



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**Participación del sistema inmune en el silenciamiento de E7 del Virus de Papiloma
Humano mediante siRNAs liposomales en un modelo murino de cáncer**

Tesis que presenta:

M.C. Ivonne Lizeth Martínez Carlín

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

en la especialidad de Biomedicina Molecular

Director de tesis: Dr. Arturo Chávez Reyes

Ciudad de México

Agosto 2016

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Monterrey.

Para la realización de los estudios de doctorado CONACYT asignó la beca No. 346876 con número de registro de estudiante # 268077

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	8
2.- ANTECEDENTES.....	10
TERAPIA GÉNICA	10
RNA DE INTERFERENCIA	11
<i>Mecanismo de RNA de interferencia.....</i>	<i>12</i>
APLICACIONES DEL RNA DE INTERFERENCIA	14
<i>Biotecnología.....</i>	<i>14</i>
<i>Genómica funcional.....</i>	<i>15</i>
<i>Medicina.....</i>	<i>15</i>
IMPLEMENTACIÓN DE siRNAs EN LA CLÍNICA	18
<i>Vehículos de liberación o acarreadores.....</i>	<i>19</i>
<i>Propiedades de los acarreadores.....</i>	<i>21</i>
<i>Barreras en la biodistribución de siRNAs.....</i>	<i>23</i>
<i>Tipos de acarreadores.....</i>	<i>27</i>
CÁNCER	33
CÁNCER CERVICOUTERINO	34
<i>Estadísticas.....</i>	<i>34</i>
<i>Desarrollo de la enfermedad.....</i>	<i>36</i>
VIRUS DE PAPILOMA HUMANO	38
<i>Genoma del virus.....</i>	<i>38</i>
<i>Ciclo replicativo.....</i>	<i>39</i>
<i>Oncogenes E6 y E7.....</i>	<i>41</i>
RNA DE INTERFERENCIA Y VIRUS DE PAPILOMA HUMANO	45
siRNAs LIPOSOMALES	48
3.- JUSTIFICACIÓN.....	49
4.- HIPÓTESIS	49
5.- OBJETIVO GENERAL	50
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
6.- METODOLOGÍA	51
MATERIALES	51
<i>Línea celular.....</i>	<i>51</i>
<i>RNAs cortos de interferencia (siRNAs).....</i>	<i>51</i>
<i>Oligonucleótidos para PCR.....</i>	<i>51</i>
<i>Animales.....</i>	<i>52</i>
<i>Reactivos y Kits.....</i>	<i>52</i>
<i>Equipo de laboratorio.....</i>	<i>53</i>

MÉTODOS	54
<i>Cultivo celular</i>	54
<i>Inoculación de ratones C57BL/6 con células TC-1</i>	54
<i>Elaboración de siRNAs liposomales</i>	54
<i>Ensayo de biodistribución</i>	55
<i>Ensayo dosis y tiempo respuesta</i>	55
<i>Extracción de RNA</i>	56
<i>Síntesis de cDNA</i>	56
<i>PCR en tiempo real (qPCR)</i>	57
<i>Extracción de proteína y Western Blot</i>	57
<i>Efecto terapéutico de siRNAs liposomales</i>	58
7.- RESULTADOS	59
BIODISTRIBUCIÓN DE siRNAs-LIPOSOMALES EN RATONES INMUNOCOMPETENTES	59
SILENCIAMIENTO DEL ONCOGÉN E7 DE VPH-16 POR siRNAs LIPOSOMALES EN UN MODELO MURINO INMUNOCOMPETENTE	61
<i>Evaluación de la dosis para el silenciamiento de E7 en la expresión tumoral de mRNA y proteína</i>	61
<i>Evaluación de tiempo para el silenciamiento de E7 en la expresión tumoral de mRNA y proteína</i>	63
EFECTO TERAPÉUTICO DE siRNAs LIPOSOMALES EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER	65
8.- DISCUSIÓN	69
9.- CONCLUSIONES	74
10.- PERSPECTIVAS	74
BIBLIOGRAFIA	75

Índice de Figuras

FIGURA 1. MECANISMO DE RNA DE INTERFERENCIA	13
FIGURA 2. GENES BLANCO PARA EL MECANISMO DE RNAi EN CÁNCER.....	17
FIGURA 3. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN Y PUNTOS CLAVE PARA LA LIBERACIÓN DE siRNAs	19
FIGURA 4. VEHÍCULOS DE LIBERACIÓN DE siRNAs	20
FIGURA 5. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS EN EL DISEÑO DE ACARREADORES	22
FIGURA 6. OBSTÁCULOS EN LA ADMINISTRACIÓN DE siRNAs DE MANERA SISTÉMICA.....	26
FIGURA 7. ESTADÍSTICAS DEL CÁNCER CERVICOUTERINO EN MÉXICO Y EL MUNDO.....	35
FIGURA 8. DESARROLLO DEL CÁNCER CERVICOUTERINO.....	37
FIGURA 9. ESTRUCTURA Y GENOMA DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO	39
FIGURA 10. CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO	40
FIGURA 11. MECANISMO DE ACCIÓN DE E6 Y E7 DE VPH SOBRE LAS PROTEÍNAS P53 Y RB EN EL CICLO CELULAR.....	44
FIGURA 12. LÍNEA DE TIEMPO DE LA INVESTIGACIÓN DE RNAi Y VIRUS DE PAPILOMA HUMANO	47
FIGURA 13. BIODISTRIBUCIÓN DE siRNAs LIPOSOMALES EN EL MODELO DE ESTUDIO.....	60
FIGURA 14. EXPRESIÓN DE mRNA DE E7 VPH-16 EN UN ENSAYO DE DOSIS CON siRNAs LIPOSOMALES.....	62
FIGURA 15. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E7 VPH-16 EN UN ENSAYO DE DOSIS CON siRNAs LIPOSOMALES	62
FIGURA 16. EXPRESIÓN DE mRNA DE E7 VPH-16 EN UN ENSAYO DE TIEMPO CON siRNAs LIPOSOMALES	64
FIGURA 17. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E7 VPH-16 EN UN ENSAYO DE TIEMPO CON siRNAs LIPOSOMALES.....	64
FIGURA 18. EFECTO TERAPÉUTICO DE siRNAs LIPOSOMALES EN EL VOLUMEN TUMORAL	66
FIGURA 19. EFECTO TERAPÉUTICO DE siRNAs LIPOSOMALES EN EL PESO DEL TUMOR.....	67
FIGURA 20. EFECTO TERAPÉUTICO DE siRNAs LIPOSOMALES EN LA EXPRESIÓN DE mRNA Y PROTEÍNA DE E7	68

Abreviaturas

ApoB	Apolipoproteína B
ATP	Trifosfato de adenosina
CaCu	Cáncer cervicouterino
CDK	Cinasa dependiente de ciclinas
cDNA	DNA complementario
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPC	1,2-dioleo-sn-glicero-3-fosfocolina
DOSPA	2,3-dioleoloxi-N-[2-(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-propanaminio trifluoroacetato
DOTAP	1,2-dioleo-3-trimetilamonio-propano
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoloxi)propil]-N,N,N-trimetilamoniocloruro
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dsRNA	RNA de doble cadena
E6-AP	Proteína de unión a E6
EphA2	Receptor efrina tipo A2
FAK	Cinasa de adhesión focal
FBS	Suero fetal bovino
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mRNA	RNA mensajero
miRNAs	microRNAs
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
Rb	Retinoblastoma
RdRPs	RNA polimerasas dependientes de dsRNA
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RITS	Silenciamiento transcripcional inducido por RNA
RNAi	RNA de interferencia
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
siRNAs	RNAs cortos de interferencia
siRNAs-L	RNAs cortos de interferencia liposomales
TBS-T	Tris buffer salino y tween 20
TLRs	Receptores tipo Toll
VEFG	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPH	Virus de papiloma humano

Resumen

El mecanismo de RNA de interferencia se encuentra altamente conservado en la naturaleza y consiste en un silenciamiento génico post-transcripcional inducido por RNAs de doble cadena. A partir de su descubrimiento ha sido ampliamente utilizado para la búsqueda de funciones asociadas a genes así como para reducir o bloquear la expresión de genes que se encuentren alterados o sobreexpresados y que estén ligados al desarrollo de las enfermedades. De manera que la terapia por RNAi utilizando los llamados RNAs cortos de interferencia se convierte en una alternativa creando oportunidades de tratamiento para un diverso grupo de enfermedades entre ellas el cáncer. No obstante, el desarrollo de un método de liberación sistémica eficaz y seguro ha limitado su implementación en la clínica.

En el presente trabajo se evaluó el potencial terapéutico antitumoral de liposomas neutros diseñados por nuestro equipo de trabajo utilizando como modelo de estudio un modelo murino de cáncer de cérvix. Para ello se hizo uso de la línea celular TC-1 la cual expresa los oncogenes E6 y E7 del Virus de Papiloma Humano.

Se analizó su biodistribución y se efectuaron ensayos de dosis y tiempo respuesta en ratones que portaban tumor a fin de estandarizar el silenciamiento del oncogén E7 y establecer los parámetros para la realización de ensayos terapéuticos. Los resultados indican que el sistema liposomal puede distribuirse en el organismo alcanzando tumor y otros órganos. Y dosis de 40 μ g administradas vía intravenosa dos veces por semana durante dos semanas dan como resultado una inhibición en el crecimiento tumoral disminuyendo la expresión de mRNA y proteína de E7 de VPH.

Abstract

RNA interference mechanism is highly conserved in nature and consisted in a post-transcriptional gene silencing induced by double stranded RNA. Since its discovery it has been widely used for search functions associated to genes as well as to reduce or block the expression of genes that are overexpressed or altered and that are linked to the development of diseases. In manner that RNAi therapy using small interfering RNAs becomes an alternative creating opportunities of treatment for a diverse group of diseases including cancer. However, the development of an effective and safe method of systemic delivery has limited its implementation in the clinic.

In this work, the antitumor therapeutic potential of neutral liposomes designed by our working team using a mouse model of cervical cancer was evaluated. We made use of the TC-1 cell line which expresses E6 and E7 oncogenes of Human Papilloma Virus type 16.

Biodistribution was analyzed and dose and time response assays in mice bearing tumor to standardize silencing the oncogene E7 and set the parameters for performing therapeutic trials were conducted. The results indicated that liposomal system can be distributed in the body reaching tumor and other organs. Doses of 40 μg of siRNAs administered intravenously twice a week for two weeks results in an inhibition in tumor growth decreasing both mRNA and protein expression E7 of HPV-16.

1.- INTRODUCCIÓN

El descubrimiento del RNA de interferencia (RNAi, por sus siglas en inglés *RNA interference*) como un potente mecanismo de silenciamiento génico representa actualmente una serie de oportunidades para el estudio de la función de genes pero principalmente se visualiza como una estrategia terapéutica la cual esta siendo evaluada en diversos ensayos clínicos.

El mecanismo de RNA de interferencia tiene lugar en el citoplasma de la célula donde moléculas de RNA de doble cadena de 19-21 pares de bases (pb) conocidos como RNAs cortos de interferencia (siRNAs, por sus siglas en inglés *small interfering RNA*) son capaces de inducir la formación de un complejo denominado RISC (*RNA induced silencing complex*) y guiar la degradación de un mRNA con secuencia complementaria.

A pesar de que diversas terapias están siendo puestas a prueba para ciertas enfermedades, un punto clave en la investigación para el uso de siRNAs en aplicación clínica, es el desarrollo de un método seguro que permita su administración de manera sistémica para poder sobrellevar las limitaciones derivadas de sus características físicas y químicas como son: un elevado peso molecular (13 kDa) y su fuerte carga iónica (40 cargas negativas) lo que ocasiona su difícil acceso a la membrana celular. La incorporación de siRNAs en acarreadores como liposomas, nanoparticulas, micelas, dendrímeros y nanotubos de carbón, entre otros, constituye la etapa clave para su implementación en terapia. Estos acarreadores deben estar diseñados para cumplir con ciertas características y sobrellevar diversas limitaciones en su utilización. Deben estar orientados no solo a la necesidad de internalización, liberación y acumulación en citoplasma sino en la interacción con componentes sanguíneos que puedan limitar su biodistribución.

Un área de interés a tratar con siRNAs es el relacionado con el desarrollo del cáncer. El diseño de siRNAs específicos para el silenciamiento de genes que se relacionen con el progreso de la enfermedad como los involucrados en proliferación, angiogénesis, metástasis

y resistencia a quimioterapias, entre otros, constituyen blancos potenciales para el uso de RNA de interferencia.

El cáncer cervicouterino (CaCu) representa uno de los mayores problemas a nivel mundial. Es por ello que haciendo uso de las ventajas que pudiera representar el uso de interferentes se han diseñado siRNAs contra los oncogenes del Virus de Papiloma Humano (VPH) con la finalidad de evaluar su silenciamiento y su efecto en el desarrollo de tumores. La capacidad oncogénica del virus radica en la expresión de los oncogenes E6 y E7, los cuales codifican para proteínas del mismo nombre y actúan uniéndose a reguladores importantes del ciclo celular, siendo capaces de transformar a las células y conferirles su malignidad, representando por lo tanto un blanco terapéutico atractivo.

Basados en el diseño reportado por nuestro grupo de trabajo (Landen *et al* 2005) de un vehículo acarreador conformado por liposomas neutros que ha mostrado ser un sistema de liberación eficiente en ratones inmunocomprometidos (NCr-*nu*) con una adecuada presencia de los complejos de silenciamiento en células tumorales así como distribución citoplasmática en hígado, riñón y pulmón y probados para inhibir la expresión de genes como EphA2, survivina y FAK. En este trabajo se analizó la biodistribución del sistema liposomal en un modelo murino inmunocompetente (C57BL/6), se estandarizó el silenciamiento del oncogén E7 de VPH-16 *in vivo* y se evaluó su efecto terapéutico antitumoral a fin de continuar con la caracterización del sistema.

2.- ANTECEDENTES

Terapia Génica

La terapia génica es considerada una de las herramientas con mayor potencial de desarrollo para el tratamiento de las enfermedades en los últimos años. Esta es definida como: La transferencia de material genético a las células de un individuo. Buscando que la introducción de un gen “normal” pueda sustituir o modular la función de un gen “defectuoso” en el organismo. De manera que se reestablezca una función celular abolida o incorrecta, se introduzca una nueva función o se interfiera con una ya existente (Ruiz Castellanos 2005).

En un inicio su empleo se centro en las enfermedades hereditarias monogénicas, sin embargo, este concepto ha sido ampliado a un aspecto más general que involucra cualquier estrategia que emplee el uso de material genético con fines terapéuticos a fin de prevenir o curar enfermedades que estén dadas por alteraciones génicas somáticas o multifuncionales, por lo que actualmente se utiliza como estrategia para el tratamiento de diferentes enfermedades hereditarias, enfermedades infecciosas, autoinmunes, cáncer, entre otras. Siendo este último quien ocupa la mayor parte de los ensayos clínicos en esta área (Vera Lastra 2006).

Se sabe que las alteraciones genéticas desempeñan un papel esencial en la patogenia de ésta enfermedad, lo que hace al uso de la terapia génica una herramienta prometedora para su tratamiento, dando lugar a lo que se conoce como *Terapia génica del cáncer*.

Los avances en este campo incluyen inmunoterapia, reemplazo de genes supresores, genes suicidas, inhibición de oncogenes, supresión tumoral y quimioprotección. Se ha demostrado en los últimos años la eficacia de la aplicación de la terapia génica en cáncer mediante el uso de RNAs interferentes para inhibir la sobreexpresión de genes que estén relacionados con el desarrollo de la enfermedad lo que da lugar al desarrollo de nuevas oportunidades terapéuticas.

RNA de Interferencia

Se le conoce como RNA de interferencia al mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional inducido por RNAs de doble cadena de manera específica de secuencia (Fire *et al* 1998).

Es un mecanismo propio de la célula, el cual puede activarse de manera endógena por la producción de microRNAs (miRNAs), la introducción de RNAs largos de doble cadena (dsRNA, por sus siglas en inglés *doublestranded*) provenientes de virus o la liberación de fragmentos pequeños de RNA doble (siRNAs) sintetizados químicamente. Se encuentra presente en plantas, levaduras, insectos, peces y mamíferos. Se determinó primeramente como mecanismo de defensa antiviral en plantas de tabaco y se observó posteriormente en la especie *Petunia hybrida* donde fue denominado como mecanismo de co-supresión o silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, por sus siglas en inglés *Post-transcriptional gene silencing*) (Napoli *et al* 1990; Ratcliff *et al* 1997). Fue descrito por Andrew Fire y Craig Mello en 1998 quienes al trabajar con el nemátodo *Caenorhabditis elegans* reportaron que al hacer uso de RNAs de doble cadena homólogos en secuencia al gen blanco era posible evitar la expresión de este al interferir con la traducción de su mRNA (Fire *et al* 1998; Montgomery *et al* 1998).

Este mecanismo de regulación genética tiene un papel fundamental en diversos procesos celulares como: regulación de la expresión de genes durante el desarrollo, en la diferenciación celular, protección frente a infecciones virales y es capaz de evitar la integración de elementos transponibles (Rodríguez 2007). Actualmente está siendo utilizado para: biotecnología alimentaria, determinar la función de un gen en particular, interferir la expresión de genes de patógenos, búsqueda de blancos farmacéuticos y en terapia (Hannon & Rossi 2004).

1) *Mecanismo de RNA de interferencia*

El mecanismo de RNA de interferencia inicia con la entrada de moléculas largas de RNA de doble cadena en el citoplasma de la célula. Estas son reconocidas por una enzima denominada Dicer la cual las corta en fragmentos más pequeños que se caracterizan por tener un tamaño aproximado de 19-21 pb con dos nucleótidos no apareados en los extremos y a los que se les conoce como RNAs cortos de interferencia (siRNAs). Estos inducen el reclutamiento y formación de un complejo denominado RISC (por sus siglas en inglés y traducido al español como Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA) el cual posee actividad de helicasa, nucleasa y polimerasa que se une a los siRNAs y en presencia de ATP separa ambas cadenas seleccionando solamente una de ellas, generalmente la cadena antisentido o hebra guía (esto con base en estabilidad termodinámica) y al que se le conoce ahora como RISC activado. La cadena guía permanece asociada al complejo y es utilizada para unirse al mRNA blanco. Si la complementariedad es del 100% se induce un corte en la región central del RNA duplex aproximadamente 10 nucleótidos río arriba del extremo 5' de la hebra antisentido dando lugar a su degradación. En caso de no ser 100% complementario RISC se quedara unido a la cadena de mRNA interfiriendo con el paso de los ribosomas. En cualquiera de las dos situaciones se tiene como resultado la inhibición de la traducción y por consiguiente la inhibición en la expresión de la proteína (Hannon 2002).

En *C. elegans* ha sido reportada la existencia de RNA polimerasas dependientes de dsRNA (RdRPs, por sus siglas en inglés *RNA-dependent RNA polymerases*) responsables de amplificar el mecanismo de RNAi. Este fenómeno se ha denominado RNAi transitivo y está dado por la amplificación de las cadenas dobles de RNA original mediante la síntesis complementaria de su secuencia. Esta polimerasa utiliza como molde el mRNA fragmentado para producir un nuevo dsRNA que es capaz de ser reconocido por Dicer para dar inicio nuevamente al mecanismo de interferencia. De manera que unas pocas moléculas de dsRNA dan origen a cientos de ellas (Alder *et al* 2003; Sijen *et al* 2001). A la fecha no se ha encontrado actividad de RNA polimerasas dependientes de RNA en células de mamífero.

Otro aspecto importante del mecanismo de RNAi es su papel en la remodelación de la cromatina. Este mecanismo es utilizado por el organismo para la organización y mantenimiento del genoma. Su formación parece generar silenciamiento transcripcional en respuesta a la expresión de transcritos centroméricos repetidos, transgenes o transposones. Este efecto se ha visto principalmente en *Schizosaccharomyces pombe* donde se ha reportado la formación de un complejo denominado RITS (por sus siglas en inglés *RNA induced transcriptional silencing*) al cual se unen Chp1, una proteína de unión a centrómero, necesaria para la metilación de la histona H3 lisina 9 y la proteína Tas3 de función desconocida. Este mecanismo no se ha descrito completamente (Volpe *et al* 2002; Verdel *et al* 2004).

