



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

**UNIDAD MONTERREY**

**Efectos terapéuticos del silenciamiento de WT1 por  
siRNAs liposomales administrados por vía  
respiratoria en modelos murinos de melanoma**

**Tesis que presenta**

**Martín Rogelio Ramos González**

**Para obtener el grado de**

**Doctorado en Ciencias**

**Ingeniería y Física Biomédica**

**Director de Tesis**

**Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta**

**Director Externo de Tesis**

**Dr. Arturo Chávez Reyes**

## AGRADECIMIENTOS

Parte de lo que somos es la esencia de aquellas personas que en algún momento de nuestras vidas han recorrido a nuestro lado el mismo camino, compartiendo su amistad, apoyo y experiencias, lo que nos ha llevado al punto en que nos encontramos hoy en día.

Así mismo es preciso reconocer que la ciencia avanza debido al esfuerzo conjunto de quienes en distintos grados han aportado sus capacidades y conocimientos para el beneficio de una mejor sociedad.

Bajo este contexto agradezco a todas las personas e instituciones cuyas aportaciones permitieron la realización de este trabajo de manera satisfactoria.

A mi familia que desde pequeño me han apoyado día a día a entender un poco más el mundo que nos rodea.

A mis amigos con los que he compartido los retos y emociones que hacen más interesantes nuestras vidas.

A mis profesores que con mucha paciencia me han brindado sus consejos, y con quienes he tenido la suerte de no ser solo un alumno, sino un amigo.

Al Conacyt que apoyando el desarrollo de la ciencia representa una parte fundamental para el futuro de nuestro país. Al Cinvestav, líder nacional en investigación y formación de científicos de alta calidad, y al que me siento muy orgulloso de formar parte.

Y especialmente a aquellos que me han brindado su apoyo incondicional, que me han acompañado en mis noches en vela, en los momentos de alegrías y desazón, *Anna*, *Daemon*, y muy cariñosamente a mis mascotas Cami y Nedy†.

# Índice de Contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	iv
<b>CÁNCER</b> .....	1
Definición .....	1
Importancia.....	2
Metástasis .....	3
<b>MELANOMA</b> .....	5
<b>MARCADORES TUMORALES</b> .....	8
<b>TUMOR DE WILMS</b> .....	9
<b>WT1</b> .....	11
Estructura.....	13
Isoformas .....	13
WT1 y cáncer.....	15
Genes relacionados a WT1 .....	17
WT1 como biomarcador tumoral .....	17
<b>MECANISMO DE RNA DE INTERFERENCIA</b> .....	18
siRNA como tratamiento contra el cáncer.....	20
Nanopartículas y otras estructuras utilizadas como vehículos para los siRNAs .....	21
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	25
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
<b>MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	26
Línea celular .....	26
Ratones .....	26
RNAs cortos de interferencia (siRNAs) .....	26

---

PCR primers .....	27
Liposomas.....	27
Anticuerpos.....	27
Otros Reactivos.....	28
Equipo Utilizado.....	29
<b>METODOLOGÍA IN VITRO</b> .....	30
Condiciones del cultivo celular .....	30
Transfección de células B16F10 con siRNAs .....	30
Recolección de células transfectadas.....	31
Análisis de expresión del mRNA de WT1 por PCR .....	31
Análisis de expresión de proteína de WT1 por Western Blot .....	31
Estudio de viabilidad y proliferación celular.....	32
Ciclo celular por citometría de flujo.....	33
Ensayo de migración e invasión .....	34
Análisis de apoptosis por TUNEL.....	35
<b>METODOLOGÍA IN VIVO</b> .....	36
Biodistribución de los L-siRNAs .....	36
Construcción de la cámara de nebulización .....	37
Administración de los siRNAs liposomales nebulizados .....	38
Extracción de órganos .....	39
Análisis microscópico.....	39
Tratamiento a corto y largo plazo con siRNAs liposomales .....	40
Preparación de los modelos de metástasis y tumor subcutáneo .....	40
Tratamiento a corto plazo con siRNAs liposomales nebulizados .....	41
Estudio de sobrevida con tratamiento a largo plazo de siRNAs liposomales .....	41
Análisis de los tumores.....	42
Pruebas estadísticas .....	42
<b>RESULTADOS</b> .....	43
<b>IN VITRO</b> .....	43

---

Análisis del silenciamiento de WT1 en cultivo celular .....	43
Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la viabilidad y proliferación de células en cultivo .....	44
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	47
Ensayos de migración e invasión.....	49
Análisis de apoptosis por TUNEL.....	51
<b>IN VIVO</b> .....	53
Estudio de Biodistribución .....	53
Tratamiento a corto plazo con L-siRNAs en el modelo de metástasis a pulmón.....	55
Tratamiento a corto plazo con L-siRNAs en el modelo de tumor subcutáneo.....	57
Estudio de sobrevida con tratamiento a largo plazo en el modelo de metástasis a pulmón .....	59
<b>DISCUSIÓN</b> .....	63
<b>CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	73
<b>REFERENCIAS</b> .....	74

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Las células metastásicas se desprenden y viajan por el torrente sanguíneo. ....	3
<b>Figura 2.</b> Etapas de diseminación en la metástasis. ....	4
<b>Figura 3.</b> La escala Fitzpatrick considera la sensibilidad a los rayos UV con relación al grado de pigmentación de la piel. . ....	5
<b>Figura 4.</b> Progresión del melanoma a través de las capas de la piel.. ....	6
<b>Figura 5.</b> Sobrevida a 15 años en base a la profundidad del melanoma. ....	7
<b>Figura 6.</b> Determinación de un tratamiento personalizado contra el cáncer. ....	9
<b>Figura 7.</b> Esquema representativo del tumor de Wilms. ....	10
<b>Figura 8.</b> Inmunohistoquímica donde se aprecia la expresión de WT1 en podocitos renales. ....	12
<b>Figura 9.</b> Funciones de las principales isoformas de WT1.. ....	14
<b>Figura 10.</b> WT1 actúa en múltiples pasos durante la determinación del sexo. ....	15
<b>Figura 11.</b> Esquema del silenciamiento de un mRNA mediado por siRNA. ....	19
<b>Figura 12.</b> Diferentes entidades químicas y biológicas como vehículos para siRNAs. ....	21
<b>Figura 13.</b> Diagrama de la metodología in vitro. ....	30
<b>Figura 14.</b> Diagrama de la metodología para el estudio de biodistribución. ....	36
<b>Figura 15.</b> Posición en que se administra el tratamiento nebulizado a los ratones. ....	37
<b>Figura 16.</b> Administración de los siRNAs liposomales por vía respiratoria. ....	38
<b>Figura 17.</b> Diagrama de la metodología para los estudios in vivo. ....	40
<b>Figura 18.</b> Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la expresión de mRNA y proteína a las 72 horas de transfección. ....	43
<b>Figura 19.</b> Análisis de viabilidad al silenciar WT1 en la línea celular B16F10 a las 48 y 72 horas de transfección. ....	45
<b>Figura 20.</b> Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la proliferación celular en la línea celular B16F10 a las 48 y 72 horas de transfección. ....	46

<b>Figura 21.</b> Análisis del ciclo celular por citometría de flujo en la línea celular B16F10 a las 72 horas de silenciar WT1.. .....	47
<b>Figura 22.</b> Efecto del silenciamiento de WT1 en la línea celular B16F10 sobre las fases del ciclo celular a las 72 horas de transfección.....	48
<b>Figura 23.</b> Ensayo de migración e invasión silenciando WT1 en la línea celular B16F10. ..	50
<b>Figura 24.</b> Análisis de apoptosis por TUNEL al silenciar WT1 en la línea celular B16F10 a 48 y 72 horas.....	51
<b>Figura 25.</b> Estudio de Biodistribución.....	54
<b>Figura 26.</b> Tratamiento a corto plazo por vía aérea con L-siRNAs de tumores metastásicos de melanoma en pulmón.....	55
<b>Figura 27.</b> Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la expresión de mRNA y proteína en tumores metastásicos de melanoma en pulmón a corto plazo.. .....	57
<b>Figura 28.</b> Tratamiento a corto plazo por vía aérea con L-siRNAs de tumores subcutáneos de melanoma.....	58
<b>Figura 29.</b> Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la expresión de mRNA y proteína en tumores subcutáneos a corto plazo.. .....	59
<b>Figura 30.</b> Estudio de sobrevida a largo plazo con tratamiento de L-siRNAs por vía respiratoria.. .....	60
<b>Figura 31.</b> Tratamiento a largo plazo por vía aérea con L-siRNAs de tumores metastásicos de melanoma en pulmón.....	61
<b>Figura 32.</b> Efecto del tratamiento a largo plazo con L-siRNAs inhalados sobre la expresión de mRNA y proteína de WT1 en tumores metastásicos de melanoma a pulmón.....	62

## ABSTRACT

Cancer is considered among the main causes of death worldwide and the number of cases keeps rising every year, as there is not an effective treatment to offer for most of them. The lungs represent a frequent target of primary and metastatic tumors due to his high oxygenation and large air spaces to grow. Melanoma is the most aggressive type of skin cancer showing a high affinity to metastasize into the lungs, being the overexpression of the WT1 protein associated with the development of this cancer, as well as several other types. In this study, we evaluated the effects of siRNA silencing the WT1 protein in both, *in vitro* in the B16F10 melanoma cell line, and *in vivo* in a murine model of pulmonary metastatic melanoma and subcutaneous tumor implementing a novel delivery strategy of neutral DOPC liposomal-siRNA system administrated via inhalation. *In vitro* studies showed an effective silencing of WT1 mRNA (69%) and WT1 protein (86%) in the siRNAsWT1 treated cells when compared with controls, resulting in a loss of viability (40%) and proliferation (49%) of the cells, induced G1 cell-cycle arrest (11%), a restriction of migration (87%) and invasion (100%) capacities, as well as an activation of apoptosis (12%). *In vivo* we tested our delivery system obtaining an efficient biodistribution in lungs, kidney, liver and spleen. The respiratory administration of L-WT1siRNA after two weeks of treatment resulted in silencing of WT1 mRNA (68%) and protein (59%), achieving an important antitumor activity with a 44% in tumor weight reduction. In a survival study 80% of the L-WT1siRNA treated mice were alive after all the controls mice had died, delaying the death almost a week at the end of the study. For the subcutaneous tumors, no effective silencing or reduction in the size of the tumor were observed. This work demonstrates the efficacy of the neutral DOPC liposomal-siRNA delivery system by respiratory administration as a novel therapy to reduce the malignancy of pulmonary tumors and to increase survivability by silencing specific cancer biomarkers as WT1.



## RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y el número de casos fatales continúa en aumento al no existir un tratamiento eficaz para un gran número de ellos. Los pulmones representan uno de los principales blancos para el desarrollo de tumores primarios y metastásicos, debido a la gran oxigenación y disponibilidad de espacio dentro del órgano. El melanoma es el tipo de cáncer de piel más agresivo mostrando una marcada afinidad para producir metástasis en los pulmones, siendo la sobreexpresión de WT1 asociada al desarrollo de este cáncer, así como de muchos otros tipos. En este estudio evaluamos los efectos de silenciar al oncogén WT1 por medio de siRNAs, tanto *in vitro* en la línea celular B16F10 de melanoma murino, como *in vivo* en los modelos murinos de metástasis de melanoma a pulmón y tumores subcutáneos, implementando un nuevo sistema de tratamiento inhalado basado en siRNAs encapsulados en liposomas neutros de DOPC. Los estudios *in vitro* mostraron un silenciamiento efectivo de WT1 tanto a nivel de mRNA (69%), como de proteína (86%) en las células tratadas con siRNAs<sub>WT1</sub>, resultando en una pérdida de la viabilidad (40%) y proliferación (49%) de las células, inducción de arresto del ciclo celular en la fase G1 (11%), una restricción en las capacidades de migración (87%) e invasión (100%), así como activación de apoptosis (12%). Al probar nuestro sistema de tratamiento *in vivo* se obtuvo una biodistribución eficiente a los pulmones, riñones, hígado y bazo. La administración de los L-siRNAs<sub>WT1</sub> durante dos semanas en el modelo de metástasis pulmonares logró un silenciamiento del mRNA y proteína de WT1 del 68% y 59%, respectivamente, lo que se tradujo en un efecto antitumoral con un 44% de reducción en el peso de los tumores. En el estudio de supervivencia, el 80% de los ratones tratados con L-siRNAs<sub>WT1</sub> se mantenían vivos al momento que había muerto todos los ratones de los grupos controles, alcanzando una semana más de vida al finalizar el estudio. Sin embargo, no se observó silenciamiento o reducción del tamaño tumoral en el modelo de tumor subcutáneo. El presente trabajo demuestra la eficacia del sistema L-siRNAs administrado por vía respiratoria como un novedoso tratamiento para lesiones malignas en pulmones, por medio del silenciamiento específico de biomarcadores como WT1.

# INTRODUCCIÓN

## CÁNCER

### *Definición*

Se conoce como cáncer a un amplio grupo de enfermedades que comparten como principal característica la división descontrolada de las células. Este proceso se desencadena en respuesta a algún estímulo nocivo que produce mutaciones en el material genético o cambios en el patrón de expresión de proteínas reguladoras. La acumulación de mutaciones que afectan a los sistemas de regulación del ciclo celular resulta en una división celular descontrolada, así como una alteración en los mecanismos de control de apoptosis que conlleva a un estado de inmortalización celular.

