobre la línea celular MCF-7**

Muchos estudios han puesto en evidencia que la interacción de las nanopartículas con las células, tanto *in vitro* como *in vivo*, puede provocar una gran variedad de respuestas biológicas. La interacción depende de las propiedades de los nanosistemas, entre ellas, composición cuali-cuantitativa de la formulación, tamaño, carga y morfología (Rauch y cols., 2013). Algunas de las respuestas biológicas reportadas implican la activación de vías de señalización intracelular, y la disrupción de los mecanismos que controlan la progresión del ciclo celular. Considerando que las NPCs diseñadas se proponen como vehículo de oligonucleótidos para el tratamiento de una patología tumoral, se estudió el efecto de las nanopartículas de fosfatidilcolina sobre vías de señalización implicadas en el control del ciclo celular y en la proliferación de las células MCF-7.

Además, y como se mencionó en la introducción, la participación de la fosfatidilcolina, en señalización intracelular y en la generación de efectos celulares como proliferación/apoptosis, diferenciación e invasión, ya ha sido reportada (Liu y cols., 2006; Mazie y cols., 2006; Ramoni y cols., 2004). La hidrólisis de la fosfatidilcolina mediada por la fosfolipasa D (PLD) genera ácido fosfatídico (PA) y colina, siendo ambos importantes segundos mensajeros implicados en diversas vías de señalización (figura 61). PA se une a Raf-1 y promueve su reclutamiento a la membrana plasmática donde es activado por interacción directa con Ras (Rizzo y cols., 2000). La activación de Ras inducida por Raf-1 deriva en la activación de las vías de señalización de las MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) y PI3K/AKT (Clem y cols., 2011). Por lo tanto, el PA tendría un rol fundamental como mediador de cascadas que inducen proliferación y supervivencia celular. Asimismo, el PA también se une y activa a mTOR (*mammalian target of rapamycin*), proteína que interviene en distintos procesos celulares como transcripción, traducción de proteínas y crecimiento celular (Laplante y cols., 2012).

La fosfatidilcolina es también sustrato de la fosfolipasa C dependiente de PC (PC-PLC - *PhosphatidylCholine-dependent PhosphoLipase C*) cuya actividad catalítica sobre PC genera los segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) y fosfocolina (P-chol) (figura 61). Los mismos, están implicados en la activación de kinasas que inducen migración y proliferación celular como las MAPKs (Plo y cols., 2000; van Dijk y cols., 1997).



**Figura 61:** Metabolismo de la Fosfatidilcolina por las enzimas PLD y PC-PLC e implicancia de los segundos mensajeros generados en señalización intracelular. La alteración de la actividad de las fosfolipasas puede afectar la proliferación y diferenciación en células de cáncer de mama. Las flechas negras indican reacciones químicas, las azules indican translocación y las verdes estimulación. Imagen tomada y adaptada de Abalsamo L. y cols., 2012.

En este contexto se estudiaron los efectos de ambas formulaciones de NPCs, sobre la activación de las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y Ras/Raf/MEK/ERK, tras 24 hs de incubación con las nanopartículas. Los resultados evidenciaron que la interacción de las nanopartículas de fosfatidilcolina con la línea celular MCF-7, no provoca la inducción de la vía PI3K/AKT/mTOR. Sin embargo, se observó un aumento significativo en los niveles de fosforilación de las proteínas MEK 1/2 y ERK 1/2, de manera dependiente de la concentración, cuando el tratamiento se realizó con las NPCs preparadas a pH 7. Mientras que con las nanopartículas preparadas a pH 5 no se obtuvieron diferencias significativas en el grado de fosforilación de dichas kinasas, en ninguna de las condiciones evaluadas. La activación de la vía de señalización mediada por MEK 1/2 y ERK 1/2 correlacionó con la inducción de la proliferación celular, promovida por las NPCs preparadas en buffer neutro (0,1 % p/v).

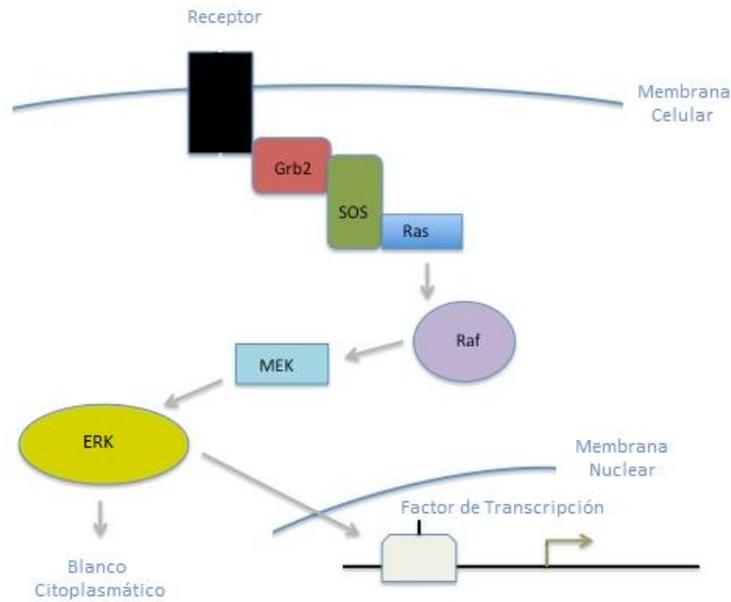
Podría pensarse entonces que estos efectos son consecuencia del metabolismo de la fosfatidilcolina, proveniente de las nanopartículas, por las fosfolipasas (PLD y PC-PLC). Esto implicaría que las características fisicoquímicas de las NPCs preparadas en buffer pH 7, favorecerían su captación preferencial, aumentando la disponibilidad de PC. En consecuencia se induciría la generación de segundos mensajeros que resultarían en la activación de ERK 1/2, y en la inducción de proliferación celular.

Varios estudios han comprobado la correlación entre propiedades de las nanopartículas como

tamaño, carga superficial y morfología con su cinética y eficiencia de captación celular (Oh y cols., 2014). Los estudios de Lunov y colaboradores demostraron que nanopartículas poliméricas con carga negativa y un diámetro de aproximadamente 100 nm, fueron más eficientemente fagocitadas por macrófagos que nanopartículas con carga positiva (Lunov y cols., 2011). Además, reportes más recientes evidenciaron el efecto de la morfología sobre la captación de nanopartículas. En este sentido se observó que partículas con forma de bastón exhiben mayor internalización que partículas esféricas (Bartneck y cols., 2010; Oh y cols., 2014), aunque este efecto dependería del tipo celular.

Dado que las NPCs preparadas en pH 7 presentaron carga negativa y forma más alargada, los antecedentes mencionados apoyarían la hipótesis planteada previamente sobre la captación preferencial de estas partículas, frente a las NPCs esféricas que resultan de la dispersión en buffer pH 5.

La activación de la vía de señalización de MEK  $1/2$  y ERK  $1/2$  podría ser activada por otros mecanismos distintos al de inducción por los segundos mensajeros derivados de la metabolización de la fosfatidilcolina. Las cascadas de proteínas kinasas activadas por mitógenos, entre las que se encuentran las proteínas MEK  $1/2$  y ERK  $1/2$ , son activadas frente a un amplio rango de estímulos (Roux y cols., 2004). La vía se inicia con la unión extracelular de factores de crecimiento, u hormonas, a sus receptores de membrana correspondientes. Entre estos receptores se pueden encontrar los de tipo tirosina kinasa y receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (Marshall, 1994). La activación del receptor provoca la activación de Ras, que interacciona con la proteína Raf atrayéndola hacia la membrana, e induciendo indirectamente su fosforilación y en consecuencia su activación (Jimenez, 2002). En condiciones basales, ERK se encuentra unida a MEK formando un complejo restringido al citoplasma. Al inducirse la vía, MEK es fosforilada por Raf activa, provocando la disociación del complejo y la fosforilación de ERK (Alessi y cols., 1994). En consecuencia, ERK fosforila y activa tanto blancos citosólicos como nucleares, mediando así la regulación de distintos eventos celulares (Steelman y cols., 2004) (figura 63). La interacción de las NPCs con la membrana plasmática, directa o indirectamente, podría provocar la activación de un receptor de membrana, el cual desencadenaría cascadas de señalización que deriven en la fosforilación de MEK y ERK. De hecho, se ha descrito la activación de proteínas miembros de la vía de señalización de las MAP Kinasas, como ERK  $1/2$ , JNK y p38 por otros sistemas nanoparticulados (Eom y cols., 2010; Manna y cols., 2012).



**Figura 63:** Esquema de la vía de señalización de Ras/Raf/MEK/ERK. Se muestran las principales proteínas involucradas en esta vía.

### V.1.3 Estudio del efecto de las NPCs sobre la localización intracelular y contenido proteico de un receptor de membrana

Los sistemas nanoparticulados interactúan diferencialmente con la membrana celular, dependiendo de su composición y características fisicoquímicas y superficiales; esto puede resultar en la inducción de distintos mecanismos de endocitosis de las nanopartículas, una eficiencia de internalización diferencial y en la inducción de la actividad de receptores de membrana (Oh y cols., 2014).

Se ha reportado que la regulación de la actividad de las proteínas de membrana puede ser dependiente de la composición lipídica, cuali y cuantitativa, de la membrana plasmática, y en particular se cree que los microdominios lipídicos conocidos como *lipid rafts* podrían estar implicados en este fenómeno (Simons y cols., 2011). Aunque los primeros reportes de estos dominios los describen como meramente estructurales (Simons y cols., 1997), actualmente se sabe que están implicados en diversas funciones celulares como señalización intracelular, adhesión, remodelación del citoesqueleto, entre otras (Pike, 2009). Hoy en día se reconoce que varios receptores de tipo tirosina kinasa son susceptibles a regulación por parte del microambiente lipídico que los rodea; entre ellos se pueden encontrar al FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*), Trk A (*Tropomyosin receptor kinase A*), PDGFR (*Platelet-derived Growth Factor Receptor*), IR (*Insulin Receptor*), EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), entre otros

(Coskun y cols., 2011). Particularmente, se ha descrito que las nanopartículas pueden activar receptores de membrana como por ejemplo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Unfried y cols., 2008).

Por su parte, el ácido fosfatídico y el diacilglicerol generados como resultado de las acciones de la PLD y la PC-PLC sobre la fosfatidilcolina, respectivamente, pueden actuar sobre el tráfico intracelular de proteínas, y por ende, modificar la duración de la señal de receptores de membrana (Donaldson, 2009).

Considerando los posibles efectos de la fosfatidilcolina por sí misma, y de los sistemas nanoparticulados sobre la dinámica de la membrana celular y la activación de receptores de membrana, se evaluaron los efectos de las nanopartículas de fosfatidilcolina sobre la expresión y localización celular del EGFR. Este receptor ha sido propuesto como modelo para evaluar la interacción de nanopartículas con receptores de membrana (Kathawala y cols., 2015). Como se detalla en la sección de resultados, la interacción de las NPCs con las células de epitelio mamario MCF-7 tuvo diferentes efectos sobre la expresión del EGFR, según el buffer utilizado al momento de la obtención de las partículas. Se observó que el tratamiento de las células con las nanopartículas preparadas en buffer fosfato pH 7 a una concentración final de 0,1 % (p/v), provocó el aumento del contenido proteico del receptor, así como también la alteración de su localización intracelular, limitándose a la zona nuclear y perinuclear. En ese sentido, se describió recientemente un proceso dependiente de la estimulación sostenida de las actividades de cPCK y PLD que conduce al secuestro del EGFR cerca de la región perinuclear (Idkowiak-Baldys y cols., 2009).

En las condiciones en las cuales se observaron los efectos sobre el EGFR, también se demostró el aumento de la viabilidad y proliferación celular, consecuente con el mayor grado de fosforilación de MEK 1/2 y ERK 1/2. Por lo tanto, podría pensarse que las características fisicoquímicas de las nanopartículas preparadas en buffer fosfato pH 7, estarían afectando la regulación del EGFR, y por ende la activación mediada por este receptor de la vía de señalización MEK/ERK.

Está reportado que la membrana celular juega un papel muy importante en la correcta activación del EGFR luego de la unión de su ligando específico, pero que también lo hace en el mecanismo de auto-inhibición del receptor. El grupo de McLaughlin propuso el modelo electrostático de activación/inhibición del EGFR (McLaughlin y cols., 2005), en el cual postulan que la perturbación de interacciones electrostáticas entre el receptor y la membrana provoca la liberación de una porción del EGFR, lo que a su vez permite la activación del receptor (Arkhipov y cols., 2013). En el mismo sentido, el grupo de Coskun y colaboradores, demostraron que el microambiente lipídico no afecta la capacidad de unión del EGF, sino que específicamente afecta y modifica la actividad tirosina kinasa del receptor (Coskun y cols., 2011). Las nanopartículas, además de interactuar con la membrana lipídica, y consecuentemente interferir con el tráfico y activación del EGFR, podrían también ejercer efectos

directamente sobre la actividad del mismo. Se reportó que la dimerización del receptor independiente de ligando ocurre con relativa frecuencia; sin embargo, no es activado hasta que no se une el ligando. Un mecanismo auto-inhibitorio que involucra la cola C-terminal del receptor podría explicar la ausencia de actividad del dímero (McLaughlin y cols., 2005). En nuestro caso, la interacción de las mencionadas NPCs con los dímeros inactivos del EGFR, podría ser propuesto como un posible mecanismo que deshabilita tal inhibición, y conduce a la activación del receptor aún en ausencia de ligando específico. Más aún, la activación del dímero involucra la reorganización de las regiones hidrofóbicas del EGFR, por lo que estas nanopartículas podrían favorecer dicha organización facilitando la transición a la conformación activa.