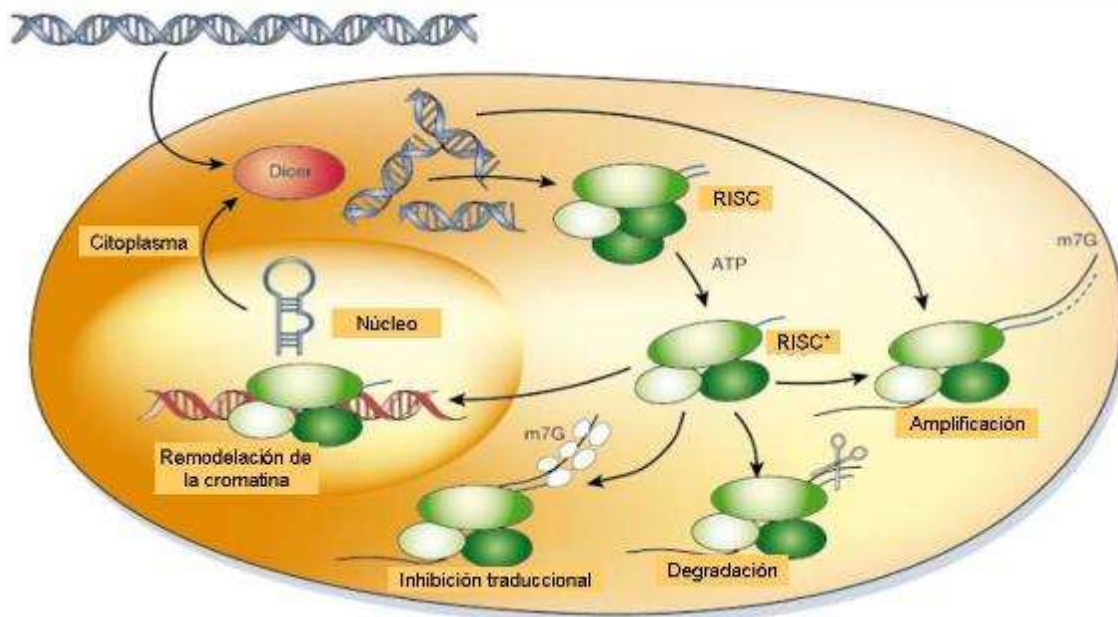


Figura 1. Mecanismo de RNA de interferencia (Modificado de Hannon 2002)

Aplicaciones del RNA de interferencia

El RNAi ha resultado de gran importancia en los campos de la biología molecular, fisiología, virología y genética. Su implementación se ha enfocado en dilucidar el efecto del silenciamiento selectivo de genes en células de mamífero tanto *in vitro* como *in vivo* determinando su función por medio de su inhibición y analizando los cambios fenotípicos o de respuesta. Es también en el área de biotecnología y medicina una herramienta prometedora. En farmacéutica representa un aspecto altamente importante al tener la posibilidad de utilizarse como “fármaco” y dirigirse a blancos que son poco tratables con medicamentos convencionales (Shehata 2014).

Algunas de las aplicaciones del RNAi han sido en:

1) Biotecnología

El empleo del mecanismo de RNA de interferencia en biotecnología ha estado enfocado a su aplicación en el mejoramiento de cultivos particularmente en el diseño de plantas alimenticias. Considerando que los cambios producidos son heredables y se obtiene un fenotipo y genotipo estable, se han desarrollado modificaciones en el material genético de diversas especies vegetales que han sido de gran utilidad. Esto para la obtención de plantas resistentes a virus, mayor calidad de aceites vegetales y para mejoras nutricionales. Por ejemplo, se ha utilizado RNAi para la producción de cepas de algodón cuyas semillas posean niveles bajos de toxinas y puedan ser aptas para el consumo humano (Sunilkumar *et al* 2006). Así como plantas de tomate con niveles reducidos de alérgenos (Le *et al* 2006) y disminución en la producción de precursores de carcinógenos en el tabaco (Gavilano *et al* 2006). Se prevé en un futuro la posibilidad de seguir utilizando esta herramienta biotecnológica con el propósito de evaluar mecanismos que involucren regulación de señales que estén relacionadas con mecanismos de homeostasis, estrés hídrico y radiación UV.

2) *Genómica funcional*

Estudios genómicos a gran escala y diseños de bibliotecas basadas en RNAs interferentes son unos de los proyectos con mayor auge en las empresas farmacéuticas. El RNAi en sistemas experimentales permite esclarecer la función de genes determinados. Esto puede realizarse mediante técnicas basadas en microarreglos no convencionales que en combinación con un conjunto de siRNAs permiten la realización de estudios amplios del genoma dando lugar al desarrollo de nuevas tecnologías que permitan identificar factores clave que jueguen un papel importante en procesos biológicos poco estudiados.

3) *Medicina*

➤ RNA de interferencia en terapia

Una de las aplicaciones más relevantes y con más importancia del mecanismo de RNA de interferencia es su implementación en terapia. Se define como una forma de “medicina molecular” enfocada en introducir en células blanco moléculas de siRNAs con la finalidad de suprimir la expresión de genes que estén en relación con el desarrollo de la enfermedad. Se ha empleado en el tratamiento de enfermedades metabólicas, desordenes genéticos, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades virales (Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y Hepatitis C) y cáncer (Nakamura *et al* 2009; Stevenson 2004).

Actualmente están registrados casi 40 estudios relacionados a RNAi con la finalidad de ofrecer un tratamiento para diversos tipos de padecimientos. Diversos estudios en fase clínica se han enfocado en Bcl-2, c-Myc, RAS, ApoB, Her2, entre otros (NIH 2015).

Table 1. Clinical trials for RNAi therapy. Information obtained from <http://clinicaltrials.gov>, <http://alnylam.com>, and <http://tekmirapharm.com>

siRNA product	Target	Disease	Company	Stage
AGN211745	VEGFR1	AMD	Allergan Inc. (Irvine, CA) Sirna Therapeutics Inc. (Whitehouse Station, NJ)	Completed. Phase II
ALN-PCS	PCSK9	Hypercholesterolemia	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	Active. Phase I
ALN-RSV01	Nucleocapsid	Respiratory syncytial virus infection	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	Completed. Phase II
ALN-TTR01	TTR	TTR amyloidosis	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	Active. Phase I
ALN-VSP	VEGF	Liver cancer	Alnylam Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	Completed. Phase I
Atu027	PKN3	Advanced solid tumors	Silence Therapeutics (London, UK)	Active. Phase I
Bevasiranib	VEGF	AMD	Opko Health Inc. (Miami, FL)	Terminated. Phase III
Bevasiranib	VEGF	Diabetic macular edema	Opko Health Inc. (Miami, FL)	Completed. Phase II
CALAA-01	RRM2	Solid tumors	Calando Pharmaceuticals (Pasadena, CA)	Active. Phase I
ISNP (QPI-1002)	p53	Acute kidney injury	Quark Pharmaceuticals (Fremont, CA)	Completed. Phase I
ISNP (QPI-1002)	p53	Delayed graft function in kidney transplantation	Quark Pharmaceuticals (Fremont, CA)	Active. Phase I, II
NCT00672542	LMP2 MP7 MECL1	Metastatic melanoma	Duke University (Durham, NC)	Active. Phase I
PRO-040201	ApoB	Hypercholesterolemia	Tekmira Pharmaceuticals Corp. (British Columbia, Canada)	Terminated. Phase I
QPI-1007	Caspase 2	Chronic optic nerve atrophy	Quark Pharmaceuticals (Fremont, CA)	Active. Phase I
RTP8011-14	DDIT4	AMD	Quark Pharmaceuticals (Fremont, CA)	Active. Phase II.
siG12D LODER	KRAS	Pancreatic cancer	Silenseed Ltd. (Jerusalem, Israel)	Active. Phase I
SYL040012	ADRB2	Glaucoma	Sylentis, S.A. (Madrid, Spain)	Active. Phase I, II
TD101	Keratin 6a	Pachyonychia congenita	Pachyonychia Congenita Project (Salt Lake City, UT)	Completed. Phase I
TKM-PLK-1	PLK1	Solid tumors	Tekmira Pharmaceuticals Corp. (British Columbia, Canada)	Active. Phase I

ADRB2: 2 adrenergic receptors; AMD: age-related macular degeneration; ApoB: apolipoprotein B; DDIT4: DNA-damage-inducible transcript 4; LMP2, LMP7, MECL1: immunoproteasome subunit; PCSK9: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PKN3: protein kinase N3; PLK1: polo-like kinase 1; RRM2: ribonucleotide reductase M2 subunit; TTR: transthyretin; VEGF: vascular endothelial growth factor; VEGFR1: vascular endothelial growth factor receptor 1.

Tabla 1. Ensayos clínicos para RNAi en terapia (Suk 2012)

➤ RNA de interferencia y Cáncer

La implementación de RNAs de interferencia en cáncer constituye una herramienta novedosa debido a que diversas investigaciones están enfocadas en diseñar siRNAs que inhiban de manera importante la expresión de moléculas involucradas en el inicio y progresión del tumor. El entendimiento de las vías moleculares en la carcinogénesis permite el empleo de RNAs interferentes dentro de estas rutas y esto conlleva a la inhibición en la expresión de elementos clave en este padecimiento tales como moléculas involucradas en angiogénesis, proliferación,

apoptosis, resistencia a quimioterapias y metástasis. Aprobada por la *US Food and Drug Administration* (FDA) se ha utilizado como una herramienta efectiva de silenciamiento y muestra gran potencial en estudios clínicos. Mediante el empleo de siRNAs se han podido identificar genes que tienen participación en las distintas etapas del desarrollo tumoral. Por lo que se considera una alternativa para el tratamiento del cáncer en combinación con quimioterapias mediante el silenciamiento de genes sobreexpresados en células tumorales (Phalon *et al* 2010).

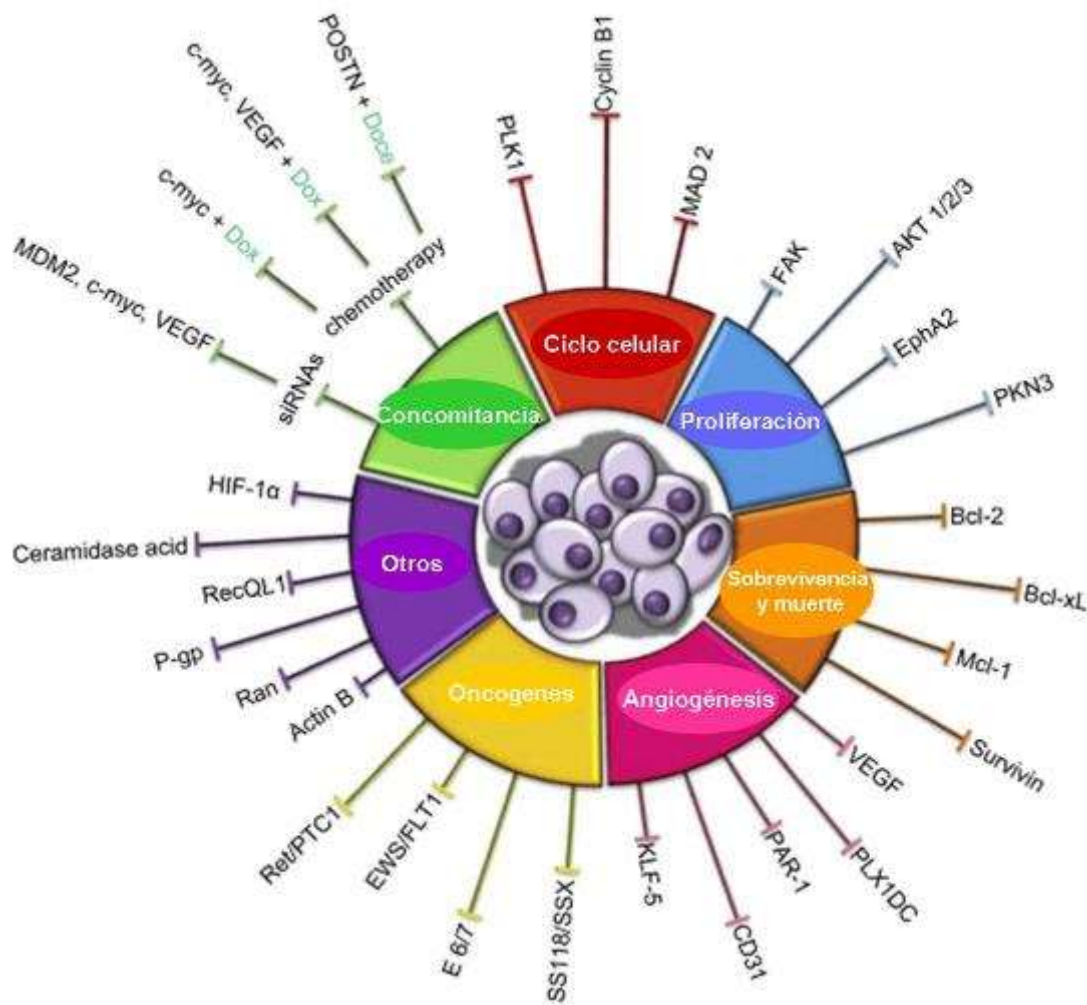


Figura 2. Genes blancos para el mecanismo de RNAi en cáncer (Modificado de Resnier 2013)

Implementación de siRNAs en la clínica

A pesar de la gran alternativa que los siRNAs pudieran representar en el tratamiento de las enfermedades; la poca estabilidad biológica, su limitada entrada en las células y el no contar con un sistema de liberación apropiado limitan su aplicación en la clínica.

Las moléculas de siRNAs en su forma nativa son poco estables en sangre y son rápidamente eliminadas de circulación vía degradación por las endonucleasas del suero, reconocimiento por moléculas del sistema reticuloendotelial o debido a una rápida excreción renal. Así mismo se ha determinado que debido a su tamaño (7nm), elevado peso molecular (13kDa) y su carga negativa (40 cargas negativas), los siRNAs no pueden cruzar fácilmente la membrana celular. Como consecuencia no permanecen en circulación el tiempo suficiente para llegar a su sitio de acción además que sus características no son propias para un silenciamiento efectivo, por lo que se requieren vehículos de administración seguros y eficientes que protejan a los siRNAs en sangre y les permitan llegar y ser liberados a las células blanco (Kim *et al* 2009; Shehata 2014).

A pesar de los reportes existentes de una liberación “exitosa” *in vivo* mediante el uso de inyecciones hidrodinámicas en ratones, esta estrategia no es aplicable a estudios humanos, por lo que debe buscarse la aplicación de estrategias factibles clínicamente que representen un progreso en el desarrollo de terapias basadas en RNAi.

1) Vehículos de liberación o acarreadores

El uso de RNAs interferentes como agentes terapéuticos requiere de un sistema acarreador que permita su empleo no solo mediante una aplicación local sino principalmente por administración sistémica para ser capaz de llegar a cualquier órgano del cuerpo donde se desarrolle la enfermedad. Esta liberación sistémica de los siRNAs debe superar ciertos obstáculos tanto fuera como dentro de las células para poder ejercer su función.

Las consideraciones en el desarrollo de vehículos acarreadores deben estar enfocadas a características relacionadas a incrementar el tiempo en circulación y su internalización en las células del tejido blanco como lo son: Protección de los siRNAs, evadir su agregación a proteínas séricas, evitar su degradación enzimática, impedir que sufra excreción renal de manera rápida, no ser reconocido por el sistema fagocítico, asegurar una biodistribución efectiva, paso a través de la matriz extracelular, interacción y entrada a las células blanco, escape del sistema endocítico, liberación del vehiculo transportador y toma por el complejo RISC (Kim *et al* 2009; Suk *et al* 2012).

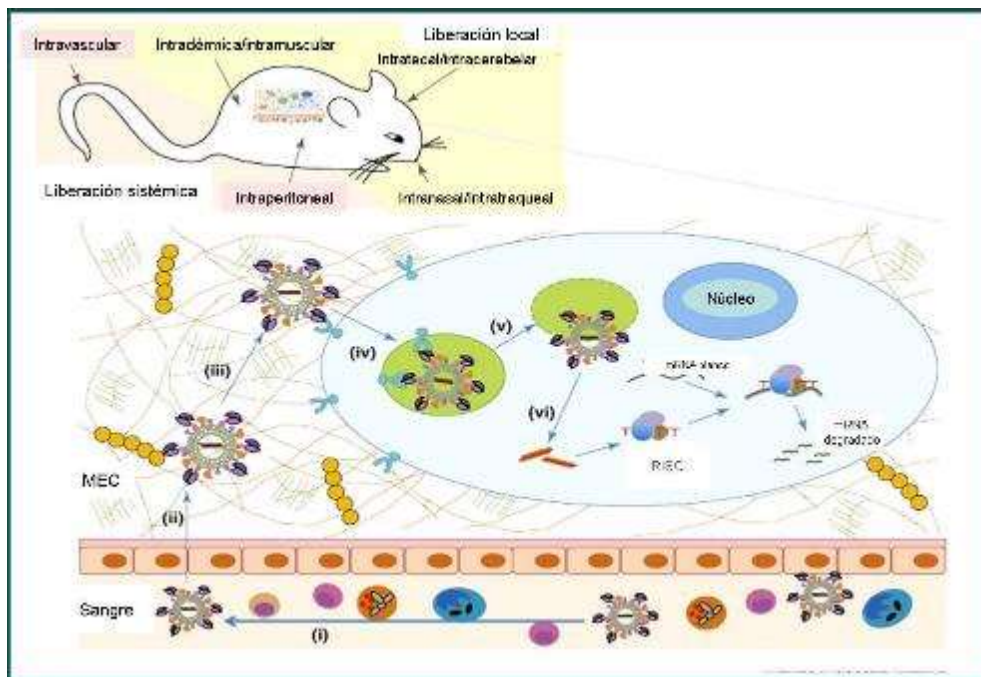


Figura 3. Vías de administración y puntos clave para la liberación de siRNAs (Kim 2009)

De igual manera un vehículo de liberación eficiente debe cumplir con ciertos requisitos:

- 1) No tóxico
- 2) Tener la carga adecuada para su transporte
- 3) Biodegradable
- 4) No activar respuesta inmune (Saad *et al* 2009)

Estudios recientes están enfocados en el desarrollo de acarreadores que cumplan con estas características. Se han diseñado una variedad de sistemas que promuevan la liberación *in vivo* de los siRNAs. Incluyendo nanopartículas, nanotubos de carbón, polímeros catiónicos, sistemas lipídicos, moléculas fusionadas a anticuerpos, micelas y dendrímeros, entre otros.

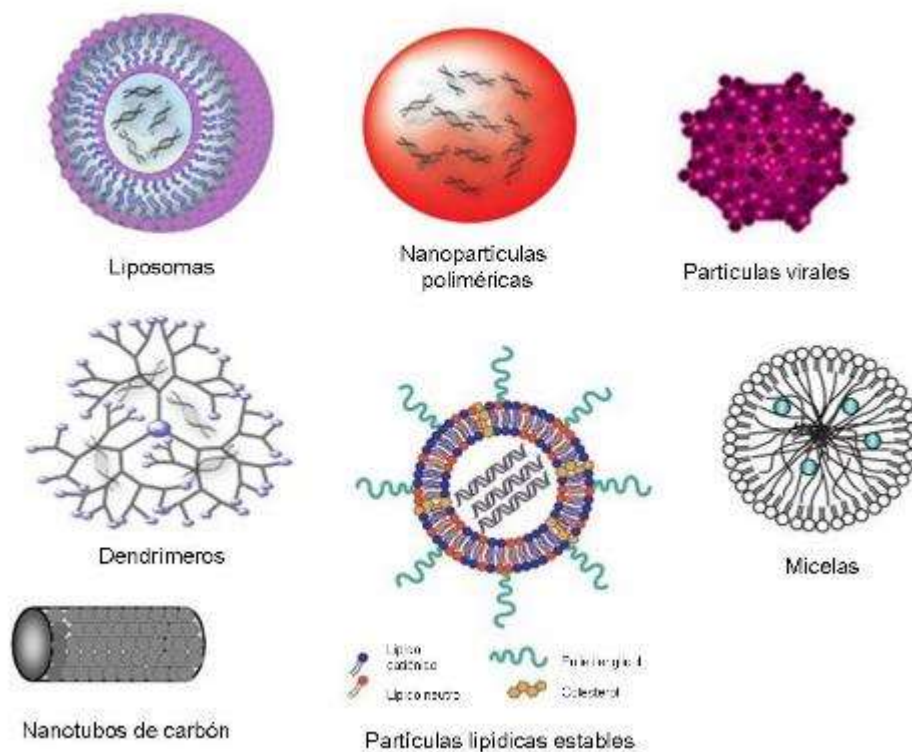


Figura 4. Vehículos de liberación de siRNAs

2) *Propiedades de los acarreadores*

El diseño óptimo de un vehículo acarreador determinara su efectividad en la entrega de siRNAs a las células blanco. Cada sistema acarreador poseerá características únicas de biodistribución, toxicidad, toma celular e interacción con otros componentes.

Las propiedades de los acarreadores estarán determinadas de acuerdo a su:

➤ Tamaño

Partículas de un tamaño inferior a 20 nm son rápidamente eliminadas por excreción renal y partículas superiores a los 200 nm son reconocidas por el sistema fagocítico mononuclear. Sistemas acarreadores cuyo tamaño oscile alrededor de los 100 nm se considera pueden superar estas limitaciones. No obstante resultados satisfactorios se han logrado con acarreadores de diversos tamaños.

➤ Composición y carga

La carga superficial de un acarreador es también un parámetro crítico a considerar. Acarreadores con cargas positivas pueden ser atraídos fácilmente a la membrana de las células sin embargo son más propensos a interactuar con las proteínas plasmáticas de carga negativa lo que da lugar a la formación de agregados que pueden fácilmente ser reconocidos por el sistema inmune restringiendo su efecto de liberación. Compuestos con cargas negativas difícilmente interactuarán con la membrana previniendo su entrada en las células. El uso de componentes con cargas neutras o ligeramente positivas limitaría estos problemas.

➤ Estabilidad y funcionalidad

Para sobrellevar las limitantes de cargas positivas en los acarreadores, el enmascaramiento de estas por el uso de polímeros u otros compuestos proporciona estabilidad al acarreador en circulación. Así mismo la adición de anticuerpos o moléculas afines a receptores en la membrana celular en la superficie de los acarreadores dirigiría a estos a un tipo de célula en especial confiriéndoles especificidad y evitando efectos fuera de blanco.