El organismo adulto está compuesto en su mayor parte de células diferenciadas que son incapaces de dividirse y que cumplen una función específica. No obstante, también contamos con un repertorio más limitado de células multipotenciales con la capacidad de proliferar y regenerar tejidos, garantizando así el correcto funcionamiento de los órganos (1). Es esta capacidad de proliferar la que se activa en una célula somática por efecto de alguna mutación heredada o adquirida la que deriva en la aparición de un cáncer (2). Se otorga la denominación de carcinoma cuando el sitio primario del que proviene son las células epiteliales, sarcoma cuando surge a partir de células de tejido conectivo, leucemias o linfomas aquellas que provienen de los glóbulos blancos o teratomas si provienen de tejidos germinales.

Una vez establecida una colonia de células neoplásicas, éstas demandan un elevado suplemento nutricional y forman tumores que cambian la estructura de los órganos que los albergan, alterando su función debido a un desplazamiento y compresión del tejido sano, secuestrando su aporte nutricional y en muchos casos secretando enzimas que degradan la matriz que los rodea, ocasionando de esta manera un daño significativo al organismo.

## ***Importancia***

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y su incidencia va en aumento. Tan sólo en el año 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de defunciones en todo el mundo, lo que representó el 14% del total de muertes. Los tipos de cáncer que causan el mayor número de muertes a nivel global son: pulmón, hígado, estómago, colon y mama (OMS 2017).

Entre los factores de riesgo que predisponen el desarrollo del cáncer se encuentran agentes externos y hereditarios, así como hábitos conductuales (3). Algunos ejemplos de estos factores se encuentran organizados en la siguiente tabla:

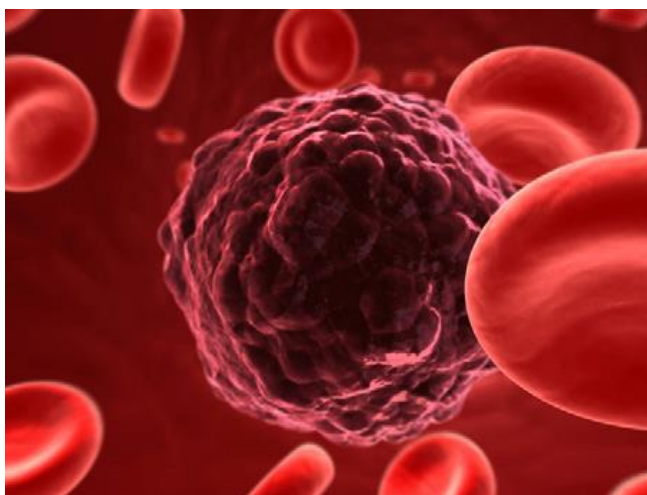
**Tabla 1.** Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer.

<b>Factores de riesgo</b>	<b>Ejemplo</b>
<i>Genéticos</i>	Herencia, mutaciones
<i>Físicos</i>	Radiaciones ultravioletas e ionizantes
<i>Químicos</i>	Asbestos, arsénico, humo de tabaco
<i>Biológicos</i>	Infecciones por virus, bacterias o parásitos
<i>Conductuales</i>	Alimentación, consumo de alcohol o tabaco

Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha decretado que alrededor del 30% de las defunciones por cáncer podrían haberse evitado con tan sólo modificar algunas conductas de riesgo, entre las que destaca el tabaquismo. Lamentablemente las muertes por cáncer siguen en aumento, estimando que pudiera alcanzarse la cifra de 13.1 millones para el año 2030. Para prevenirlo se crean continuamente iniciativas de prevención y concientización hacia las poblaciones en riesgo, así como campañas de detección oportuna. Si bien, en la mayoría de los casos el cáncer es curable si se detecta en etapas tempranas, la sobrevida disminuye entre más se demore el inicio del tratamiento (4).

## *Metástasis*

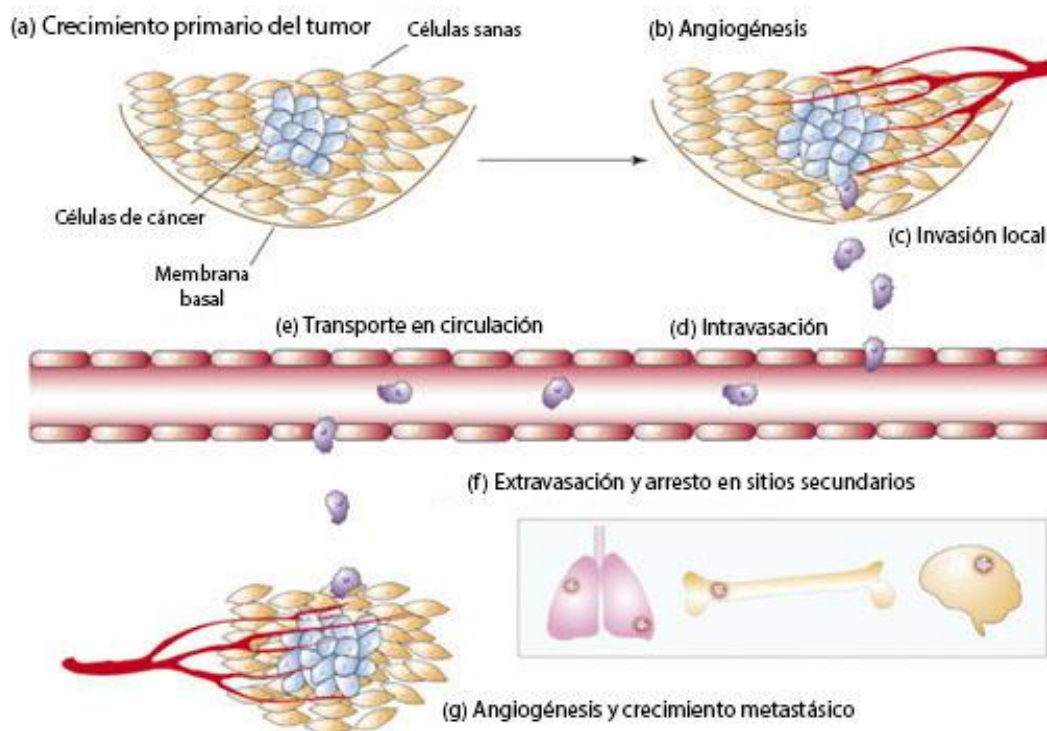
Una vez que el cáncer se ha establecido en un tejido, crece hasta agotar los recursos disponibles sobrepasando la capacidad de la vasculatura local. En respuesta a esto el tumor libera factores proangiogénicos que induce la formación de nueva vasculatura y le permite aumentar su irrigación sanguínea, así como contar con una vía de escape para separarse del tejido adyacente y migrar a órganos distantes que le confieran un nuevo nicho para su desarrollo, proceso que se conoce como metástasis.



**Figura 1.** Las células metastásicas se desprenden y viajan por el torrente sanguíneo.

La metástasis se define como el proceso de migración de células malignas desde un tumor primario, su diseminación e invasión hacia sitios distantes (Fig. 1). Representa uno de los mayores problemas para el tratamiento del cáncer, siendo la enfermedad metastásica responsable de más del 90% de las muertes por cáncer (5). Las células tumorales utilizan dos vías principales de diseminación: la vía linfática, desde la cual invaden los nódulos linfáticos que drenan al órgano donde el tumor se encuentra alojado; y la vía sanguínea, que permite la invasión directa de órganos distantes como los pulmones, cerebro, huesos o hígado, siendo éstos los blancos más comunes (6).

Las diferentes etapas del proceso de metástasis son: separación de algunas células del tumor primario, degradación del tejido conectivo e invasión del estroma subyacente, infiltración dentro de los vasos sanguíneos o linfáticos, migración hacia los vasos del órgano blanco donde son extravasadas, invasión de la matriz extracelular y proliferación en el parénquima del órgano afectado (Figura 2) (7).



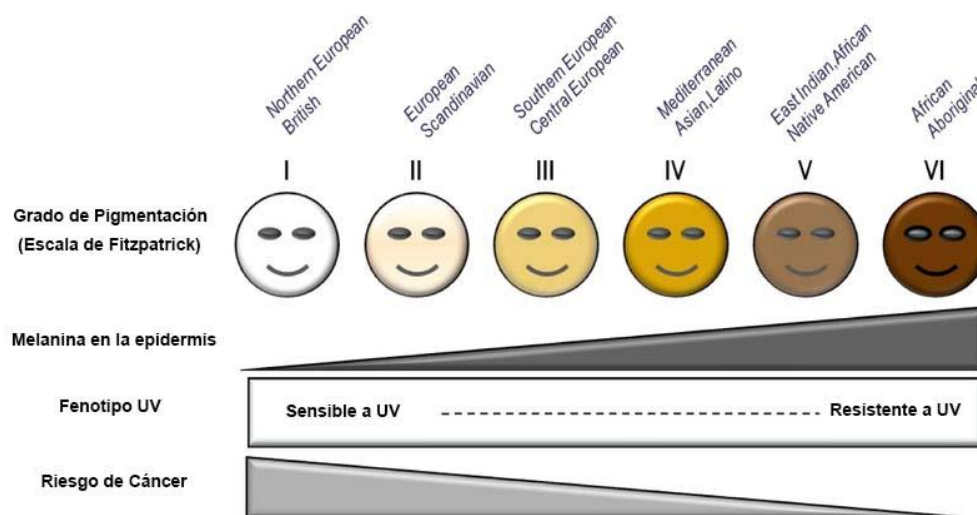
**Figura 2.** Etapas de diseminación en la metástasis.

Con frecuencia los órganos más vascularizados son un blanco atractivo para las células metastásicas debido a su alta disponibilidad de nutrientes y oxígeno, como lo es la médula ósea, la cual se ve comúnmente invadida por diversos procesos metastásicos (8). Los pulmones son el segundo sitio más común de metástasis considerando todos los cánceres en general. Una de las principales características que lo hacen un blanco atractivo para las células metastásicas es su extensa área de superficie vascular, así como un medio rico en oxígeno necesario para satisfacer los altos requerimientos metabólicos de las células tumorales (9).

Una mayor sensibilidad en las técnicas de detección ha permitido la identificación de células de tumor circulantes en sangre periférica, que en pacientes con cáncer promedian de 5 a 10 células por mililitro. Estas células tumorales pueden ser detectadas y aisladas a partir de una muestra de sangre, siendo posteriormente utilizadas en pruebas genéticas y de resistencia a drogas que orienten hacia una terapéutica adecuada, así mismo, el aumento o disminución en su número puede ser relacionado directamente a un pronóstico de sobrevida del paciente (10).

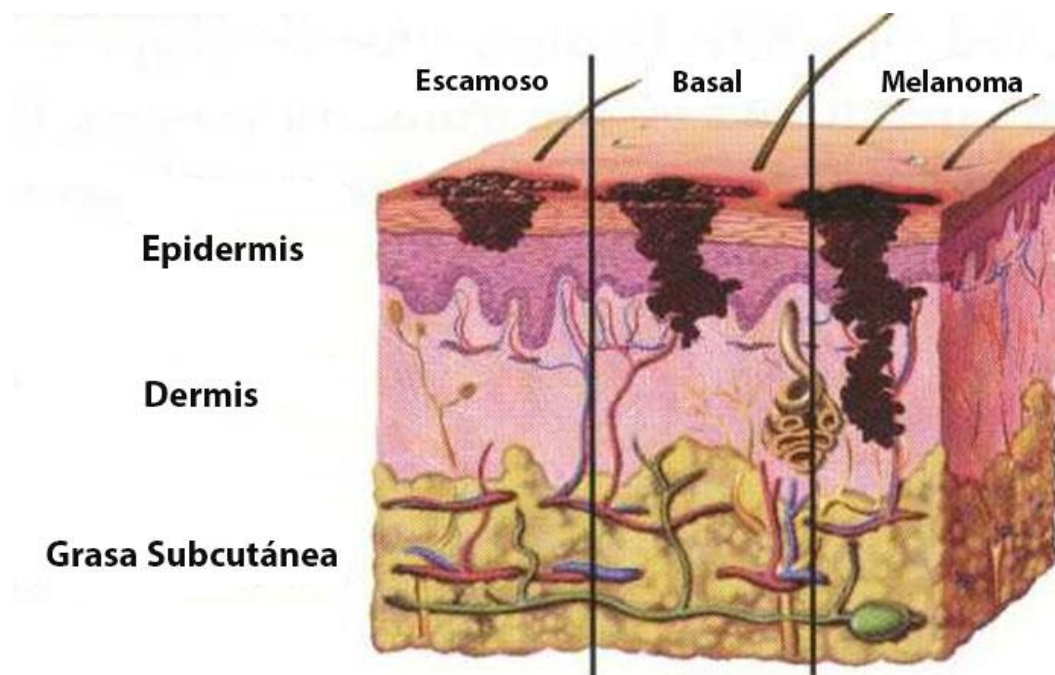
## MELANOMA

El melanoma es el sexto tipo de cáncer más común a nivel global y la forma más letal de cáncer de piel, con cerca del 80% de todas las muertes por este tipo de cáncer (11). La incidencia del melanoma se ha ido incrementando más rápido que cualquier otro tipo de cáncer en los Estados Unidos, en gran medida adjudicado a la creciente exposición a los rayos solares con motivos recreativos y cosméticos (12). El riesgo de contraer esta enfermedad está directamente asociado con la cantidad de melanina que protege la piel y al grado de exposición a rayos UV (Figura 3).



**Figura 3.** La escala Fitzpatrick considera la sensibilidad a los rayos UV con relación al grado de pigmentación de la piel. A menor cantidad de melanina mayor será el riesgo de desarrollar melanoma en algún momento de la vida (13).