Por otro lado, esta misma línea de pensamiento no permite limitar la discusión sólo al EGFR. Se podría suponer que otro receptor de membrana (u otros), que no hemos estudiado, se vea también alterado de alguna forma por las nanopartículas de PC preparadas en buffer pH 7 y a una concentración de 0,1 % (p/v), resultando en los efectos mencionados.

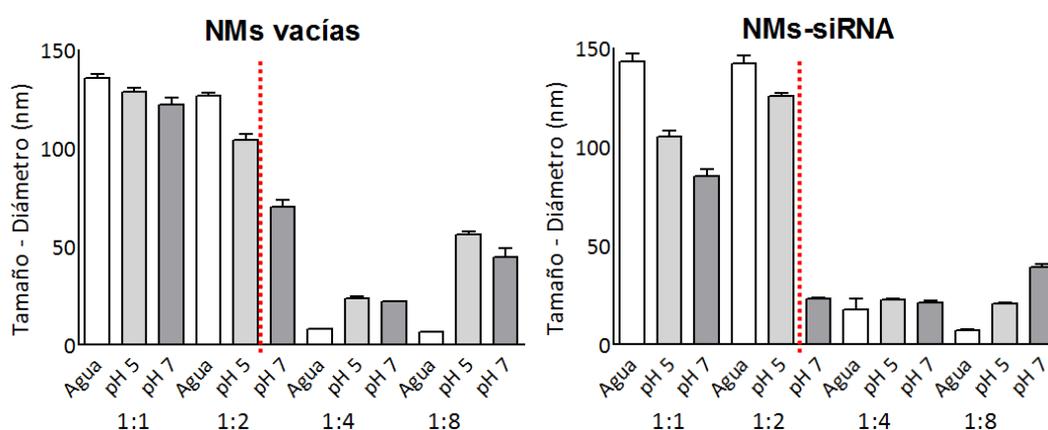
En síntesis, el aumento en los niveles de pMEK y pERK a partir de la incubación de las nanopartículas de fosfatidilcolina (pH 7 a 0,1 % p/v), correlacionó con un aumento significativo en la viabilidad celular, dado por un aumento en la proliferación. Asimismo, la inducción de la vía de señalización MEK/ERK y la inducción de proliferación celular, se asoció a un aumento de la expresión y localización aberrante del EGFR cuando las células MCF-7 fueron tratadas con las NPCs preparadas en buffer neutro (0,1 % p/v). Si bien estos efectos son dependientes de la concentración final a la que se evalúen, los resultados obtenidos indicarían que las nanopartículas de fosfatidilcolina preparadas en buffer fosfato pH 7, no serían las adecuadas para la vehiculización de agentes terapéuticos a células tumorales.

A pesar de los estudios realizados usando nanocarriers basados en lípidos para vehiculización de fármacos y material genético, la relación entre sus propiedades fisicoquímicas y la activación de los receptores de membrana permanece como un área del conocimiento en incipiente desarrollo.

## V.2 Sección II: Nanopartículas Mixtas basadas en FosfatidilColina y colato de sodio - NMs

### V.2.1 Caracterización y evaluación *in vitro* de las NMs como vehículos de siRNA

Como se mencionó previamente, es importante estudiar las características físico-químicas, como tamaño, carga y morfología, de los sistemas nanoparticulados con el objeto de poder correlacionar dichos parámetros, con su eficiencia como vehículos de agentes terapéuticos y sus acciones biológicas. Con este propósito, las Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio fueron estudiadas mediante microscopia electrónica y dispersión dinámica de luz (DSL). Por microscopia, se evidenciaron partículas esféricas en el rango nanométrico cuyo tamaño disminuye a medida que aumenta la proporción de colato de sodio. Más específicamente, los ensayos mediante DSL evidenciaron partículas con diámetros de entre 70 y 135 nm para las relaciones PC:SC de 1:1 y 1:2, y de entre 7 y 60 nm para las formulaciones 1:4 y 1:8. Al evaluar los sistemas incubados con el siRNA se pudo observar un patrón similar, quedando en evidencia 2 poblaciones de tamaños dependiendo de la relación PC:SC (figura 64).

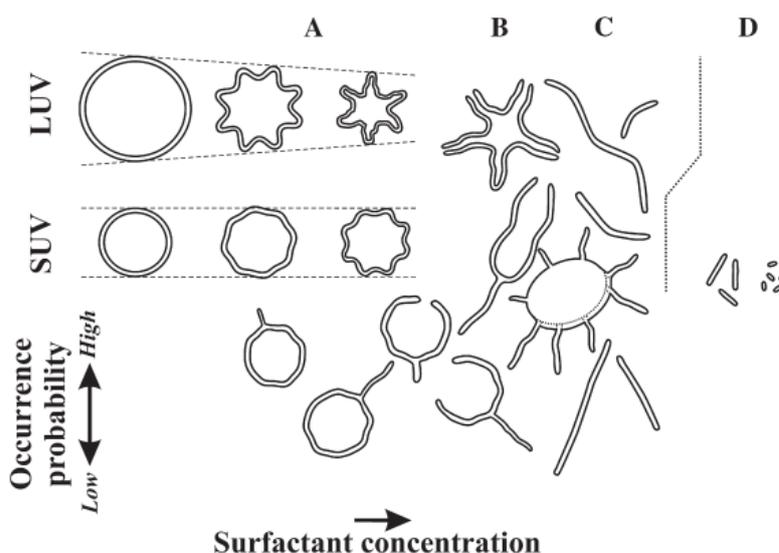


**Figura 64:** Tamaños de partículas de NMs y complejos NMs-siRNA medidos por DLS. Se muestran los valores de diámetro (nm) obtenidos para las Nanopartículas Mixtas vacías y cargadas con siRNA (N/P = 2000). La línea punteada señala las dos poblaciones de tamaños identificadas.

La incubación de las Nanopartículas Mixtas con el siRNA, provocó la formación de complejos con tamaños similares a los obtenidos para las partículas vacías, con las excepciones de las formulaciones con relación 1:8 a pH 5, y las 1:1 y 1:2 de pH 7,4. Es de destacar, también, que las distribuciones de tamaño medio fueron obtenidas con bajo índice de dispersión, hecho que avala la presencia de poblaciones homogéneas de nanopartículas; esto fue observado especialmente con las formulaciones de pH 5, siendo

las preparadas en agua las más heterogéneas.

Los resultados relativos al tamaño de las NMs concuerdan con evidencias previas que demostraron que el tamaño y la estructura de los agregados resultantes de la mezcla de fosfolípidos con sales biliares, depende de la relación entre ambos componentes (Muller, 1981). En 1991 se utilizó la técnica de dispersión dinámica de luz para, de forma indirecta, monitorear los cambios estructurales de vesículas de fosfatidilcolina, al ir agregando colato de sodio (Walter y cols., 1991). En este trabajo se llegó a la conclusión de que al dispersar PC en soluciones acuosas, ésta forma estructuras de tipo bicapa compatibles con vesículas; y que el agregado de la sal biliar provoca la transición a estructuras más pequeñas y uniformes, consistentes con una morfología micelar (figura 65 (Elsayed y cols., 2011)), que se evidencia además por la disminución en la turbidez de la solución. Estos resultados fueron también corroborados por el grupo de Chen y colaboradores (Chen y cols., 2008). Más aún, se demostró que una bicapa fosfolipídica puede ser desintegrada debido a la adición de altas concentraciones de sales biliares (a relaciones fosfatidilcolina: sal biliar  $\geq 4$ ), formándose micelas mixtas (Venneman y cols., 2002).

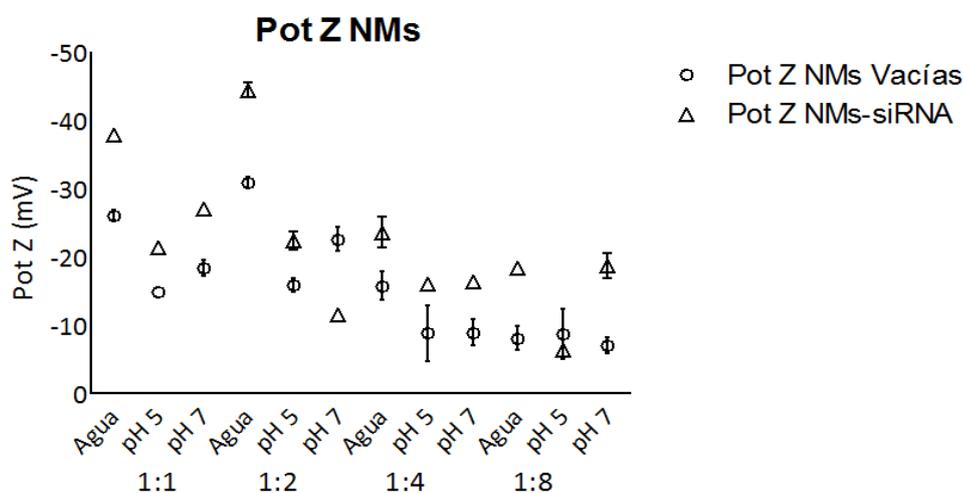


**Figura 65:** Transición vesícula-micela en mezclas de fosfolípidos y colato de sodio. Se esquematiza la transformación de estructuras vesiculares a micelares, dada por el agregado de colato de sodio. Imagen tomada de Elsaed y cols., 2011.

Cabe destacar que las diferencias macroscópicas entre las formulaciones de las Nanopartículas Mixtas (figura 39) también concuerdan con estas evidencias. Podría proponerse entonces que, a bajas proporciones de colato de sodio se obtuvieron pequeñas vesículas unilamelares, mientras que al aumentar la sal biliar se propició la formación de micelas mixtas. Ello concuerda con las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de las NMs PC:SC 1:1 y 1:8.

En lo que respecta a las determinaciones de potencial Z, los resultados para las NMs vacías arrojaron valores negativos en todos los casos, en particular de entre -7 y -31 mV. A diferencia de lo observado para las determinaciones de tamaño, en este caso sólo se apreció una moderada disminución en el valor absoluto negativo del potencial Z de las partículas resultantes al aumentar la proporción de la sal biliar. Este fenómeno se observa a pesar de que con el aumento de la proporción de colato de sodio, aumenta la proporción de entidades químicas con carga negativa. Ello podría justificarse en virtud de los cambios de tamaño y organización estructural descriptos. La mayor proporción de colato en la formulación genera partículas más pequeñas que podrían promover, a su vez, mayor exposición de los grupos colina al medio circundante, lo cual redundaría en partículas con carga negativa absoluta menor.

La formación de los complejos NMs-siRNA arrojó mediciones aún más negativas (figura 66), con excepción de dos de las formulaciones (1:8 buffer acetato pH 5 y 1:2 buffer fosfato pH 7,4), lo cual podría estar indicando que el oligonucleótido se encuentra, al menos en parte, en la superficie de las partículas (Omedes Pujol y cols., 2013). También es interesante remarcar el hecho de que todos los valores absolutos de potencial Z fueron superiores a 15 mV, lo cual concuerda con una aceptable estabilidad de los sistemas debido a las fuerzas repulsivas dominantes.



**Figura 66:** Valores de potencial Z de partículas de NMs y complejos NMs-siRNA. Se muestran los valores de potencial Z (mV) obtenidos para las Nanopartículas Mixtas vacías y cargadas con siRNA (N/P = 2000).

Si bien los valores de potencial Z obtenidos fueron negativos para todas las formulaciones, los ensayos de EMSA demostraron la capacidad de las Nanopartículas Mixtas de unir oligonucleótidos. Este fenómeno ya ha sido descrito para el caso de los nanoliposomas basados en lípidos aniónicos o zwitteriónicos propuestos como vectores de liberación de siRNA, potencialmente más seguros que los

basados en lípidos catiónicos (Kapoor y cols., 2012). El entrapamiento de siRNA y la eficiencia de liberación con estos lípidos por sí mismos es, sin embargo, debatible debido a la ausencia de interacciones electrostáticas que mejoren el acomplejamiento con el siRNA. Así se ha propuesto el agregado de calcio (Patil y cols., 2005) y de poli L-lisina (Lee y cols., 1996) para formar los complejos, consiguiéndose en ambos casos alta eficiencia biológica. Los intentos de preparar liposomas aniónicos conteniendo siRNA sin utilizar un agente adicional, mostraron pobre eficiencia de encapsulación (7-9 %), excepto en el caso de Halder y colaboradores, quienes prepararon nanoliposomas neutros con DOPC, que dieron eficiente silenciamiento para el gen de la quinasa de adhesión focal en un modelo de tumor de ovario en ratones (Halder y cols., 2006). Además es importante recordar que aunque las NPCs preparadas en buffer fosfato pH 7 evidenciaron valores de potencial Z negativos, también presentaron capacidad de unión de siRNA.