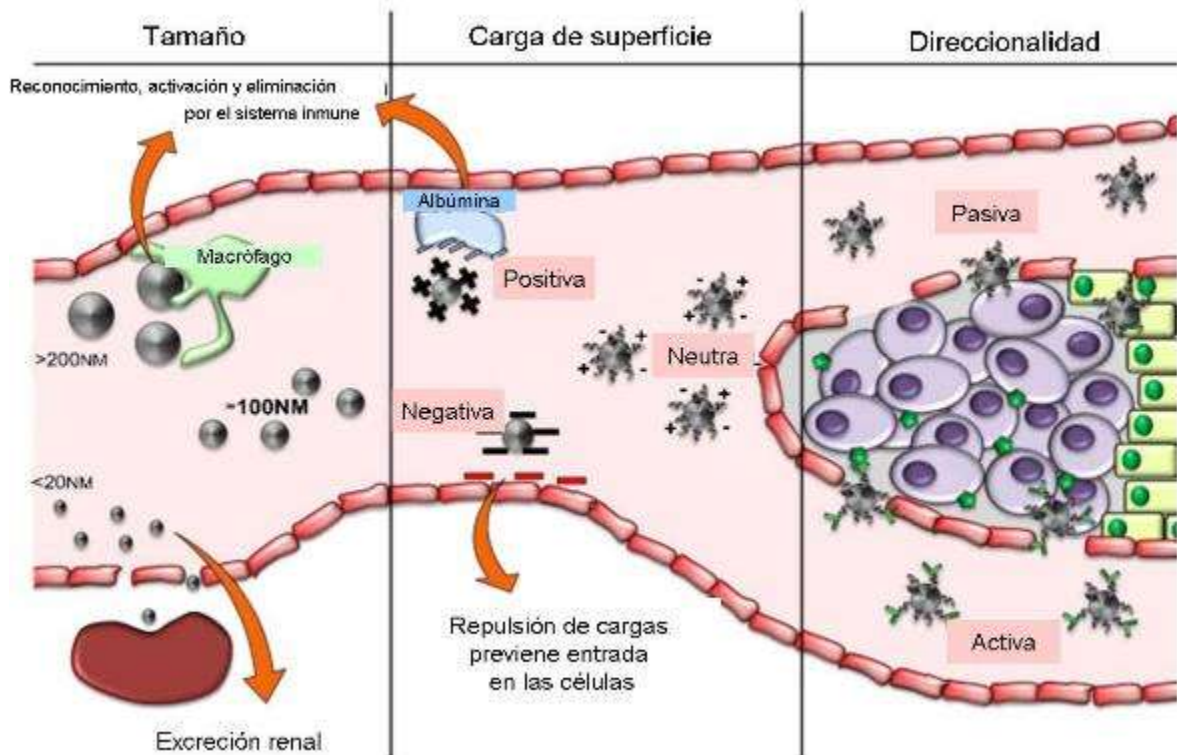
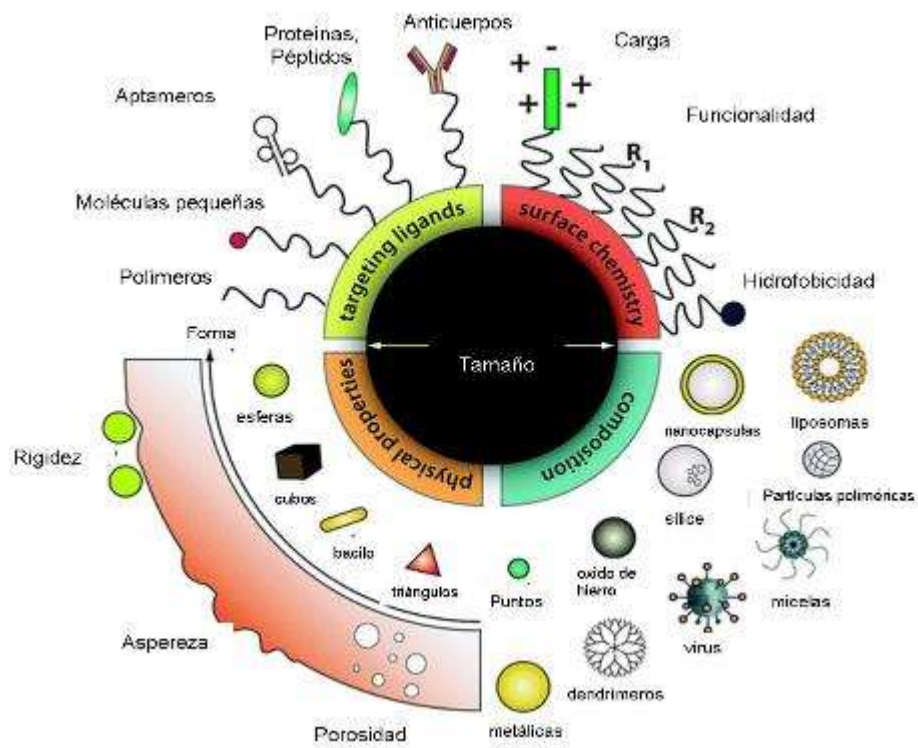


Figura 5. Parámetros físico-químicos en el diseño de acarreadores (Modificado de Resnier 2013).

3) *Barreras en la biodistribución de siRNAs*

Existen diversas barreras fisiológicas que los acarreadores de siRNAs deben atravesar para alcanzar su sitio de acción

➤ **En torrente sanguíneo**

De las mayores limitantes para hacer uso de siRNAs en el tratamiento de las enfermedades es que no se cuenta con un vehículo acarreador que pueda administrarse de manera sistémica. La mayoría de los acarreadores diseñados y probados en estudios clínicos y experimentales se administran de manera local y esto debido a las limitantes establecidas para los vectores-siRNAs en sangre.

Una de las primeras barreras fisiológicas una vez administrados los siRNAs es la actividad de las nucleasas en suero. La principal nucleasa sérica es una exonucleasa 3'. La vida media en suero reportada para siRNAs no modificados varía desde minutos a 1 hora. Por otro lado, una vez que los vehículos de liberación ingresan a torrente sanguíneo estos pueden ser blancos de unión para proteínas del suero como albúmina, lipoproteínas y opsoninas quienes juegan un papel importante en su reconocimiento y posterior eliminación por macrófagos del sistema retículo endotelial; el cual representa otra de las limitantes en la aplicación sistémica (White 2008; Cong-fei 2014). Un buen vehículo de liberación debe ser capaz de evitar su reconocimiento por estas moléculas para prolongar su vida media y llegar a los sitios donde se encuentra el padecimiento a tratar.

➤ **Filtración renal**

Otra de las limitaciones en la administración vía sistémica es su rápida eliminación. Diversos estudios *in vivo* han reportado una mayor acumulación de los complejos acarreadores en riñón. Partículas con un diámetro de 5 nm y pesos moleculares de aproximadamente 50 kDa están sujetos a una rápida eliminación renal. Se requieren vehículos de liberación con el tamaño y

peso apropiados que incrementen el tiempo de retención de siRNAs y puedan evitar el ser rápidamente eliminados y permanecer en circulación (Zhou *et al* 2014).

➤ **Biodistribución a través del endotelio vascular**

El paso del torrente sanguíneo a los diferentes tejidos a través del endotelio vascular es otra de las barreras que debe ser superada por los vehículos de liberación. Diversas características propias de los acarreadores como tamaño, carga, composición e hidrofobicidad juegan un papel importante en la biodistribución de estos hacia los diversos órganos del cuerpo. En general, moléculas mayores a 5 nm no son capaces de atravesar el endotelio vascular y permanecen en circulación hasta ser eliminados por el organismo. Así mismo partículas con cargas negativas son removidas más rápidamente que partículas con cargas positivas.

En tumores se ha reportado que la vascularización presenta características diferentes en comparación a tejidos sanos tales como mayor número de vasos sanguíneos, un pobre drenaje linfático, mayor permeabilidad inducida por mediadores vasculares y un endotelio discontinuo donde pueden encontrarse fenestraciones lo suficientemente grandes que permitan el paso de moléculas de diversos tamaños y estas condiciones facilitarían su acumulación dentro del tumor, un fenómeno conocido como “Efecto de permeabilidad y retención” reportado por Maeda *et al* en el 2001, algo favorable para la aplicación clínica de estos compuestos (Cong-fei 2014).

➤ **Interacción con matriz extracelular**

Cuando los vehículos de liberación han podido salir de circulación y atravesar el endotelio vascular, estos deben interactuar y pasar a través de la matriz extracelular antes de llegar a la superficie de las células. Esta matriz extracelular puede crear resistencia para el transporte de los acarreadores evitando su llegada al sitio blanco.

➤ **Entrada a las células blanco**

Debido a la carga negativa de la membrana celular y en ocasiones debido también a la carga negativa de los acarreadores utilizados es poco probable que estos puedan ingresar a la célula. Solo aquellos con carga positiva podrían ser atraídos hacia la membrana por interacción de cargas y permitir su entrada. Para sobrellevar estas limitaciones se han creado acarreadores específicos los cuales poseen anticuerpos, péptidos, aptameros y/o moléculas pequeñas que pueden interactuar con receptores en la membrana celular para facilitar y promover su unión y entrada a las células. De igual manera pueden ser dirigidos para acumularse únicamente en células tumorales esto mediante la adición de marcadores o ligandos que sean expresados solamente en tumor (Suk *et al* 2012).

➤ **Escape endosomal**

La mayoría de los compuestos entran a la célula por endocitosis. Un aspecto importante a considerar una vez que los acarreadores están dentro de la célula es su escape del endosoma, ya que si estos no son liberados a tiempo seguirán la ruta endosomal hasta convertirse en endosomas tardíos y posteriormente serán degradados sin haber liberado su contenido; lo que ocasionaría que no se llevara a cabo el mecanismo de interferencia a pesar de que los interferentes hayan ingresado a la célula. Algunas partículas poliméricas se reporta que pueden sobrellevar estas condiciones de pH ácido y el medio ambiente lisosomal contribuiría a provocar un cambio osmótico que resulte en la ruptura del acarreador y escape de los siRNAs cargados (Cho 2003).

➤ **Activación del sistema inmune**

Los acarreadores están expuestos a las proteínas del plasma y células del sistema inmune durante todo su recorrido por el organismo. Estos pueden ser reconocidos por macrófagos, células dendríticas o proteínas del complemento y despertar una cascada de reacciones inmunológicas que no sería adecuada para su implementación. Se ha reportado que la

utilización de altas cantidades de siRNAs resulta en la activación de respuestas inmunes innatas y la producción de citocinas *in vitro* e *in vivo*.

Receptores RIG-1 (*retinoic acid- inducible gene 1*), PKR (*dsRNA dependent proteína kinase R*), MDA5 (*Melanoma differentiation associated proteína 5*) y receptores TLR (*Toll like receptor*) como TLR-3, TLR-7, TLR8 y TLR-9 localizados en la membrana endosomal están involucrados en el reconocimiento de cadenas de RNA. Se determinó primeramente que el largo de las cadenas dobles de RNA podía despertar una respuesta inmunológica por medio de la activación de PKR y RIG-1. Posteriormente se ha estipulado que ciertos motivos en la secuencia de las cadenas de los siRNAs pueden llevar a la activación de una respuesta inmunológica a través de la activación de los TLRs. La activación de estos receptores conlleva a la producción de interferones y citocinas (Sledz 2003; Judge 2005; Whitehead *et al* 2011). Esta respuesta inmune se ha analizado en diversos estudios experimentales para lograr que pueda ser vista como una manera benéfica de contribuir al efecto de silenciamiento.

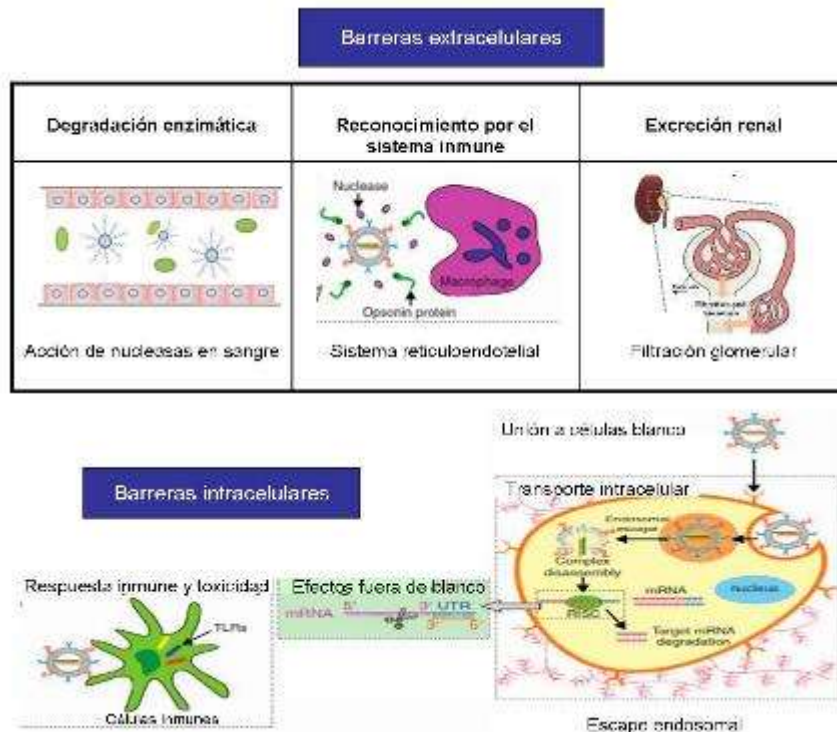


Figura 6. Obstáculos en la administración de siRNAs de manera sistémica

4) Tipos de acarreadores

Los primeros estudios *in vivo* para el análisis del efecto de RNAs interferentes como posibles moléculas terapéuticas fueron realizados utilizando siRNAs “desnudos”. Santel *et al* (2006) evaluaron la biodistribución de moléculas de siRNAs marcados con Cy3 en ratones nu/nu reportando que estos se localizan principalmente en riñón a los 20 minutos post-inyección sin ser detectados en otros órganos como: hígado, bazo, páncreas o pulmón y se acumulan en el lumen de los túbulos proximales y orina a los 5 minutos de haber sido inyectados.

Diversas modificaciones químicas pueden realizarse a las moléculas de siRNAs para mejorar su estabilidad en sangre sin afectar su actividad de silenciamiento pero si su potencialidad. La sustitución del grupo –OH por fósforo, boro, metilos o grupos tiol incrementa la vida media de estas moléculas en sangre. siRNAs conjugados a colesterol también incrementan su vida media en plasma comparados a aquellos no modificados (Layzer *et al* 2004; Soutschek *et al* 2004; Behlke M 2008). Sin embargo, a pesar de las mejoras que se obtienen utilizando esta estrategia, el encapsulamiento de las moléculas de siRNAs representa una mejor alternativa. A fin de lograr que los siRNAs lleguen adecuadamente a las células y sean liberados en citoplasma para su funcionamiento se han desarrollado diferentes sistemas de liberación que han sido clasificados en 2 categorías: vectores virales y vectores no virales.

Los vectores virales están basados en el uso de virus modificados que permiten la introducción de material dentro de la célula utilizando su mecanismo natural de infección pero sin causar la enfermedad. Los más utilizados son retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados. Son altamente eficientes, sin embargo, inducen niveles altos de toxicidad y activación de la respuesta inmune lo que limita su aplicación *in vivo* (Romero *et al* 2000).

Una manera de sobrellevar las desventajas del uso de vectores virales es mediante la creación de vectores clasificados como no virales donde se incluyen nanoparticulas, liposomas, uso de polímeros y péptidos, entre otros, que está siendo desarrollada y analizada en diversos estudios. Pueden dividirse en vectores poliméricos y vectores lipídicos.

➤ **Vectores poliméricos**

De acuerdo a los materiales utilizados estos vectores pueden dividirse en polímeros naturales (quitosan y atelocolágeno), polímeros catiónicos solubles en agua y nanopartículas poliméricas.

Partículas de quitosan han mostrado ser efectivas y seguras para su uso *in vivo* cuando se administran en ratones vía intranasal (Howard *et al* 2006). El uso de atelocolágeno como acarreador también ha tenido buenos resultados al incrementar la entrada de siRNAs en las células y prolongar el efecto de silenciamiento (Minakuchi 2004).

Dentro del segundo grupo se encuentran la ciclodextrina y la polietilenimina (PEI).

La ciclodextrina se utilizó primeramente para la liberación de DNA plasmídico en 1999 y es de los polímeros sintéticos más utilizados. Calando Pharmaceuticals desarrolló CALLA-01 para inhibir la expresión de la subunidad M2 de la ribonucleótido reductasa (R2) e inhibir el crecimiento tumoral. La polietilenimina ha sido probada tanto *in vitro* como *in vivo* reportándose que PEI de alto peso molecular posee una alta eficiencia de transfección así como alta toxicidad mientras que PEI de bajo peso molecular es más biocompatible pero menos eficiente (Davis 2010).

En cuanto a las nanopartículas poliméricas las mas utilizadas se basan en policaprolactona (PCL), poli (D, L-láctido) (PLA) y poli (D, L-láctido-co-glicólido) (PLGA).

➤ **Vectores lipídicos**

La formulación lipídica mayormente comercializada para transfección de siRNAs es la Lipofectamina. La carga positiva de los lípidos empleados interactúa electrostáticamente con las cargas negativas de los ácidos nucleicos ocasionando la formación de lipoplejos al mezclarse. Esta formulación ha sido ampliamente utilizada y reportada en diversos ensayos donde se ha determinado su efectividad a la vez que se ha cuestionado su toxicidad.

Otros agentes de transfección convencionales han sido empleados en liberaciones locales y sitios mucosos. La administración intranasal de complejos Oligofectamina-siRNAs mostró buenos resultados en pulmones de ratones para la protección contra la infección del virus de la influenza (Tompkins 2004). Similarmente una aplicación vaginal de los mismos complejos indujo protección contra virus del herpes (Palliser 2006).

Vectores conocidos como SNALPs (*stable nucleic acid-lipid particles*) también han sido reportados para encapsular siRNAs. Son nanopartículas lipídicas de aproximadamente 120 nm de diámetro formadas por una mezcla de lípidos catiónicos y fusogénicos rodeadas de polietilenglicol. Se ha hecho uso de ellas en estudios de Hepatitis B, Dislipidemia y Ébola. Tekmira Pharmaceuticals y Ainylam Pharmaceuticals iniciaron estudios clínicos de Fase I en 2010 y 2009 respectivamente (Rossi 2006, Zimmermann *et al* 2006; Judge *et al* 2009).

Partículas lipoides conformadas por moléculas de liberación parecidas a lípidos, colesterol y polietilenglicol han sido reportadas para mejorar la efectividad de los SNALPs. Fueron empleadas para disminuir la expresión de ApoB y el factor de expresión FVII en hepatocitos de ratones y primates no humanos mostrando mejores resultados en relación a dosis y toxicidad (Akinc *et al* 2008).

❖ *Liposomas*

Representan los vectores lipídicos más utilizados.

La palabra liposomas deriva del vocablo “*lipos*” que significa grasa y “*soma*” que se refiere a cuerpo. Descritos por primera vez en 1961 por Alec Bangham fueron definidos como: Vesículas microscópicas en las cuales un volumen acuoso es encerrado por una membrana compuesta de moléculas lipídicas. Pueden formarse por una o varias capas de lípidos de manera que existen liposomas unilamelares y multilamelares los cuales varían en su tamaño, desde nanómetros a micrómetros en diámetro y pueden estar formados de uno o varios tipos de lípidos. Representan uno de los métodos más eficientes para la liberación de agentes terapéuticos al actuar como un reservorio de liberación prolongada. Tienen la capacidad de servir como acarreadores de fármacos, oligonucleótidos, RNA antisentido, siRNAs, antígenos, proteínas y otras moléculas. Su tamaño, composición y carga influyen en su distribución y absorción celular (Kumar 2012).

Los lípidos que conforman los liposomas pueden ser catiónicos, aniónicos o neutros siendo mayormente utilizados los lípidos catiónicos constituidos generalmente por DOTAP (*1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane*), DOSPA (*2,3-dioleoyloxy-N-[2-(spermine-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-propanaminium trifluoroacetate*) y DOTMA (*N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchloride*).

Su amplia utilidad radica en su eficiencia de encapsulación, eficiencia de transfección y carga positiva, pudiendo interactuar más fácilmente con la carga negativa de las moléculas de siRNAs formando un complejo estabilizado por interacciones electrostáticas (Ozpolat *et al* 2010).

Se ha determinado que la carga de superficie de los liposomas influye en su interacción con la membrana de las células. En estudios *in vitro*, liposomas con carga positiva son fácilmente atraídos a la membrana celular, sin embargo, en estudios *in vivo* esto ha representado una desventaja. Diversos estudios señalan que debido a la positividad de su carga interactúan fuertemente con las membranas plasmáticas desestabilizándolas y provocando lisis celular. Además, proteínas del suero cargadas negativamente se unen con facilidad a los liposomas catiónicos y se ha reportado que esta unión neutraliza la carga positiva de los liposomas a la vez que aumenta su tamaño y causa la formación de agregados, activando también el sistema del complemento y causando su rápido aclaramiento por las células del sistema retículo endotelial. Así mismo, existe evidencia de efectos citotóxicos, inflamación pulmonar e inducción de respuesta interferón (Zelphati 1998., Dokka *et al* 2000).

Una opción empleada para mejorar esta situación es el enmascaramiento de cargas mediante el uso de polietilenglicol (PEG), esta estrategia minimiza la interacción no específica liposoma-proteína previniendo agregaciones y haciéndolos más estables. No obstante, existen reportes en los que se hace alusión al impedimento estérico ocasionado por PEG donde la interacción liposoma-membrana puede verse obstaculizada. (Harris *et al* 2003)

Para lípidos con cargas negativas, estudios con liposomas aniónicos muestran una pobre encapsulación de siRNAs y baja eficiencia de transfección (Ozpolat 2010).