Los pacientes afectados por melanoma presentan una lesión más profunda a medida que se demora más tiempo el diagnóstico. Esto repercute negativamente en el pronóstico y la expectativa de vida tras el tratamiento, por lo que la detección en estadios tempranos es de vital importancia para procurar una mejor tasa de remisión. En un inicio, el melanoma se expande en una pequeña superficie delimitada a las capas de la epidermis (melanoma *in situ*). Con el tiempo avanza en profundidad abriéndose paso por la piel hacia la dermis (melanoma invasivo), hasta finalmente alcanzar los vasos subcutáneos volviéndose potencialmente metastásico (Figura 4).



**Figura 4.** Progresión del melanoma a través de las capas de la piel. El melanoma puede infiltrar hacia los vasos sanguíneos (azul y rojo) o linfáticos (verde) y diseminarse a órganos distantes.

Una de las características que le confieren una alta letalidad al melanoma es su alta propensión para formar metástasis, en especial a tejidos como pulmones, cerebro, hígado, entre otros. Tanto las células neoplásicas en el tumor primario, como las células metastásicas muestran una gran adaptabilidad a los distintos microambientes donde pudiera alojarse el tumor (14). Esto

origina subpoblaciones celulares con diferentes características fenotípicas, que ocasiona que este cáncer se vuelva altamente resistente a la quimioterapia convencional, por lo que el tratamiento de elección sigue siendo la escisión quirúrgica, en especial durante las etapas de melanoma *in situ*. La profundidad del melanoma al momento del diagnóstico ha mostrado ser uno de los factores que tiene una mejor correlación con el pronóstico del paciente, ya que sólo el 42% de los casos de melanoma invasivo (mayor a 4 mm de profundidad) logran la remisión tras el tratamiento con quimioterapia (Figura 5) (15).



**Figura 5.** Supervivencia a 15 años en base a la profundidad del melanoma.

El difícil tratamiento del melanoma, aunado a su creciente incidencia en la población en general, deja de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas terapias que muestren ser efectivas en mejorar el panorama para las personas afectadas. Por lo tanto, es esencial la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que tengan como blanco los distintos elementos que componen la compleja red genética implicada tanto en el desarrollo del cáncer primario, el proceso de metástasis, así como el desarrollo de resistencia a quimioterapia (16).

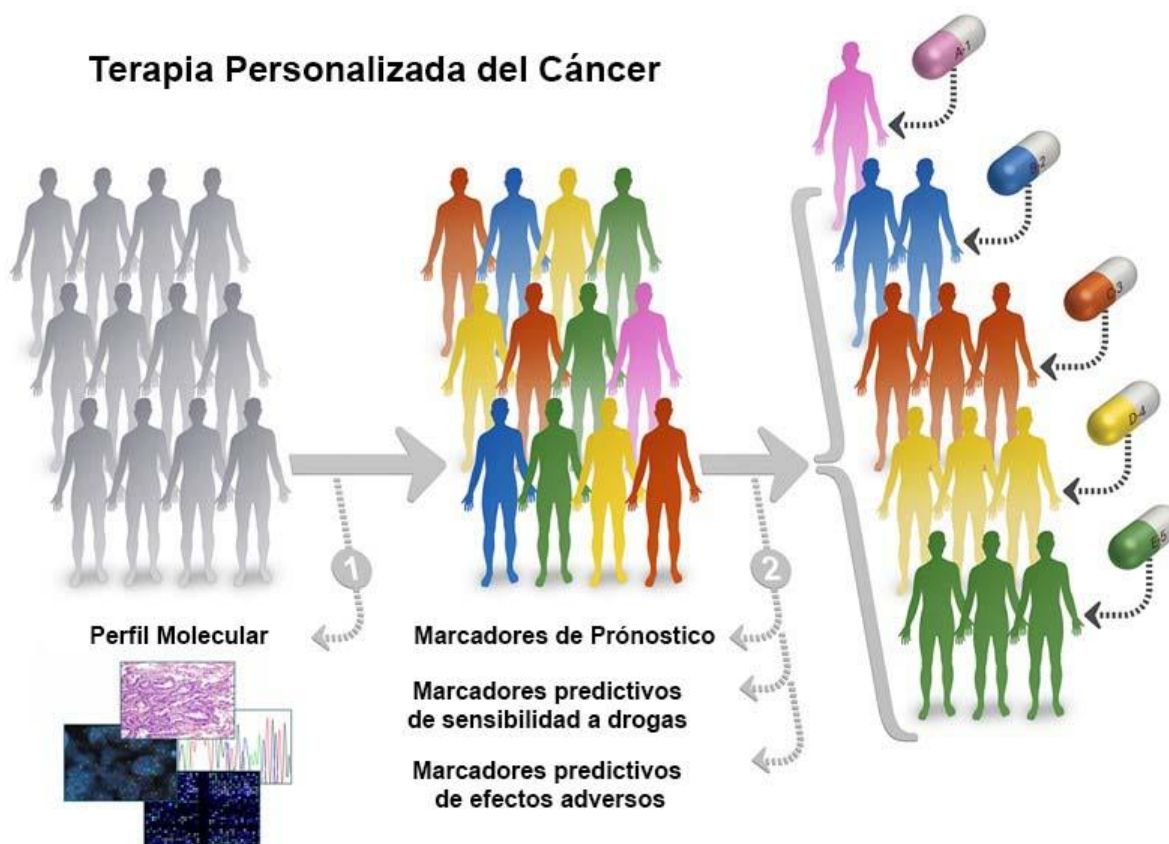


## MARCADORES TUMORALES

La ciencia médica se ha visto notablemente favorecida por el desarrollo de técnicas más eficientes de secuenciación genética, así como de los avances en el área de la proteómica, por lo que a nivel molecular hemos logrado extender nuestro entendimiento de los factores y entidades que originan y permiten la progresión del cáncer. La aplicación de estos conocimientos en el diseño y desarrollo de nuevas terapias ha permitido ofrecer un tratamiento personalizado para cada caso, identificando las características de la enfermedad y combatiéndola acorde a las necesidades específicas de cada individuo (17).

Un factor importante por considerar son las mutaciones iniciales que propiciaron el desarrollo del tumor primario y que generalmente se mantienen presentes en las células de los focos metastásicos. Esto nos permite obtener a partir de una biopsia única la información necesaria para tratar tanto el sitio primario de diseminación como las posibles áreas de metástasis que pudieran pasar inadvertidas. En el caso de detectarse nuevas mutaciones que impliquen cambios en la terapéutica, es posible hacer ajustes y mantener un monitoreo de la eficacia del tratamiento (Figura 6) (18).

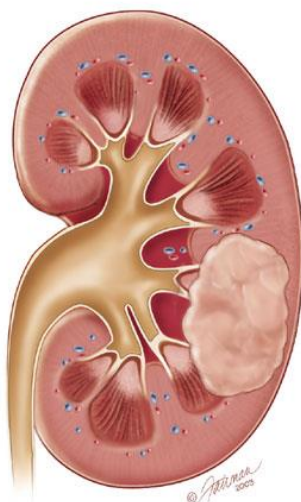
Recientemente han cobrado singular importancia diferentes métodos de diagnóstico molecular del cáncer, los cuales están enfocados a la detección de biomarcadores predictivos que permitan dirigir la terapia hacia aquellas moléculas que confieren ventajas en la proliferación del tumor y resistencia a fármacos (19). La presencia o ausencia de estos biomarcadores está íntimamente relacionada al grado de respuesta que tendrá el paciente hacia ciertos tipos de terapia, lo que facilita la personalización de los tratamientos.



**Figura 6.** Determinación de un tratamiento personalizado contra el cáncer.

## TUMOR DE WILMS

El tumor de Wilms, conocido también como nefroblastoma, es una neoplasia renal maligna de la infancia descrito inicialmente en 1899 por el doctor Max Wilms (20). Es el segundo cáncer intraabdominal más común en la infancia y el quinto más común si se consideran todas las neoplasias malignas pediátricas. Por sí solo representa más del 95% de todos los tumores de riñón en edad infantil. Este tumor (Fig. 7) se presenta normalmente en niños menores de 5 años, con una mayor incidencia entre los 2 a 3 años de edad (21).



**Figura 7.** Esquema representativo del tumor de Wilms.

A inicios del siglo pasado la mortalidad de los pacientes con tumor de Wilms era muy alta, no más del 30% de los niños afectados superaba la fase de infancia temprana (22). Hoy en día se ha logrado mejorar la tasa de supervivencia hasta superar el 90% de casos que alcanzan la remisión total, debido principalmente a la implementación de técnicas de detección y terapias combinadas.

En la mayoría de los casos el tumor de Wilms no se detecta en los primeros años de vida ya que suele comenzar como una masa abdominal asintomática que no preocupa a los padres hasta que el aumento de tamaño es considerable como para producir molestias. Sólo en el 25% de los casos se ha asociado con la aparición de hipertensión arterial, la cual es consecuencia de un aumento en la secreción de la hormona renina (23).

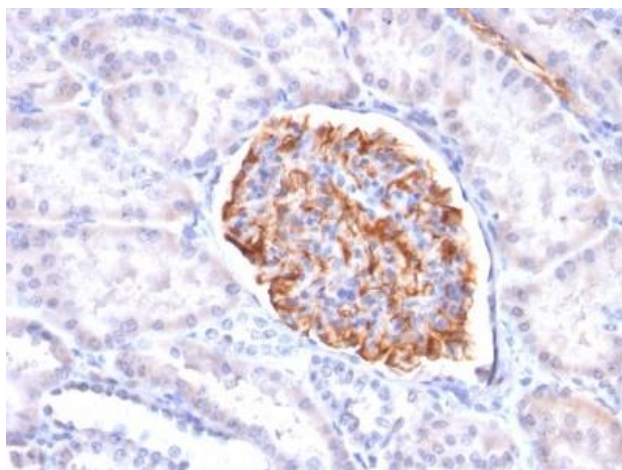
El tratamiento quirúrgico suele ser la mejor opción siendo necesaria la resección completa del riñón afectado, seguido de algunas sesiones de quimioterapia. En casos más complicados o donde se sospeche un mal pronóstico se requiere de una terapia de radiación agresiva la cual

suele extenderse a grandes regiones de la cavidad abdominal buscando erradicar posibles focos de diseminación peritoneal.

Los tumores de la infancia, incluyendo el tumor de Wilms, han ayudado a esclarecer muchos de los mecanismos moleculares de la carcinogénesis, debido a que la corta edad de aparición sugiere que tan sólo unos pocos eventos genéticos son necesarios en la evolución del cáncer para desencadenar un fenotipo maligno. En el caso del tumor de Wilms, se detectó la existencia de una deleción de la banda 13 en el brazo corto del cromosoma 11, la cual estaba asociada a una mayor propensión a la aparición de tumores, por lo que se sugirió que el segmento faltante estaba relacionado a un gen supresor de tumores. Entre los principales genes candidatos se logró aislar y clonar al gen WT1, aunque también se han identificado alteraciones en genes como PAX6, IGF2 y p57 causantes de síndromes asociados a una alta predisposición a formar un tumor de Wilms (21).

## WT1

El gen del tumor de Wilms 1 (WT1), aislado en el año de 1990, codifica para una proteína con función de factor de transcripción que actúa como un importante regulador del crecimiento y desarrollo celular. Durante la etapa embrionaria WT1 es esencial para la formación del aparato urogenital y participa en el desarrollo de varios sistemas actuando como gen activador de otros factores de transcripción. Posterior al nacimiento cae su nivel de expresión, siendo casi indetectable en la vida adulta con presencia principalmente en los podocitos que recubren el glomérulo renal (Figura 8), en la glía del sistema nervioso central y en órganos involucrados en la hematopoyesis como la médula ósea y los nódulos linfáticos.



**Figura 8.** Inmunohistoquímica donde se aprecia la expresión de WT1 en podocitos renales.

La importancia de WT1 durante el desarrollo embrionario ha sido ampliamente estudiada mediante el empleo de ratones transgénicos a los que se les indujeron mutaciones en el gen WT1. Los efectos observados en ratones knock-out de este gen (*wt1*<sup>-/-</sup>) incluyen: agenesia renal y gonadal, anormalidades severas en el corazón, pulmón, bazo y mesotelio, debido a una actividad apoptótica aumentada en los órganos mencionados, siendo estas afectaciones incompatibles con la vida, lo que ocasiona que estos ratones no lleguen a superar etapas tempranas en el desarrollo embrionario (24).