En particular, las NMs PC:SC 1:1 evidenciarían una baja capacidad de unir siRNA mientras que las formulaciones 1:2, 1:4 y 1:8 mostraron una clara capacidad de complejación de siRNA. La migración de los complejos formados entre dichas formulaciones y el siRNA dependería de la relación de colato de sodio empleada. A mayor proporción de la sal biliar, mayor la migración de los complejos, evidenciándose el menor tamaño de los mismos (figura 42). Asimismo, se observaron efectos sobre el tamaño para una misma relación PC:SC, dependiendo del diluyente utilizado en la preparación de las partículas. En las formulaciones 1:1 y 1:2 preparadas en agua y buffer acetato pH 5, y en las 1:1 buffer fosfato pH 7,4, predominarían nanovesículas mixtas de PC y SC, dándose una transición paulatina hacia estructuras micelares más pequeñas en las formulaciones con mayor cantidad de colato de sodio. Este menor tamaño de los sistemas y la morfología que adoptan se podría asociar a una mayor exposición de la cabeza polar de la colina y relación carga/superficie relativa, lo que permitiría mejor y mayor incorporación del siRNA. Cabe destacar que, si bien el pKa del colato de sodio es de 4,80 (37°C, fuerza iónica de 150 mM) para una solución acuosa, se ha descrito que éste cambia a un valor de 6,91 cuando el colato es unido a bicapas de PC (Elsayed y cols., 2011). Es probable, entonces, que este aumento en el pKa del SC sea un fenómeno que ocurre en la preparación de las NMs; dicho aumento dependerá de la proporción de PC, y del medio dispersante en cada formulación. Por lo tanto, dentro de una misma relación PC:SC, a pH 5, la sal biliar en el contexto de la partícula, presentaría una carga tal que favorecería la capacidad de unión de siRNA.

Por otro lado, la evaluación realizada con el DNA plasmídico arrojó resultados opuestos, siendo mejor la capacidad de unión del oligonucleótido para las partículas con relación 1:1. El hecho de que éstas preparaciones resultaran eficientes para la unión de pDNA pero no de siRNA, podría estar indicando que la carga de la partícula no sería tan determinante en la unión de los oligonucleótidos, como lo sería la estructura de las mismas.

Muy probablemente sea, entonces, la organización estructural resultante, junto con la carga superficial expuesta, dos variables de notable incidencia en la capacidad de unión de la estructura

nucleótida a vehicular.

La citotoxicidad que presentan muchos de los sistemas propuestos en literatura para la vehiculización de drogas, determina o limita su aplicación terapéutica. Para el caso de las NMs, la evaluación de estas formulaciones demostró, en primer término, un efecto sobre la viabilidad celular, dependiente de la concentración final de las partículas en el medio de cultivo. En particular, comparando los resultados obtenidos dentro de una misma relación PC:SC, se puede ver que en todos los casos las nanopartículas obtenidas por dispersión en buffer acetato pH 5 fueron las menos tóxicas. Si bien todos los valores de potencial Z obtenidos resultaron negativos, las NMs pH 5 presentaron los de menor valor absoluto. En cambio, no se puede observar una relación clara entre estas formulaciones y sus tamaños. De este modo, de las características físico-químicas estudiadas, la carga superficial de las NMs sería la que principalmente se asocia con su citotoxicidad, para una misma relación PC:SC.

Por otro lado, se observó que la citotoxicidad aumenta a medida que lo hace la proporción de colato de sodio, siendo las 1:8 las más tóxicas. Este efecto podría estar asociado, tanto al aumento de la concentración de la sal biliar, como a la disminución de la concentración final de fosfatidilcolina. A modo de ejemplo, las partículas con relación 1:1 contienen 1,29 % de PC y 0,71 % de SC, mientras que las 1:8 poseen 0,39 % de PC y 1,61 % de SC; por lo tanto, las diferencias observadas podrían deberse a un efecto tóxico del colato de sodio *per se* y a la disminución de la fosfatidilcolina, ya que los fosfolípidos pueden atenuar los efectos tóxicos dados por las sales biliares (Tan y cols., 2013). En condiciones fisiológicas las sales biliares son esencialmente biosurfactantes aniónicos, capaces de promover actividad membranalítica (Garidel y cols., 2007), lo que estaría en concordancia con la mayor citotoxicidad demostrada por las formulaciones con relación PC:SC 1:8.

Al mismo tiempo, dada la correlación observada entre el aumento del colato de sodio y la reducción del tamaño de las NMs, se podría suponer que los efectos citotóxicos estarían asociados a este parámetro. En este sentido es importante tener en cuenta que las moléculas más pequeñas tienen una relación superficie/volumen mayor, lo cual podría convertirlas en más reactivas y por lo tanto más disruptivas para la homeostasis celular (Nel y cols., 2009).

Finalmente, no debe descartarse una combinación de estos factores relativos a la composición y características físico-químicas de las nanopartículas, como determinantes de su citotoxicidad (Rauch y cols., 2013).

Considerando la capacidad de unión de siRNA y la citotoxicidad de las Nanopartículas Mixtas se diseñaron los ensayos de captación intracelular y de silenciamiento de un gen blanco, para las formulaciones con relación PC:SC intermedias (1:2 y 1:4).

Por microscopía de fluorescencia se corroboró, a las 18 hs posteriores a la transfección, la presencia de siRNA en el interior celular mediada por los vehículos ensayados. Como ya se mencionó, es común la degradación del siRNA en la vía de internalización endo-lisosomal, por lo que demostrar la presencia del oligonucleótido en la célula no resulta suficiente. Por esta razón, se evaluó la capacidad de mediar el silenciamiento del gen de actina. Al realizar la evaluación del contenido proteico de esta proteína por marcación con faloidina, no se observó una disminución al emplear las NMs 1:2 preparadas en los buffers pH 5 y 7, y para las formulaciones 1:4 dispersadas en agua y buffer acetato pH 5. En cambio, mediante ensayos de *Western Blotting*, sólo se evidenció un descenso en los niveles de actina al transfectar el siRNA con las NMs 1:4 pH 5.

Esta inconsistencia en los resultados obtenidos en estos dos ensayos podría deberse a diferencias de sensibilidad y especificidad de ambas metodologías. La actina está presente en la célula en dos estados posibles, monomérica o globular (conocida como actina G) y polimérica o filamentosa (también llamada actina F). La faloidina es una toxina de origen fúngico que se une a la actina F, formando un complejo altamente estable. La marcación con faloidina unida a un fluoróforo para evaluar el contenido proteico de actina ya ha sido empleada anteriormente (Rivera y cols., 2011); y se ha descartado la posible disminución en la afinidad de unión de la toxina debido a la unión del fluoróforo. Por otro lado, el anticuerpo utilizado para la detección de la actina en los *Western Blots* reconoce ambas formas de la actina, es decir la totalidad de la proteína. Este hecho, sumado a las diferencias en la sensibilidad de los métodos podría explicar las diferencias observadas.

Finalmente, al evaluar la posibilidad de emplear estas formulaciones como vehículos de DNA plasmídico, se encontró que las formulaciones con relación PC:SC 1:1 preparadas en agua y buffer acetato pH 5, resultaron eficientes en la internalización celular del oligonucleótido y en la expresión de la proteína fluorescente (YFP), ya que ésta fue detectada por Microscopía de Fluorescencia. Por lo tanto estos resultados ameritarían un estudio más exhaustivo con el fin de evaluar la capacidad de estos sistemas de silenciar un gen blanco mediante la transfección de shRNAs.

## **V.2.2 Estudio de los efectos biológicos de las NMs sobre la línea celular MCF-7**

Las Nanopartículas Mixtas constituyen un sistema ampliamente utilizado en tecnología farmacéutica para distintas aplicaciones, como por ejemplo la solubilización de sustancias hidrofóbicas o encapsulación de compuestos hidrofílicos, aunque hasta el momento no habían sido propuestos como

vehículos de oligonucleótidos.

Si bien el sistema de NMs propuesto está compuesto por excipientes farmacéuticamente aceptables y biodegradables, la combinación de éstos en la formulación de nanopartículas puede generar propiedades o características nuevas, que a su vez podrían resultar en efectos no deseados (Palombo y cols., 2014). Es por esto que estudiamos los efectos de las Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio, sobre la activación de vías de señalización intracelular y sobre viabilidad celular.

En este trabajo de tesis se evidenció que la interacción de las Nanopartículas Mixtas con las células MCF-7, puede provocar diferentes grados de activación de las cascadas de señalización de PI3K/AKT y de Raf/Ras/ERK. Esta activación depende tanto de la relación PC:SC como del diluyente empleado en cada caso. Se observó un mayor grado de fosforilación de las proteínas AKT y ERK 1/2 tras la incubación con las formulaciones 1:4 y 1:8, y mayor aún si estas fueron preparadas en agua y en buffer fosfato pH 7,4. Es importante recordar que estas partículas son las que menor tamaño presentaron, y a su vez, mostraron un valor de potencial z menos negativo con respecto mostraron menor carga superficial con respecto a las formulaciones 1:1 y 1:2.

Sin embargo, al evaluar el efecto de las NMs sobre la viabilidad celular, se observan discrepancias con respecto a los resultados relativos a señalización intracelular. Durante este trabajo se ha mencionado en varias oportunidades que la activación de las vías de PI3K/AKT y de Raf/Ras/ERK están relacionadas a viabilidad y proliferación celular, pero al comparar los resultados mostrados en las figuras 55 y 56, se ve que el aumento en el grado de fosforilación de AKT y/o ERK no correlaciona con un aumento en la viabilidad. En particular, se observó que las preparaciones de Nanopartículas Mixtas dispersadas en agua, independientemente de su relación PC:SC, no tienen efecto alguno sobre la viabilidad celular; mientras que las partículas PC:SC 1:8 preparadas en agua evidenciaron una marcada inducción de la fosforilación de AKT y ERK. Otros resultados llamativos son los obtenidos por el tratamiento de las células con las preparaciones PC:SC 1:1 y 1:2 dispersadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7,4. En este caso no se observa diferencia en el grado de fosforilación de las kinasas mencionadas, pero sí se ven diferencias significativas en la viabilidad celular respecto al basal; este efecto puede ser la disminución en la viabilidad celular para el caso de las NMs 1:2 pH 7,4 o de proliferación para las tres formulaciones restantes.

Estas discrepancias podrían deberse a factores distintos e incluso a una combinación de ellos. Como se discutió en la sección correspondiente a las nanopartículas de fosfatidilcolina, podría ser que las características físico-químicas propias de cada partícula, dadas según sus proporciones de PC y colato de sodio y el diluyente utilizado en su preparación, determinen la interacción con la célula y por ende el tipo de respuesta y efecto biológico final.

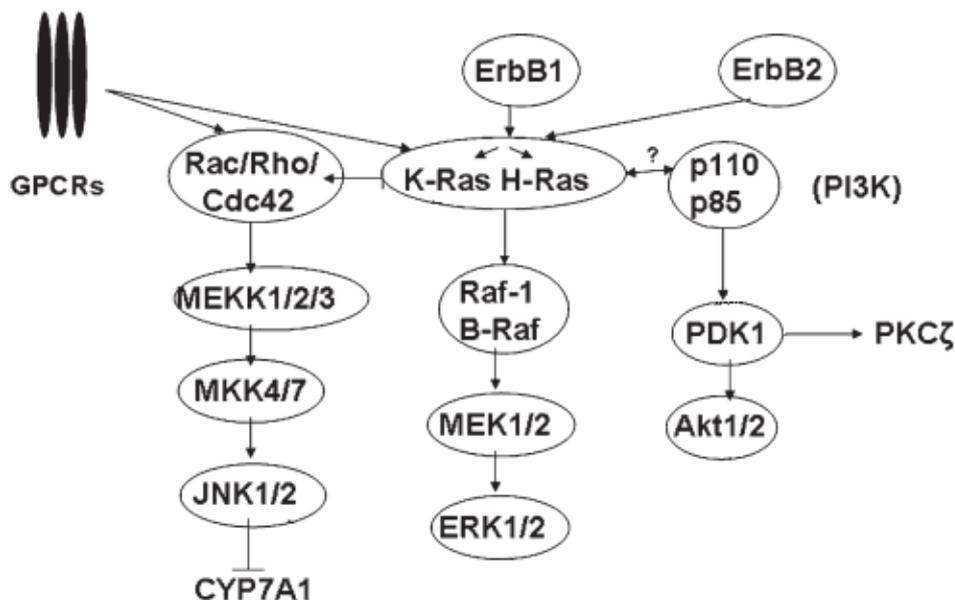
Sin embargo, parte de los efectos podrían entenderse teniendo en cuenta que al variar la

relación de PC:SC, se modifican también las concentraciones finales tanto de la fosfatidilcolina como del colato de sodio. Entonces, las partículas preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7,4 tendrían efectos proliferativos cuando la concentración de fosfatidilcolina es más elevada, y citotóxicos al disminuir esta y/o aumentar la de la sal biliar, en concordancia con los resultados obtenidos por el grupo de Tan y cols., 2013 (Tan y cols., 2013).