❖ *Liposomas neutros*

Lípidos neutros se han utilizado para evitar la toxicidad asociada a lípidos catiónicos. Con el fin de limitar las interacciones de las cargas positivas de los lípidos catiónicos con las proteínas negativas del suero se utilizan polímeros u otros materiales como cubierta de los liposomas para neutralizar sus cargas, no obstante se ha demostrado que esto podría limitar su interacción con las células. Es por ello que diversos grupos de investigación se han enfocado en crear un acarreador que pueda superar estas limitaciones a fin de encontrar un vehículo de liberación de siRNAs apropiado para el uso *in vivo*.

Los lípidos neutros como DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) y DOPE (*1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*) se encuentran entre los más utilizados.

Landen *et al* en el 2005 publicaron el uso de un vehículo de liberación (liposomas) compuesto por fosfatidilcolina (DOPC) capaz de encapsular siRNAs y que fue probado en modelos murinos atímicos. En este estudio siRNAs liposomales marcados fluorescentemente fueron administrados vía intravenosa en ratones atímicos que portaban células de cáncer de ovario y se comparó su biodistribución contra siRNAs encapsulados en liposomas catiónicos (DOTAP) o siRNAs desnudos. Los liposomas neutros (DOPC) mostraron una eficiencia de liberación de los complejos de silenciamiento a las células tumorales 10 veces mayor a los liposomas catiónicos y 30 veces mayor a los siRNAs desnudos. Así mismo se reportó una biodistribución en hígado, riñón y pulmón. Además, el sistema fue altamente efectivo para reducir la expresión de EphA2 cuarenta y ocho horas después de una administración única en un modelo ortotópico de cáncer de ovario.

Se probó su efecto terapéutico utilizando siRNAs contra este gen (EphA2) sobreexpresado en este tipo de cáncer para lo que ratones NCr-nu fueron inoculados en la cavidad peritoneal con células HeyA8 o Skov-3 y una semana después de su inoculación se inicio el tratamiento utilizando 5 µg de siRNAs. El periodo de tratamiento fue de 4 semanas administrando los siRNAs liposomales 2 veces por semana vía intravenosa. Al final de este periodo el grupo tratado con siRNAs específicos contra EphA2 mostró resultados efectivos en reducir el tamaño del tumor en comparación a 2 grupos control: liposomas vacíos y liposomas siRNAs control negativo o no silenciadores. El efecto se vio potenciado al utilizar Paclitaxel en combinación con siRNAs-EphA2 lo que resultó en una disminución del crecimiento tumoral del 91% en comparación al 65% obtenido al usar paclitaxel y siRNAs-negativos.

Halder *et al* (2006) probaron el potencial terapéutico del silenciamiento de la cinasa de adhesión focal (FAK) utilizando este mismo sistema mostrando que el tratamiento resulta en una decremento de la densidad microvascular, disminución de la expresión de VEGF y metaloproteinasas 9 así como un aumento en apoptosis de células tumorales.

Cáncer

El cáncer es considerado un grave problema de salud pública y una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Cada año 14 millones de personas son diagnosticadas con cáncer en el mundo y se registran 8.2 millones de muertes. Se estima que el número de nuevos casos aumente a 22 millones en las siguientes 2 décadas (OMS 2015).

El cáncer es definido como un grupo de enfermedades caracterizado por el crecimiento descontrolado de las células. Sus causas pueden ser factores externos como radiación, tabaco, químicos y organismos infecciosos o factores internos como mutaciones, hormonas e inmunodeficiencias. Las células cancerígenas evaden señales supresoras de crecimiento, apoptosis, inducen angiogénesis y presentan mecanismos de invasión y metástasis.

Dentro de los cánceres más comunes se encuentran:

- Hombres: Cáncer de pulmón, Cáncer de próstata, Cáncer colorrectal
- Mujeres: Cáncer de mama, Cáncer colorrectal, Cáncer de cérvix, Cáncer de pulmón

Cáncer cervicouterino

Es a nivel mundial una de las causas principales de muerte en la mujer. También conocido como cáncer cervical o cáncer de cérvix, el cáncer cervicouterino hace referencia a las neoplasias malignas originadas en la porción inferior del cuello del útero que se encuentra orientado hacia la vagina.

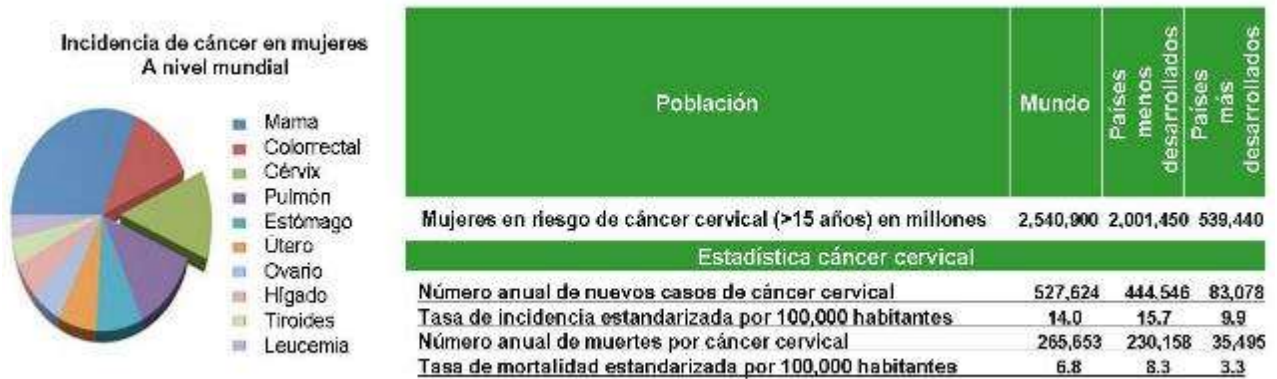
El cérvix se encuentra cubierto por una capa de tejido denominada epitelio cervical. Se constituye por una parte interna que se encuentra en contacto con el cuerpo uterino denominada endocérvix la cual está revestida por un epitelio cilíndrico simple con células epiteliales mucosas y una parte externa que se encuentra orientada hacia la vagina denominada exocérvix formada por epitelio plano estratificado. La zona de transición entre el epitelio mucoso endocervical y el escamoso exocervical es conocido como zona de transformación, lugar principal para el desarrollo del cáncer de cérvix. Cuando las células de este epitelio crecen de forma anormal pueden generarse lesiones precancerosas o displasias, las cuales sino son tratadas oportunamente pueden llevar al desarrollo del cáncer. El 80% son carcinomas de células escamosas y el 20% restante corresponde a adenocarcinomas (Hilario 2006).

1) Estadísticas

Las estadísticas a nivel mundial indican que el cáncer cervicouterino es la tercera causa de muerte por cáncer en la mujer. Representa el 14% de los cánceres y afecta principalmente a mujeres mayores de 40 años. Anualmente se diagnostican 527,624 nuevos casos de CaCu y ocurren 265,653 muertes.

Esta enfermedad afecta mayoritariamente a la población de países en vías de desarrollo donde se calcula que la falta de programas de detección temprana está relacionada con un 60% de la mortalidad por este tipo de cáncer. Su incidencia en Latinoamérica es particularmente alta.

En el caso de México, el cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Su incidencia es de 18.5 casos por cada 100, 000 mujeres con una tasa de mortalidad de 9.2. Estadísticas actuales indican que cada año 13,960 mujeres son diagnosticadas con cáncer cervical y 4,769 mueren por la enfermedad (Bruni *et al* 2014).



México

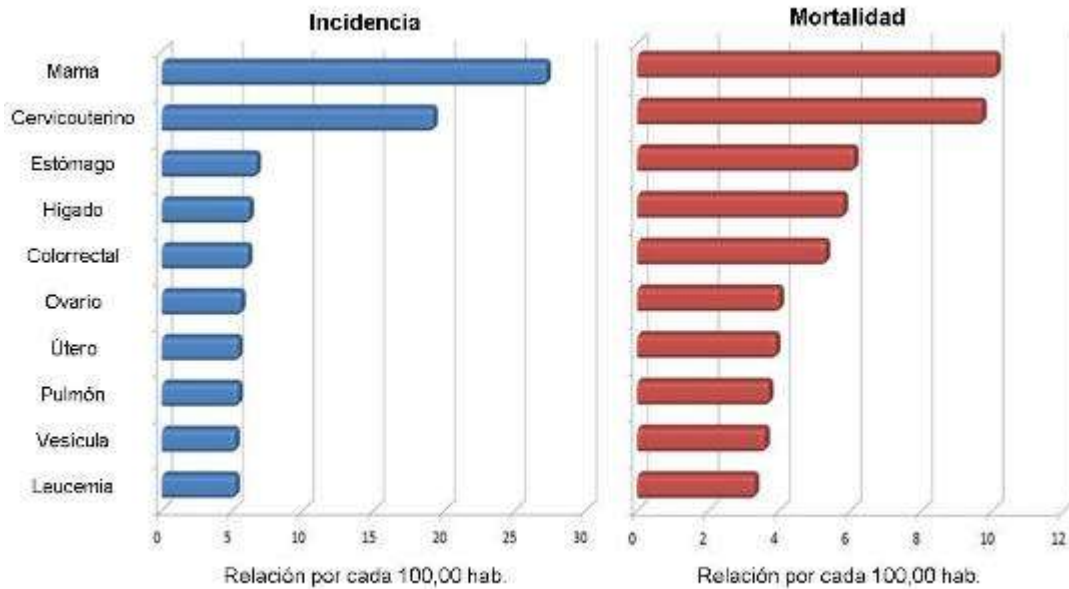


Figura 7. Estadísticas del cáncer cervicouterino en México y el mundo (Bruni *et al* 2014)

2) Desarrollo de la enfermedad

El principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino está ligado a una infección persistente por el Virus de Papiloma Humano (VPH).

La infección por VPH representa una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente. Se ha estimado que el 80% de la población está destinada a adquirir la infección en algún momento de su vida. Sin embargo, solo el 15% de estas dará lugar a una lesión de riesgo considerable y solo el 5% desarrollará cáncer (López Saavedra *et al* 2006).

Existen más 150 tipos distintos de VPH de los cuales al menos 40 son capaces de infectar el epitelio cervical. El virus puede infectar tanto el epitelio mucoso como el epitelio cutáneo y de acuerdo a su tipo de lesión se agrupan en bajo, moderado o alto riesgo. Los de alto riesgo oncogénico y principalmente relacionados a la enfermedad son los tipos 16 y 18 encontrados en el 99.7% de los casos. Los de bajo riesgo oncogénico (tipo 6 y 11) solo darán lugar a lesiones benignas de la piel como verrugas o condilomas. Cáncer de pene, vagina, ano, vulva y cabeza y cuello también han sido asociados con VPH (Beaudenon 2008).

El desarrollo del cáncer cervicouterino es un proceso lento que puede tomar varios años ya que la mayoría de las lesiones leves revierten espontáneamente en los primeros dos años en individuos con un sistema inmune eficiente, solo aquellos que no sean capaces de revertir este procesos desarrollan una serie de lesiones precancerosas que en un periodo de 10-20 años podrá verse reflejado como cáncer cervical.

La infección puede clasificarse primeramente en una infección temporal o en una infección latente que se caracteriza por la presencia de VPH en las células pero sin alguna manifestación clínica. Posteriormente pequeños cambios en el epitelio cervical pueden ser detectados en una prueba histológica o citologías. Estas pequeñas lesiones aumentan gradualmente hasta llegar a la infección clínica manifestada por la aparición visible de cambios en el cérvix y el desarrollo de cáncer. Esto da lugar a que si no es detectado a tiempo puede originar un cáncer invasor.

Los cambios en el epitelio cervical pueden clasificarse como leves, moderados o severos. Según el grado de afectación del área cervical se ha establecido clínicamente la denominación de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Estas lesiones neoplásicas se dividen a su vez en: NIC-I (cuando solo se ha afectado menos de 3 partes del cérvix), NIC-II (se ve afectado un 50% del cérvix) y NIC-III (la mayor parte del área cervical presenta anomalías) también conocida como carcinoma *in situ* (Lizano *et al* 2009). El pronóstico para el cáncer cervicouterino dependerá de la etapa o estadio de la enfermedad. Debe determinarse el grado de lesión y si existe o no diseminación hacia otros órganos.

Otros de los factores de riesgo para del desarrollo del cáncer cervical incluyen: relaciones sexuales a temprana edad, tener múltiples compañeros sexuales, parejas sexuales con un número elevado de excompañeros sexuales, elevado número de partos, ninguno o pocos exámenes de revisión y sistema inmune comprometido (Faridi 2011).

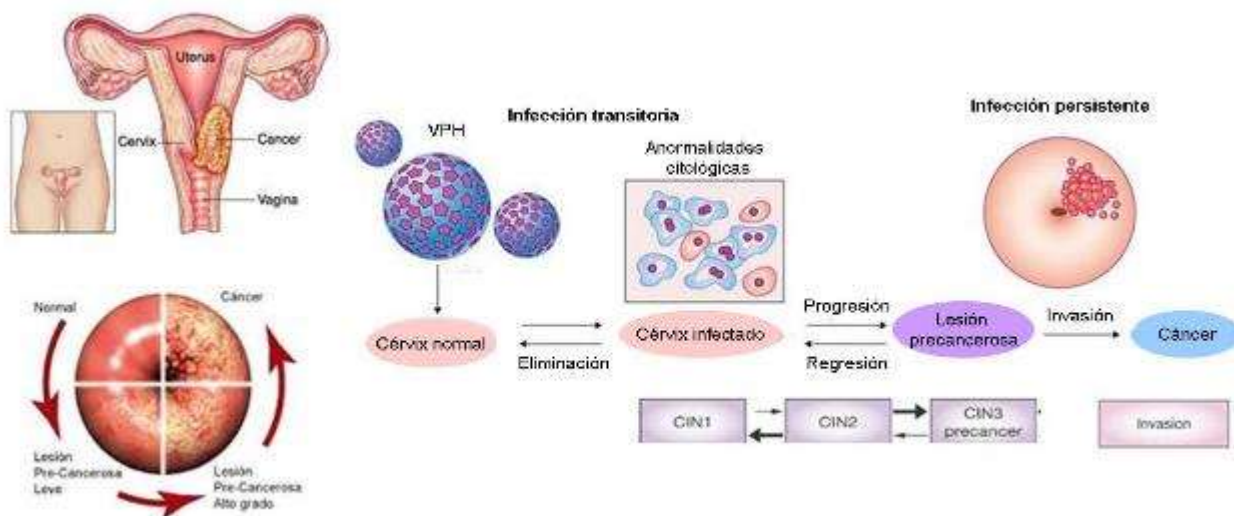


Figura 8. Desarrollo del cáncer cervicouterino

Virus de Papiloma Humano

Los virus de papiloma pertenecen a la familia *Papillomaviridae* (descrita por primera vez en los años 30) y al género *Papillomavirus*. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden ser encontrados en diferentes especies animales incluyendo reptiles, aves y mamíferos. El virus de papiloma humano y su relación con el cáncer cervical fue establecida por Harald zur Hausen en los años 80s. Aproximadamente existen 630 millones de personas infectadas con VPH en el mundo (zur Hausen 1987, Rautava 2012).

Es un virus no envuelto formado por una cápside icosaédrica constituida por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) organizados con sus dos proteínas estructurales L1 y L2. Los viriones de VPH están compuestos de 360 copias de la proteína mayor (L1) que representa el 90% de la partícula viral y 72 moléculas de la proteína menor (L2). La partícula viral tiene un tamaño aproximado de 55 nm (Doorbar *et al* 2012).

1) Genoma del virus

El virus esta conformado por una molécula de DNA circular de doble cadena de 7,900 pares de bases. Su genoma puede ser dividido en tres diferentes regiones: Una región larga de control (LCR, por sus siglas en inglés *long control region*) que posee los elementos necesarios para la expresión de los genes virales, genes de expresión temprana (E1-E8) relacionados con la replicación y la transcripción viral y genes de expresión tardía (L1 y L2) que codifican para las proteínas de la cápside.

El material genético viral es transcrito a manera de un mRNA policistrónico.

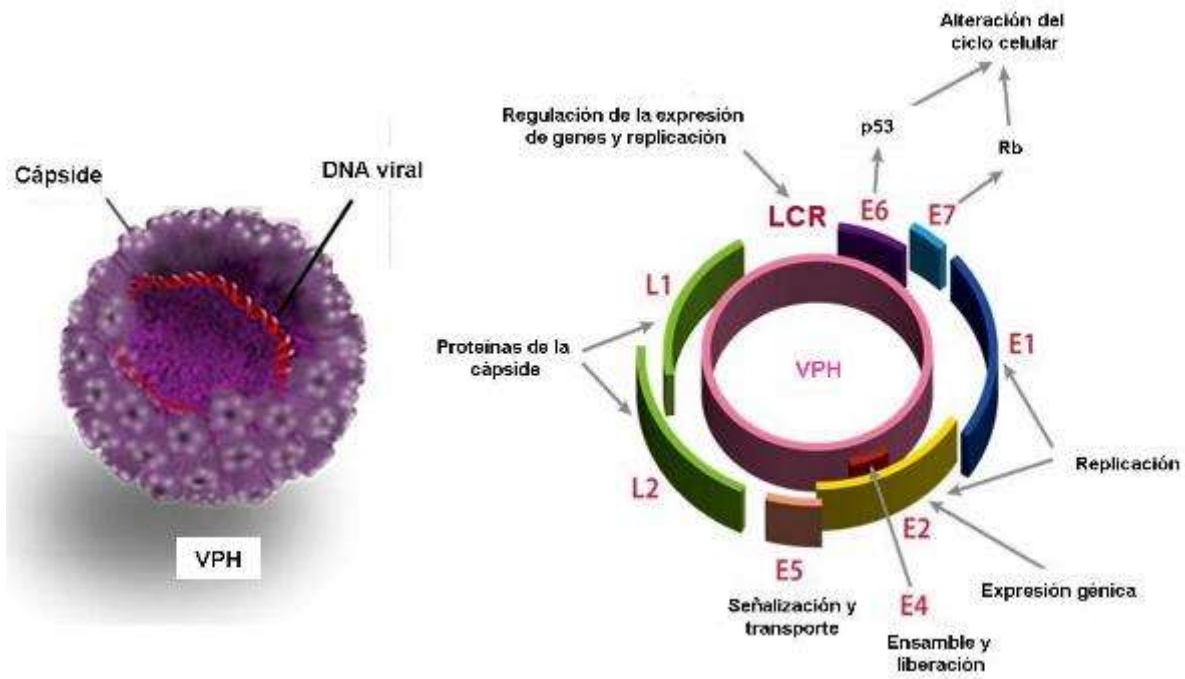


Figura 9. Estructura y genoma del Virus de papiloma humano

2) Ciclo replicativo

El ciclo replicativo del VPH está ligado a la diferenciación de las células epiteliales. La infección por VPH tiene lugar por medio de una microabrasión en el epitelio cervical dejando expuestas las células basales a las partículas virales que podrán ingresar a ellas mediante un mecanismo de unión virus-receptor. Los receptores establecidos para la infección son heparan sulfato y alfa integrinas. Una vez que se da la unión virus-receptor, estos son internalizados hacia el citoplasma de la célula por endocitosis.

El genoma viral permanece primeramente en forma episomal y se replica junto con la célula. Cuando las células de la capa basal del epitelio se duplican, una de ellas migra al estrato superior para continuar con su diferenciación y otra permanece en el estrato basal. De manera que cuando una célula es infectada al replicarse, una de las células hijas perpetuará la infección mientras la otra podrá expresar los diversos genes para completar el ciclo viral.

Al entrar en la célula, el virus expresa primeramente los genes E1 y E2 que se unen al origen de replicación del virus y codifican proteínas requeridas para la replicación viral a la vez que participan en regular la expresión de otros genes tempranos como E6 y E7.

En este primer punto se está en un estadio no productivo de replicación en donde el virus se mantiene en un bajo número de copias (30-50 copias por célula) en forma de episoma. Conforme la célula se mueve a los estratos superiores se entra en una fase productiva y el número de copias aumenta. Se expresan los genes E4 y E5 quienes actúan contribuyendo a la formación del virión así como los genes L1 y L2 para su ensamble. Los virus maduran en el estrato final y son liberados del epitelio cuando éste se renueva.

El punto de origen hacia la transformación maligna de las células se da con la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped. Esto sucede en el marco de lectura del gen E2 ocasionando que la regulación negativa que ejerce este sobre los genes E6 y E7 se pierda dándose así una sobreexpresión de los mismos. De manera que las células infectadas pierden el control sobre su proliferación y se replican de manera descontrolada invadiendo todos los estratos del epitelio cervical (Abdul *et al* 2009; Crosbie *et al* 2013).