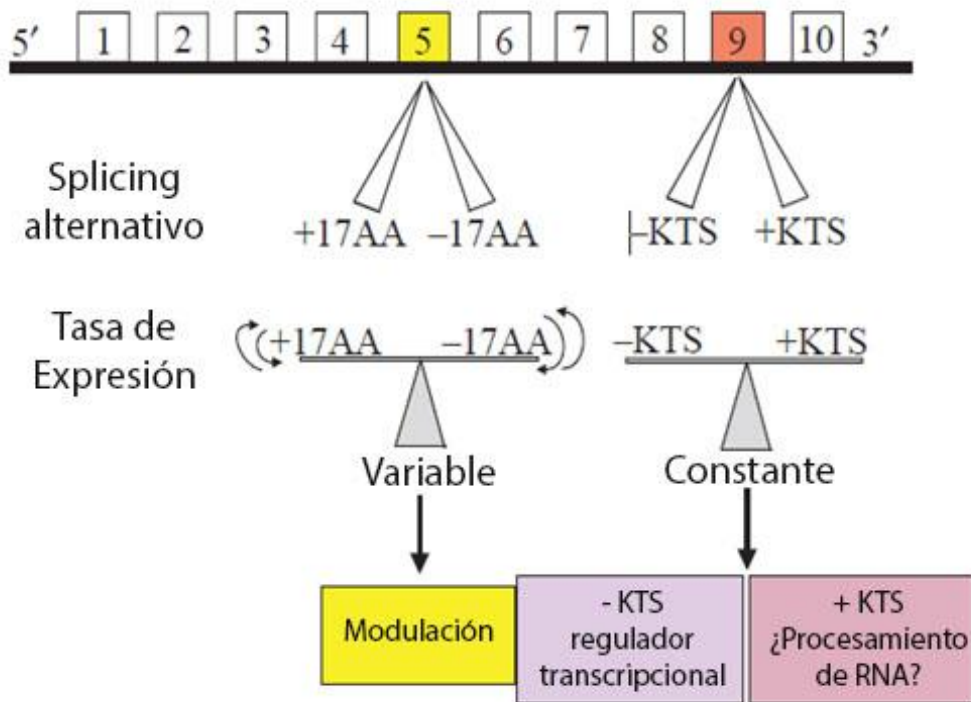
En la vida adulta, estudios han demostrado que la isquemia y la hipoxia secundarias a un infarto al miocardio estimulan la expresión *de novo* de WT1 tanto en células endoteliales como de músculo liso en las arterias coronarias (25). WT1 se colocaliza con marcadores de proliferación celular y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en corazones con isquemia e hipoxia. Esto sugiere que WT1 pudiera tener un papel en la proliferación de células vasculares coronarias y, por lo tanto, en el proceso de neovascularización del corazón.

## ***Estructura***

El gen WT1 codifica para una proteína de 52-54 kilodaltons (kDa) y consta de 10 exones. En su extremo carboxilo presenta 4 dedos de zinc que le confieren su afinidad al DNA. Una de las principales características de WT1 es la gran cantidad de isoformas que se producen por combinaciones de sus sitios de splicing alternativo, que son regiones propensas a edición y variación durante la maduración del RNA mensajero (mRNA). Se han detectado al menos 24 variaciones distintas de esta proteína, no obstante, queda por dilucidar si estas variantes cumplen diferentes funciones o simplemente representan remanentes evolutivos (26).

## ***Isoformas***

Se ha estudiado en mayor detalle la función de las principales isoformas derivadas del splicing alternativo de los exones 5 y 9. El primer sitio de splicing está ubicado en el exón 5 que codifica para 17 aminoácidos, los cuales conforman la totalidad del exón, pudiendo estar o no presente en la proteína final (27). Este exón se encuentra únicamente en los mamíferos y se sugiere que su función sea de modulación, ya que modifica la función de la proteína WT1 cuando existen mutaciones adicionales. El segundo sitio de splicing se encuentra en el exón 9, resultando en la inclusión de tres aminoácidos, lisina, treonina y serina (+KTS) (28) (29) (Figura 9).

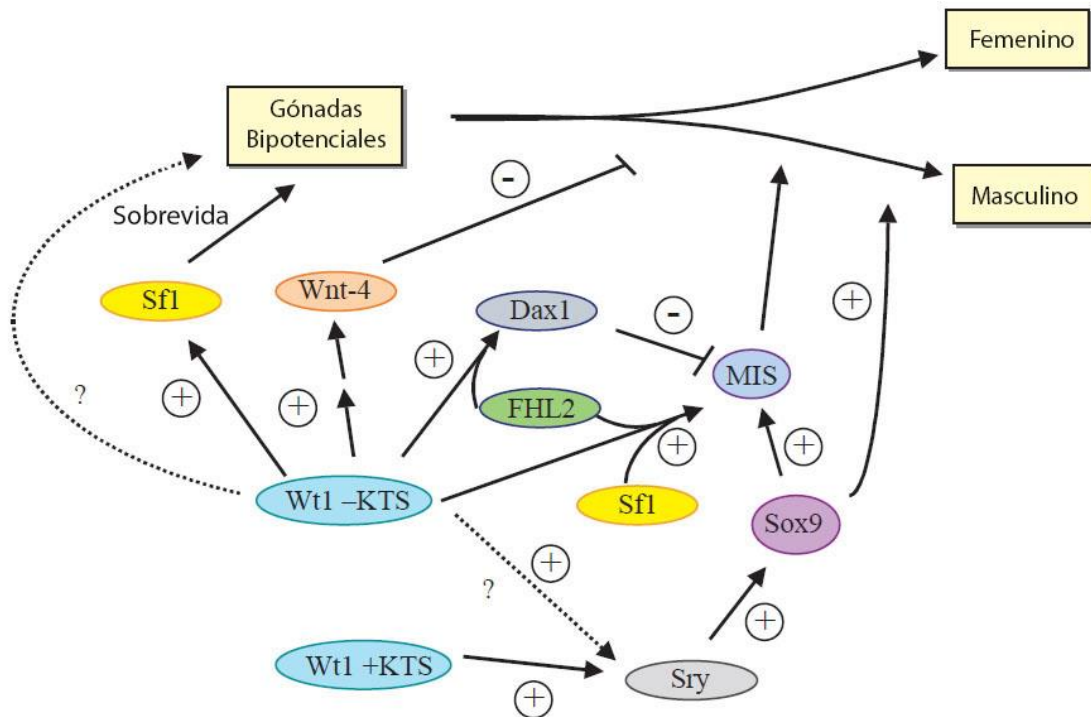


**Figura 9.** Funciones de las principales isoformas de WT1. Las flechas curvas indican que las isoformas +/-17AA varían su expresión inversamente entre sí (30).

La variante WT1(-KTS) actúa como un regulador transcripcional con capacidad de activación y represión de genes, dependiendo del tipo de promotor y la fase del ciclo celular. Debido a que la proteína WT1(+KTS) tiene una mayor afinidad por el RNA que por el DNA, se cree que pudiera participar activamente en el procesamiento del RNA (31) (32). Cabe destacar que la proporción entre las proteínas WT1(+KTS) y WT1(-KTS) es prácticamente constante en todas las células, mientras que la proporción entre las isoformas del exón 5 es muy variable (30).

Un ejemplo de cómo las dos isoformas principales de WT1 actúan en conjunto lo encontramos durante el desarrollo de las gónadas y el proceso de determinación del sexo. WT1(-KTS) es responsable de la sobrevivencia de las gónadas bipotenciales, nombre que reciben cuando se encuentran aún en su estado indiferenciado. WT1(+KTS) es necesario para la expresión de *Sry*,

lo que conlleva a la producción de hormona anti-mulleriana, determinante para la progresión gonadal hacia un fenotipo masculino (Figura 10).



**Figura 10.** WT1 actúa en múltiples pasos durante la determinación del sexo. Flechas + significan activación, barras – indican supresión (30). WT1+KTS es indispensable para la progresión del fenotipo masculino.

### **WT1 y cáncer**

Inicialmente WT1 fue identificado como el gen afectado por una delección del cromosoma 11p13 en pacientes con tumor de Wilms y síndrome WAGR (Tumor de Wilms, aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental). En estos niños se encontró que sólo una copia del gen se encontraba deletada. Posteriormente al evaluar los tumores que se desarrollaron en estos pacientes se pudo revelar que la copia restante de WT1 se encontraba inactiva, usualmente por una mutación puntual. Se clasificó a WT1 como un gen supresor de tumores,



ya que se observó que los heterocigotos para WT1 presentaban anomalías durante el desarrollo, y que la pérdida de ambas copias del gen se asociaba a altas probabilidades de desarrollar tumores (30).

Existen varios síndromes genéticos estrechamente relacionados a anomalías en WT1, como el síndrome Denys-Drash, el síndrome Frasier e históricamente el síndrome WAGR, donde se estima que alrededor del 15% de los pacientes con tumor de Wilms presentan mutaciones puntuales en el gen WT1. En otros casos se han detectado altos niveles de expresión de la proteína silvestre (wild-type) de WT1 (21)

Se ha descrito a WT1 como un oncogén, ya que se ha visto implicado en otras neoplasias como la leucemia, donde pueden detectarse altos niveles de la proteína en la mayoría de los casos. En cáncer de mama se han reportado casos en ambos extremos, tanto de alta expresión como de niveles bajos de WT1 (33).

Entre los tejidos que normalmente expresan WT1 durante el desarrollo se encuentra la capa de mesotelio, membrana que recubre la cavidad pleural y peritoneal. En un estudio llevado a cabo por Amin y cols., se evaluó la expresión de WT1 en líneas celulares de mesotelioma maligno y en biopsias de lesión primaria de mesotelioma. El RNA y la proteína de WT1 fueron detectados en 16 de 19 líneas celulares de mesotelioma y en 5 de 8 biopsias de tumores, evidencia que relaciona fuertemente la expresión de WT1 con el desarrollo de tumores en diferentes tejidos (34).

La expresión de WT1 se detectó en múltiples líneas celulares de melanoma, pero no fue así en cultivos de melanocitos normales, por lo que se ha asociado fuertemente a WT1 con la transformación de melanocitos hacia una lesión maligna. Se ha encontrado una fuerte expresión de WT1 en los vasos sanguíneos que rodean al melanoma, lo que sugiere que WT1 también pudiera contribuir al proceso de neo-angiogénesis en el microambiente del tumor (12).

## ***Genes relacionados a WT1***

Se han identificado una gran variedad de genes blanco de WT1 que tienen una importante participación en los procesos de transformación maligna. Entre éstos se encuentran genes involucrados en proliferación y regulación del ciclo celular, apoptosis, así como algunos factores de crecimiento y sus receptores (35). Un ejemplo es Bcl-2, un antiapoptótico que en algunos tipos celulares es activado por WT1. Este gen tiene gran importancia en la supervivencia celular por medio del escape de la vía de apoptosis, lo que ha permitido su asociación con el desarrollo de un gran número de neoplasias, así como de fenotipos de resistencia a agentes quimioterapéuticos. En condiciones normales existen genes que llevan a cabo efectos complementarios y que son regulados también por WT1, tal es el caso de la activación de *p21* y la represión de *ciclina E*, teniendo estos genes papeles antagónicos en la regulación de la progresión del ciclo celular, lo cual hace notar que las diferentes isoformas de WT1 pudieran tener funciones antagónicas entre sí (36).

## ***WT1 como biomarcador tumoral***

Un biomarcador tumoral ideal sería aquella molécula que sea expresada únicamente en células transformadas y nunca en tejido normal y que, además, pudiera ser detectada en sangre, secreciones o en una biopsia o aspirado del tumor. WT1 tiene el potencial de cumplir con esta descripción. Debido a que WT1 se expresa en un gran número de neoplasias en el humano, ha ido en aumento su uso como herramienta de diagnóstico al permitir a los patólogos distinguir entre tumores cuya histología es muy similar (37).

La expresión de WT1 en algunos subtipos de cáncer, principalmente leucemias, ha llevado al cuestionamiento respecto a que si su presencia pudiera tener relación con el pronóstico de estos pacientes. Brieger, *et al* (38) estudiaron pacientes con leucemia mieloblástica aguda con mutaciones *de novo* y se observó que la sobrevivida a 3 años fue de 43% para los pacientes con

baja o nula expresión de WT1, en contraste con tan solo el 12% de sobrevida en pacientes con niveles altos de expresión.

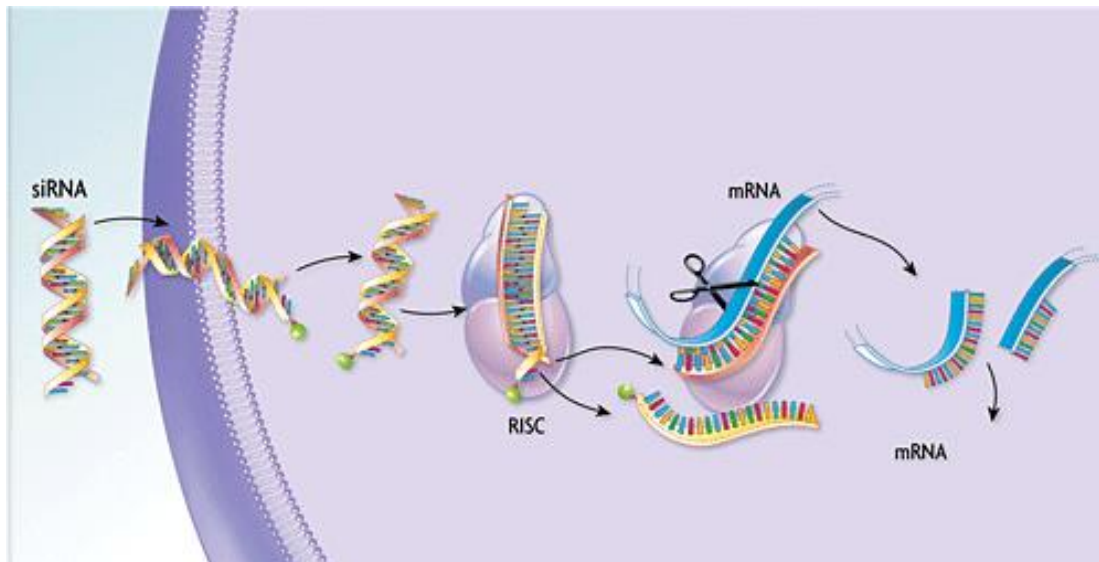
Además de servir como un buen biomarcador tumoral y herramienta diagnóstica, WT1 nos orienta hacia una predicción más fehaciente en el pronóstico del paciente, así como ser un potencial blanco terapéutico en diversos tipos de cáncer.