Para ahondar en este sentido, y considerando que los mayores efectos de activación de AKT y ERK se observaron con las mayores concentraciones de colato de sodio, se analizaron los efectos de la sal biliar por sí misma.

En los últimos años se ha demostrado que las sales biliares actúan como moléculas reguladoras y que su función es similar a las de una hormona, pudiendo activar receptores específicos y cascadas de transducción de señales a concentraciones fisiológicas (Studer y cols., 2012). El concepto de los ácidos biliares como hormonas surge en 1999 cuando varios grupos reportan éstos ácidos como ligandos del receptor farnesoide x (FXR - Farnesoid X Receptor) (Makishima y cols., 1999; Parks y cols., 1999). Seguido de este descubrimiento, se demuestra que la expresión de varios genes con elementos FXR en su región promotora, es inducida por ácidos biliares. Además, se ha evidenciado la participación de los ácidos biliares en vías de señalización intracelular (figura 67) (Hylemon y cols., 2009); éstos son capaces de activar diferentes isoformas de la proteína kinasa C (PKC) en hepatocitos y células del colón (Craven y cols., 1987; Pongracz y cols., 1995). También se reportó la activación de la proteína kinasa N-terminal de c-jun (JNK - c-Jun N-terminal Kinase) 1/2 por estos compuestos en hepatocitos primarios (Gupta y cols., 2001). Asimismo, se describió su capacidad de transactivar el EGFR en hepatocitos (Qiao y cols., 2001; Rao y cols., 2002) y en otras líneas de epitelio gastrointestinal (Werneburg y cols., 2003; Yoon y cols., 2002). También hay evidencias de la activación, mediada por proteína G, de las vías de señalización de AKT y ERK 1/2 (Dent y cols., 2005).

Es por ello que resultó interesante estudiar los efectos del colato de sodio *per se* sobre la inducción de las vías de AKT y ERK 1/2 y la viabilidad celular.



**Figura 67:** Esquema simplificado de posibles vías de señalización activadas por ácidos biliares. Los ácidos biliares podrían activar receptores de membrana, ya sea receptores acoplados a proteína G o con actividad tirosina kinasa intrínseca, activando así las vías de Ras/Raf/MEK/ERK y/o de PI3K/AKT. Erb 1 y 2: Receptores de factores de crecimiento; Ras: abreviatura de Rat Sarcoma; proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina; Raf: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; proteína río arriba de MEK; MEK: Kinasa de ERK; NFκB: factor nuclear κ B; ERK: kinasas reguladas por señales. Imagen tomada de Hylemon PB. y cols., 2009.

Al incubar las células MCF-7 con concentraciones crecientes de colato de sodio, se vio que efectivamente aumenta el grado de fosforilación de AKT y ERK para las concentraciones más altas evaluadas. Además, se vio que el efecto sobre la viabilidad celular depende de la concentración de la sal biliar; se observa que a las concentraciones más bajas evaluadas el SC aumenta la viabilidad celular, pero a una concentración alta se produce el efecto contrario. Estos resultados podrían explicar las diferencias en los efectos sobre viabilidad celular dados por las Nanopartículas Mixtas preparadas en los buffers acetato pH 5 y fosfato pH 7,4; de todas maneras podría plantearse la existencia de algún otro factor involucrado, ya que para las partículas con relación 1:2 el efecto final sobre viabilidad depende del buffer utilizado en su preparación.

Los máximos niveles de fosforilación de AKT y ERK 1/2 correlacionaron con la inducción de citotoxicidad. Dada la actividad membranolítica del colato de sodio mencionada anteriormente, puede pensarse que este efecto estaría dado por la toxicidad propia de la sal biliar; en este sentido, la activación de las kinasas inducirían proliferación, hasta que el colato alcanza una concentración umbral que desencadena la disminución en la viabilidad celular, enmascarando el efecto proliferativo de dichas kinasas.

Por otro lado, habría que considerar que la magnitud y el tiempo durante el cual se mantiene la activación de ciertos mediadores celulares, como es el caso de ERK 1/2 y AKT, puede condicionar el resultado del estímulo (Nikolakopoulou y cols., 2013). Aunque la activación de AKT y ERK ha sido tradicionalmente vinculada a supervivencia y proliferación celular, varios estudios recientes han reportado que la activación sostenida de ERK 1/2 podría causar arresto del ciclo celular y/o apoptosis; por lo que el efecto final de la activación de esta proteína no sería siempre el mismo, sino que dependería del tipo, la fuerza y/o duración del estímulo (Nikolakopoulou y cols., 2013). Asimismo, la implicancia de la fosforilación de AKT en la disminución de la viabilidad celular ya ha sido reportada. Se sabe que también la activación sostenida de AKT puede provocar el arresto del ciclo celular, entre las fases G2-M en la línea celular MCF-7 (Maddika y cols., 2008), controlar la progresión del ciclo celular afectando la actividad de ciclina-D, c-Myc y GSK3b (Liang y cols., 2003) e inducir apoptosis (Chen y cols., 2014).

Con el fin de evaluar si la fosforilación de ERK 1/2 y AKT detectada a las 24 hs, corresponde a una inducción sostenida de las quinasas por el colato de sodio en altas concentraciones, se realizaron ensayos de *Western Blotting* tras la incubación de las células MCF-7 con colato de sodio durante diferentes tiempos. Estos resultados mostraron que si bien la cinética de activación de ambas quinasas es ligeramente distinta, para ambas se ve un aumento del grado de fosforilación a medida que aumenta el tiempo de incubación (figura 59).

Particularmente, se evidenció un aumento en la fosforilación de ERK 1/2, por la incubación con colato de sodio 2 mM, en dos fases. Se observó un rápido aumento de los niveles de pERK a los 15 minutos, que luego desciende prácticamente a niveles basales a los 30 minutos, para luego ir aumentando gradualmente hasta las 24 hs. Esta activación bifásica de ERK ha sido reportada anteriormente (Murphy y cols., 2002) y podría estar vinculada con la activación de diferentes receptores, o de un mismo receptor que induce una cinética de activación de la quinasa en dos fases (Bonfiglio y cols., 2013).

Las sales biliares actúan como ligandos de ciertos receptores, como el TGR5 (*bile acid-responsive G protein-coupled Receptor*) o el FXR (Scotti y cols., 2007), cuya activación podría ser la responsable de los efectos observados. Por otro lado, se ha reportado que en ciertas condiciones, la inducción de apoptosis dada por la activación sostenida de ERK 1/2, requiere la activación de EGFR (Nikolakopoulou y cols., 2013). Sin embargo, es importante destacar que no evidenciamos diferencias en el contenido proteico de este receptor a las 24 hs (resultados no mostrados), aunque sería interesante realizar el estudio de la fosforilación de EGFR a diferentes tiempos de incubación con el colato de sodio.

La activación sostenida de AKT y ERK dada por el colato de sodio, podría explicar en parte los resultados obtenidos. Sin embargo, debe considerarse que la incubación de las células MCF-7 con las NPCs preparadas en buffer pH 7 (0,1 % p/v) también fueron realizados tras 24 hs de incubación con las nanopartículas, y resultaron en un incremento de la fosforilación de ERK 1/2 que se asoció a proliferación

celular. Es posible, entonces, que la activación sostenida de AKT por el colato de sodio tenga mayor peso para inducir la muerte celular en las células MCF-7 o podrían atribuirse las discrepancias a diferencias en la magnitud de los estímulos respectivos. Sin embargo, las hipótesis propuestas solo implican la correlación de resultados, otros posibles mecanismos podrían justificar la citotoxicidad de altas concentraciones de las sales de colato, y la concomitante activación de ERK 1/2 y AKT.

Dadas las acciones pleiotrópicas de las sales biliares, la expresión de sus receptores específicos en tejidos que no son considerados blancos de las mismas (Scotti y cols., 2007), y su amplio uso en tecnología farmacéutica, sería de gran importancia la comprensión de los mecanismos por los cuales nanopartículas conteniendo colato de sodio median sus efectos biológicos.

# **CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES

### VI.1 Nanopartículas de Fosfatidilcolina - NPCs

En esta parte del trabajo de tesis demostramos:

- La formación de nanopartículas empleando como único componente la fosfatidilcolina.
- La relación entre las características físico-químicas de las partículas y el medio de preparación de las mismas.
- La capacidad de algunas formulaciones de estas nanopartículas de unir siRNA.
- La dependencia de la capacidad de unión del oligonucleótido, tanto con las características de las partículas, como con la relación entre las concentraciones del vehículo y del siRNA.
- La posibilidad de lograr la formación de complejos NPC-siRNA sin el agregado de otros componentes, como por ejemplo lípidos catiónicos.
- La ausencia de citotoxicidad (en el rango de concentraciones utilizadas)
- La capacidad de las formulaciones de Nanopartículas de PC seleccionadas de vehicular un oligonucleótido hasta el interior celular.
- La importancia del estudio de los efectos biológicos de los sistemas de vehiculización propuestos, aún cuando se trate de compuestos considerados biocompatibles.

## VI.2 Nanopartículas Mixtas de FosfatidilColina y Colato de Sodio - NMs

En esta parte del trabajo de tesis demostramos:

- La formación de nanopartículas cuya estructura depende de su composición; obteniéndose morfologías concordantes con vesículas cuando las relaciones de fosfolípido:surfactante son iguales, y con micelas al aumentar la proporción de colato de sodio.
- La capacidad de ciertas formulaciones de estas nanopartículas de unir oligonucleótidos.
- La dependencia de la capacidad de unión del oligonucleótido, tanto con la relación PC:SC, como con la relación entre el vehículo y el oligonucleótido.
- La posibilidad de lograr la formación de complejos NMs-siRNA utilizando un sistema de composición simple.
- La presencia de citotoxicidad dependiente de la dosis y de las características físico-químicas de cada partícula resultante.
- La capacidad de las formulaciones de NMs seleccionadas de vehiculizar oligonucleótidos hasta el interior celular, mediando también la expresión de un gen reportero o el silenciamiento génico post-transcripcional.
- La importancia del estudio de los efectos biológicos de los sistemas de vehiculización propuestos, aún cuando se trate de compuestos considerados biocompatibles.

### VI.3 Conclusiones Generales

Los sistemas nanoparticulados como vehículos de oligonucleótidos se presentan como la clave para la utilización de la tecnología del iRNA con fines terapéuticos.

En este trabajo se propusieron 2 sistemas basados en lecitina, dado que es considerada un compuesto inocuo o biocompatible, y es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica. Las NPCs, están compuestas únicamente por fosfatidilcolina, mientras que las NMs contienen, además, colato de sodio. Ambos son sistemas simples y de fácil preparación, que probaron ser capaces de unir e internalizar oligonucleótidos, sin el agregado de por ejemplo lípidos catiónicos, los cuales resultan altamente tóxicos.

Consideramos importante resaltar que mediante la mera evaluación de estos sistemas preparados en distintos medios dispersantes, se lograron optimizar las condiciones para su uso como vehículo de oligonucleótidos, obteniéndose en ambos casos sistemas funcionales. De este estudio surgieron posibles vinculaciones entre las características físico-químicas de cada partícula y su desempeño. Por lo tanto, con el fin de conseguir una completa optimización de estos sistemas, se denota la importancia de la evaluación exhaustiva de dichas características, con el fin de correlacionar, y a futuro predecir su respuesta.

Idealmente, los vehículos de agentes terapéuticos no deberían tener efectos sobre la célula blanco. Sin embargo, demostramos que aunque se utilicen compuestos considerados como biocompatibles, los sistemas nanoparticulados resultantes pueden provocar efectos no esperados sobre las células. Por esta razón, el estudio de los efectos biológicos es algo que debería ser tenido en cuenta en todo desarrollo biofarmacéutico. Desde el punto de vista del trabajo con partículas en la escala nanométrica, la importancia de estos estudios resulta comprensible ya que, como mencionamos, para todo sistema nanoparticulado surgen propiedades nuevas y no predecibles, con respecto al material que dio su origen. Por otro lado, de la evaluación de los efectos biológicos, y más importante aún, de los mecanismos subyacentes, pueden surgir correlaciones con las características físico-químicas de las nanopartículas. Esto permitiría completar el perfil de acción del sistema nanoparticulado y mejorar las correlaciones entre sus características y su desempeño.