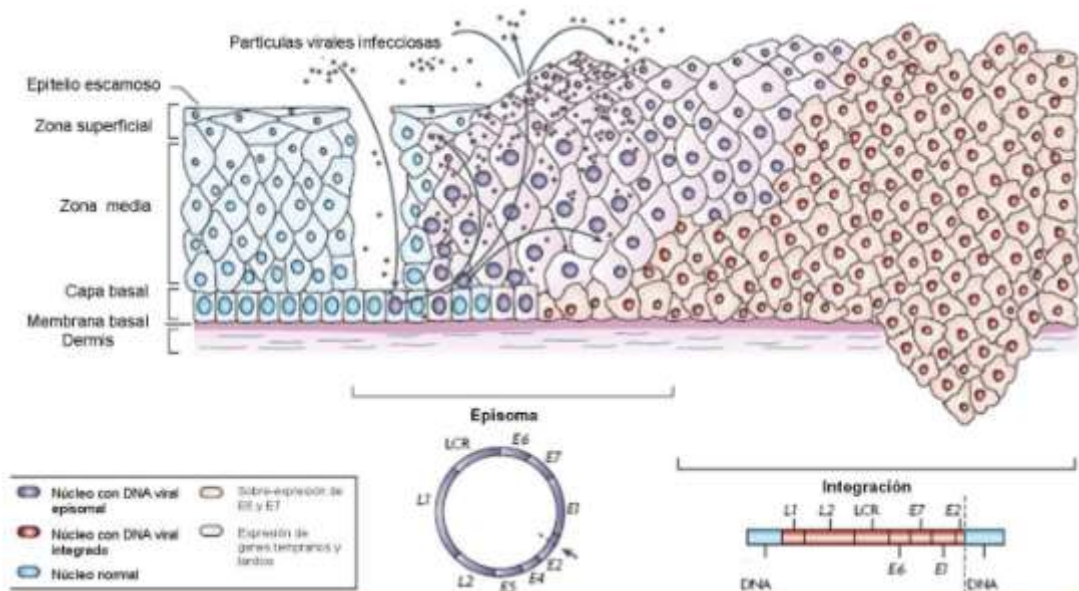


Figura 10. Ciclo replicativo del virus de papiloma humano

3) *Oncogenes E6 y E7*

La oncogenicidad del virus esta relacionada a la sobreexpresión de los genes E6 y E7 que de acuerdo a su función pueden afectar la acción de moléculas relacionadas con el ciclo celular. En el caso de E6 este actúa como represor de apoptosis y permite la replicación de células con material genético dañado, E7 por su parte funciona como promotor de la replicación celular. Sus acciones en conjunto conducen a la inmortalización y transformación maligna de las células.

➤ **Oncogén E6**

El oncogén E6 posee 477 pb y codifica para una proteína de 158 aminoácidos con un peso molecular de 16 kDa. Esta proteína está conformada por dos dedos de zinc con cuatro motivos C-x-x-C que son importantes para la activación transcripcional, transformación, inmortalización y su asociación con otras proteínas celulares. En su extremo carboxilo terminal posee un motivo de unión a dominios PDZ. Puede interactuar con diversas moléculas como factores de transcripción, supresores tumorales, coactivadores, transductores de señalización, entre otras proteínas celulares.

Los mecanismos asociados a la transformación e inmortalización de las células son diversos, sin embargo, el más importante está relacionado con su acción sobre la proteína p53. Este es un factor de transcripción que forma parte del mecanismo de control de la célula para mantener la integridad de su material genético. Cuando daños en el DNA son detectados, p53 actúa provocando un arresto en el ciclo celular a fin de activar mecanismos de reparación que permitan reparar el material genético dañado antes de continuar con el proceso de replicación, si el daño provocado no puede repararse, p53 enviará a la célula a apoptosis para evitar la propagación de este error. E6 es capaz de reclutar e interactuar con la proteína denominada E6AP, una ubiquitin ligasa, que se une a p53 y lo marca para degradación proteosomal. Esto lleva a una inhibición en apoptosis y favorece la integración de material genético extraño a la célula huésped comprometiendo la integridad del DNA y causando daño celular así como

inestabilidad cromosómica (Scheffner *et al* 1990; Huibregtse *et al* 1991; Havre *et al* 1995; Kesis *et al* 1996).

Puede interferir con el mecanismo de apoptosis de manera independiente a p53, vía su asociación con Bak. Bak es capaz de inducir la formación de poros en la membrana mitocondrial y dar lugar a la liberación de citocromo C desencadenando la activación de la vía de las caspasas. Aunado a esto E6 induce la degradación proteosomal de Bak interfiriendo con el mecanismo de apoptosis e incrementando la supervivencia de las células (Thomas & Banks 1998).

Se ha reportado que E6 puede inducir actividad telomerasa manteniendo la longitud de los telómeros lo que produce un aumento en el número de divisiones celulares. Esto mediante la unión de E6 y E6AP al promotor de la transcriptasa reversa de telomerasa humana (hTERT, por sus siglas en inglés *human Telomerase reverse transcriptase*) promoviendo la degradación del represor transcripcional NFX1-91 lo que activa su transcripción y ocasiona un aumento en su expresión (Klingelhutz *et al* 1996; Ganguly 2009; Ghittoni R. *et al* 2010).

También es capaz de interactuar con proteínas con dominios PDZ relacionados con proliferación, polaridad y adhesión celular (Massimi *et al* 2004), desregular la expresión de Notch 1, un gen blanco de p53 involucrado en la supresión de tumores (Yugawa *et al* 2007) e interactúa con el factor regulador de interferón (IRF-3, por sus siglas en inglés *interferon regulatory factor 3*) por lo que E6 contribuiría a la evasión del sistema inmune de células infectadas (Ronco *et al* 1998).

➤ **Oncogén E7**

El papel que juega E7 en la inmortalización y transformación de células se ha demostrado en cultivo y en modelos animales.

E7 codifica para una proteína de bajo peso molecular de aproximadamente 10 kDa constituida por 100 aminoácidos. Posee tres regiones conservadas (CR). La región CR1 es la necesaria para la transformación celular y degradación de Rb. El dominio de unión a Rb se encuentra en la región CR2 al igual que un sitio de fosforilación caseína cinasa II. El extremo carboxilo terminal o CR3 posee dos motivos C-x-x-C implicados en la unión a proteínas celulares.

La capacidad transformante de E7 recae en su acción sobre la proteína de retinoblastoma (Rb). En células normales Rb se encuentra inactivada estando unida al factor de transcripción E2F como punto control del ciclo celular previniendo la entrada en la fase S. Su fosforilación por complejos de ciclinas-CDK ocasiona su liberación de este factor y permite la progresión en el ciclo celular. Cuando E7 está presente en células infectadas es capaz de unirse a Rb liberándola del factor E2F y activándola. El punto de control en el ciclo celular en la transición G1/S se pierde y las células entran en un estado de proliferación descontrolada (Dyson 1998).

Además de su interacción con Rb, E7 interactúa con otras proteínas celulares como los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27 inhibiendo su función y favoreciendo la progresión a la fase S en el ciclo celular (Ganguly 2009; Ghittoni R. *et al* 2010). Entre otras de sus funciones se encuentran: Interactúa con desacetilasas de histonas cuya unión promueve la proliferación celular (Brehm *et al* 1999), Contribuye a la evasión del sistema inmune uniéndose e inactivando el factor regulador de interferón 1 (IRF1) (Um *et al* 2002), Suprime la respuesta citotóxica al reducir la expresión de TAP-1 lo que ocasiona una desregulación en el proceso de presentación de antígenos por el complejo MHC-1 (Georgopoulos *et al* 2000).

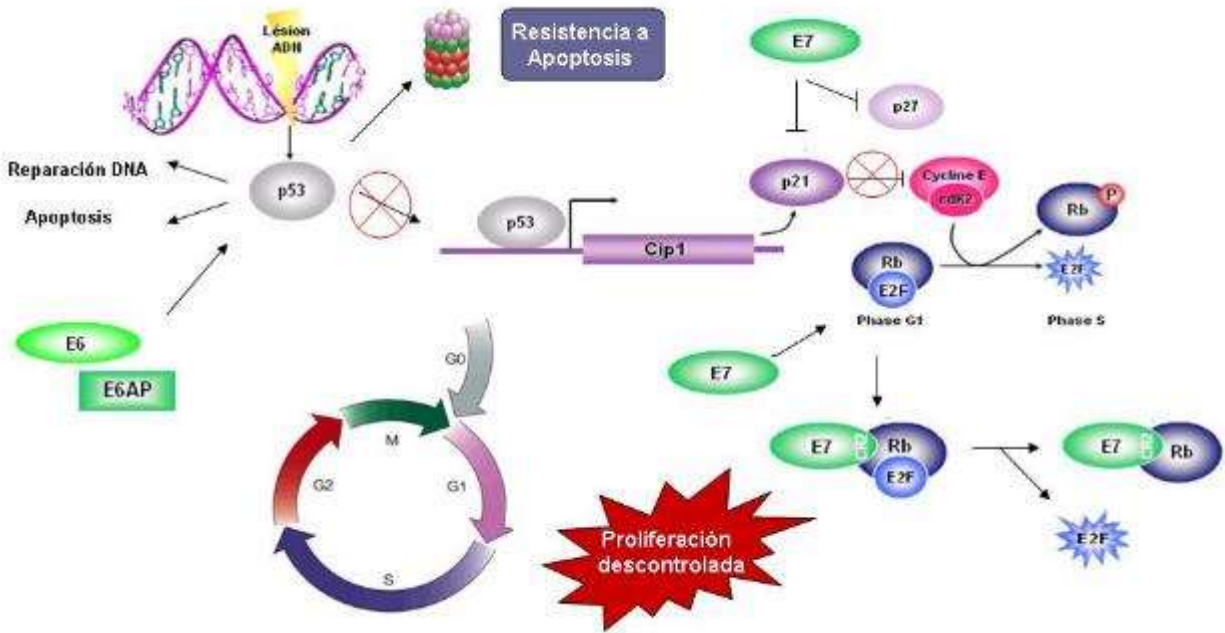


Figura 11. Mecanismo de acción de E6 y E7 de VPH sobre las proteínas p53 y RB en el ciclo celular

RNA de interferencia y Virus de Papiloma Humano

(Modelos de estudio)

Dada la importancia de los oncogenes E6 y E7 del VPH involucrados en la transformación e inmortalización celular y desarrollo del CaCu estos representan blancos terapéuticos atractivos para su silenciamiento por siRNAs.

El uso RNAs interferentes específicos contra estos oncogenes ha mostrado resultados altamente satisfactorios. Estudios *in vitro* demuestran que el silenciamiento de E6 y E7 en líneas celulares humanas de cáncer de cérvix (SiHa y Caski, positivas para VPH 16 y 18) conlleva entre otros efectos a inducir la acumulación de p53 y Rb, disminuye la viabilidad celular, se activa la muerte celular por apoptosis y se reduce su capacidad invasiva (Jiang *et al* 2002; Butz *et al* 2003; Bai *et al* 2006, Sima *et al* 2008; Chang *et al* 2010). Estos resultados indican que es posible revertir el efecto ocasionado por E6 - E7 y de esta manera recuperar los sistemas de regulación celular afectados por la expresión de los genes virales.

Adicionalmente se ha analizado el efecto de siRNAs en conjunto con el uso de agentes quimioterapéuticos como el cisplatino y paclitaxel. Evidencias sugieren que el silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 puede incrementar la sensibilidad de las células a la acción de estos fármacos (Putral *et al* 2005; Liu *et al* 2009). Por lo que esto representaría una alternativa para el tratamiento de la enfermedad.

Uno de los puntos clave para poder considerar el silenciamiento de estos oncogenes como terapia molecular aplicable es ver su efecto en modelos *in vivo*. El uso de siRNAs en modelos animales ha dado como resultado la reducción en el desarrollo de tumores.

Yoshinouchi *et al* (2003) mostraron que ratones NOD/SCID inoculados con células SiHa transfectadas con siRNAs contra E6 desarrollaron tumores más lentamente (hasta los 45 días después de la inoculación) en comparación a aquellos inoculados con células transfectadas con siRNAs control (presencia del tumor al día 29). Por su parte Fujii *et al* (2006) muestran

una disminución en la progresión de tumores de VPH-18 en ratones desnudos mediante inyecciones intratumorales de siRNAs específicos para E6 y E7 en combinación con un polímero acarreador.

En ese mismo año Niu *et al* evaluaron el efecto antitumoral de siRNAs contra E6 administrados en conjunto con un agente de transfección lipídico mediante inyecciones intraperitoneales en ratones desnudos inoculados subcutáneamente con células CaSki mostrando que los ratones tratados con interferentes específicos contra E6 durante 5 o 10 días presentaron tumores más pequeños que los ratones tratados con un interferente control.

A pesar de los buenos resultados una de las principales limitantes para la aplicación de interferentes en clínica es su método de liberación además que los estudios *in vivo* realizados hasta el momento han sido principalmente empleando modelos murinos inmunodeficientes. Pocos estudios en modelos inmunocompetentes de cáncer cervical han sido realizados en los últimos años.

En 2011 Wu *et al.* reportan una reducción del 50% en el tamaño tumoral en un modelo murino inmunocompetente de cáncer cervical al utilizar siRNAs E6/7 en partículas lipídicas formadas de una combinación de DOTAP/DOPE y cubiertas con PEG administradas de manera intravenosa esto en comparación a grupos tratados con siRNAs control dentro de las partículas lipídicas y siRNAs desnudos. De igual manera se probó si existiría un efecto potenciado de reducción en el crecimiento del tumor al combinar la administración de siRNAs y cisplatino obteniendo resultados negativos. Estos resultados indican que las partículas lipídicas fueron liberadas eficientemente al tumor y se produjeron efectos antitumorales específicos. Sin embargo, el uso de liposomas PEGilados continúa siendo controversial.

Recientemente Khairuddin *et al* reportaron el uso de siRNAs E6/7 y la participación del sistema inmune en la actividad antitumoral. Evaluaron si las secuencias de RNA interferente

utilizadas producían la activación del sistema inmune innato y esto contribuía al efecto de silenciamiento producido por los siRNAs, mostrando que es posible una inmunoestimulación inducida por siRNAs a través de TLR-7. Sin embargo, este ensayo no evalúa realmente los obstáculos a los que se enfrenta la administración sistémica de siRNAs debido a que las células fueron tratadas previo al establecimiento del tumor y las secuencias utilizadas fueron previamente definidas como inmunoestimuladoras.

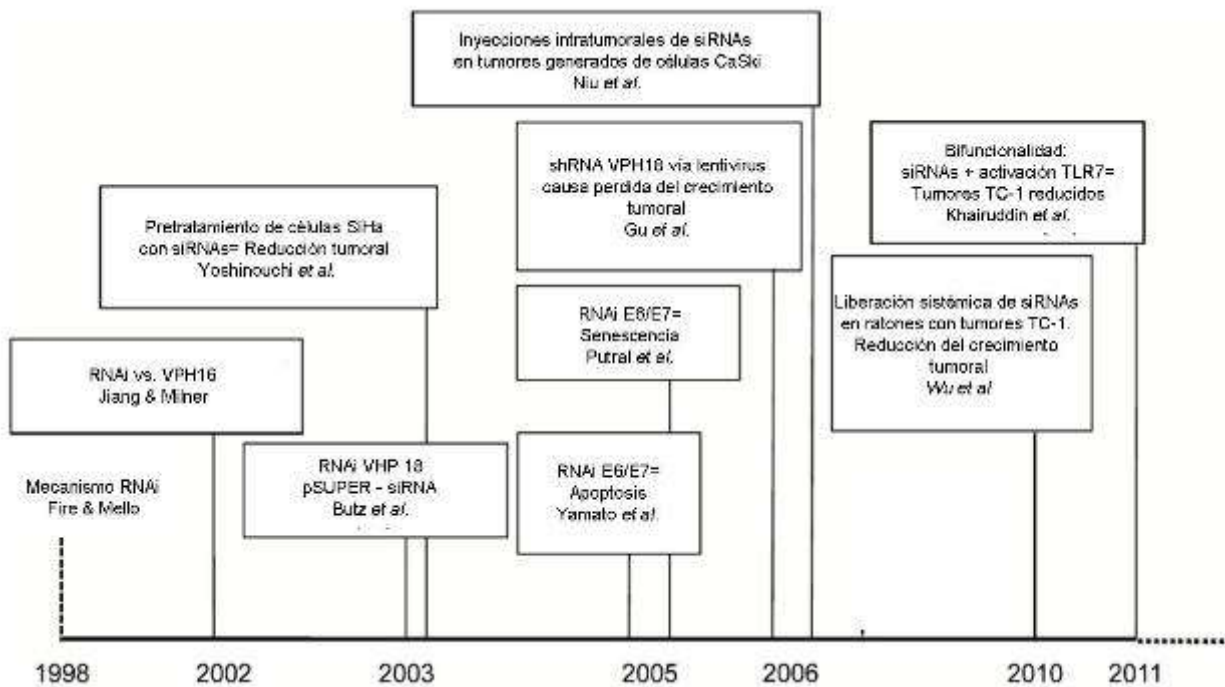


Figura 12. Línea de tiempo de la investigación de RNAi y Virus de Papiloma Humano (Modificado de Singhania et al. 2012)

siRNAs Liposomales

Existe un sistema de biodistribución para siRNAs basado en liposomas neutros constituidos de DOPC que fue diseñado por nuestro grupo de trabajo (Landen *et al* 2005). Tales liposomas fueron capaces de liberar siRNAs en células tumorales 10 y 30 veces más en comparación a liposomas catiónicos formados por DOTAP y siRNAs desnudos respectivamente.

Este vehículo de liberación ha sido probado en otros modelos *in vivo* dando resultados terapéuticos eficaces. Administraciones intravenosas o intraperitoneales 2 veces por semana de los siRNAs liposomales en una dosis de 150 $\mu\text{g kg}$ resulta en una disminución en la expresión de genes como Bcl-2, FAK, Survivina, IL-8, entre otros y una reducción significativa en el desarrollo de tumores, los cuales aumentan en combinación con quimioterapia en diversos modelos de cáncer (pancreático, melanoma, hígado, colorrectal y mama) incluyendo tumores subcutáneos y modelos ortotópicos sin mostrar toxicidad o efectos secundarios adversos (Gray 2008., Merritt 2008., Ozpolat 2008., Villares 2008).

3.- JUSTIFICACIÓN

A pesar de la gran alternativa que podría representar el uso de RNA de interferencia con fines terapéuticos, el establecimiento de un sistema de biodistribución eficiente limita su aplicación en clínica. Se ha diseñado en nuestro equipo de trabajo un sistema de liberación el cual ha demostrado ser eficaz en estudios *in vivo* en ratones atímicos. Por lo que surge la necesidad de probar este sistema en un modelo murino inmunocompetente a fin de continuar con su caracterización y posible aplicación terapéutica. Para este fin, se propone el análisis del silenciamiento del oncogén E7 del Virus de Papiloma Humano en ratones con sistema inmune completo.

4.- HIPÓTESIS

El silenciamiento del oncogén E7 del Virus de Papiloma Humano por siRNA liposomales puede efectuarse con fines terapéuticos en un modelo murino inmunocompetente.

5.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la presencia de un sistema inmune completo en un modelo murino afecta el silenciamiento del oncogén E7 del Virus de Papiloma Humano por siRNAs liposomales.

Objetivos específicos

- a) Analizar la biodistribución de siRNAs liposomales (siRNAs-L) en un modelo murino inmunocompetente
- b) Estandarizar el silenciamiento *in vivo* del oncogén E7 del Virus de Papiloma Humano mediante el uso de siRNAs liposomales en el modelo de estudio
- c) Evaluar el efecto antitumoral de siRNAs liposomales en un modelo murino inmunocompetente

6.- METODOLOGÍA

Materiales

1) *Línea celular*

La línea celular TC-1 son células epiteliales de pulmón de ratones de la cepa C57BL/6 transformadas con los oncogenes E6 y E7 del Virus de Papiloma Humano tipo 16 y c-Ha-ras. Donadas por el Dr. Roberto Montes de Oca de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

2) *RNAs cortos de interferencia (siRNAs)*

Para el diseño de los siRNAs se tomó como referencia la secuencia publicada en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para el oncogén E7 (Gene ID: 1489079) del VPH-16 (referencia de secuencia no: NC_001526.2.). La secuencia del siRNA utilizada (5' **cgcttcggttgctgacaaagc** 3') se diseñó con el programa *RNAi Direct* (<http://sidirect2.rnai.jp>) y tiene una longitud de 23 pb posicionándose en los nucleótidos 752-774 del mRNA de VPH-16. Los siRNAs se obtuvieron de la casa comercial Sigma Aldrich.

Como control negativo se utilizó un siRNA **Universal Negative Control** (Sigma Aldrich, Cat. SIC001) el cual no posee homología con ninguna secuencia de mamífero.

Para los ensayos de biodistribución se hizo uso de un siRNA marcado con Alexa Fluor 488. Adquirido también de Sigma Aldrich.

3) *Oligonucleótidos para PCR*

Mediante el programa FastPCR se diseñó un juego de primers que flanqueara la región blanco del siRNA para E7:

Primer Forward 5' **cagctggacaagcagaaccgga** 3'

Primer Reverse 5' **ggtttctgagaacagatggggca** 3'

Fragmento amplificado: 172 pb

Para el control de carga se utilizaron primers para β -actina

Primer Forward 5' **gctacagcttcaccaccaca** 3'

Primer Reverse 5' **tctccagggaggaagaggat** 3'

Fragmento amplificado: 150 pb

4) Animales

Se emplearon ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 4 a 6 semanas de edad obtenidos del Bioterio CINVESTAV-IPN Unidad Zacatenco. Mantenidos en una sección del bioterio de Cinvestav Unidad Monterrey bajo condiciones óptimas (agua y comida *ad libitum*). El protocolo para el uso de animales fue sujeto al Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-CINVESTAV) y fue aprobado bajo el Número de Identificación 0077-14.