## MECANISMO DE RNA DE INTERFERENCIA

Todos los procesos que se llevan a cabo dentro de la célula, desde los más elementales como la división celular, generación de energía, mecanismos de adhesión o endofagia, están estrictamente regulados por un delicado equilibrio de expresión génica. Por mucho tiempo fue un misterio como la estructura básica de la vida, la célula, podía funcionar con altos grados de exactitud, hasta alcanzar niveles inimaginables de complejidad, aún para los estándares actuales. La investigación realizada por Fire y cols. en el ámbito de regulación génica sobre genes de *C. elegans* y *Drosophila* reveló el potencial del mecanismo de RNA de interferencia (RNAi) como una poderosa herramienta con la cual es posible modular negativamente la expresión de un gen (39).

El RNAi es un mecanismo conservado en todas las células eucariotas que permite el silenciamiento de la expresión de un gen por medio de la degradación de su RNA mensajero (mRNA). Se cree que este mecanismo evolucionó como una forma de defensa hacia el ingreso de material genético ajeno a la célula, en específico RNAs de doble cadena (dsRNAs), como en el caso de genomas virales y transposones (40). Su activación se lleva a cabo dentro del citoplasma celular al detectarse la presencia de dsRNAs largos por la proteína Dicer, que tiene función de RNasa III. Los dsRNAs son entonces procesados a pequeñas cadenas de dsRNA, conocidos como RNAs cortos de interferencia (siRNAs), de 21 a 24 nucleótidos de extensión, y que presentan en su extremo 3' dos bases desapareadas. Al introducir siRNAs de origen

sintético se puede activar directamente el proceso de silenciamiento mediado por RNAi, sin embargo, la participación de Dicer en el corte de los siRNAs ha demostrado producir un potente efecto de silenciamiento (41).



**Figura 11.** Esquema del silenciamiento de un mRNA mediado por siRNA.

Los siRNAs presentes en el citoplasma son reconocidos e incorporados a un grupo de proteínas que poseen diferentes tipos de actividad entre las que se encuentran nucleasa, polimerasa, helicasa y RNAsa, los cuales en conjunto son conocidos como complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés). La doble cadena del siRNA es separada dentro del RISC, conservándose en la mayoría de los casos dentro del complejo RISC la cadena antisentido, la cual es complementaria al mRNA del gen a silenciar. Al ocurrir el apareamiento dentro de RISC de la cadena antisentido con el mRNA y siendo esta complementariedad del 100% se produce un corte en la cadena del mRNA, lo que la lleva a su posterior degradación, o bien, en caso de no ser completamente complementarios, se produce un bloqueo transcripcional ya que RISC impide el avance de los ribosomas. De esta manera la célula ve

limitada su capacidad para producir la proteína a partir de la cadena de mRNA, resultando en un silenciamiento del gen (Figura 11).

Debido al potente efecto de silenciamiento altamente específico del RNAi contra prácticamente cualquier cadena de RNA, se le ha propuesto como un mecanismo bastante promisorio como método terapéutico hacia secuencias de patógenos ya conocidas, así como una versátil herramienta de investigación que nos permite conocer de forma directa la función de un gen de interés.

### ***siRNA como tratamiento contra el cáncer***

A partir del año 2000 se ha ido popularizando el uso de siRNAs como una potente herramienta para silenciar la expresión de proteínas. Si bien se ha utilizado experimentalmente como tratamiento para enfermedades hereditarias, terapia antiviral (VIH, VHB, VHC), e incluso como vacuna para ciertos tipos de tumores (42), su aplicación más extendida ha sido como tratamiento para diversos tipos de cáncer.

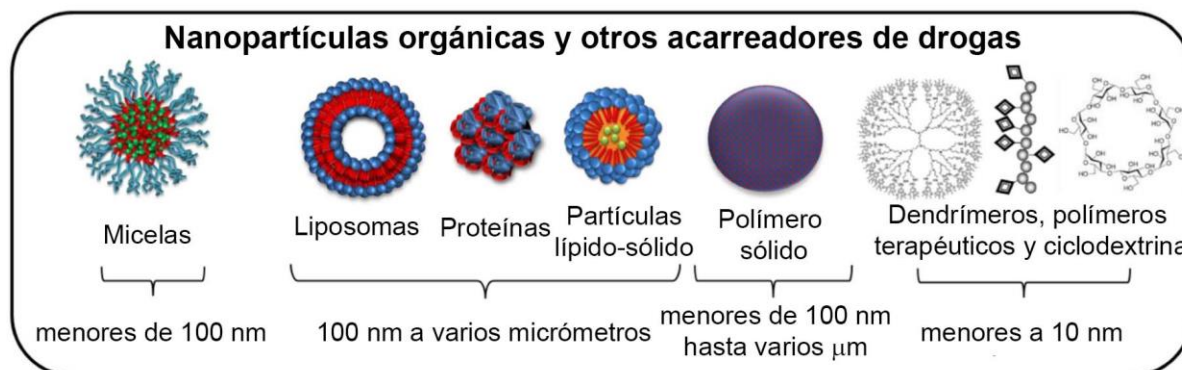
La naturaleza misma del cáncer como un grupo de células mutadas con pérdida de la regulación de alguna de sus proteínas o la activación de oncogenes lo hacen un blanco idóneo para el tratamiento con siRNAs ya que, como muchos estudios lo demuestran, es posible administrarlo tanto en modelos *in vitro* o *in vivo* y obtener resultados promisorios de un potente efecto antitumoral. Se han silenciado proteínas que intervienen en el ciclo celular (ciclina D1) (43), apoptosis (Bcl-2) (36), angiogénesis (angiostatina) (44), así como oncogenes relacionados con cáncer de hígado, pulmón, ovario, leucemia, por nombrar sólo unos cuantos (45) (46) (47).

Existen antecedentes del uso de RNAi como tratamiento experimental para combatir metástasis pulmonares, resaltando el reporte realizado por Zamora-Ávila y colaboradores (48). En dicho trabajado se utilizó la línea celular B16F10 derivada de melanoma murino para establecer un modelo de metástasis pulmonar en ratones. Posteriormente se administró por vía respiratoria un complejo formado por el polímero polietilenimina (PEI) como vector y un plásmido

codificante de pequeñas cadenas de RNA interferentes, conocidas como shRNA, dirigidas contra el oncogén WT1. Después de 4 semanas de tratamiento se extrajeron los pulmones y se evaluó el grado de silenciamiento obtenido, así como su efecto en los focos metastáticos obteniendo resultados positivos, tanto en la eficacia de esta vía para la administración de terapias, como en una marcada disminución de los focos tumorales en los ratones tratados.

### *Nanopartículas y otras estructuras utilizadas como vehículos para los siRNAs*

Al momento de decidir utilizar un fármaco como tratamiento en un modelo experimental, se deben considerar las características ideales del vehículo necesario para llevarlo a su sitio de acción, teniendo en cuenta las interacciones que se presentan con la molécula acarreada. Debido a la naturaleza química y el pequeño tamaño de los siRNAs, éstos al ingresar al organismo son degradados por nucleasas endógenas o excretados por orina en un lapso de 10-30 minutos, cuando son administrados sin un recubrimiento que los proteja. Actualmente existen numerosas opciones de vehículos disponibles como acarreadores de fármacos, cada una con sus ventajas y desventajas, para ello se han empleado diferentes entidades químicas, de naturaleza biológica o inorgánica y con múltiples grados de complejidad en su construcción. Los vehículos de distribución más utilizados en los modelos animales se muestran en la figura 12, junto con sus características distintivas (49).



**Figura 12.** Diferentes entidades químicas y biológicas como vehículos para siRNAs.

Entre las opciones de encapsulación de siRNAs más utilizadas destacan los liposomas, estos tienen la ventaja de ser de bajo costo, fácil producción y de una naturaleza fosfolipídica ideal para su captación por las células. Los liposomas suelen tener una distribución generalizada siendo absorbidos por las células a través de fusión de membranas o siendo fagocitados y liberándose al desestabilizar la membrana del endosoma, de esta forma liberan su contenido en el citoplasma donde los siRNAs encuentran las moléculas de mRNA blanco (50).

Los liposomas catiónicos se han utilizado ampliamente por poseer carga positiva y captar electrostáticamente a los siRNAs alcanzando altos porcentajes de encapsulación. No obstante, tienen el inconveniente de ser tóxicos para las células, ya que su incorporación a la membrana celular desestabiliza su carga y composición. Por el contrario, los liposomas aniónicos no se utilizan por su bajo nivel de captación de siRNAs y por ser repelidos debido a su carga por las membranas celulares (49).

En este sentido los liposomas neutros han mostrado numerosas ventajas sobre los antes mencionados gracias a su baja toxicidad y a que presentan una alta eficiencia de encapsulación de los siRNAs. Estos tienen la característica de ensamblarse espontáneamente al ser reconstituidos en medio acuoso, formando liposomas multilamelares con tamaños que varían entre 100 nm y 2  $\mu$ m. Estos tamaños son adecuados para ser transportados por el torrente sanguíneo y poder atravesar los poros capilares para distribuirse eficientemente en los tejidos. Adicionalmente, la vasculatura caótica de los tumores predispone a la presencia de tortuosidades en los flujos capilares que ayudan a una mejor extravasación aumentando así su concentración en el tejido tumoral (50).

En la categoría de liposomas neutros se encuentran los formulados diseñados por nuestro grupo de trabajo con DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine), con estrecha relación a la fosfatidilcolina, los cuales se han utilizado con gran éxito terapéutico como acarreadores de siRNAs en modelos murinos de cáncer. Su uso se ha ido generalizando debido a la alta eficiencia de estos liposomas para encapsular siRNAs, amplia biodistribución al ser

administrados por vía sistémica y una adecuada entrega hacia el interior de las células siendo inocuos al no despertar reacción inmunológica ni producir citotoxicidad derivada de su carga (51).

Este sistema liposomal siRNA-DOPC ha mostrado ser efectivo aún al ser administrado en modelos murinos de cáncer cervical con obesidad, lo que cobra importancia al considerar que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo que pueden desencadenar en el desarrollo del cáncer, siendo este vehículo efectivo para brindar de una opción de tratamiento a pacientes con estas características (52).



## JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte y su prevalencia va en aumento. Los pulmones son órganos frecuentemente afectados, tanto por tumores primarios como por procesos metastásicos, debido a su amplia irrigación sanguínea, alta oxigenación y espacios donde pueden alojarse libremente tumores. Como es un órgano vital no siempre es posible un abordaje quirúrgico y su afectación compromete gravemente la vida del paciente, por lo que es primordial buscar alternativas a las terapias tradicionales que ofrezcan mayor seguridad, buena eficiencia, que sean accesibles y fáciles de administrar.

El uso de siRNAs como herramienta para silenciar genes que confieren malignidad ha resultado ser bastante promisorio como terapia contra el cáncer. Entre los diferentes vehículos que se han empleado para proteger a los siRNAs de la degradación por nucleasas resaltan los liposomas neutros de DOPC, por no ser tóxicos, tener una alta eficiencia de encapsulación y de fácil almacenaje al poder ser liofilizados y reconstituidos cuando se requiera su uso. Los liposomas neutros de DOPC han sido utilizados por nuestro grupo como acarreadores de siRNAs en modelos de cáncer murinos, obteniendo importantes efectos terapéuticos al disminuir en gran medida el tamaño de los tumores, aunque sólo han sido probados de forma sistémica por vía intravenosa e intraperitoneal (51) (52).

La administración respiratoria de siRNAs ha sido poco estudiada, siendo una vía natural, no invasiva y de fácil acceso para el tratamiento de tumores alojados en pulmón. Estudios preliminares nuestros administrando siRNAs liposomales de forma inhalada, mostraron resultados muy favorables como terapia contra metástasis de melanoma en pulmón en modelos murinos. En base a todo esto, nos propusimos entender mejor los mecanismos antitumorales producidos por el silenciamiento de WT1 en las células de melanoma, así como determinar la biodistribución de nuestro sistema de siRNAs liposomales al ser administradas por vía respiratoria, valorar su eficiencia terapéutica antitumoral a corto plazo y efecto en la sobrevida a largo plazo en un modelo murino experimental de melanoma metastásico en pulmones.

## HIPÓTESIS

La administración de siRNAs liposomales por vía respiratoria produce un efecto terapéutico en tumores metastásicos de melanoma albergados en pulmón, así como en tumores distantes.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar la eficacia de la administración por vía respiratoria de siRNAs liposomales sobre metástasis pulmonares y tumores subcutáneos de melanoma en un modelo murino.

## OBJETIVOS PARTICULARES

### *In vitro*

- Evaluar el silenciamiento in vitro de WT1 y su efecto sobre la viabilidad, proliferación, migración, invasión, ciclo celular y apoptosis.

### *In vivo*

- Determinar la biodistribución del sistema siRNA liposomal administrado por vía respiratoria.
- Analizar los efectos de la administración de siRNAs liposomales por vía respiratoria sobre metástasis pulmonares y tumor subcutáneo de melanoma en ratones.
- Realizar un estudio de sobrevida a largo plazo con administración de siRNAs liposomales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

#### *Línea celular*

Para la realización de los diferentes estudios *in vitro* e *in vivo*, se utilizó la línea celular B16F10 derivada de melanoma murino, la cual fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC®), con el número de catálogo CRL-6475. Esta línea celular es idónea para nuestro proyecto ya que produce un modelo de metástasis a pulmones cuando es administrada de forma intravenosa en la cepa singénica de ratones C57BL/6.