## VII. RESUMEN

### **Estudio de sistemas nanométricos basados en lecitina como vehículos de oligonucleótidos en el tratamiento del cáncer de mama**

El cáncer de mama constituye la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. Su abordaje terapéutico depende de características específicas del tumor como su tamaño, contexto genético, capacidad de expresar la proteína HER2 o receptores de estrógenos y/o progesterona. Los tratamientos actuales presentan distintos efectos adversos y pérdida de eficacia a largo plazo, por lo que se han propuesto estrategias terapéuticas alternativas, entre las que se cuenta el uso de pequeños RNA de interferencia (siRNA - *small interference RNA*)

El mecanismo de RNA de interferencia es un proceso de silenciamiento génico, característico de células eucariotas, que tiene gran importancia en procesos de desarrollo y diferenciación celular, cáncer y defensa frente a virus. Ha sido propuesto para el tratamiento de una amplia variedad de condiciones o patologías, pero el principal obstáculo del uso de esta herramienta como terapia es la vehiculización del siRNA hacia la célula blanco.

El transporte de drogas mediado por nanopartículas es un área actualmente en intenso desarrollo, ya que estos sistemas permiten o mejoran la biodisponibilidad de compuestos pocos solubles, posibilitan la vehiculización dirigida hacia órganos o tejidos específicos, o incluso hacia tumores, con una disminución de los efectos tóxicos.

Dada la versatilidad de los sistemas nanoparticulados para el transporte de anti-neoplásicos, y la necesidad de sistemas con baja toxicidad y biocompatibles para el transporte de los pequeños RNA de interferencia, se planteó como objetivo general del presente trabajo de tesis, estudiar y optimizar el comportamiento de sistemas nanométricos basados en lecitina, para ser utilizados como vectores no virales capaces de vehiculizar oligonucleótidos (siRNA y pDNA) en el tratamiento del cáncer de mama. Los excipientes y las formulaciones propuestas han sido extensamente utilizados en el campo de la Tecnología Farmacéutica, aún para la vía parenteral, y están disponibles comercialmente, lo que demuestra su alta factibilidad de Transferencia Tecnológica con el consecuente eventual acortamiento de los plazos de traslación a ensayos clínicos. Adicionalmente, por su tamaño nanométrico, cuentan como ventaja inicial una capacidad de captación celular mejorada; además de la posibilidad de vectorización pasiva y selectiva hacia células neoplásicas, dada por el efecto EPR (*Enhanced Permeation and Retention*) característico de zonas tumorales.

El primer sistema estudiado consiste en Nanopartículas de Fosfatidilcolina (NPCs), las cuales demostraron no ser tóxicas para la línea celular MCF-7, poseer capacidad de unir siRNA y de internalizarlo

al citoplasma celular, pero no lograron mediar efectivamente la disminución de la expresión postranscripcional de un gen blanco.

El otro *nanocarrier* propuesto, las Nanopartículas Mixtas de fosfatidilcolina y colato de sodio (NMs), es una forma farmacéutica representada por complejos solubles de sales biliares (colato de sodio) y fosfolípidos (fosfatidilcolina) en distintos medios acuosos. Las formulaciones de Nanopartículas Mixtas diseñadas demostraron capacidad de unir oligonucleótidos, pero también presentaron citotoxicidad dependiente de su concentración, y del contenido relativo de colato de sodio en su composición. Sin embargo, mediante la optimización de las condiciones para su empleo, se logró tanto la internalización de los oligonucleótidos, como también poner en evidencia el efecto de interferencia por RNA.

Por otro lado, se estudiaron los efectos biológicos asociados a la interacción de los vehículos diseñados con las células. En cuanto a las Nanopartículas de Fosfatidilcolina, se evaluaron cuatro condiciones de incubación, variando el porcentaje final de fosfatidilcolina y el pH al cual se prepararon las nanopartículas. Para uno de estos casos se evidenció la activación de la vía MEK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*) 1/2- ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) 1/2, el incremento en el contenido proteico del receptor de EGF (EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*), asociado a una alterada localización intracelular del mismo, y un incremento en la proliferación celular. En el caso de las Nanopartículas Mixtas, se observó la activación de ERK 1/2 y AKT (proteína kinasa B) por parte de las formulaciones compuestas por alta proporción de colato de sodio, efecto que se correlacionó con la mayor citotoxicidad de estos vehículos.

En síntesis, se analizaron dos distintos sistemas basados en lecitina para la vehiculización de oligonucleótidos en cuanto a sus características fisicoquímicas, capacidad de carga de los pequeños RNA de interferencia, internalización celular y eficiencia de transfección. Los mismos mostraron características promisorias, que los posicionan como bases tecnológicas adecuadas para su optimización y plausible uso en terapia génica. La novedosa caracterización de estos sistemas en cuanto a su actividad biológica demostró que no son inertes, por lo que sus acciones sobre sistemas vivos debieran considerarse a la hora de plantear terapias específicas.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, L. and J. J. Rossi (2007). "RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges." Adv Drug Deliv Rev **59**(2-3): 75-86.
- Adamian, L., H. Naveed and J. Liang (2011). "Lipid-binding surfaces of membrane proteins: evidence from evolutionary and structural analysis." Biochim Biophys Acta **1808**(4): 1092-1102.
- Aharinejad, S., M. Sioud, T. Lucas and D. Abraham (2007). "Target validation using RNA interference in solid tumors." Methods Mol Biol **361**: 227-238.
- Ai, J., E. Biazar, M. Jafarpour, M. Montazeri, A. Majdi, S. Aminifard, . . . H. G. Rad (2011). "Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs." Int J Nanomedicine **6**: 1117-1127.
- Alessi, D. R., Y. Saito, D. G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, . . . S. Cowley (1994). "Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1." EMBO J **13**(7): 1610-1619.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-738.
- Almeida, H., M. H. Amaral, P. Lobao and J. M. Lobo (2012). "Pluronic(R) F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs." J Pharm Pharm Sci **15**(4): 592-605.
- Almgren, M. (2000). "Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants." Biochim Biophys Acta **1508**(1-2): 146-163.
- Ankrapp, D. P., J. M. Bennett and S. Z. Haslam (1998). "Role of epidermal growth factor in the acquisition of ovarian steroid hormone responsiveness in the normal mouse mammary gland." J Cell Physiol **174**(2): 251-260.
- Arkhipov, A., Y. Shan, R. Das, N. F. Endres, M. P. Eastwood, D. E. Wemmer, . . . D. E. Shaw (2013). "Architecture and membrane interactions of the EGF receptor." Cell **152**(3): 557-569.
- Aslan, B., B. Ozpolat, A. K. Sood and G. Lopez-Berestein (2013). "Nanotechnology in cancer therapy." J Drug Target **21**(10): 904-913.
- Auger, F., M. C. Gendron, C. Chamot, F. Marano and A. C. Dazy (2006). "Responses of well-differentiated nasal epithelial cells exposed to particles: role of the epithelium in airway inflammation." Toxicol Appl Pharmacol **215**(3): 285-294.
- Baldo, A., E. van den Akker, H. E. Bergmans, F. Lim and K. Pauwels (2013). "General considerations on the biosafety of virus-derived vectors used in gene therapy and vaccination." Curr Gene Ther **13**(6): 385-394.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Bartneck, M., H. A. Keul, S. Singh, K. Czaja, J. Bornemann, M. Bockstaller, . . . J. Groll (2010). "Rapid uptake of gold nanorods by primary human blood phagocytes and immunomodulatory effects of surface chemistry." ACS Nano **4**(6): 3073-3086.
- Batist, G., G. Ramakrishnan, C. S. Rao, A. Chandrasekharan, J. Gutheil, T. Guthrie, . . . L. W. Lee (2001). "Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer." J Clin Oncol **19**(5): 1444-1454.
- Bellocq, N. C., S. H. Pun, G. S. Jensen and M. E. Davis (2003). "Transferrin-containing,

- cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery." Bioconjug Chem **14**(6): 1122-1132.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-366.
- Blanchet, S., K. Ramgolam, A. Baulig, F. Marano and A. Baeza-Squiban (2004). "Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(4): 421-427.
- Bonfiglio, J. J., C. Inda, S. Senin, G. Maccarrone, D. Refojo, D. Giacomini, . . . S. Silberstein (2013). "B-Raf and CRHR1 internalization mediate biphasic ERK1/2 activation by CRH in hippocampal HT22 Cells." Mol Endocrinol **27**(3): 491-510.
- Boon, T., J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen and A. Van Pel (1994). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." Annu Rev Immunol **12**: 337-365.
- Bora, R. S., D. Gupta, T. K. Mukkur and K. S. Saini (2012). "RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities (review)." Mol Med Rep **6**(1): 9-15.
- Bowtle, W., L. Kanyowa, M. Mackenzie and P. Higgins (2011). "Physical stability and resistance to peroxidation of a range of liquid-fill hard gelatin capsule products on extreme long-term storage." Drug Dev Ind Pharm **37**(6): 685-693.
- Brajtburg, J., S. Elberg, G. S. Kobayashi and J. Bolard (1994). "Amphotericin B incorporated into egg lecithin-bile salt mixed micelles: molecular and cellular aspects relevant to therapeutic efficacy in experimental mycoses." Antimicrob Agents Chemother **38**(2): 300-306.
- Bramsen, J. B. and J. Kjems (2011). "Chemical modification of small interfering RNA." Methods Mol Biol **721**: 77-103.
- Brand, T. M., M. Iida, C. Li and D. L. Wheeler (2011). "The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer." Discov Med **12**(66): 419-432.
- Bruce, A. (2002). Molecular Biology of the Cell, Garland Science.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards and R. Agami (2002). "Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference." Cancer Cell **2**(3): 243-247.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards and R. Agami (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." Science **296**(5567): 550-553.
- Bruno, K. (2011). "Using drug-exciipient interactions for siRNA delivery." Adv Drug Deliv Rev **63**(13): 1210-1226.
- Bulun, S. E., T. M. Price, J. Aitken, M. S. Mahendroo and E. R. Simpson (1993). "A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription." J Clin Endocrinol Metab **77**(6): 1622-1628.
- Bumcrot, D., M. Manoharan, V. Koteliensky and D. W. Sah (2006). "RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs." Nat Chem Biol **2**(12): 711-719.
- Burness, M. L., T. A. Grushko and O. I. Olopade (2010). "Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker?" Cancer J **16**(1): 23-32.
- Burnett, John C. and John J. Rossi (2012). "RNA-Based Therapeutics: Current Progress and Future Prospects." Chemistry & Biology **19**(1): 60-71.
- Burstein, H. J., A. A. Prestrud, J. Seidenfeld, H. Anderson, T. A. Buchholz, N. E. Davidson, . . . J. J. Griggs (2010). "American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer." J Clin Oncol **28**(23): 3784-3796.
- Campeau, P. M., W. D. Foulkes and M. D. Tischkowitz (2008). "Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues." Hum Genet **124**(1): 31-42.
- Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." Cell **136**(4): 642-655.