5) Reactivos y Kits

Cultivo celular: Medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, Tripsina EDTA, Suero Fetal Bovino (FBS), Piruvato de sodio, Aminoácidos no esenciales y Geneticina g418. Adquiridos en GIBCO Invitrogen Life Technologies.

Extracción de RNA: Trizol (Sigma Aldrich no. T9424), cloroformo (MP Biomedicals no. 194002), isopropanol (J.T. Baker no. 9084-01), etanol (Sigma Aldrich no. E7148), Agua DEPC.

Síntesis de cDNA: kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen no. 28025-013), Oligos dT (Promega no. C1101), dNTP mix (Promega no. U151B), Inhibidor de RNAsas (Promega no. N2111)

PCR en tiempo real (qPCR): Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies no. 600882)

Western Blot: Inhibidor de proteasas (Promega no. G652A), kit para cuantificación de proteínas BCA (Pierce no. 23227), Anticuerpo monoclonal para E7 de VPH-16 (Santa Cruz Biotechnology sc-65711), Anticuerpo monoclonal β -actina (No. A5441 Sigma Aldrich) y anticuerpo anti-IgG de ratón ligado a HRP (Cell Signaling), Super Signal (Pierce no. 34075)

Cortes histológicos: Tissue-Tek O.C.T. (Embedding Medium for Frozen Tissue Specimens to Optimal Cutting Temperature) (Sakura Finetek no. 4583A), Medio de montaje para fluorescencia Vectashield con DAPI (Vector Laboratories no. H1200)

Liposomas: DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Avantis Lipids), Tween-20 (Sigma Aldrich), Terbutanol de J.T. Baker.

6) Equipo de laboratorio

Campana de bioseguridad de flujo laminar Nuaire (modelo UN-425-400, Scientific vision INC), Incubadora para cultivo celular con atmósfera controlada de CO₂ (Thermo Electron Corporation modelo 35554), Microscopio Invertido con contraste de fases (Vistavision 0805374), Baño de temperatura (Poly Science modelo 5A11B), Microscopio Confocal (Leica modelo TCS SPS), Termociclador PCR tiempo real (Step One Plus), Liofilizador Freezone 2.5 (Labconco), Criostato (Leica CM1100), Lector para placas ELISA (Labsystems modelo Multiskan ELX800), Cámara de electroforesis y transferencia (Acceso Lab) Fuente de poder (BioRad), Espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), Centrifuga refrigerada (Sigma modelo 3-18K), Placa de calentamiento Digital Dry Bath (Labnet modelo D1200), micropipetas Labnet (modelo 4 BioPette).

Métodos

1) Cultivo celular

La línea celular TC-1 se cultivó en cajas de 25cm² con medio RPMI 1640 con 5% de FBS y suplementado con aminoácidos no esenciales, piruvato y antibióticos (penicilina 1x y G418). Se mantuvo en incubación bajo condiciones de 37°C, al 5% de CO₂ y 95% de humedad. Para su mantenimiento se realizaron pases celulares al observarse el 90% de confluencia. Para ello se retiró el medio de la caja de cultivo y se añadió 1 ml de tripsina a 37°C, se dejó reposar aproximadamente 1 minuto (tiempo necesario para que las células se despeguen de la base de la caja) y posteriormente se detuvo la reacción añadiendo 3 ml de medio de cultivo. Una vez homogenizado se tomaron aproximadamente 500 µl y estos se añadieron a una nueva caja con 8 ml de medio fresco.

2) Inoculación de ratones C57BL/6 con células TC-1

Ratones hembra C57BL/6 fueron inoculados con 100,000 células TC-1 en 100 µl de solución inyectable vía subcutánea en el dorso derecho. Se obtuvo la cantidad necesaria de células durante la realización de los pases celulares. Se tomó una pequeña muestra de las células en confluencia y se realizó conteo celular en una cámara de Neubauer para determinar la cantidad de células por caja. Se realizaron los cálculos necesarios para obtener la cantidad de células a utilizar y estas fueron centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C y posteriormente lavadas en PBS para después resuspenderse en la solución inyectable. El crecimiento del tumor se monitoreó durante 3 semanas.

3) Elaboración de siRNAs liposomales

Los siRNAs liposomales fueron elaborados en base a lo descrito por Landen *et al.* (2005). Están compuestos por DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), siRNAs y Tween-20. Brevemente, el DOPC se diluyó en terbutanol a fin de obtener una concentración de 20 µg/µl. La cantidad de siRNAs (10µg y 40µg) se utilizó en una relación 1:10 (siRNAs:DOPC) y se empleó la cantidad necesaria de Tween-20 para una concentración final del 5% en base al total de esta relación. Los tres componentes se colocaron en un vial y se mezclaron en un

exceso de terbutanol a fin de homogenizar los componentes. La mezcla se congeló en un baño de hielo seco (CO₂ sólido) y acetona. Se liofilizó por 2 horas y se almacenaron a -20°C hasta el momento de su administración.

4) *Ensayo de biodistribución*

Se prepararon liposomas vacíos y liposomas que contuvieran siRNAs marcados con Alexa 488. La cantidad de siRNAs utilizada fue de 40 µg por ratón. Previo a su administración *in vivo*, la mezcla liofilizada se hidrató en solución salina para la formación de los liposomas. Los ratones (n=5) de cada grupo fueron inyectados de manera intravenosa por la vena de la cola con 200 µl de la solución de liposomas. Una hora después los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los tumores y los siguientes órganos: intestino, bazo, páncreas, riñón, hígado, pulmón, corazón, timo, cerebro y tejido muscular. Los órganos se fijaron en Tissue-Tek, se congelaron y almacenaron a -80°C. Se realizaron cortes de 12 micras en el criostato y se colocaron en un portaobjetos cubierto con Poly-L-lisina (3 cortes por cada órgano). A cada uno de los cortes se le añadió Vectashield con DAPI y se cubrieron las laminillas con un cubreobjetos. Se analizaron en el microscopio confocal.

5) *Ensayo dosis y tiempo respuesta*

Para este ensayo se utilizó un siRNA específico para el encogen E7 de VPH-16, así como un siRNA control negativo y liposomas vacíos. Los liposomas fueron preparados de acuerdo a los grupos a tratar: Para los liposomas vacíos se ajustaron los cálculos para su elaboración respetando la proporción adecuada de lípidos para la ausencia de siRNAs y para los otros dos grupos se utilizaron 10 µg o 40 µg de siRNAs por ratón. Cada una de las preparaciones se hidrató en la cantidad necesaria de solución salina de acuerdo al vial de preparación. Los ratones (n total= 40) fueron divididos en 4 grupos (10 por grupo) y cada grupo se trató de manera intravenosa con liposomas vacíos, siRNAs liposomales control negativo, siRNAs liposomales contra E7 10 µg y siRNAs liposomales contra E7 40 µg respectivamente a fin de realizar la estandarización dosis-respuesta.

Cuarenta y ocho horas después se sacrificaron todos los animales y se extrajeron tumor y órganos. Se determinó el nivel de expresión de E7 tumoral. Para determinar el tiempo efectivo de silenciamiento, una vez determinada la dosis óptima, los ratones fueron divididos en 3 grupos (n= 30, 10 por grupo) y se trataron con liposomas vacíos, siRNAs liposomales control negativo y siRNAs liposomales contra E7. Los ratones fueron sacrificados 48 y 72 horas post-tratamiento, tumores y órganos fueron disectados y se determinaron los niveles de expresión de E7 en tumor.

6) *Extracción de RNA*

Una vez que los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los tumores estos se utilizaron para la extracción de RNA. Una porción representativa de cada tumor se homogenizó en Trizol para la lisis de las células, se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se añadieron 500 µl de isopropanol, se agitó por vórtex y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo la muestra se centrifugó por 8 minutos bajo las condiciones de los centrifugados previos y se descartó el sobrenadante. Se añadió 1 ml de etanol a 75%, la muestra se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el etanol y la pastilla de RNA se dejó secar. Finalmente, el RNA se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNAsas y se cuantificó.

7) *Síntesis de cDNA*

A partir del RNA obtenido se realizó una transcripción reversa para la síntesis de cDNA utilizando el kit M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen. En un tubo eppendorf de 0.2 ml se colocaron las cantidades correspondientes de oligos dT, RNA (5 µg), dNTPs y agua libre de RNAsas para cada reacción y se incubó por 5 minutos a 65°C. Posteriormente a cada tubo se añadieron el buffer reacción, DTT e inhibidor de RNAsas. Se incubó 2 minutos a 37°C. Finalmente se añadió la enzima MVCT y la muestra se incubó 10 minutos a 25°C, 50 minutos

a 37°C y 15 minutos a 70°C para terminar la reacción. El cDNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro.

8) PCR en tiempo real (qPCR)

Con el cDNA obtenido se realizó qPCR a fin de analizar la expresión correspondiente del oncogén E7. Para ello se utilizó el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix de Agilent Technologies. En tubos ópticos para qPCR se colocaron en base a las condiciones de protocolo los elementos para la reacción: SYBR Green Mix, colorante de referencia, primers, cDNA (100 ng/μl) y agua libre de nucleasas. Los tubos se colocaron en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 5 segundos y posteriormente 60°C por 10 segundos y se procedió a las condiciones para la generación de una “melt curve”: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y por último 95°C por 15 segundos. Las curvas fueron analizadas y se tomó como control de carga la amplificación de β -actina.

9) Extracción de proteína y Western Blot

De los tumores extraídos en cada uno de los experimentos se llevó a cabo la extracción de proteína. Una muestra de tumor se maceró y se colocó en un tubo eppendorf mantenido en hielo con buffer de lisis e inhibidor de proteasas y se realizó agitación en vórtex cada 5 minutos por 30 minutos para llevar a cabo la lisis celular. Transcurrido este tiempo las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 18 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de ácido bicinónico utilizando el kit de BCA de Pierce. Una concentración de 50 μg de proteína fue utilizada para realizar el Western blot. Para ello, se preparó un gel de SDS-PAGE al 12% de acrilamida y las proteínas se separaron por electroforesis bajo condiciones de 60 volts por 20 minutos para el gel concentrador y posteriormente 100 volts por 1 hora y media para el gel separador. Habiendo terminado la separación de las proteínas estas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en una cámara de transferencia sumergible a 0.3 amperes constantes por 2 horas. La membrana se bloqueó en solución de leche descremada al 5% en TBS-T en agitación a temperatura ambiente por 2 horas. Transcurrido este tiempo, la

membrana se lavó 3 veces cada 10 minutos en TBS-T y se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario contra E7 de VPH-16 en una dilución 1:200 en solución de leche al 2.5%. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBS-T y se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG en dilución 1:5,000. Se mantuvo en agitación por 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavó la membrana para quitar el exceso de anticuerpo y la detección de la proteína se hizo utilizando el sistema de detección quimioluminiscente de Pierce. Se utilizó un fotodocumentador. Como control de carga se empleó la detección de β -actina para lo cual la membrana se incubó 1 hora con el anticuerpo primario a temperatura ambiente y en agitación, se lavó en TBS-T y se añadió el anticuerpo secundario por 1 hora más. La membrana se lavó y se añadió el reactivo de luminiscencia para la detección de la proteína.

10) Efecto terapéutico de siRNAs liposomales

Ratones hembra C57BL/6 (n=30) fueron inoculados con 100,000 células TC-1 en 100 μ l de solución inyectable vía subcutánea en el dorso derecho. Se dividieron en 3 grupos y una vez establecido el tumor (10 días posteriores a la inoculación) fueron tratados con liposomas vacíos, siRNAs liposomales control negativo o siRNAs liposomales contra E7 respectivamente de manera intravenosa 1 vez cada 3 días durante 2 semanas. El tamaño del tumor fue medido durante el tiempo de duración del ensayo y al final de este los ratones fueron sacrificados y se extrajo tumor y órganos. Se registró el peso del tumor.

7.- RESULTADOS

Biodistribución de siRNAs-liposomales en ratones inmunocompetentes

Para analizar la biodistribución de los siRNAs liposomales en el modelo de estudio, ratones hembra de la cepa C57BL/6 fueron inoculados con 100,000 células TC-1 de manera subcutánea en el dorso derecho para la generación del tumor. Veintiuno días después una vez que el tumor estuvo formado los ratones fueron inyectados de manera intravenosa con liposomas vacíos como grupo control y siRNAs liposomales marcados con Alexa 488. La dosis empleada fue de 40 µg de siRNA por ratón en 200 µl de solución salina. Una hora después los ratones fueron sacrificados y se realizó la extracción de tumor y órganos a partir de los cuales se realizaron cortes en criostato para ser analizados por microscopía confocal.

Como se observa en la Figura 13 el grupo de ratones tratado con siRNAs liposomales marcados con Alexa 488 mostró presencia de estos (puntos y tonalidad verde) en el tumor y otros órganos analizados como bazo, hígado, riñón y pulmón. Sin observarse fluorescencia para el grupo de ratones control tratado con liposomas vacíos. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Estos resultados indicaron que los siRNAs llegaron tanto al tumor como a diversos órganos del ratón, mostrando una distribución eficiente.

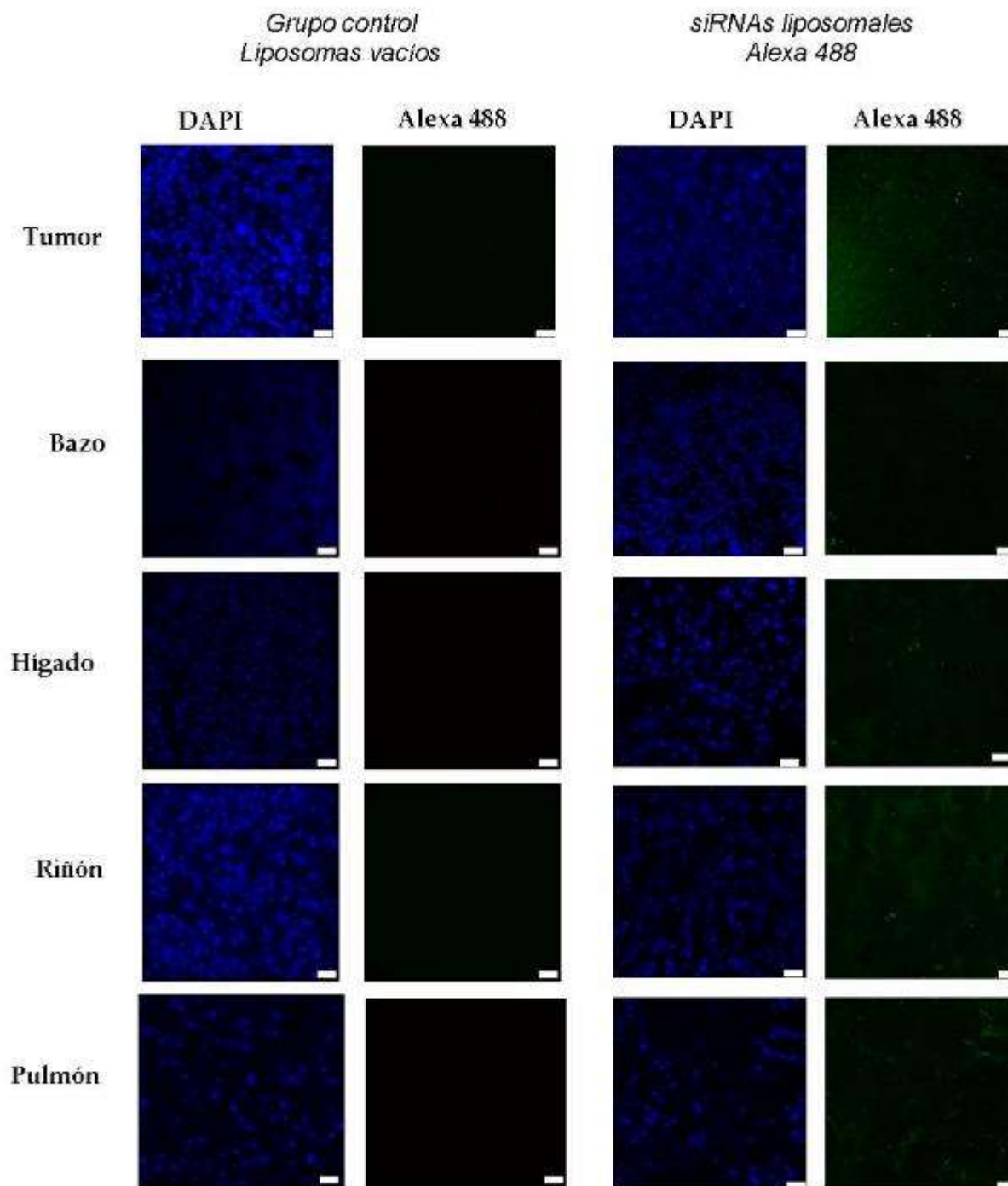


Figura 13. Biodistribución de siRNAs liposomales en el modelo de estudio. Las columnas etiquetadas como DAPI muestran los núcleos de las células en cada órgano mientras que las columnas etiquetadas como Alexa 488 muestran la biodistribución de los siRNAs liposomales en ambos grupos de estudio. Se representa la biodistribución en tumor y órganos principales. La barra blanca indica 25 micras.

Silenciamiento del oncogén E7 de VPH-16 por siRNAs liposomales en un modelo murino inmunocompetente

1) Evaluación de la dosis para el silenciamiento de E7 en la expresión tumoral de mRNA y proteína

Para determinar la dosis a la cual los siRNAs liposomales producen un efecto de silenciamiento sobre el oncogén E7, se analizó su expresión a nivel mRNA y proteína después de la administración de una dosis única. Para ello, ratones hembra C57BL/6 (n=40) se inocularon con 100,000 células TC-1 en el dorso derecho de manera subcutánea a fin de inducir la generación y crecimiento tumoral. Al cabo de 21 días cuando el tumor estuvo formado y alcanzó alrededor de 600 mm³, los ratones se dividieron en 4 grupos (n=10) los cuales fueron tratados con liposomas vacíos, siRNAs liposomales control negativo, siRNAs liposomales contra E7 a dosis de 10 µg y siRNAs liposomales contra E7 a dosis de 40 µg de manera intravenosa. Cuarenta y ocho horas después se sacrificaron por dislocación cervical y se disectó el tumor para llevar a cabo la extracción de mRNA y proteína. Se analizó su expresión por qPCR y Western blot respectivamente.

Los grupos control tratados con liposomas vacíos y siRNAs liposomales control negativo no muestran efecto en la expresión del mRNA a diferencia de los grupos tratados con siRNAs liposomales específicos contra E7 en las dos dosis utilizadas. Presentándose una inhibición en la expresión de mRNA E7 de 20% al utilizarse una dosis de 10 µg y una inhibición del 65% con la dosis más alta de 40 µg (Figura 14).

En cuanto a la expresión de la proteína de la misma manera que en el mRNA en este caso no se observó efecto de silenciamiento en los grupos control (liposomas vacíos y siRNAs liposomales control negativo), sin embargo se obtuvo una inhibición en la expresión de la proteína E7 de 18% utilizando la dosis de 10 µg de siRNAs-E7 y de 53% con la dosis de 40 µg (Figura 15). Estos resultados indican que la dosis de 40 µg es óptima para el silenciamiento y se eligió para la realización de los siguientes ensayos.