#### *Ratones*

Se adquirieron ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 5-6 semanas de edad, a los cuales se les permitió un periodo de 2 semanas de adaptación en nuestro bioterio previo a cualquier manipulación experimental. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de periodos de 12 horas luz/oscuridad con temperatura constante de 22°C. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo el protocolo No. 0076-14 aprobado por el Comité Interno del Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de nuestra institución.

#### *RNAs cortos de interferencia (siRNAs)*

Se utilizó una secuencia silenciadora de WT1 (siRNAsWT1) previamente reportada en la literatura (53) y utilizada con éxito anteriormente por nuestro grupo de trabajo, la cual está compuesta del siguiente par de cadenas de RNA:

5'-AAGCUGUCCCACUUACAGAUGCdTdT-3' (sentido)

5'-GCAUCUGUAAGUGGGACAGCUUdTdT-3' (antisentido)

Así también, se adquirieron siRNAs control negativo no silenciadores (siRNAsCN) con número de catálogo SIC001. Todos los siRNAs tanto para WT1 como control negativo fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (USA).

### ***PCR primers***

Para llevar a cabo la reacción de PCR punto final de los análisis de RT-PCR, se diseñaron a partir del mRNA murino de WT1 (NCBI Reference Sequence: NM\_144783.2) las siguientes secuencias, obtenidas de Sigma-Aldrich para WT1 y  $\beta$ -Actina como control:

WT1. Forward 5'-cccagcttgaatgcatgacc-3'. Reverse 5'-cctgtgtgtctcctttggtg-3'

$\beta$ -Actina. Forward 5'-gtccctcaccctcccacaaag-3'. Reverse 5'-gctgctcaacacctcaaccc-3'

### ***Liposomas***

Con el objetivo de servir como vehículos para la biodistribución de los siRNAs utilizados se prepararon liposomas compuestos por el fosfolípido neutro DOPC (Avanti Lipids, USA), los cuales fueron preparados siguiendo el método detallado por Landen y colab (51).

### ***Anticuerpos***

Para la detección de proteínas por el método de Western Blot se utilizaron los siguientes anticuerpos:

**WT1.** Anticuerpo policlonal purificado de conejo contra la región C terminal de la proteína WT1 de origen humano, que también reconoce las versiones de ratón y rata. (Santa Cruz Biotechnology, Inc., No. Cat. Sc-192).

**Anti-rabbit IgG.** Anticuerpo purificado de cabra contra la región H&L de IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano. (Cell Signaling Technology, No. Cat 7074).

**Actina.** Anticuerpo monoclonal de ratón anti  $\beta$ -actina. (Sigma-Aldrich, No. Cat A2228).

**Anti-mouse IgG.** Anticuerpo purificado de caballo contra la región H&L de IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano. (Cell Signaling Technology, No. Cat #7076).

### ***Otros Reactivos***

Medios de cultivo: Medio de cultivo DMEM/F12, 0.25% Tripsina-EDTA (1x), Suero Fetal Bovino (SFB), Antibiótico-Antimicótico (100x), todos marca GIBCO de Invitrogen Life Technologies (USA).

Las transfecciones *in vitro* con los siRNAs se llevaron a cabo utilizando el reactivo RNAiFect Transfection Reagent de QIAGEN (No. Cat. 301605, USA).

Para evaluar la viabilidad y realizar los conteos celulares se utilizó una tinción con azul de tripano. El reactivo azul alamar se utilizó para los ensayos de actividad metabólica. Ambos adquiridos de Biosource Invitrogen Life Technologies, USA (No. Cat. 15250-061 y DAL1100, respectivamente).

Para la extracción de RNA total de células y tejidos se empleó el reactivo TRIzol (No. Cat. 412711) del cual se sintetizó DNA complementario (cDNA) por medio del kit M-MLV (No. Cat. 28025) con RNAsaOUT (No. Cat. 10777019), todos ellos de marca Invitrogen (USA).

Se preparó buffer de lisis NP-40 (150 mM NaCl, 50 mM Tris y 1% Tritón X-100 a un pH de 8.0) adicionado con 1X Inhibidor de proteasa (No. Cat. G6521) de Promega (USA), para la extracción de las proteínas totales tanto de células como de tejidos.

El estudio de invasión celular se realizó utilizando canastillas transwell de 24 pozos con poros de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro marca Falcon (Ref. 3530097) y matrigel marca Corning (Ref. 354248, USA).

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el kit de BCA (ácido bicinconínico) de Thermo Scientific (No. Cat. 23227, USA).

La visualización de los Western Blots se realizó utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL de GE Healthcare (No. Cat. RPN2232).

Kit para detección de apoptosis DeadEnd Fluorometric TUNEL System marca Promega (Ref G3250).

Kit para análisis del ciclo celular BD Cycletest Plus DNA Reagent marca BD Bioscience (No. Cat. 340242).

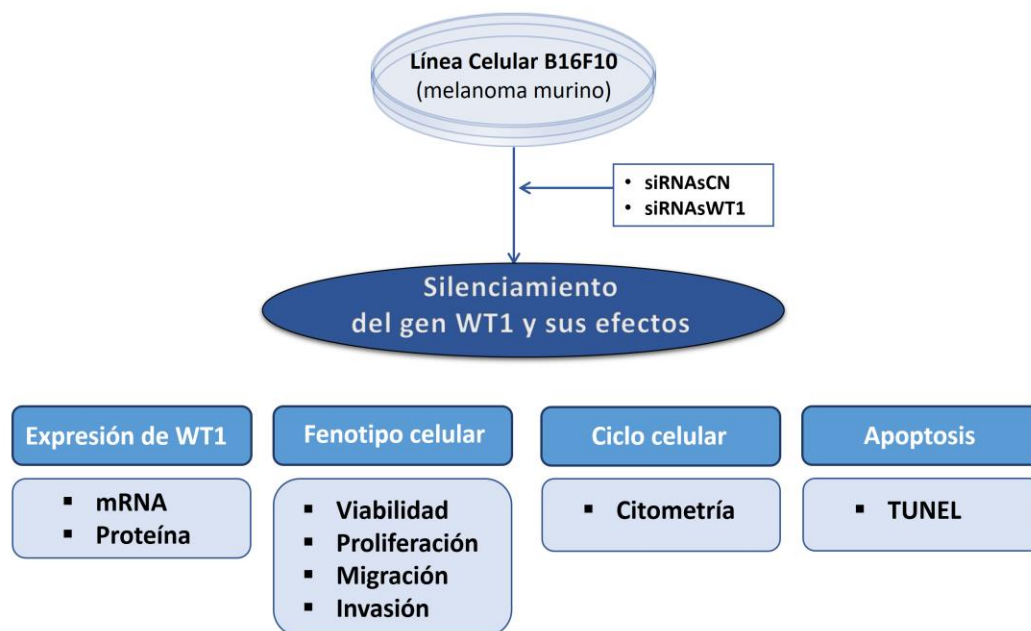
Se utilizó el medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, No. Cat. H-1200) para teñir los cortes histológicos provenientes de los órganos extraídos.

### ***Equipo Utilizado***

Para la realización de los experimentos se contó con el siguiente equipo:

- Incubadora para cultivo celular Thermo Electron Corporation modelo 3554.
- Campana de bioseguridad de flujo laminar Nuare Tipo A2, Clase II, modelo UN-425-400, USA.
- Lector para placas de ELISA marca Thermo Fisher Scientific/ Labsystems modelo Multiskan ELX800, USA.
- Cámara de electroforesis, de transferencia (No. Cat. 1658004) y fuente de poder (No. Cat.1645070) marca BioRad, USA.
- Sistema de captura de imágenes quimioluminiscentes MicroChemi marca DNR Bio-Imaging Systems, Israel.
- Liofilizadora marca Labconco, USA modelo FreeZone 2.5 Cat. 7670520 con Bomba de vacío Labconco, USA Mod. 117.
- Citómetro de flujo BD Biosciences, USA modelo FACSCanto II.
- Criostato Leica Biosystems, USA, modelo CM1100.
- Microscopio confocal Leica Biosystems, USA, modelo TCS SP5.

## METODOLOGÍA *IN VITRO*



**Figura 13.** Diagrama de la metodología *in vitro*. Estudio de la administración de siRNAs a la línea celular B16F10 en el silenciamiento de WT1 y sus efectos en diferentes mecanismos celulares.

### ***Condiciones del cultivo celular***

La línea celular B16F10 derivada de melanoma murino se mantuvo en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 8 ml de medio DMEM/F12 suplementado al 5% de SFB. Las condiciones de incubación fueron 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire húmedo. Siempre se trabajó con cultivos que tenían menos de 30 pases para tratar de mantener su integridad genómica y la reproducibilidad de los experimentos.

### ***Transfección de células B16F10 con siRNAs***

Para estudiar los efectos del silenciamiento de WT1 con siRNAs en las células en cultivo se prepararon complejos de transfección a una relación de 6:1 entre agente de transfección y siRNAs (respectivamente) y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente para permitir su

unión electrostática. Se formaron 3 grupos experimentales: Sin Tratamiento (ST) (0  $\mu\text{g}$ ), Control Negativo (siRNAsCN) (7  $\mu\text{g}$  siRNA), y silenciador de WT1 (siRNAsWT1) (7  $\mu\text{g}$  siRNA). Se mezclaron  $1 \times 10^5$  células con los complejos de transfección a temperatura ambiente, sembrando en placas de cultivo de 6 pozos cada una conteniendo 2 ml de DMEM/F12 al 5% de SFB. Las células se mantuvieron en incubación por un periodo de 72 horas posterior a la transfección.

### ***Recolección de células transfectadas***

Tras haber transcurrido 72 horas de haber realizado la transfección se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml. Se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de tripsina-EDTA a cada pozo y se incubó por 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$  para permitir que se disgregaran las células. La tripsina se inactivó agregando 1.5 ml de medio de cultivo, homogenizando cada pozo se transfirió el volumen a su respectivo tubo Falcon, se centrifugó y se lavó con PBS estéril en preparación para los siguientes análisis.

### ***Análisis de expresión del mRNA de WT1 por PCR***

Para determinar el efecto del silenciamiento en la expresión de mRNA de WT1 se obtuvo después de la transfección la pastilla celular aislando de ésta el RNA total siguiendo el método de TRIzol. Posteriormente se utilizaron 5  $\mu\text{g}$  de este RNA para sintetizar su correspondiente cDNA por medio de la reacción de transcriptasa inversa utilizando el kit M-MLV. El PCR se llevó a cabo durante 35 ciclos partiendo de 1  $\mu\text{l}$  de cDNA como templado, tanto para la amplificación de WT1 como para el control  $\beta$ -Actina. Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% a 100 volts por 45 minutos, tras lo cual se digitalizó una imagen del gel de corrimiento. Se analizó por medio de densitometría la expresión de los mRNA utilizando el software imageJ, normalizando al nivel de expresión del control  $\beta$ -Actina.

### ***Análisis de expresión de proteína de WT1 por Western Blot***

De igual manera se estudió el efecto del silenciamiento sobre la expresión de la proteína WT1 colectando la pastilla celular obtenida después de la transfección, la cual se sometió a lisis utilizando el buffer NP-40 y se purificaron las proteínas totales. Se llevó a cabo la



cuantificación de proteínas en una placa de 96 pozos por el método de BCA al leer la absorbancia de las muestras utilizando un lector de placas de ELISA. Se procedió a realizar un Western Blot cargando 100  $\mu\text{g}$  de proteínas por carril en un gel de acrilamida al 8%. Las proteínas se separaron en una cámara de electroforesis a 100 volts durante 2 horas y luego se transfirió a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) ajustando la fuente de poder a 0.3 amperes por 2 horas. Terminada la transferencia se procedió a bloquear la membrana con una solución compuesta de leche sin grasa al 5% en buffer TBS-T (TBS, Tween20 0.1%) durante toda la noche con agitación continua a 4°C. A la mañana siguiente se lavó la membrana con buffer TBS-T y se agregaron 5 ml de la solución de leche sin grasa al 2.5% en buffer TBS-T, a la cual se incorporó el anticuerpo primario (anti-WT1) a una dilución de 1:500 y se dejó en agitación a temperatura ambiente. Transcurridas 2 horas se lavó nuevamente la membrana con buffer TBS-T y se agregó el anticuerpo secundario a una dilución de 1:5,000 con las mismas condiciones empleadas durante la incubación con el anticuerpo primario. Por último, se realizaron 2 lavados a la membrana con TBS-T por 10 minutos cada uno, se añadió la solución de ECL que contenía el sustrato para la enzima acoplada al anticuerpo secundario y cuya reacción emite fotones que nos permiten visualizar la señal correspondiente al nivel de expresión de la proteína de interés. La captura de imágenes se llevó a cabo utilizando el equipo MicroChemi, el cual captura una digitalización que puede ser sometida a densitometría de las bandas de proteína con el software imageJ. Finalmente se realizó un ‘rasurado’ (stripping) de los anticuerpos de la membrana y se repitió el proceso con los anticuerpos para la detección de  $\beta$ -actina y se utilizó su expresión para normalizar como control de carga.