- Castanotto, D. and J. J. Rossi (2009). "The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics." *Nature* **457**(7228): 426-433.
- Clem, B. F., A. L. Clem, A. Yalcin, U. Goswami, S. Arumugam, S. Telang, . . . J. Chesney (2011). "A novel small molecule antagonist of choline kinase-alpha that simultaneously suppresses MAPK and PI3K/AKT signaling." *Oncogene* **30**(30): 3370-3380.
- Contreras, F. X., A. M. Ernst, F. Wieland and B. Brugger (2011). "Specificity of intramembrane protein-lipid interactions." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(6).
- Coskun, U., M. Grzybek, D. Drechsel and K. Simons (2011). "Regulation of human EGF receptor by lipids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(22): 9044-9048.
- Craven, P. A., J. Pfanstiel and F. R. DeRubertis (1987). "Role of activation of protein kinase C in the stimulation of colonic epithelial proliferation and reactive oxygen formation by bile acids." *J Clin Invest* **79**(2): 532-541.
- Cui, Z., F. Qiu and B. R. Sloat (2006). "Lecithin-based cationic nanoparticles as a potential DNA delivery system." *Int J Pharm* **313**(1-2): 206-213.
- Cummings, M. C., P. T. Simpson, L. E. Reid, J. Jayanthan, J. Skerman, S. Song, . . . S. R. Lakhani (2014). "Metastatic progression of breast cancer: insights from 50 years of autopsies." *The Journal of Pathology* **232**(1): 23-31.
- Czajka-Oraniec, I. and E. R. Simpson (2010). "Aromatase research and its clinical significance." *Endokrynol Pol* **61**(1): 126-134.
- Cheang, M. C., S. K. Chia, D. Voduc, D. Gao, S. Leung, J. Snider, . . . T. O. Nielsen (2009). "Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer." *J Natl Cancer Inst* **101**(10): 736-750.
- Chen, H., Z. Guo, F. Yu, J. Qi, L. Zhang, Y. Zhou, . . . G. Xu (2008). "Influence of La<sup>3+</sup> ions on the egg-yolk phosphatidylcholine and sodium taurocholate self-assemblies in aqueous suspension." *J Colloid Interface Sci* **328**(1): 158-165.
- Chen, J. Q. and J. Russo (2009). "ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches." *Biochim Biophys Acta* **1796**(2): 162-175.
- Chen, K. C., T. Y. Yang, C. C. Wu, C. C. Cheng, S. L. Hsu, H. W. Hung, . . . G. C. Chang (2014). "Pemetrexed induces S-phase arrest and apoptosis via a deregulated activation of Akt signaling pathway." *PLoS One* **9**(5): e97888.
- Dadla, A., S. Tannenbaum, B. Yates and L. Holle (2014). "Delayed hypersensitivity reaction related to the use of pegfilgrastim." *J Oncol Pharm Pract*.
- Dangi, J. S., S. P. Vyas and V. K. Dixit (1998). "The role of mixed micelles in drug delivery. I. Solubilization." *Drug Dev Ind Pharm* **24**(7): 681-684.
- Dankort, D., N. Jeyabalan, N. Jones, D. J. Dumont and W. J. Muller (2001). "Multiple ErbB-2/Neu Phosphorylation Sites Mediate Transformation through Distinct Effector Proteins." *J Biol Chem* **276**(42): 38921-38928.
- Dankort, D., B. Maslikowski, N. Warner, N. Kanno, H. Kim, Z. Wang, . . . W. J. Muller (2001). "Grb2 and Shc adapter proteins play distinct roles in Neu (ErbB-2)-induced mammary tumorigenesis: implications for human breast cancer." *Mol Cell Biol* **21**(5): 1540-1551.
- De Maeyer, L., E. Van Limbergen, K. De Nys, P. Moerman, N. Pochet, W. Hendrickx, . . . P. Neven (2008). "Does estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast carcinoma exist?" *J Clin Oncol* **26**(2): 335-336; author reply 336-338.
- Dent, P., Y. Fang, S. Gupta, E. Studer, C. Mitchell, S. Spiegel and P. B. Hylemon (2005). "Conjugated bile acids promote ERK1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes." *Hepatology* **42**(6): 1291-1299.
- Derfus, A. M., A. A. Chen, D. H. Min, E. Ruoslahti and S. N. Bhatia (2007). "Targeted quantum dot conjugates for siRNA delivery." *Bioconjug Chem* **18**(5): 1391-1396.
- Desigaux, L., M. Sainlos, O. Lambert, R. Chevre, E. Letrou-Bonneval, J. P. Vigneron, . . . B. Pitard (2007). "Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside

- derivatives promote efficient siRNA delivery and interference." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(42): 16534-16539.
- Diaz, M. R. and P. E. Vivas-Mejia (2013). "Nanoparticles as Drug Delivery Systems in Cancer Medicine: Emphasis on RNAi-Containing Nanoliposomes." Pharmaceuticals (Basel) **6**(11): 1361-1380.
- Docter, D., C. Bantz, D. Westmeier, H. J. Galla, Q. Wang, J. C. Kirkpatrick, . . . R. H. Stauber (2014). "The protein corona protects against size- and dose-dependent toxicity of amorphous silica nanoparticles." Beilstein J Nanotechnol **5**: 1380-1392.
- Dodes Traian, M. M., D. I. Cattoni, V. Levi and F. L. Gonzalez Flecha (2012). "A two-stage model for lipid modulation of the activity of integral membrane proteins." PLoS One **7**(6): e39255.
- Dolbeare, F. (1995). "Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics." Histochem J **27**(5): 339-369.
- Donaldson, J. G. (2009). "Phospholipase D in endocytosis and endosomal recycling pathways." Biochim Biophys Acta **1791**(9): 845-849.
- Dowler, T., D. Bergeron, A. L. Tedeschi, L. Paquet, N. Ferrari and M. J. Damha (2006). "Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA)." Nucleic Acids Res **34**(6): 1669-1675.
- El-Sayed, A. and H. Harashima (2013). "Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis." Mol Ther **21**(6): 1118-1130.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-498.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.
- Elsayed, M. M. and G. Cevc (2011). "The vesicle-to-micelle transformation of phospholipid-cholate mixed aggregates: a state of the art analysis including membrane curvature effects." Biochim Biophys Acta **1808**(1): 140-153.
- Eom, H. J. and J. Choi (2010). "p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells." Environ Sci Technol **44**(21): 8337-8342.
- Fagone, P. and S. Jackowski (2013). "Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle." Biochim Biophys Acta **1831**(3): 523-532.
- Fauman, E. B., B. K. Rai and E. S. Huang (2011). "Structure-based druggability assessment--identifying suitable targets for small molecule therapeutics." Curr Opin Chem Biol **15**(4): 463-468.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, . . . F. Bray (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." Int J Cancer **136**(5): E359-386.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.
- Gao, Y., L. Chen, Z. Zhang, Y. Chen and Y. Li (2011). "Reversal of multidrug resistance by reduction-sensitive linear cationic click polymer/iMDR1-pDNA complex nanoparticles." Biomaterials **32**(6): 1738-1747.
- Garidel, P., A. Hildebrand, K. Knauf and A. Blume (2007). "Membranolytic activity of bile salts: influence of biological membrane properties and composition." Molecules **12**(10): 2292-2326.
- Gavrilov, K. and W. M. Saltzman (2012). "Therapeutic siRNA: principles, challenges, and

- strategies." *Yale J Biol Med* **85**(2): 187-200.
- Giulianelli, S., A. Molinolo and C. Lanari (2013). "Targeting progesterone receptors in breast cancer." *Vitam Horm* **93**: 161-184.
- González (2014). *Innovative Strategies for Breast Cancer Therapy: Concepts and Applications Cervical, Breast and Prostate Cancer* i. P. Ltd., iConcept Press Ltd.
- Gori, S., S. Rimondini, V. De Angelis, M. Colozza, G. Bisagni, G. Moretti, . . . L. Crino (2007). "Central nervous system metastases in HER-2 positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab: incidence, survival, and risk factors." *Oncologist* **12**(7): 766-773.
- Goyeneche, A. A. and C. M. Telleria (2015). "Antiprogestins in gynecological diseases." *Reproduction* **149**(1): R15-33.
- Gradishar, W. J., S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, . . . J. O'Shaughnessy (2005). "Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer." *J Clin Oncol* **23**(31): 7794-7803.
- Gratton, S. E., P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier and J. M. DeSimone (2008). "The effect of particle design on cellular internalization pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(33): 11613-11618.
- Gratzner, H. G. (1982). "Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication." *Science* **218**(4571): 474-475.
- Graves, P. and Y. Zeng (2012). "Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view." *Genomics Proteomics Bioinformatics* **10**(5): 239-245.
- Gupta, S., R. T. Stravitz, P. Dent and P. B. Hylemon (2001). "Down-regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway." *J Biol Chem* **276**(19): 15816-15822.
- Guyton, K. Z., Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu and N. J. Holbrook (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury." *J Biol Chem* **271**(8): 4138-4142.
- Halder, J., A. A. Kamat, C. N. Landen, Jr., L. Y. Han, S. K. Lutgendorf, Y. G. Lin, . . . A. K. Sood (2006). "Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy." *Clin Cancer Res* **12**(16): 4916-4924.
- Hammond, M. E., D. F. Hayes, A. C. Wolff, P. B. Mangu and S. Temin (2010). "American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer." *J Oncol Pract* **6**(4): 195-197.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach and G. J. Hannon (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." *Nature* **404**(6775): 293-296.
- Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi and G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." *Science* **293**(5532): 1146-1150.
- Harburger, D. S. and D. A. Calderwood (2009). "Integrin signalling at a glance." *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 159-163.
- Haslam, S. Z., L. J. Counterman and K. A. Nummy (1993). "Effects of epidermal growth factor, estrogen, and progestin on DNA synthesis in mammary cells in vivo are determined by the developmental state of the gland." *J Cell Physiol* **155**(1): 72-78.
- Hendradi, E., Y. Obata, K. Isowa, T. Nagai and K. Takayama (2003). "Effect of mixed micelle formulations including terpenes on the transdermal delivery of diclofenac." *Biol Pharm Bull* **26**(12): 1739-1743.
- Hippalgaonkar, K., S. Majumdar and V. Kansara (2010). "Injectable lipid emulsions-

- advancements, opportunities and challenges." *AAPS PharmSciTech* **11**(4): 1526-1540.
- Hirschowitz, E. A., S. Leonard, W. Song, B. Ferris, P. L. Leopold, J. J. Lewis, . . . R. G. Crystal (1998). "Adenovirus-mediated expression of melanoma antigen gp75 as immunotherapy for metastatic melanoma." *Gene Ther* **5**(7): 975-983.
- Hoffmann, B., A. Stockl, M. Schlame, K. Beyer and M. Klingenberg (1994). "The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants." *J Biol Chem* **269**(3): 1940-1944.
- Hurvitz, S., A. Guerin, M. Brammer, E. Guardino, Z. Y. Zhou, D. Latremouille Viau, . . . D. Lalla (2014). "Investigation of adverse-event-related costs for patients with metastatic breast cancer in a real-world setting." *Oncologist* **19**(9): 901-908.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "RNAi: nature abhors a double-strand." *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 225-232.
- Hylemon, P. B., H. Zhou, W. M. Pandak, S. Ren, G. Gil and P. Dent (2009). "Bile acids as regulatory molecules." *J Lipid Res* **50**(8): 1509-1520.
- Idkowiak-Baldys, J., A. Baldys, J. R. Raymond and Y. A. Hannun (2009). "Sustained receptor stimulation leads to sequestration of recycling endosomes in a classical protein kinase C- and phospholipase D-dependent manner." *J Biol Chem* **284**(33): 22322-22331.
- Ipsaro, J. J. and L. Joshua-Tor (2015). "From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery." *Nat Struct Mol Biol* **22**(1): 20-28.
- Irwin, M. E., K. L. Mueller, N. Bohin, Y. Ge and J. L. Boerner (2011). "Lipid raft localization of EGFR alters the response of cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib." *J Cell Physiol* **226**(9): 2316-2328.
- Iyer, A. K., G. Khaled, J. Fang and H. Maeda (2006). "Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting." *Drug Discov Today* **11**(17-18): 812-818.
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, . . . P. S. Linsley (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." *Nat Biotechnol* **21**(6): 635-637.
- Jackson, A. L., J. Burchard, J. Schelter, B. N. Chau, M. Cleary, L. Lim and P. S. Linsley (2006). "Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity." *RNA* **12**(7): 1179-1187.
- Jatzkewitz, H. (1954). "[Incorporation of physiologically-active substances into a colloidal blood plasma substitute. I. Incorporation of mescaline peptide into polyvinylpyrrolidone]." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **297**(3-6): 149-156.
- Jimenez, Ed. (2002). *Biología celular y molecular*, Pearson Educación.
- Johnston, H., D. Brown, A. Kermanizadeh, E. Gubbins and V. Stone (2012). "Investigating the relationship between nanomaterial hazard and physicochemical properties: Informing the exploitation of nanomaterials within therapeutic and diagnostic applications." *J Control Release* **164**(3): 307-313.
- Judge, A. D., V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock and I. MacLachlan (2005). "Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA." *Nat Biotechnol* **23**(4): 457-462.
- Kamata, H., S. Honda, S. Maeda, L. Chang, H. Hirata and M. Karin (2005). "Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases." *Cell* **120**(5): 649-661.
- Kapoor, M. and D. J. Burgess (2012). "Efficient and safe delivery of siRNA using anionic lipids: Formulation optimization studies." *Int J Pharm* **432**(1-2): 80-90.
- Kapoor, M., D. J. Burgess and S. D. Patil (2012). "Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA." *Int J Pharm* **427**(1): 35-57.
- Kathawala, M. H., S. P. Khoo, T. Sudhakaran, X. Zhao, J. Say Chye Loo, S. Ahmed and K. Woei Ng (2015). "Fluorescence techniques used to measure interactions between hydroxyapatite