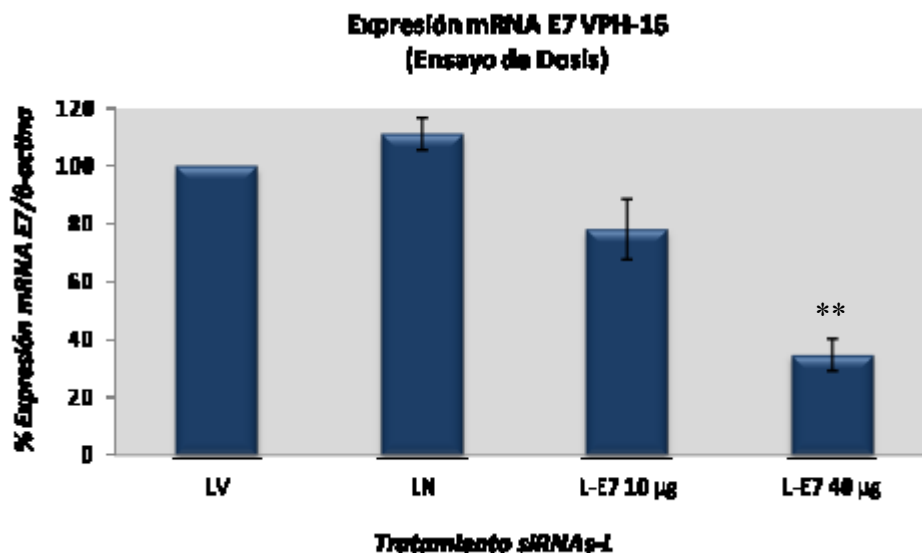


Figura 14. Expresión de mRNA de E7 VPH-16 en un ensayo de dosis con siRNAs liposomales. Se muestran los niveles de expresión de mRNA E7 en tumores de ratones C57BL/6, 48 horas después de la administración intravenosa de liposomas vacíos (LV), siRNAs liposomales control negativo (LN) o siRNAs liposomales contra E7 (L-E7) utilizando dosis de 10 o 40 µg. Las barras representan la media +/- error estándar. **p< .01

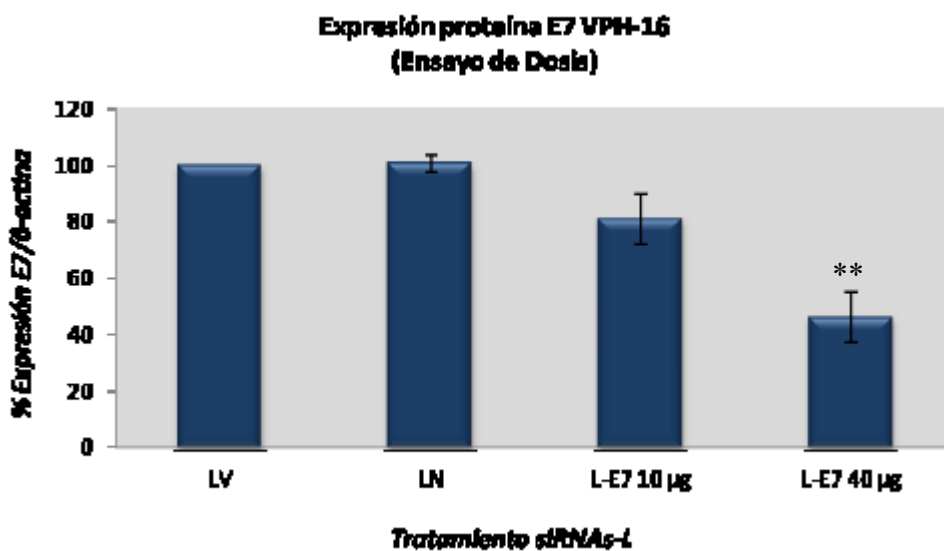


Figura 15. Expresión de la proteína E7 VPH-16 en un ensayo de dosis con siRNAs liposomales. Se muestran los niveles de expresión de proteína E7 en tumores de ratones C57BL/6, 48 horas después de la administración intravenosa de liposomas vacíos (LV), siRNAs liposomales control negativo (LN) o siRNAs liposomales contra E7 (L-E7) utilizando dosis de 10 o 40 µg. Las barras representan la media +/- error estándar. **p< .01

2) Evaluación de tiempo para el silenciamiento de E7 en la expresión tumoral de mRNA y proteína

Una vez determinada la dosis de trabajo óptima para el silenciamiento (40 μ g) del oncogén E7, se procedió a realizar un ensayo de tiempo para determinar el punto máximo de silenciamiento, así como para establecer la duración de este efecto, dato importante para el diseño en los experimentos terapéuticos. Para esto, ratones hembra C57BL/6 fueron inoculadas con 100,000 células TC-1 de forma subcutánea en el dorso derecho. A los 21 días post-inoculación cuando el tumor se había desarrollado, los ratones fueron divididos en grupos y tratados intravenosamente con siRNAs liposomales. Se tuvieron 3 grupos: liposomas vacíos, siRNAs liposomales control negativo y siRNAs liposomales contra E7. A las 48 y 72 horas después de recibido el tratamiento, los ratones se sacrificaron y se disectaron los tumores para la extracción de mRNA y proteína. El análisis de expresión se realizó mediante qPCR y Western blot.

Los resultados muestran la inhibición en la expresión de mRNA (65%) y proteína (53%) a las 48 horas como se había establecido previamente en el objetivo anterior y puede observarse además como esta inhibición comienza a perderse a las 72 horas, presentándose una recuperación en la expresión tanto a nivel de mRNA como de proteína. A este tiempo se obtiene una inhibición en la expresión de 33% para mRNA (Figura 16) y de 22% en la expresión de la proteína (Figura 17). De manera que puede decirse que el pico máximo de silenciamiento se da a las 48 horas y con esto puede establecerse la pauta de administración de siRNAs liposomales para los siguientes ensayos. La cual sería de 2 veces por semana para así mantener bajos los niveles de expresión del oncogén.

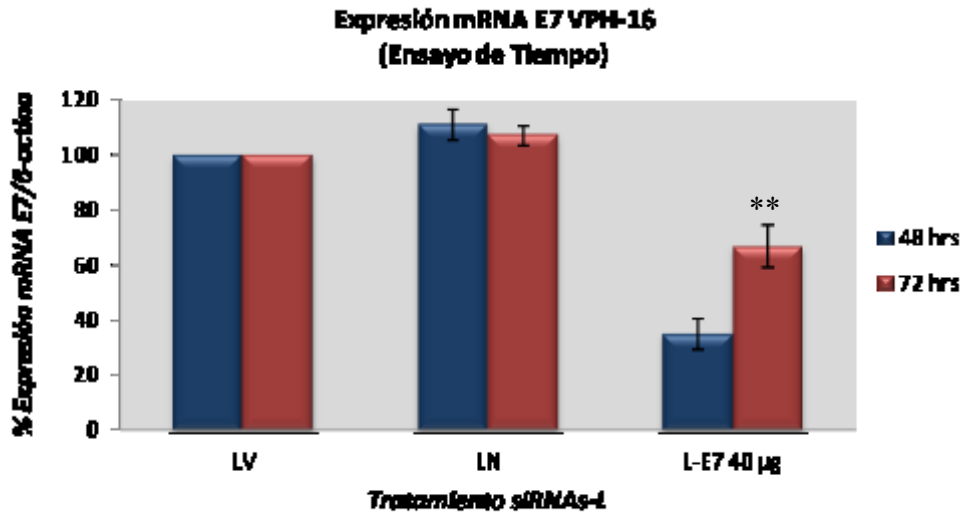


Figura 16. Expresión de mRNA de E7 VPH-16 en un ensayo de tiempo con siRNAs liposomales. Se muestran los niveles de expresión de mRNA E7 en tumores de ratones C57BL/6, 48 horas y 72 horas después de la administración intravenosa de liposomas vacíos (LV), siRNAs liposomales control negativo (LN) o siRNAs liposomales contra E7 (L-E7) utilizando una dosis de 40 µg. (n=10 por grupo/tiempo) Las barras representan la media +/- error estándar. **p< .01

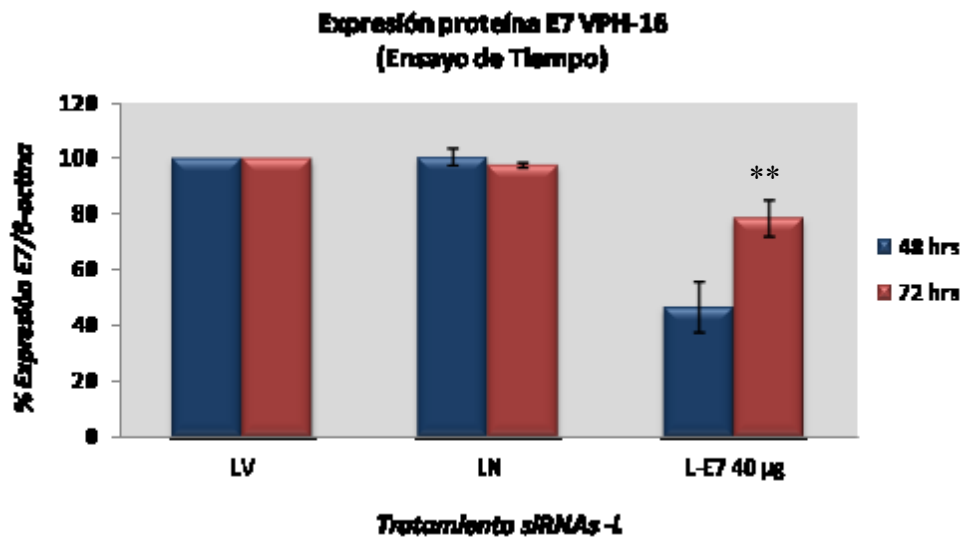


Figura 17. Expresión de la proteína E7 VPH-16 en un ensayo de tiempo con siRNAs liposomales. Se muestran los niveles de expresión de proteína E7 en tumores de ratones C57BL/6, 48 horas y 72 horas después de la administración intravenosa de liposomas vacíos (LV), siRNAs liposomales control negativo (LN) o siRNAs liposomales contra E7 (L-E7) utilizando una dosis de 40 µg. (n=10 por grupo/tiempo) Las barras representan la media +/- error estándar. **p< .01

Efecto terapéutico de siRNAs liposomales en un modelo murino de cáncer

Con la finalidad de evaluar el efecto terapéutico de los siRNAs liposomales en el modelo de estudio, ratones C57BL/6 fueron inoculados subcutáneamente con células TC-1 para la generación del tumor. Diez días después de la inoculación celular y cuando el tumor comienza su crecimiento, se inició el tratamiento con los siRNAs-L de manera intravenosa. Se formaron tres grupos: liposomas vacíos, siRNAs liposomales control negativo y siRNAs liposomales contra E7. El tratamiento fue dado según los resultados obtenidos en los ensayos de determinación para dosis y tiempo (dos veces por semana en una dosis de 40 μg). Se realizaron tres dosis (días 10, 13 y 16) y el volumen tumoral fue registrado durante el ensayo a fin de evaluar su crecimiento. Una vez terminado el tratamiento los ratones fueron sacrificados (día 19) y se extrajeron tumor y órganos. Se registró el peso del tumor al final del experimento.

Como se observa en la Figura 18, los grupos de ratones control que fueron tratados con liposomas vacíos o siRNAs liposomales control negativo presentaron un volumen tumoral mayor al final del ensayo en comparación al grupo de ratones tratados con siRNAs liposomales contra E7 (liposomas vacíos: 577.47 mm^3 , liposomas negativos: 722.27 mm^3 , liposomas siRNAs E7: 225.61 mm^3). El tratamiento con siRNAs liposomales E7 disminuye el crecimiento del tumor en comparación a los grupos control mostrando una tendencia a partir de la segunda dosis (día 13) y esta inhibición puede seguir observándose en los días subsecuentes de manera significativa. Un incremento en el tamaño del tumor al final del experimento fue observado en el grupo de ratones tratado con siRNAs liposomales control negativo sin embargo, este no mostró ser estadísticamente significativo. El peso de los tumores también fue menor en el grupo de ratones tratados con siRNAs liposomales contra E7 en comparación a los grupos control (liposomas vacíos: 0.43gr, liposomas negativos: 0.49gr, liposomas siRNAs E7: 0.22gr) (Figura 19).

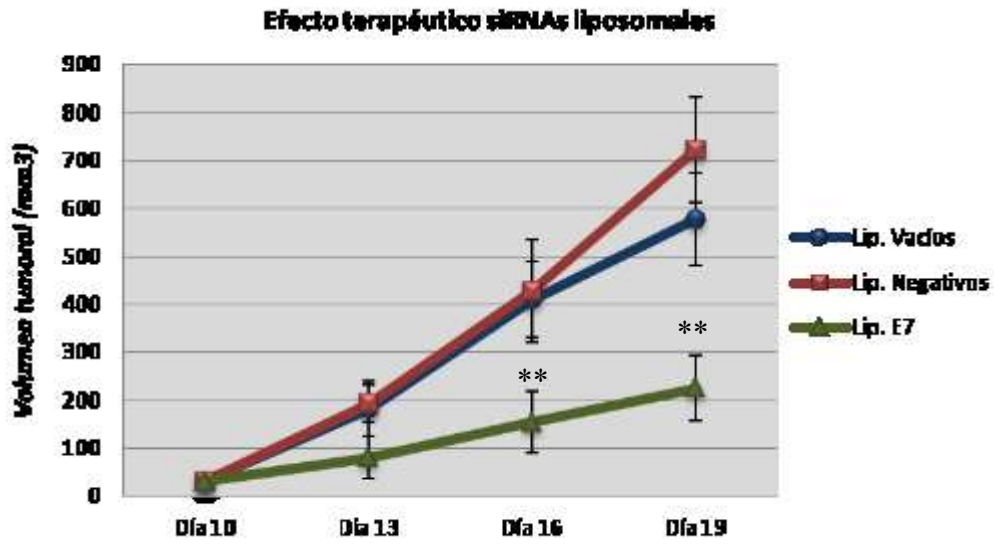


Figura 18. Efecto terapéutico de siRNAs liposomales en el volumen tumoral.

Se muestra el crecimiento del tumor en ratones C57BL/6 al haber sido tratados intravenosamente con liposomas vacíos, siRNAs liposomales control negativo y siRNAs liposomales contra E7 dos veces por semana durante dos semanas utilizando una dosis de 40 μ g. La imagen inferior muestra los tumor obtenidos al sacrificar a los ratones una vez concluido el tratamiento (n=10 por grupo). Las barras representan la media +/- error estándar. **p<.01

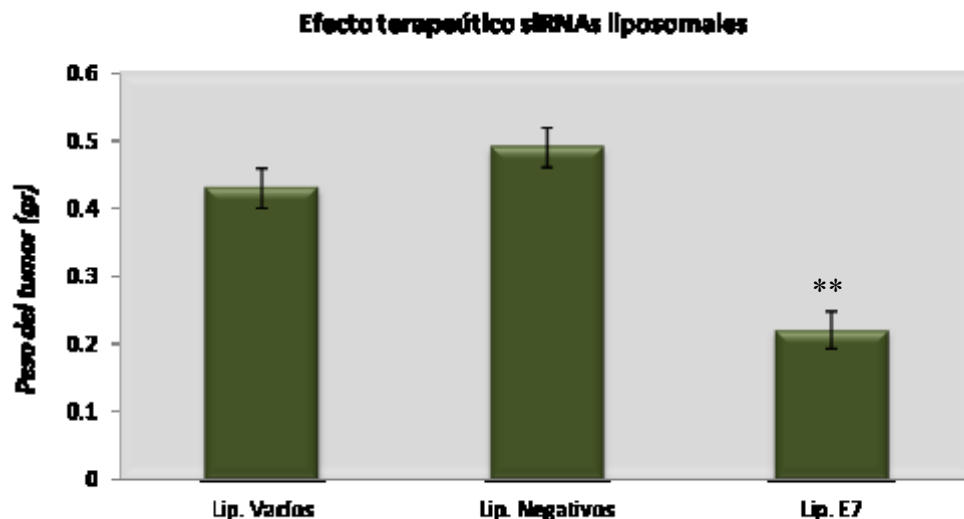


Figura 19. Efecto terapéutico de siRNAs liposomales en el peso del tumor.

Se muestra el peso del tumor al final del experimento en ratones C57BL/6 tratados intravenosamente con liposomas vacíos, siRNAs liposomales control negativo y siRNAs liposomales contra E7 dos veces por semana durante dos semanas utilizando una dosis de 40 μ g (n=10 por grupo). Las barras representan la media +/- error estándar. **p< .01

La expresión a nivel mensajero y proteína de E7 se evaluó una vez terminado el ensayo. Obteniéndose como resultado una inhibición del 50% a nivel mRNA y 70% a nivel proteína en los grupos de ratones tratados con siRNAs liposomales contra E7 en comparación a los 2 grupos control: liposomas vacíos y siRNAs liposomales control negativo (Figura 20).

Efecto terapéutico siRNAs liposomales en la expresión de E7 VPH-16

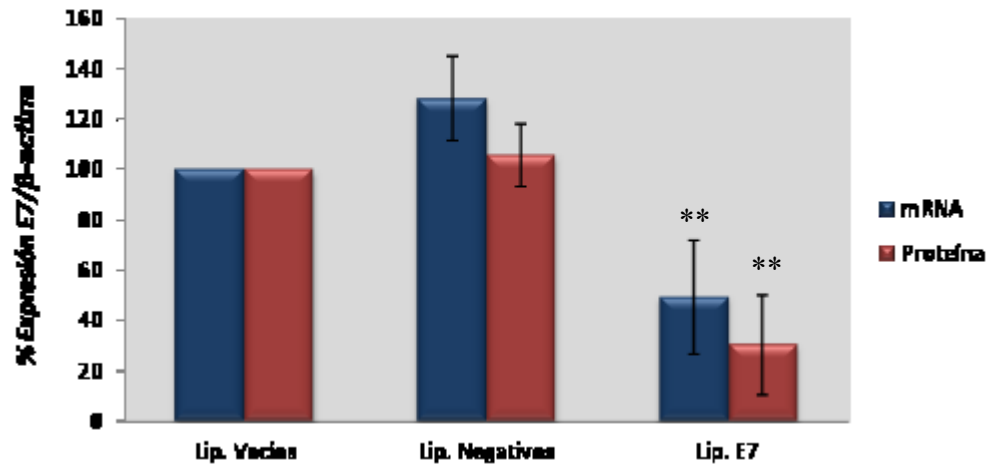


Figura 20. Efecto terapéutico de siRNAs liposomales en la expresión de mRNA y proteína de E7 de VPH-16.

Se muestra el nivel de expresión de mRNA y proteína tumoral al final del experimento en ratones C57BL/6 tratados intravenosamente con liposomas vacíos, siRNAs liposomales control negativo y siRNAs liposomales contra E7 dos veces por semana durante dos semanas utilizando una dosis de 40 μ g (n=10 por grupo). Las barras representan la media +/- error estándar. **p< .01

8.- DISCUSIÓN

El aprovechamiento del mecanismo de RNA de interferencia por medio del uso de siRNAs ha mostrado tener una gran potencial en su aplicación como terapia en modelos pre-clínicos. Sin embargo, una de sus principales limitantes es el desarrollo de acarreadores que sean seguros y eficientes, lo que ha retardado su aplicación en humanos. Potenciales candidatos a vehículos de liberación como liposomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanotubos de carbón, entre otros están siendo estudiados para mejorar las limitantes que se presentan para su posterior aplicación a nivel clínico.

En el presente estudio se analizó si la eficiencia del sistema de liposomas neutros de DOPC diseñados por nuestro grupo de trabajo para la biodistribución de siRNAs (siRNAs liposomales) se ve afectada por la presencia de un sistema inmune completo. Esto se logró evaluando tanto su biodistribución como su efecto terapéutico en un modelo murino de ratones C57BL/6 para cáncer de cérvix. Se determinaron parámetros de dosis y tiempo respuesta, análisis de expresión a nivel de mRNA y proteína del oncogén E7 de VPH-16 para comprobar su silenciamiento efectivo y finalmente, se estudio el potencial terapéutico antitumoral de dicho silenciamiento.

El sistema de siRNAs liposomales mostró en el reporte original una biodistribución eficiente a tumor y diversos órganos en un modelo murino de cáncer de ovario. Aunado a esto se mostró su efecto en el silenciamiento específico del gen blanco y la actividad antitumoral resultante de dicho silenciamiento (Landen *et al* 2005). Este sistema ha sido evaluado en otros modelos de cáncer pero únicamente en ratones inmunodeficientes (Halder 2006., Gray 2008., Merritt 2008., Pecot 2014), permaneciendo la incógnita de su efectividad en organismos inmunocompetentes.

Lo primero a evaluar fue la biodistribución de los siRNAs liposomales. Para tal efecto se utilizó de la línea celular TC-1 que expresa los oncogenes E6 y E7 del virus de papiloma humano y es singénica a la cepa de ratones C57BL/6 empleada en este trabajo, lo que

permite el establecimiento de tumores en los ratones inmunocompetentes. Los animales fueron inoculados con las células TC-1 y habiéndose formado el tumor, fueron tratados intravenosamente con siRNAs marcados fluorescentemente y encapsulados en los liposomas. Una hora después, los ratones se sacrificaron y se disectaron tumor y órganos y sus cortes histológicos se analizaron por microscopía confocal. El sistema liposomal fue capaz de biodistribuirse adecuadamente en el organismo y fueron observados en el tumor siendo capaz también de llegar a órganos principales (hígado, bazo, riñón y pulmón). Esto concuerda con el reporte original (Landen *et al* 2005) así como con el estudio de Villares *et al* (2008) ambos realizados en ratones atímicos y donde se demostró que era posible utilizar los siRNAs-L no solo para tumores intraperitoneales sino también para tumores subcutáneos. Estos resultados establecen una ventaja en relación a la administración intratumoral, que fue la estrategia seguida por otros grupos de trabajo (Niu *et al* 2006, Fujii *et al* 2006) y que está limitada a la accesibilidad de los tumores. Esta amplia distribución de nuestros siRNAs liposomales nos indica que podrían ser utilizados para el tratamiento de afectaciones en cualquier parte del organismo sin limitarse únicamente a administraciones localizadas que solo serían viables clínicamente si se tiene accesibilidad a esa región del organismo en cuestión donde se presenta el problema.

Habiendo establecido la biodistribución de los siRNAs liposomales en el modelo de estudio el siguiente paso fue determinar si el sistema liposomal aún conservaba su eficiencia en liberar los siRNAs e inducir el silenciamiento del gen de interés, en este caso el oncogén E7 de VPH-16. Se diseñó un siRNA específico contra E7 y se realizaron ensayos buscando la dosis óptima de silenciamiento basados en las dosis utilizadas previamente por nuestro grupo de trabajo y lo reportado por otros grupos. Con base a nuestros resultados la dosis seleccionada fue de 40 μ g de siRNAs liposomales por ratón y fue esta dosis con la que se realizaron ensayos de tiempo respuesta para determinar la duración del efecto de silenciamiento. Originalmente se había propuesto que además del análisis a 48 horas también se analizaría el grado de silenciamiento a 72 y 96 horas. Sin embargo, al realizar el estudio a las 72 horas después de una dosis única se encontró que los niveles de expresión tanto de mRNA como de proteína comenzaban a

reestablecerse. Debido a esto y siguiendo las reglas de uso ético de animales, se excluyó del estudio el análisis de las 96 horas.