### ***Estudio de viabilidad y proliferación celular***

Para el estudio de la viabilidad celular posterior al silenciamiento de WT1 se utilizaron dos métodos: El primero se realizó utilizando la tinción con azul tripano, para la cual se transfectaron células en placas de cultivo de 12 pozos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por pozo con 1 ml de medio DMEM/F12 con 5% SFB. Las células fueron recolectadas con tripsina transcurridas 48 o 72 horas, para posteriormente ser teñidas con azul de Tripano (1:1) y

proceder al conteo en una cámara de Neubauer. Esta tinción nos permite diferenciar células vivas de muertas al poder observar una coloración azul únicamente en las células que presentan poros en su membrana externa permitiendo la internalización del colorante. La relación entre células vivas y muertas se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad} = (\text{células vivas} / \text{células totales}) * 100$$

El segundo método utilizado para medir viabilidad fue el ensayo de azul Alamar, el cual se basa en la oxidación de un colorante por enzimas mitocondriales, lo que representa una medida directa de la actividad metabólica de las células. Se sembraron células ya transfectadas en placas de 96 pozos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células en 100  $\mu$ l de medio DMEM/F12 con 5% SFB por pozo (18 pozos por grupo). Transcurridas 48 y 72 horas las placas se analizaron en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 570 nm.

El estudio de proliferación celular se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito para viabilidad, se realizó el conteo de células vivas con azul tripano y por medio de la siguiente fórmula se conoce el número de células por mililitro:

$$\text{No. de células por mililitro} = \text{No. Promedio de células por campo} * 2 \text{ (factor de dilución)} * 10,000$$

Conociendo el número de células vivas por mililitro de suspensión se multiplicó por los mililitros totales, y así se obtuvo el número total de células, con lo que pudimos comparar el efecto del silenciamiento de WT1 sobre la proliferación celular.

### ***Ciclo celular por citometría de flujo***

Con la finalidad de determinar el efecto del silenciamiento de WT1 en el ciclo celular, se transfectaron acorde a los 3 grupos experimentales  $1 \times 10^5$  células por pozo con 2 ml de DMEM/F12 con 5% SFB en placas de 6 pozos. Las células tratadas se recolectaron a las 72 horas, se lisó la membrana plasmática para obtener los núcleos aislados e inmediatamente

después teñirlos con yoduro de propidio frío durante 2 horas para posteriormente ser analizados por citometría de flujo. La medición en el citómetro se llevó a cabo a 620 nm, considerando 30 mil eventos para cada muestra utilizando un control sin tinción para ajustar la fluorescencia basal. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software ModFit LT v5.

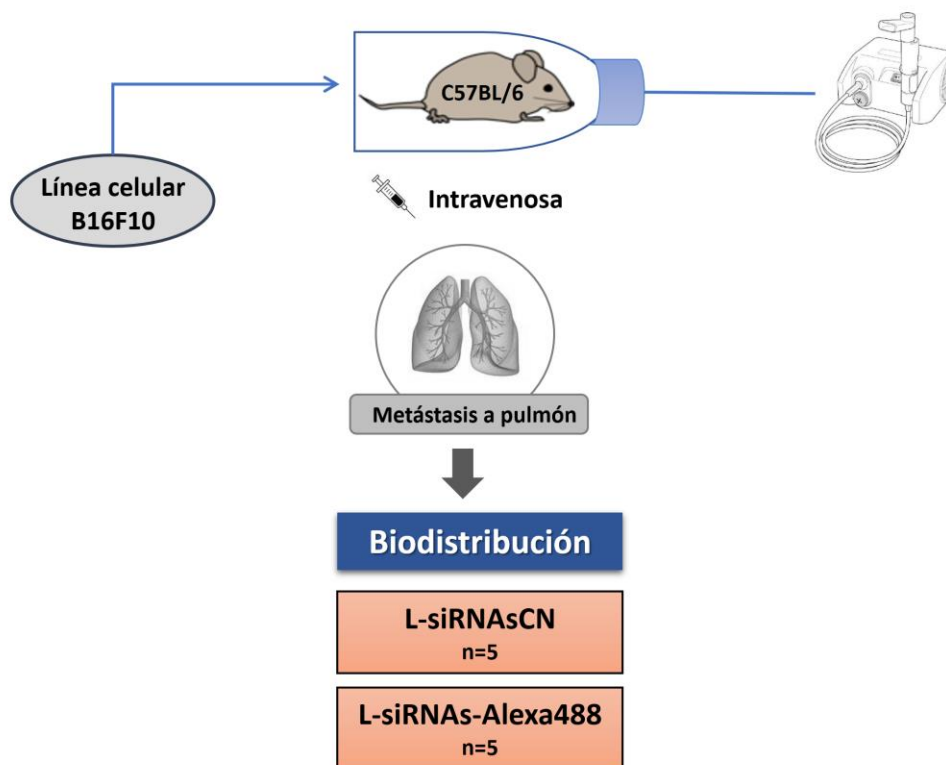
### ***Ensayo de migración e invasión***

Para conocer los efectos del silenciamiento sobre la capacidad de motilidad celular, lo que es de gran relevancia en el proceso de metástasis, se colocaron canastillas transwell en placas de cultivo de 24 pozos. Las canastillas destinadas al estudio de migración no llevan recubrimiento, en cambio, las de invasión fueron cubiertas con 50  $\mu$ l de matrigel a una concentración de 1.2 mg/ml, dejando polimerizar durante 2 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se retiró el exceso de matrigel dejando sólo una delgada capa. Las células se sometieron durante 24 horas a un cambio de medio bajo en suero que contenía un 1% de SFB, lo cual permite una mayor activación del proceso de quimiotaxis, para después ser transfectadas acorde al grupo de tratamiento. Se colocaron 500  $\mu$ l de medio DMEM/F12 al 5% SFB en la parte inferior de las canastillas y se sembraron  $2.5 \times 10^4$  células en la parte superior de las mismas utilizando medio de cultivo con solo 1% de SFB, estableciendo así un gradiente de concentración de SFB para inducir quimiotaxis. A las 48 horas se recolectaron las canastillas del estudio de migración y a las 72 horas las del estudio de invasión. Se sometieron al siguiente protocolo de tinción: se retiraron las células que no migraron de la parte superior con un hisopo de algodón, se hizo un lavado con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 minutos las células que sí lograron atravesar la membrana. Una vez fijadas las células se retiró la membrana conteniendo las células de la canastilla y se montó sobre un portaobjetos. Se tiñeron con DAPI para la visualización y conteo de los núcleos en un microscopio de fluorescencia.

### ***Análisis de apoptosis por TUNEL***

Con el objetivo de describir si existe activación del proceso de apoptosis desencadenado por el silenciamiento de WT1, se llevó a cabo el cultivo y transfección de las células acorde a cada grupo de tratamiento siguiendo la metodología previamente detallada. De las células transfectadas en solución se tomó un número de  $2.5 \times 10^4$  para sembrarse sobre un cubreobjetos redondo previamente colocado en placas de cultivo celular de 12 pozos con 1 ml de medio DMEM/F12 al 5% de SFB. A las 48 y 72 horas se retiraron los portaobjetos realizando un suave lavado con PBS estéril para retirar los restos de medio y se procedió a la tinción de apoptosis con el kit DeadEnd Fluorometric TUNEL System, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 25 min a 4°C y se realizó un lavado con la solución de equilibrio del kit. Las células se incubaron en condiciones de oscuridad durante 60 minutos a 37°C con la enzima TdT y los nucleótidos dUTP, los cuales se incorporan en los extremos de las cadenas de DNA cortadas por nucleasas, mecanismo característico del proceso de apoptosis. Por último, se montaron los cubreobjetos que contenían las células procesadas con VectaShield con DAPI sobre un portaobjetos para su posterior análisis en un microscopio de fluorescencia.

## METODOLOGÍA *IN VIVO*



**Figura 14.** Diagrama de la metodología para el estudio de biodistribución.

### ***Biodistribución de los L-siRNAs***

Para este propósito se estableció un modelo de tumores metastásicos de melanoma en los pulmones de ratones C57BL/6, inoculando los ratones a través de una inyección en la vena de la cola con  $5 \times 10^5$  células de la línea celular B16F10, las cuales estaban suspendidas en 200  $\mu$ l de solución salina fisiológica inyectable (NaCl 0.9%). El establecimiento de este modelo de metástasis se caracteriza por la presencia de tumores detectables en pulmones al transcurrir una semana y 15 días después de la inoculación podemos encontrar nódulos tumorales ampliamente establecidos en ambos pulmones.

Los ratones se dividieron en dos grupos, el primero fungió como control al administrársele L-siRNAsCN carentes de marca fluorescente y el segundo recibió la misma secuencia control de siRNA acoplada a Alexa fluor 488 lo que sirvió como marca fluorescente para detectar la presencia de L-siRNAs en los órganos analizados (Fig. 14).

Después de la administración de los L-siRNAs esperamos 1 hora para permitir su correcta absorción y distribución por el organismo. Transcurrido este tiempo los ratones fueron sacrificados y las muestras de los diferentes órganos obtenidos procesadas.

### ***Construcción de la cámara de nebulización***

Para poder administrar el tratamiento nebulizado a los ratones se diseñó y construyó una cámara de nebulización (Fig. 15) a partir de material disponible en el laboratorio, la cual nos permitía posicionar simultáneamente para un mismo tratamiento un máximo de 10 ratones. La distribución homogénea de los flujos de aire entre todas las cápsulas se obtuvo realizando agujeros equidistantes entre sí a la misma altura de la base, mientras que la inmovilización de los ratones los mantuvo en una posición óptima para respirar el aire nebulizado que era direccionado por gradientes de presión de aire nebulizado que fluía directamente hacia las vías aéreas de los ratones (Fig. 16).



**Figura 15.** Posición en que se administra el tratamiento nebulizado a los ratones.

### ***Administración de los siRNAs liposomales nebulizados***

Se realizó una mezcla con los componentes de los siRNAs liposomales en viales adecuados para su liofilización siguiendo la técnica descrita por Landen y cols. (51), lo que permitió su almacenamiento por periodos de tiempo prolongado manteniéndolos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La dosis individual que se preparó para cada ratón fue de  $10\ \mu\text{g}$  de siRNAs por sesión. Se tomó un vial previamente liofilizado y se reconstituyeron los siRNAs liposomales en  $500\ \mu\text{l}$  de solución salina fisiológica estéril para cada dosis. Una vez posicionados los ratones en sus cápsulas se procedió a iniciar la nebulización del tratamiento, para lo cual los ratones permanecieron inmóviles durante la totalidad del tiempo de administración, alrededor de 6 a 8 minutos, donde inhalaban directamente el aire nebulizado que contenía los siRNAs liposomales. Para el estudio de biodistribución se aplicó una dosis única de siRNAs liposomales con o sin marca fluorescente a cada ratón 15 días después de haber sido inoculados con las células, tiempo en el que se aseguraba la presencia de tumores en los pulmones.



**Figura 16.** Administración de los siRNAs liposomales por vía respiratoria.

### ***Extracción de órganos***

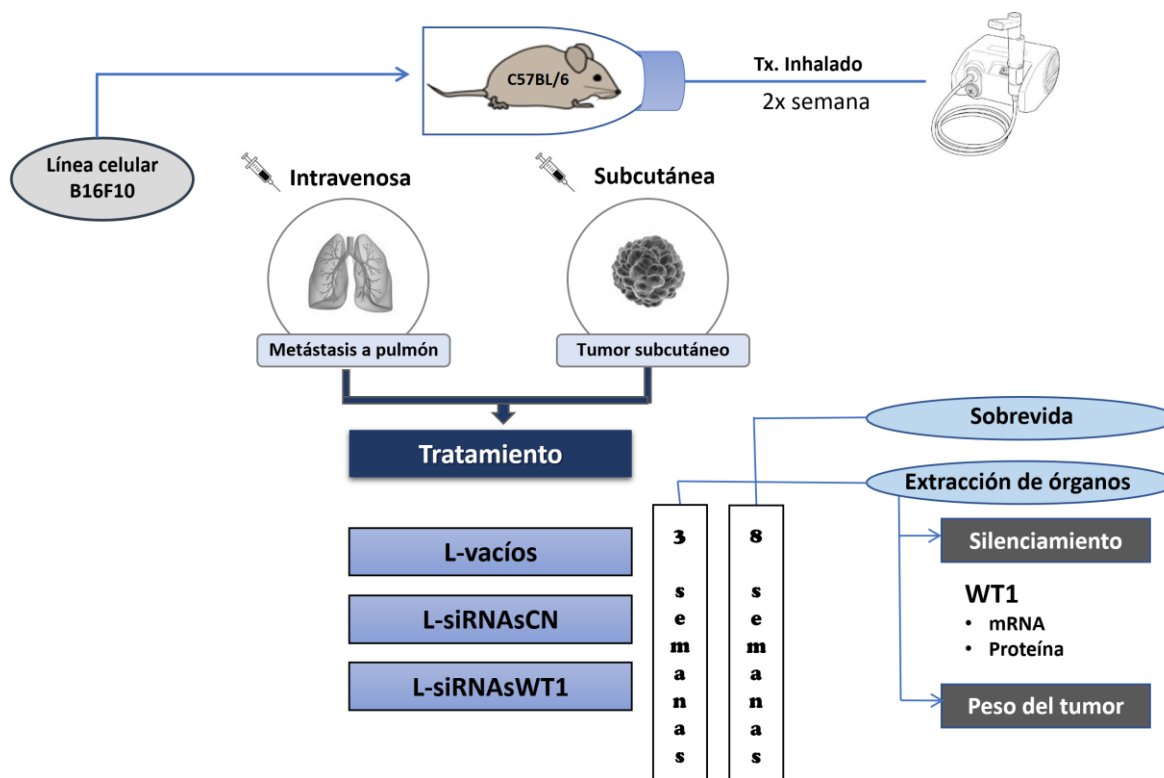
En el estudio de biodistribución se permitió un lapso de 1 hora para que los siRNAs liposomales se distribuyeran por el organismo después de haber sido administrados. Transcurrido este tiempo los ratones fueron sacrificados obteniendo muestras de los principales órganos, incluidos los pulmones que eran el principal órgano de interés. Las muestras obtenidas fueron embebidas en resina Tissue-Tek®, congeladas y almacenadas a -80°C para su procesamiento posterior.