- nanoparticles and epidermal growth factor receptors." *Biotechnol J* **10**(1): 171-179.
- Khalifeh, I. M., C. Albarracin, L. K. Diaz, F. W. Symmans, M. E. Edgerton, R. F. Hwang and N. Sneige (2008). "Clinical, histopathologic, and immunohistochemical features of microglandular adenosis and transition into in situ and invasive carcinoma." *Am J Surg Pathol* **32**(4): 544-552.
- Kirtane, A. R., S. M. Kalscheuer and J. Panyam (2013). "Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: Challenges and opportunities." *Adv Drug Deliv Rev* **65**(13-14): 1731-1747.
- Kleinman, M. E., H. Kaneko, W. G. Cho, S. Dridi, B. J. Fowler, A. D. Blandford, . . . J. Ambati (2012). "Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3." *Mol Ther* **20**(1): 101-108.
- Kleinman, M. E., K. Yamada, A. Takeda, V. Chandrasekaran, M. Nozaki, J. Z. Baffi, . . . J. Ambati (2008). "Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3." *Nature* **452**(7187): 591-597.
- Kozielski, K. L., S. Y. Tzeng and J. J. Green (2013). "Bioengineered nanoparticles for siRNA delivery." *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **5**(5): 449-468.
- Kreike, B., M. van Kouwenhove, H. Horlings, B. Weigelt, H. Peterse, H. Bartelink and M. J. van de Vijver (2007). "Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas." *Breast Cancer Res* **9**(5): R65.
- Krol, J. and W. J. Krzyzosiak (2004). "Structural aspects of microRNA biogenesis." *IUBMB Life* **56**(2): 95-100.
- Kuhn, D. A., D. Vanhecke, B. Michen, F. Blank, P. Gehr, A. Petri-Fink and B. Rothen-Rutishauser (2014). "Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages." *Beilstein J Nanotechnol* **5**: 1625-1636.
- Lakadamyali, M., M. J. Rust and X. Zhuang (2006). "Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes." *Cell* **124**(5): 997-1009.
- Lammers, T., F. Kiessling, W. E. Hennink and G. Storm (2012). "Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress." *Journal of Controlled Release* **161**(2): 175-187.
- Lanari, C., V. Wargon, P. Rojas and A. A. Molinolo (2012). "Antiprogesterins in breast cancer treatment: are we ready?" *Endocr Relat Cancer* **19**(3): R35-50.
- Laplanche, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." *Cell* **149**(2): 274-293.
- Lavigne, C. and A. R. Thierry (2007). "Specific subcellular localization of siRNAs delivered by lipoplex in MCF-7 breast cancer cells." *Biochimie* **89**(10): 1245-1251.
- Lechardeur, D., K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, . . . G. L. Lukacs (1999). "Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer." *Gene Ther* **6**(4): 482-497.
- Lee, J. M., T. J. Yoon and Y. S. Cho (2013). "Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy." *Biomed Res Int* **2013**: 782041.
- Lee, R. J. and L. Huang (1996). "Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer." *J Biol Chem* **271**(14): 8481-8487.
- Lee, Y. S., S. Pressman, A. P. Andress, K. Kim, J. L. White, J. J. Cassidy, . . . R. W. Carthew (2009). "Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking." *Nat Cell Biol* **11**(9): 1150-1156.
- Li, W. and F. C. Szoka, Jr. (2007). "Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery." *Pharm Res* **24**(3): 438-449.
- Liang, J. and J. M. Slingerland (2003). "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression." *Cell Cycle* **2**(4): 339-345.

- Liu, J. (2004). "Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi." Science **305**(5689): 1437-1441.
- Liu, J., T. Gong, C. Wang, Z. Zhong and Z. Zhang (2007). "Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization." Int J Pharm **340**(1-2): 153-162.
- Liu, X., Q. Zhao, S. Araki, S. Zhang and J. Miao (2006). "Contrasting effects of phosphatidylinositol- and phosphatidylcholine-specific phospholipase C on apoptosis in cultured endothelial cells." Endothelium **13**(3): 205-211.
- Lorenz, C., P. Hadwiger, M. John, H. P. Vornlocher and C. Unverzagt (2004). "Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells." Bioorg Med Chem Lett **14**(19): 4975-4977.
- Lunov, O., T. Syrovets, C. Loos, J. Beil, M. Delacher, K. Tron, . . . T. Simmet (2011). "Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line." ACS Nano **5**(3): 1657-1669.
- Lv, X., X. Pang, X. Jin, Y. Song and H. Li (2014). " $\beta$ -catenin knockdown enhances the effects of fluorouracil in the breast cancer cell line MDA-MB-468." Biomedical Reports.
- Maddika, S., S. R. Ande, E. Wiechec, L. L. Hansen, S. Wesselborg and M. Los (2008). "Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis." J Cell Sci **121**(Pt 7): 979-988.
- Makishima, M., A. Y. Okamoto, J. J. Repa, H. Tu, R. M. Learned, A. Luk, . . . B. Shan (1999). "Identification of a nuclear receptor for bile acids." Science **284**(5418): 1362-1365.
- Malamas, A. S., M. Gujrati, C. M. Kummitha, R. Xu and Z. R. Lu (2013). "Design and evaluation of new pH-sensitive amphiphilic cationic lipids for siRNA delivery." J Control Release **171**(3): 296-307.
- Manke, A., L. Wang and Y. Rojanasakul (2013). "Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity." Biomed Res Int **2013**: 942916.
- Manna, P., M. Ghosh, J. Ghosh, J. Das and P. C. Sil (2012). "Contribution of nano-copper particles to in vivo liver dysfunction and cellular damage: role of IkappaBalpha/NF-kappaB, MAPKs and mitochondrial signal." Nanotoxicology **6**(1): 1-21.
- Mansoori, B., S. Sandoghchian Shotorbani and B. Baradaran (2014). "RNA interference and its role in cancer therapy." Adv Pharm Bull **4**(4): 313-321.
- Marshall, C. J. (1994). "MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase." Curr Opin Genet Dev **4**(1): 82-89.
- Martinez, J. and T. Tuschl (2004). "RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease." Genes Dev **18**(9): 975-980.
- Masuda, H., D. Zhang, C. Bartholomeusz, H. Doihara, G. N. Hortobagyi and N. T. Ueno (2012). "Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **136**(2): 331-345.
- Matsumura, Y., T. Oda and H. Maeda (1987). "[General mechanism of intratumor accumulation of macromolecules: advantage of macromolecular therapeutics]." Gan To Kagaku Ryoho **14**(3 Pt 2): 821-829.
- May, F. (2014). "Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer." Cancer Management and Research: 225.
- Mazie, A. R., J. K. Spix, E. R. Block, H. B. Achebe and J. K. Klarlund (2006). "Epithelial cell motility is triggered by activation of the EGF receptor through phosphatidic acid signaling." J Cell Sci **119**(Pt 8): 1645-1654.
- McCarthy, H. and C. McCrudden (2014). "Current status of gene therapy for breast cancer: progress and challenges." The Application of Clinical Genetics: 209.
- McLaughlin, S., S. O. Smith, M. J. Hayman and D. Murray (2005). "An electrostatic engine model for autoinhibition and activation of the epidermal growth factor receptor

- (EGFR/ErbB) family." *J Gen Physiol* **126**(1): 41-53.
- Miller, E., H. J. Lee, A. Lulla, L. Hernandez, P. Gokare and B. Lim (2014). "Current treatment of early breast cancer: adjuvant and neoadjuvant therapy." *F1000Res* **3**: 198.
- Miller, W. R., S. White, J. M. Dixon, J. Murray, L. Renshaw and T. J. Anderson (2006). "Proliferation, steroid receptors and clinical/pathological response in breast cancer treated with letrozole." *Br J Cancer* **94**(7): 1051-1056.
- Moghimi, S. M., P. Symonds, J. C. Murray, A. C. Hunter, G. Debska and A. Szewczyk (2005). "A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy." *Mol Ther* **11**(6): 990-995.
- Morrissey, D. V., J. A. Lockridge, L. Shaw, K. Blanchard, K. Jensen, W. Breen, . . . B. Polisky (2005). "Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs." *Nat Biotechnol* **23**(8): 1002-1007.
- Mouritsen, O. G. (2011). "Model answers to lipid membrane questions." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(9): a004622.
- Muir, D., S. Varon and M. Manthorpe (1990). "An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures." *Anal Biochem* **185**(2): 377-382.
- Muller, J., I. Decordier, P. H. Hoet, N. Lombaert, L. Thomassen, F. Huaux, . . . M. Kirsch-Volders (2008). "Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells." *Carcinogenesis* **29**(2): 427-433.
- Muller, K. (1981). "Structural dimorphism of bile salt/lecithin mixed micelles. A possible regulatory mechanism for cholesterol solubility in bile? X-ray structure analysis." *Biochemistry* **20**(2): 404-414.
- Murphy, L. O., S. Smith, R. H. Chen, D. C. Fingar and J. Blenis (2002). "Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products." *Nat Cell Biol* **4**(8): 556-564.
- Nagai, H., T. Noguchi, K. Takeda and H. Ichijo (2007). "Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways." *J Biochem Mol Biol* **40**(1): 1-6.
- Nazareus, M., Q. Zhang, M. G. Soliman, P. Del Pino, B. Pelaz, S. Carregal-Romero, . . . W. J. Parak (2014). "In vitro interaction of colloidal nanoparticles with mammalian cells: What have we learned thus far?" *Beilstein J Nanotechnol* **5**: 1477-1490.
- Nel, A. E., L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, . . . M. Thompson (2009). "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface." *Nat Mater* **8**(7): 543-557.
- Nguyen, J. and F. C. Szoka (2012). "Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle?" *Acc Chem Res* **45**(7): 1153-1162.
- Nikolakopoulou, Z., G. Nteliopoulos, A. T. Michael-Titus and E. K. Parkinson (2013). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids selectively inhibit growth in neoplastic oral keratinocytes by differentially activating ERK1/2." *Carcinogenesis* **34**(12): 2716-2725.
- Oh, N. and J. H. Park (2014). "Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells." *Int J Nanomedicine* **9 Suppl 1**: 51-63.
- Okamura, K., J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler and E. C. Lai (2007). "The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila." *Cell* **130**(1): 89-100.
- Oliveira, D. M. and M. A. Goodell (2003). "Transient RNA interference in hematopoietic progenitors with functional consequences." *Genesis* **36**(4): 203-208.
- Olivotto, I. A., P. T. Truong, C. H. Speers, V. Bernstein, S. J. Allan, S. J. Kelly and M. L. Lesperance (2004). "Time to stop progesterone receptor testing in breast cancer management." *J Clin Oncol* **22**(9): 1769-1770.
- Omedes Pujol, M., D. J. Coleman, C. D. Allen, O. Heidenreich and D. A. Fulton (2013). "Determination of key structure-activity relationships in siRNA delivery with a mixed micelle system." *J Control Release* **172**(3): 939-945.

- Onuma, K., Y. Sato, S. Ogawara, N. Shirasawa, M. Kobayashi, J. Yoshitake, . . . F. Okada (2009). "Nano-scaled particles of titanium dioxide convert benign mouse fibrosarcoma cells into aggressive tumor cells." Am J Pathol **175**(5): 2171-2183.
- Paddison, P. J., A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon and D. S. Conklin (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." Genes Dev **16**(8): 948-958.
- Palombo, M., M. Deshmukh, D. Myers, J. Gao, Z. Szekely and P. J. Sinko (2014). "Pharmaceutical and toxicological properties of engineered nanomaterials for drug delivery." Annu Rev Pharmacol Toxicol **54**: 581-598.
- Pantarotto, D., R. Singh, D. McCarthy, M. Erhardt, J. P. Briand, M. Prato, . . . A. Bianco (2004). "Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery." Angew Chem Int Ed Engl **43**(39): 5242-5246.
- Parks, D. J., S. G. Blanchard, R. K. Bledsoe, G. Chandra, T. G. Consler, S. A. Kliewer, . . . J. M. Lehmann (1999). "Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor." Science **284**(5418): 1365-1368.
- Patil, S. D., D. G. Rhodes and D. J. Burgess (2005). "Biophysical characterization of anionic lipoplexes." Biochim Biophys Acta **1711**(1): 1-11.
- Peacock, H., A. Kannan, P. A. Beal and C. J. Burrows (2011). "Chemical modification of siRNA bases to probe and enhance RNA interference." J Org Chem **76**(18): 7295-7300.
- Penzes, K., C. Baumann, I. Szabadkai, L. Orfi, G. Keri, A. Ullrich and R. Torka (2014). "Combined inhibition of AXL, Lyn and p130Cas kinases block migration of triple negative breast cancer cells." Cancer Biol Ther **15**(11): 1571-1582.
- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, . . . D. Botstein (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**(6797): 747-752.
- Phillips, M. C. and D. Chapman (1968). "Monolayer characteristics of saturated 1,2-diacyl phosphatidylcholines (lecithins) and phosphatidylethanolamines at the air-water interface." Biochim Biophys Acta **163**(3): 301-313.
- Pike, L. J. (2009). "The challenge of lipid rafts." J Lipid Res **50 Suppl**: S323-328.
- Plo, I., D. Lautier, T. Levade, H. Sekouri, J. P. Jaffrezou, G. Laurent and A. Bettaieb (2000). "Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and phospholipase D are respectively implicated in mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB activation in tumour-necrosis-factor-alpha-treated immature acute-myeloid-leukaemia cells." Biochem J **351 Pt 2**: 459-467.
- Pongracz, J., P. Clark, J. P. Neoptolemos and J. M. Lord (1995). "Expression of protein kinase C isoenzymes in colorectal cancer tissue and their differential activation by different bile acids." Int J Cancer **61**(1): 35-39.
- Poole, A. J., Y. Li, Y. Kim, S. C. Lin, W. H. Lee and E. Y. Lee (2006). "Prevention of Brca1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist." Science **314**(5804): 1467-1470.
- Qiao, L., E. Studer, K. Leach, R. McKinstry, S. Gupta, R. Decker, . . . P. Dent (2001). "Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis." Mol Biol Cell **12**(9): 2629-2645.
- Ralph, G. S., P. A. Radcliffe, D. M. Day, J. M. Carthy, M. A. Leroux, D. C. Lee, . . . M. Azzouz (2005). "Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model." Nat Med **11**(4): 429-433.
- Ramoni, C., F. Spadaro, B. Barletta, M. L. Dupuis and F. Podo (2004). "Phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mitogen-stimulated fibroblasts." Exp Cell Res **299**(2): 370-382.