Cabe destacar que la dosis que produjo mejores resultados en nuestro modelo es mayor a lo anteriormente reportado en los otros modelos de estudio en ratones atímicos (incluidos cáncer de ovario, melanoma, cáncer de mama) que utilizaron el mismo sistema de siRNAs liposomales y cuyas dosis efectivas fueron de 5 μg o 10 μg de siRNAs liposomales por ratón (Landen 2005., Halder 2006., Villares 2008., Vivas Mejía 2010., Cortez 2012). Esto indica que el cambio en el modelo de estudio a un organismo inmunocompetente podría estar originando de alguna manera el requerimiento de dosis más altas. Se ha demostrado que liposomas con cargas catiónicas son más fácilmente reconocidos por el sistema retículo endotelial y activan el sistema del complemento lo que hace que sean más rápidamente eliminados de circulación evitando llegar a su sitio de acción y presentando menor disponibilidad (Zelphati 1998). Sin embargo, nuestro sistema liposomal es neutro y a pesar de que no existen reportes de que este tipo de liposomas puedan ocasionar alguna de estas respuestas, no puede descartarse que pudieran ser reconocidos y destruidos por el sistema inmunológico resultando que una menor cantidad de ellos lleguen a las células tumorales y requiriendo, por lo tanto, una mayor dosis. Otra posibilidad es que los liposomas neutros presenten una menor eficiencia de transfección sobre la línea celular empleada y por lo tanto, concentraciones bajas de siRNAs no son suficientes para originar un silenciamiento efectivo y medible. Para probar esta hipótesis se podría evaluar en ratones atímicos el mismo modelo de cáncer de cérvix para así poder realizar una comparación más adecuada. Sin embargo, cabe destacar que esta dosis (40 μg de siRNAs) fue empleada en un modelo de estudio similar (Wu *et al* 2011), solo que el sistema liposomal es completamente diferente y mucho más complejo que el nuestro.

Basados en estos resultados se determinó la periodicidad de las dosis para llevar a cabo los estudios sobre el efecto terapéutico antitumoral en este modelo utilizando siRNAs-L. Debido a que los niveles de expresión del oncogén empiezan a recuperarse a las 72 horas, se estableció que los siRNAs-L debían administrarse dos veces por semana.

Además establecimos que fuera durante un periodo de dos semanas, ya que en base al conocimiento que teníamos sobre el desarrollo del tumor, es el tiempo en el que en los grupos control se alcanza el límite de tamaño tumoral éticamente permitido. Se determinó que el uso de siRNAs-L específicos contra el oncogén E7 ocasiona una inhibición en el crecimiento del tumor la cual puede verse desde las primeras administraciones. Se observó que tanto el volumen como el peso tumoral fueron reducidos en un 60% en comparación a grupos control y esta inhibición está ligada a un silenciamiento en la expresión de E7 tanto a nivel mensajero como a nivel proteína. Si bien, al final del experimento se observa un incremento en el grupo tratado con liposomas control negativo en los parámetros analizados éste incremento no es significativo. La inhibición que obtuvimos en el desarrollo de los tumores fue mayor a la reportada por Wu *et al* en el 2011 quienes también evaluaron el efecto antitumoral de partículas lipídicas cargadas con siRNAs específicos para E6/7. Ellos mostraron una inhibición de alrededor del 50% en el tamaño de los tumores con volúmenes finales de aproximadamente 70 mm² sin mostrar el nivel de expresión de los oncogenes. Es de importancia señalar que el sistema lipídico empleado por este grupo de trabajo está conformado por una mezcla de lípidos rodeado por una cubierta de polietilenglicol (PEG), la cual si bien ha mostrado ser eficiente en el enmascaramiento de cargas positivas ayudando así a evitar en cierta medida los efectos tóxicos ligados a ellas, se ha demostrado también que dicha cubierta puede interferir con la unión lípido-célula produciendo una liberación ineficiente de su contenido dando lugar a una disminución o incluso la ausencia de silenciamiento (Harris *et al* 2003; Pecot 2014).

Cabe mencionar que el esquema de tratamiento utilizado en este trabajo (3 dosis de 40 µg equivalentes a 1.6 mg/kg de peso) es comparable e incluso menor a lo reportado por otros grupos de trabajo donde el tratamiento excede no solo la dosis sino el número de aplicaciones (y por consiguiente la cantidad total de siRNAs) necesarias para obtener, en el mejor de los casos, resultados parecidos a los nuestros (Chien *et al* 2005., Li *et al* 2008., Yagi 2009). Esto sugiere que en uso clínico nuestro sistema liposomal resultaría la opción más atractiva por sus mejores características de costo-beneficio.

Si bien se ha tenido éxito en estudios similares donde se evalúa la efectividad de un sistema de liberación es de importancia señalar que una de las grandes ventajas de nuestro vehículo acarreador es la simplicidad de sus componentes y fácil elaboración. El empleo de liposomas para la liberación de drogas ha sido utilizado ampliamente, demostrando que se puede hacer uso de estos de manera segura. Todo lo anterior coloca a nuestro sistema de liberación de siRNAs a base de liposomas neutros de DOPC como una muy buena alternativa con potencial clínico para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y/o enfermedades que sean el resultado de la sobre expresión de genes.

9.- CONCLUSIONES

- ✓ El sistema de liposomas neutros de DOPC es capaz de biodistribuir eficientemente siRNAs en un modelo murino inmunocompetente llegando a tumor y otros órganos.
- ✓ Los liposomas neutros de DOPC son capaces de liberar su contenido de siRNAs e inducir el silenciamiento del oncogén E7.
- ✓ El tratamiento con siRNAs liposomales tiene un efecto antitumoral significativo en el modelo murino inmunocompetente.
- ✓ La presencia de un sistema inmune completo no afecta la eficiencia del sistema de liposomas neutros de DOPC para su biodistribución, silenciamiento del gen blanco y efecto antitumoral en el modelo de estudio

10.- PERSPECTIVAS

Dada la participación de los oncogenes E6 y E7 en la afectación del ciclo celular y apoptosis es de interés llevar a cabo ensayos para determinar cual es el mecanismo involucrado en la inhibición del crecimiento tumoral. Así como el uso conjunto de siRNAs liposomales y agentes quimioterapéuticos para analizar si existe un efecto aditivo que pudiese limitar aún más el desarrollo del tumor. Es importante también realizar estudios en modelos de metástasis a fin de determinar el alcance de esta terapia

BIBLIOGRAFIA

Abdul N, Brown C & Gaston K. (2009) The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1700-1717

Akinc A, Zumbuehl A & Goldberg M. (2008) A combinatorial library of lipid like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol.* 26 (5): 561-569

Alder M, Dames S, Gaudet J & Mango S. (2003) Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference. *RNA* 9: 25-32

Bai L, Wei L, Wang J, Li X & He P. (2006) Extended effects of human papillomavirus 16 E6-specific short hairpin RNA on cervical carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer* 16: 718–729

Beaudenon S & Huibregtse J. (2008) HPV E6, E6AP and cervical cancer. *BMC Biochemistry* 9 (Suppl I):S4 1-7

Behlke M. (2008) Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides* 18: 305-320

Brehm A, Nielsen S, Miska E, McCance D, Reid J, Bannister A & Kouzarides T. (1999) The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 18 (9): 2449-2458

Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Serrano B, Brotons M, Cosano R, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S & Castellsagué X. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in World. Summary Report 2014-04-08.

Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M & Hoppe-Seyler F. (2003) siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 22 (38): 5938–5945

Chang JT, Kuo T-F, Chen Y-J, Chiu C-C, Lu Y-C, LI H-F, Shen C-R & Cheng A-J. (2010) Highly potent and specific siRNA against E6 or E7 genes of HVP 16 or HPV 18 infected cervical cancers. *Cancer Gene Ther* 17, 827-836

Chien PY, Wang J, Carbonaro D, Lei S, Miller B, Sheikh S, Ali SM, Ahmad MU & Ahmad I. (2005) Novel cationic cardiolipin analogue-based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery in vitro an in vivo. *Cancer Gene Ther.* 12 (3): 321-328

Cho Y, Kim J & Park K. (2003) Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *J. Pharm Pharmacol* 55: 721-734

Cong-fei X & Wang J. (2014) Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *AJPS* 10 (1): 1-12

Cortez V, Mann M, Tekmal S, Suzuki T, Miyata N, Rodriguez Aguayo C, Lopez Berestein G & Sood AK. (2012) Targeting the PELP1-KDM1 axis as a potential therapeutic strategy for breast cancer. *Breast Cancer Res* 14 (4): R108

Crosbie E, Einstein M, Franceschi S & Kitchener H. (2013) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 382: 889-899

Davis M, Zuckerman J, Hang C, Seligson D, Tolcher A, Alabi C, Yen Y, Heidel J & Ribas A. (2010) Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464: 1067–1070

Dokka S, Toledo D, Shi X, Castranova V & Rojanasakul Y. (2000) Oxygen radical mediated pulmonary toxicity induced by some cationic liposomes. *Pharm Res.* 17 (5): 521

Doorbar J, Quint W, Banks L, Braco I, Stoler M, Broker T & Stanley M. (2012) The biology and life cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 30S F55-F70

Dyson N, Howley P, Munger K & Harlow E. (1989) The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243 (4893): 934-937

Faridi R, Zahra A, Khan K & Idrees M. (2011) Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal* 8: 269-276

Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S & Mello C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-11

Fujii T, Saito M, Iwasaki E, Ochiya E, Takei Y, Hayashi S, Ono A, Hirao N, Nakamura M, Kubushiro K, Tsukazaki K & Aoki D. (2006) Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol.* 29: 541-548

Ganguly N & Parihar S. (2009) Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J. Biosci* 34: 113-123

Gavilano L, Coleman N, Burnley L, Bowman M, Kalengamaliro N, Hayes A, Bush L & Siminszky B. (2006) Genetic engineering of *Nicotiana tabacum* for reduced nicotine content. *J Agric Food Chem* 54 (24): 9071-9078

Georgopoulos N, Proffitt J & Blair E. (2000) Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* 19: 4930-4935

Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B & Tommasino M. (2010) The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 40: 1-13

Gray M, Van Buren G & Dallas N. (2008) Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J Natl Cancer Inst* 100: 109-120

Halder J, Kamat A & Landen C. (2006) Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. *Clin Cancer Res* 12: 4916-4924

Hannon G & Rossi J. (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431: 371-378

Harris J Chess R. (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* 2: 214-221

Havre P, Yuan J, Hedrick L, Cho K & Glazer P. (1995) p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res.* 55: 4420-4424

Hilario E. (2006) Morfología del cérvix uterino. VIII Simposium Internacional sobre Regulación natural de la Fertilidad

Howard K, Rahbek U, Liu X, Damgaard C, Glud S, Andersen M, Hovgaard M, Schmitz A, Nyengaard J, Besenbacher F & Kjems J. (2006) RNA Interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther.* 14: 476-484

Huibregtse J, Scheffner M & Howley P. (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10 (13): 4129-4135

Jiang M & Jo M. (2002) Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* 21: 6041-6048

Judge A, Sood V, Shaw J, Fang D, McClintock K & MacLachlan I. (2005) Sequence dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature Biotechnology* 23 (4): 457-462

Judge A, Robbins M, Tavakoli I, Levi J, Hu L, Fronda A, Ambegia E, McClintock K & MacLachlan I. (2009) Confirming the RNAi mediated mechanism of action of siRNA based cancer therapeutics in mice. *J Clin Invest* 119 (3): 661-673

Kesis T, Connolly D, Hedrick L & Cho K. (1996) Expression of HPV 16 E6 or E7 increase integration of foreign DNA. *Oncogene* 13 (2): 427-431

Khairuddin N, Gantier M, Blake S, Wu S, Behlke M, Williams B & McMillan N. (2011) siRNA-induced immunostimulation through TLR7 promotes antitumoral activity against HPV-driven tumors in vivo. *Immunol Cell Biol*; 89 (2): 1-10

Kim S, Garg H, Joshi A & Manjunath N. (2009) Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs in vivo. *Cell* 15 (11): 491-500

Klingelhutz A, Foster S & McDougall J. (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380 (6569): 79-82

Kumar K, Bhowmik D & Deb L. (2012) Recent trends in liposomes used as novel drug delivery system. *Pharma Innovation* 1 (1): 29-38

Landen C, Chavez Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers M, Lopez-Berestein G & Sood A. (2005) Therapeutic EphA2 Gene Targeting In vivo Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery. *Cancer Res* 65 (15): 6910-6918

Layzer J, McCaffrey A, Tanner A, Huang Z, Kay M & Sullenger B. (2004) In vivo activity of nuclease resistant siRNAs. *RNA* 10 (5): 766-771

Le L, Lorenz Y, Scheurer S, Fötisch K, Enrique E, Bartra J, Biernettl S, Vieths S & Sonnewald U. (2006) Desing of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotechnol J* 4 (2): 231-242

Li SD, Chono S & Huang L. (2008) Efficient gen silencing in metastatic tumor by siRNA formulated in surface-modified nanoparticles. *J Control Release* 126 (1): 77-84

Liu W, Green N, Seymour L & Stevenson M. (2009) Paclitaxel combined with siRNA targeting HPV 16 oncogenes improves cytotoxicity for cervical carcinoma. *Cancer gene therapy* 16: 764-775

Lizano Soberón M, Carrillo A & Contreras A. (2009) Infección por Virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología* 4: 205-216

López Saavedra A & Lizano Soberón M. (2006) Cáncer cervicouterino y el Virus de Papiloma Humano: La historia que no termina. *Cancerología* 1: 31-55.

Massimi P, Gammoli N, Thomas M & Bank L. (2004) HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain containing tumour suppressor or substrates for proteasome mediated degradation. *Oncogene* 23: 8033-8039

Merritt W, Lin Y & Spannuth W. (2008) Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth. *J Natl Cancer Inst* 100: 359-372

Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M & Ochiya T. (2004) Atelocollagen mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 32 (13): e109

Montgomery M, Xu S & Fire A. (1998) RNA as a target of doublestranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15502-15507.

Napoli C, Lemieux C & Jorgensen R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-suppression of Homologous Genes *in trans*. *The Plant Cell* 2: 279-289

Nakamura López Y, Esparza Aguilar M, Garrido Olvera L, Palomar Olguín V & Gallardo Pérez J.C. (2009) Aplicaciones terapéuticas del RNA de interferencia. *Bioquímica* 34 (1): 26-36

Niu X, Peng Z, Duan W, Wang H & Wang P. (2006) Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference *in vitro* and *in vivo*. *Int J Gynecol Cancer* 16: 743-751

Ozpolat B, Akar U, Tekedereli I & Lopez-Berestein G. (2008) Targeted silencing of Bcl-2 by liposomal siRNA nanovectors leads to autophagic and apoptotic cell death *in vivo* breast cancer models. *Proc AACR* 4928

Ozpolat B, Sood A & Berestein G. (2010) Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J Intern Med* 267: 44-53

Palliser D. (2006) An siRNA based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 439: 89-94

Pecot CV, Wu SY, Bellister S, Filant J, Rupaimoole R, Hisamatsu T, Bhattacharya R, Maharaj A, Azam S, Rodriguez Aguayo C, Nagaraja AS, Morelli MP, Gharpure KM, Waugh TA, Gonzalez Villasana V, Zand B, Dalton HJ, Kopetz S, Lopez Berestein G, Ellis LM & Sood AK. (2014) Therapeutic silencing of KRAS using systemically delivered siRNAs. *Mol Cancer Ther* 13 (12): 2876-2885

Phalon C, Rao D & Nemunaitis J. (2010) Potential use of RNA interference in cancer therapy. *Expert Rev Mol Med*. 18;12:e26

Putral L, Bywater M, Gu W, Saunders N, Gabrielli B, Leggatt G & McMillan N. (2005) RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol* 68: 1311-1319

Ratcliff F, Harrison BD & Baulcombe DC. (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276: 1558-1560

Rautava J & Syrjanen S. (2012) Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and Neck Pathol* 6: S3-S15

Resnier P, Montier T, Mathieu V, Benoit J & Passirani C. (2013) A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials* 34: 6429-6443

Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrera R & Larrain A. (2006) Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus de papiloma humano en epitelio cervical- *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 71 (2): 135 - 40

Rodríguez M. (2007) RNA interferente: Del descubrimiento a sus aplicaciones. An. R. Acad. Nac. Farm. 73 (1): 97-124

Romero E, Morilla M & Bakas L. (2000) Vectores lipídicos. Nuevas estrategias aplicadas a la terapia génica. Medicina 61: 205-214

Ronco L, Karpova A, Vidal M & Howley P. (1998) Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor 3 and inhibits its transcriptional activity. Genes Dev. 12: 2061-2072

Rossi J. (2006) SNALPing siRNAs in vivo. Gene Therapy 13: 583-584

Ruiz Castellanos M & B. Sangro. (2005) Terapia génica: ¿Qué es y para qué sirve? Ant Sist. Sanit. Navar. 28 (1): 17-27

Saad I, Rebolledo D & Castillo J. (2009) El impacto de la tecnología del RNA de interferencia en la industria farmacéutica. Recuperado de www.octi.guanajuato.gob.mx/sinnco/.../MT/.../MT62_MSAAD_101.pdf

Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, Dames S, Loffler K, Fechtner M, Arnold W, Giese K, Klippel A & Kaufmann J. (2006) A novel siRNA lipoplex technology for RNA interference in the Mouse vascular endothelium. Gene Ther. 13: 1222-1234

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ & Howley PM. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell 63 (6): 1129-1136

Shehata M, Fang B, Zhang P, Hu Z, Gu S, Weng K, Gray J & Chen F. (2014) Nanoparticle mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and viral infections. *Theranostics* 4 (9): 872-892

Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen K, Parrish S, Timmons L, Plasterk R & Fire A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA triggered gene silencing. *Cell* 107 (4): 465 – 476

Sima N, Wang W, Kong D, Deng D, Xu Q, Zhou J, Xu G, Meng Li, Lu Y, Wang S & Ma D. (2008) RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. *Apoptosis* 13: 273–281

Singhania R, Khairuddin N, Clarke D & McMillan N. (2012) RNA interference for the treatment of papillomavirus disease. *Open Virol J.* 6: 204-215

Sledz C, Holko M, Veer M, Silverman R & Williams B. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology* 5 (9): 834-839

Soutschek J, Akinc A, Bramiage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M & Vornlocher HP. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432 (7014): 173-178

Stevenson M. (2004) Therapeutic potential of RNA Interference. *N Engl J Med.* 351: 1772-7

Suk S, Wong S & Jik Y. (2012) siRNA as a conventional drug in the clinic? Challenges and current technologies. *Drug Discov Today Technol* 9 (2): e167-e173

Sunilkumar G, Campbell L, Puckhaber L, Stipanovic R & Rathore K. (2006) Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (48): 18054-18059

Thomas M & Banks L. (1998) Inhibition of Bak induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17: 2943-2954

Tompkins S. (2004) Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8682-8686

Um S, Rhyu J, Kim E, Jeon K, Hwang E & Park J. (2002) Abrogation of IRF-1 response by high risk HPV E7 protein *in vivo*. *Cancer Lett.* 179: 205-212

Vera Lastra O. (2006) Terapia génica. *Med Int Mex.* 22 (5): 422-38

Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S & Grewal S. (2004) RNAi mediated targeting of heterochromatin by the RITS. *Science* 303: 672-676

Villares G, Zigler M & Wang H. (2008) Targeting melanoma growth and metastasis with systemic delivery of liposome incorporated protease activated receptor-1 small interfering RNA. *Cancer Res* 68: 9078-9086

Vivas Mejia P, Benito JM, Fernandez A, Han HD, Mangala L, Rodriguez Aguayo C, Chavez Reyes A, Lin YG, Carey MS, Nick AM, Stone RL, Kim HS, Claret FX, Bommann W, Hennessy BT, Sanguino A, Peng Z, Sood AK & Lopez Berestein G. (2010) c-Jun-NH2-kinase-1 inhibition leads to antitumor activity in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 16(1): 184-194

Volpe T, Kidner C, Hall I, Teng G, Grewal S & Martienssen R. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine 9 methylation by RNAi. *Science* 297: 1833-1837

White P. (2008) Barriers to successful delivery of short interfering RNA after systemic administration. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 35: 1371-1376

Whitehead K, Dahlman J, Langer R & Anderson D. (2001) Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2: 77-96

Woodman C., Collins S. & L. Young. (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7: 11-22

Wu SY, Singhania A, Burgess M, Putral LN, Kirkpatrick C, Davies & McMillan NAJ. (2011) Systemic delivery of E6/7 siRNA using novel lipidic particles and its application with cisplatin in cervical cancer mouse models. *Gene Therapy* 18: 14-22

Yagi N, Manabe I, Tottori T, Ishihara A, Ogata F, Kim JH, Nishimura S, Fujiu K, Oishi Y, Itaka K, Kato Y, Yamauchi M & Nagai R. (2009) A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 69 (16): 6531-6538

Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, Nishihara T & Yamato K. (2003) *In Vitro* and *in Vivo* growth suppression of Human Papillomavirus 16-positive cervical cancer Cells by E6 siRNA. *Mol Ther* 8 (5): 762-768

Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M & Kiyono T. (2007) Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 27: 3732-3742

Zelphati O, Uyechi L, Barron L & Szoka F. (1998) Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim Biophys Acta* 1390 (2): 119-133

Zhou Y, Zhang C & Liang W. (2014) Development of RNAi technology for targeted therapy- A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *J. Control Release* 10 (193): 270-281

Zimmermann T, Lee A, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk M, Harborth J, Heyes J, Jeffs L, John M, Judge A, Lam K, McClintock K, Nechev L, Palmer L, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat A, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher H & MacLachlan I. (2006) RNAi mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111-114

Zur Hausen H. (1987) Papillomaviruses in human cancer. *Appl Phatol.* 5 (1): 19-24