- Ramrakhiani (2012). "Nanostructures and their applications." Recent Research in Science and Technology
- Rand, T. A., S. Petersen, F. Du and X. Wang (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." Cell **123**(4): 621-629.
- Rao, Y. P., E. J. Studer, R. T. Stravitz, S. Gupta, L. Qiao, P. Dent and P. B. Hylemon (2002). "Activation of the Raf-1/MEK/ERK cascade by bile acids occurs via the epidermal growth factor receptor in primary rat hepatocytes." Hepatology **35**(2): 307-314.
- Raoul, C., T. Abbas-Terki, J. C. Bensadoun, S. Guillot, G. Haase, J. Szulc, . . . P. Aebischer (2005). "Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS." Nat Med **11**(4): 423-428.
- Rauch, J., W. Kolch, S. Laurent and M. Mahmoudi (2013). "Big signals from small particles: regulation of cell signaling pathways by nanoparticles." Chem Rev **113**(5): 3391-3406.
- Rimawi, M. F., P. B. Shetty, H. L. Weiss, R. Schiff, C. K. Osborne, G. C. Chamness and R. M. Elledge (2010). "Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes." Cancer **116**(5): 1234-1242.
- Rivera, A. S., J. U. Hammel, K. M. Haen, E. S. Danka, B. Cieniewicz, I. P. Winters, . . . M. Nickel (2011). "RNA interference in marine and freshwater sponges: actin knockdown in *Tethya wilhelma* and *Ephydatia muelleri* by ingested dsRNA expressing bacteria." BMC Biotechnol **11**: 67.
- Rizzo, M. A., K. Shome, S. C. Watkins and G. Romero (2000). "The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras." J Biol Chem **275**(31): 23911-23918.
- Robbins, M., A. Judge, L. Liang, K. McClintock, E. Yaworski and I. MacLachlan (2007). "2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists." Mol Ther **15**(9): 1663-1669.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-344.
- Ruan, W., M. E. Monaco and D. L. Kleinberg (2005). "Progesterone stimulates mammary gland ductal morphogenesis by synergizing with and enhancing insulin-like growth factor-I action." Endocrinology **146**(3): 1170-1178.
- Ruby, J. G., C. H. Jan and D. P. Bartel (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." Nature **448**(7149): 83-86.
- Sadeghi, S., O. Olevsky and S. A. Hurvitz (2014). "Profiling and targeting HER2-positive breast cancer using trastuzumab emtansine." Pharmgenomics Pers Med **7**: 329-338.
- Scotti, E., F. Gilardi, C. Godio, E. Gers, J. Krneta, N. Mitro, . . . M. Crestani (2007). "Bile acids and their signaling pathways: eclectic regulators of diverse cellular functions." Cell Mol Life Sci **64**(19-20): 2477-2491.
- Scheffel, U., B. A. Rhodes, T. K. Natarajan and H. N. Wagner, Jr. (1972). "Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system." J Nucl Med **13**(7): 498-503.
- Schwarz, D. S., Y. Tomari and P. D. Zamore (2004). "The RNA-induced silencing complex is a Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease." Curr Biol **14**(9): 787-791.
- Sen, G. L. and H. M. Blau (2005). "Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies." Nat Cell Biol **7**(6): 633-636.
- Shen, H., V. Mittal, M. Ferrari and J. Chang (2013). "Delivery of gene silencing agents for breast cancer therapy." Breast Cancer Res **15**(3): 205.
- Silvander, M. (1996). "Vesicle solubilization by alkyl sulfate surfactants: a cryo-TEM study of the vesicle to micelle transition." Journal of Colloid and Interface Science **179**(1): 104-113.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-572.
- Simons, K. and J. L. Sampaio (2011). "Membrane organization and lipid rafts." Cold Spring Harb

- Perspect Biol **3**(10): a004697.
- Singh, R. and J. W. Lillard, Jr. (2009). "Nanoparticle-based targeted drug delivery." Exp Mol Pathol **86**(3): 215-223.
- Singha, K., R. Namgung and W. J. Kim (2011). "Polymers in small-interfering RNA delivery." Nucleic Acid Ther **21**(3): 133-147.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich and W. L. McGuire (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science **235**(4785): 177-182.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, . . . et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." Science **244**(4905): 707-712.
- Smoluchowski (1916). "Drei Vorträge über Diffusion, Brownsche Molekularbewegung und Koagulation von Kolloidteilchen " Physik. Z.(17).
- Snead, N. M., J. R. Escamilla-Powers, J. J. Rossi and A. P. McCaffrey (2013). "5' Unlocked Nucleic Acid Modification Improves siRNA Targeting." Mol Ther Nucleic Acids **2**: e103.
- Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, . . . A. L. Borresen-Dale (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10869-10874.
- Steelman, L. S., S. C. Pohnert, J. G. Shelton, R. A. Franklin, F. E. Bertrand and J. A. McCubrey (2004). "JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis." Leukemia **18**(2): 189-218.
- Studer, E., X. Zhou, R. Zhao, Y. Wang, K. Takabe, M. Nagahashi, . . . P. B. Hylemon (2012). "Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes." Hepatology **55**(1): 267-276.
- Subramaniam, P., S. J. Lee, S. Shah, S. Patel, V. Starovoytov and K. B. Lee (2012). "Generation of a library of non-toxic quantum dots for cellular imaging and siRNA delivery." Adv Mater **24**(29): 4014-4019.
- Sydlik, U., K. Bierhals, M. Soufi, J. Abel, R. P. Schins and K. Unfried (2006). "Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **291**(4): L725-733.
- Sznitowska, M., M. Klunder and M. Placzek (2008). "Paclitaxel solubility in aqueous dispersions and mixed micellar solutions of lecithin." Chem Pharm Bull (Tokyo) **56**(1): 70-74.
- Tan, Y., J. Qi, Y. Lu, F. Hu, Z. Yin and W. Wu (2013). "Lecithin in mixed micelles attenuates the cytotoxicity of bile salts in Caco-2 cells." Toxicol In Vitro **27**(2): 714-720.
- Taratula, O., O. B. Garbuzenko, P. Kirkpatrick, I. Pandya, R. Savla, V. P. Pozharov, . . . T. Minko (2009). "Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery." J Control Release **140**(3): 284-293.
- Thach, C. T. and J. N. Finkelstein (2013). "Cationic nanoparticles disrupt cellular signaling in a cholesterol dependent manner." Toxicol In Vitro **27**(4): 1277-1286.
- Tinkle, S., S. E. McNeil, S. Muhlebach, R. Bawa, G. Borchard, Y. C. Barenholz, . . . N. Desai (2014). "Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap." Ann N Y Acad Sci **1313**: 35-56.
- Trotta, M., F. Pattarino and T. Ignoni (2002). "Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures." Eur J Pharm Biopharm **53**(2): 203-208.
- Unfried, K., U. Sydlik, K. Bierhals, A. Weissenberg and J. Abel (2008). "Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(2): L358-367.
- Urban-Klein, B., S. Werth, S. Abuharbeid, F. Czubayko and A. Aigner (2005). "RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo." Gene Ther **12**(5): 461-466.

- Van Asten, K., P. Neven, A. Lintermans, H. Wildiers and R. Paridaens (2014). "Aromatase inhibitors in the breast cancer clinic: focus on exemestane." Endocr Relat Cancer **21**(1): R31-49.
- van Dijk, M. C., F. J. Muriana, J. de Widt, H. Hilkmann and W. J. van Blitterswijk (1997). "Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in platelet-derived growth factor-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in Rat-1 fibroblasts." J Biol Chem **272**(17): 11011-11016.
- van Hoogevest, P. and A. Wendel (2014). "The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients." Eur J Lipid Sci Technol **116**(9): 1088-1107.
- Venneman, N. G., S. J. Huisman, A. Moschetta, G. P. vanBerge-Henegouwen and K. J. van Erpecum (2002). "Effects of hydrophobic and hydrophilic bile salt mixtures on cholesterol crystallization in model bile." Biochim Biophys Acta **1583**(2): 221-228.
- Vertegel, A. A., R. W. Siegel and J. S. Dordick (2004). "Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme." Langmuir **20**(16): 6800-6807.
- Von Rosenvinge, E. C. and J. P. Raufman (2011). "Muscarinic receptor signaling in colon cancer." Cancers (Basel) **3**(1): 971-981.
- Walter, A., G. Kuehl, K. Barnes and G. VanderWaerd (2000). "The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea." Biochim Biophys Acta **1508**(1-2): 20-33.
- Walter, A., P. K. Vinson, A. Kaplun and Y. Talmon (1991). "Intermediate structures in the cholate-phosphatidylcholine vesicle-micelle transition." Biophys J **60**(6): 1315-1325.
- Wang, J., Z. Lu, M. G. Wientjes and J. L. Au (2010). "Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers." AAPS J **12**(4): 492-503.
- Wang, Y., S. Gao, W. H. Ye, H. S. Yoon and Y. Y. Yang (2006). "Co-delivery of drugs and DNA from cationic core-shell nanoparticles self-assembled from a biodegradable copolymer." Nat Mater **5**(10): 791-796.
- Watts, J. K., N. Choubdar, K. Sadalpure, F. Robert, A. S. Wahba, J. Pelletier, . . . M. J. Damha (2007). "2'-fluoro-4'-thioarabino-modified oligonucleotides: conformational switches linked to siRNA activity." Nucleic Acids Res **35**(5): 1441-1451.
- Weihua, Z., R. Tsan, W. C. Huang, Q. Wu, C. H. Chiu, I. J. Fidler and M. C. Hung (2008). "Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity." Cancer Cell **13**(5): 385-393.
- Werneburg, N. W., J. H. Yoon, H. Higuchi and G. J. Gores (2003). "Bile acids activate EGF receptor via a TGF- $\alpha$ -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **285**(1): G31-36.
- Weyermann, J., D. Lochmann and A. Zimmer (2004). "Comparison of antisense oligonucleotide drug delivery systems." J Control Release **100**(3): 411-423.
- Whitehead, K. A., R. Langer and D. G. Anderson (2009). "Knocking down barriers: advances in siRNA delivery." Nat Rev Drug Discov **8**(2): 129-138.
- Worgall, S., G. Wolff, E. Falck-Pedersen and R. G. Crystal (1997). "Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration." Hum Gene Ther **8**(1): 37-44.
- Yang, F., W. Huang, Y. Li, S. Liu, M. Jin, Y. Wang, . . . Z. Gao (2013). "Anti-tumor effects in mice induced by survivin-targeted siRNA delivered through polysaccharide nanoparticles." Biomaterials **34**(22): 5689-5699.
- Yang, X., M. Sierant, M. Janicka, L. Peczek, C. Martinez, T. Hassell, . . . B. Nawrot (2012). "Gene silencing activity of siRNA molecules containing phosphorodithioate substitutions." ACS Chem Biol **7**(7): 1214-1220.
- Yang, Y., F. A. Nunes, K. Berencsi, E. E. Furth, E. Gonczol and J. M. Wilson (1994). "Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy." Proc Natl

- Acad Sci U S A **91**(10): 4407-4411.
- Yao, Y. D., T. M. Sun, S. Y. Huang, S. Dou, L. Lin, J. N. Chen, . . . E. Song (2012). "Targeted delivery of PLK1-siRNA by ScFv suppresses Her2+ breast cancer growth and metastasis." Sci Transl Med **4**(130): 130ra148.
- Yhee, J. Y., S. Song, S. J. Lee, S. G. Park, K. S. Kim, M. G. Kim, . . . K. Kim (2015). "Cancer-targeted MDR-1 siRNA delivery using self-cross-linked glycol chitosan nanoparticles to overcome drug resistance." J Control Release **198**: 1-9.
- Yoon, J. H., H. Higuchi, N. W. Werneburg, S. H. Kaufmann and G. J. Gores (2002). "Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line." Gastroenterology **122**(4): 985-993.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp and D. P. Bartel (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.