### ***Análisis microscópico***

A partir de las muestras de órganos congelados se realizaron cortes histológicos de 16 micrómetros de grosor por medio de un criostato, se montaron sobre portaobjetos y se les añadió medio de montaje Vectashield con DAPI y se sellaron con esmalte de uñas para prevenir su desecación. Se observaron en un microscopio confocal utilizando los canales de luz visible, UV (405 nm) para la visualización de los núcleos, y laser de argón para la visualización de la marca fluorescente Alexa488 presente en los siRNAs liposomales. Se utilizaron los cortes provenientes de órganos tratados con siRNAs liposomales sin marca fluorescente como controles para la estandarización de la fluorescencia endógena de cada órgano.



## Tratamiento a corto y largo plazo con siRNAs liposomales



**Figura 17.** Diagrama de la metodología para los estudios *in vivo*. Tx, tratamiento.

### Preparación de los modelos de metástasis y tumor subcutáneo

Para reproducir los dos modelos de cáncer estudiados, tanto el de metástasis a pulmón como el establecimiento de un tumor subcutáneo, se inocularon  $5 \times 10^5$  células de la línea celular B16F10, las cuales se encontraban suspendidas en 200  $\mu$ l de solución salina fisiológica. A diferencia del modelo de metástasis pulmonar que se describió previamente inoculando las células por la vena de la cola, el modelo de tumor subcutáneo se obtuvo inyectando las células en el cuadrante inferior derecho de la región dorsal del ratón, formando un ámpula subcutánea donde rápidamente se reabsorbe el líquido quedando únicamente las células inoculadas

delimitadas al área de la inyección. Este modelo forma tumores cubiertos por piel que sobresalen visiblemente después de la primera semana de haber sido inoculados.

### ***Tratamiento a corto plazo con siRNAs liposomales nebulizados***

Para estudiar el potencial terapéutico de los L-siRNAs, ratones que portaban tumores, ya sea de metástasis pulmonar o subcutáneos, recibieron tratamiento con los L-siRNAs nebulizados correspondientes al grupo experimental en que fueron asignados: L-vacíos (0 µg de siRNAs), L-siRNAsCN (10 µg de siRNAs) o L-siRNAsWT1 (10 µg de siRNAs). El proceso de preparación, reconstitución y nebulización de los L-siRNAs se mantuvo igual al previamente descrito. El esquema de tratamiento fue el mismo para ambos modelos de cáncer murinos (metástasis pulmonares y tumor subcutáneo), administrando 2 dosis por semana siendo ésta la frecuencia óptima obtenida en modelos previos de nuestro grupo, empezando el 3er día posterior a la inoculación de las células hasta alcanzar un total de 5 dosis durante todo el tratamiento. Al momento de haber completado el número de dosis totales, correspondiente al día 18 post-inoculación, los ratones fueron sacrificados debido al marcado deterioro de su salud, evitando así la muerte de éstos. Una vez sacrificados los ratones se extrajeron los tumores y se conservaron muestras de cada uno de los órganos estudiados para posterior procesamiento.

### ***Estudio de sobrevida con tratamiento a largo plazo de siRNAs liposomales***

El esquema a largo plazo se realizó únicamente con el modelo de metástasis pulmonares, ya que se decidió excluir el modelo de tumores subcutáneos al no haber obtenido resultados favorables a corto plazo. Se continuó con la aplicación de 2 dosis por semana a partir del 3er día de haber sido inoculadas las células, teniendo el tratamiento una duración máxima de 8 semanas, tiempo que se consideró suficiente en caso de que el tratamiento fuera efectivo, ya que considerando el modelo de metástasis pulmonar los ratones controles morirían entre la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semana. Se retiraban del estudio a manera individual los ratones que mostraban síntomas

de afección pulmonar o decaimiento físico en general, lo que incluía síntomas de dificultad respiratoria, debilidad, movilidad reducida y/o disminución en los tiempos de reacción, momento en que se procedió a sacrificarlos registrando el grupo, día y número de dosis recibidas para cada ratón. A los ratones sacrificados se les extrajeron los tumores y se obtuvieron muestras de cada órgano estudiado.

### ***Análisis de los tumores***

Para realizar los análisis correspondientes a cada grupo experimental, los tumores fueron extraídos de los ratones al momento de ser sacrificados para evitar degradación del tejido. A los grupos de ratones con metástasis pulmonares se les extrajo el paquete pulmonar, el cual consiste en tráquea, bronquios y pulmones, y se pesó la totalidad del mismo para evaluar el grado de afectación. A los ratones con tumor subcutáneo se les disecó el tumor de los tejidos adyacentes a la piel registrando el peso total del mismo. De cada tumor se obtuvieron muestras para los análisis de mRNA por RT-PCR, expresión de proteínas por Western Blot, y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  con Tissue-Tek para análisis histológicos. Las metodologías correspondientes a estos estudios fueron descritas previamente.

### ***Pruebas estadísticas***

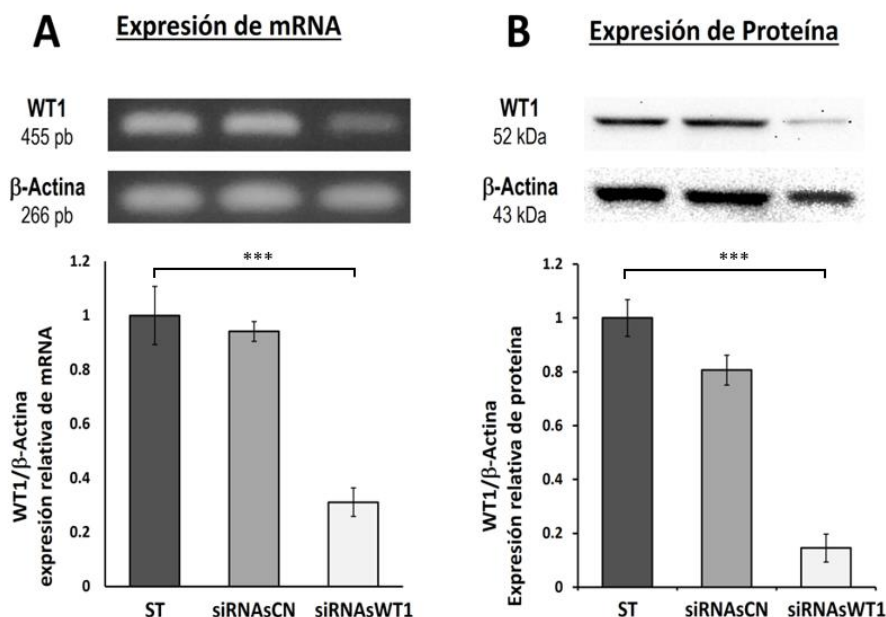
Todos los estudios tanto *in vitro* como *in vivo* fueron sometidos a análisis estadísticos que abarcaban comparaciones entre cada grupo utilizando la *t de student* como prueba principal para denotar las diferencias entre tratamientos. En caso de obtener una *p* significativa se hace la notación a su valor con asteriscos señalada en cada gráfica (\*). Únicamente en el estudio de sobrevida se utilizó un análisis de comportamiento en el tiempo para el estimador de Kaplan-Meier denominado prueba log-rank, de misma manera señalando su valor de significancia *p* con asteriscos determinados en la gráfica.

## RESULTADOS

### *IN VITRO*

#### *Análisis del silenciamiento de WT1 en cultivo celular*

Se analizó la expresión de WT1 tras 72 horas de tratamiento con los siRNAs y se determinó el nivel de silenciamiento obtenido tanto a nivel de mRNA por RT-PCR, como el nivel de proteína utilizando la técnica de Western Blot. En la figura 18 se presentan en la parte superior geles representativos mostrando los diferentes niveles de expresión para los diferentes grupos. Después de realizar el análisis de densitometría, en las gráficas podemos apreciar que se alcanzó un silenciamiento a nivel de mRNA del 69% en el grupo de tratamiento con siRNAsWT1, así mismo, se observa una disminución en la expresión de proteína WT1 donde el silenciamiento es aún más importante, con un 86% de inhibición de la expresión cuando se compara con el control sin tratamiento (ST).



**Figura 18.** Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la expresión de mRNA y proteína a las 72 horas de transfección. A) Bandas de expresión de mRNA medido por RT-PCR y gráfica con sus niveles de expresión. B) Expresión de proteína WT1 por Western Blot y gráfica correspondiente. Se normalizó al control Sin Tratamiento (ST). Promedio  $\pm$  desviación estándar, \*\*\* $p < 0.001$ .

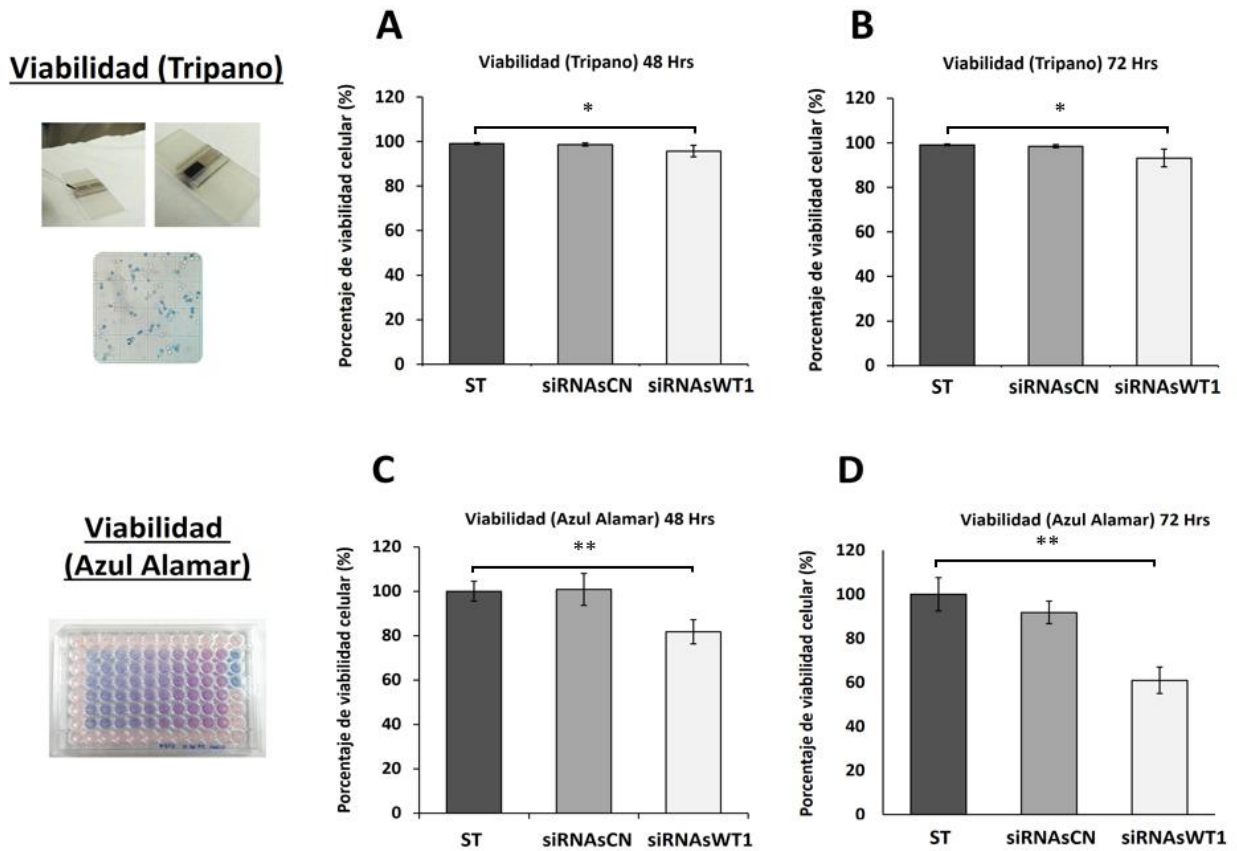
Se comprobó también que el silenciamiento es específico de secuencia ya que los niveles de expresión en el grupo siRNAsCN no muestran diferencias significativas contra el control ST. Este es un control fundamental ya que se utiliza la misma entidad química, sólo que en este caso los siRNAs han sido diseñados de manera que no reconozcan ninguna secuencia en mamíferos.

### ***Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la viabilidad y proliferación de células en cultivo***

Una vez corroborando el silenciamiento eficaz de WT1, se procedió a analizar su efecto sobre la viabilidad celular medida a las 48 y 72 horas de tratamiento. Se utilizaron dos técnicas para medir viabilidad que nos permiten tomar en consideración diferentes aspectos celulares, esto debido a la sensibilización provocada en las células cuando se utiliza tripsina para disgregarlas y permitir su conteo, por lo que al utilizar un segundo método podemos validar los resultados obtenidos. En la primera sección de la figura 19 se muestran los resultados obtenidos con la tinción de Azul Tripano la cual nos permite diferenciar las células vivas de las muertas. Se observa una ligera caída en el porcentaje de viabilidad (95% de viabilidad, fig. 19A) a las 48 horas, mientras que disminuye un poco más (93% de viabilidad, fig. 19B) a las 72 horas en el grupo tratado con siRNAsWT1.

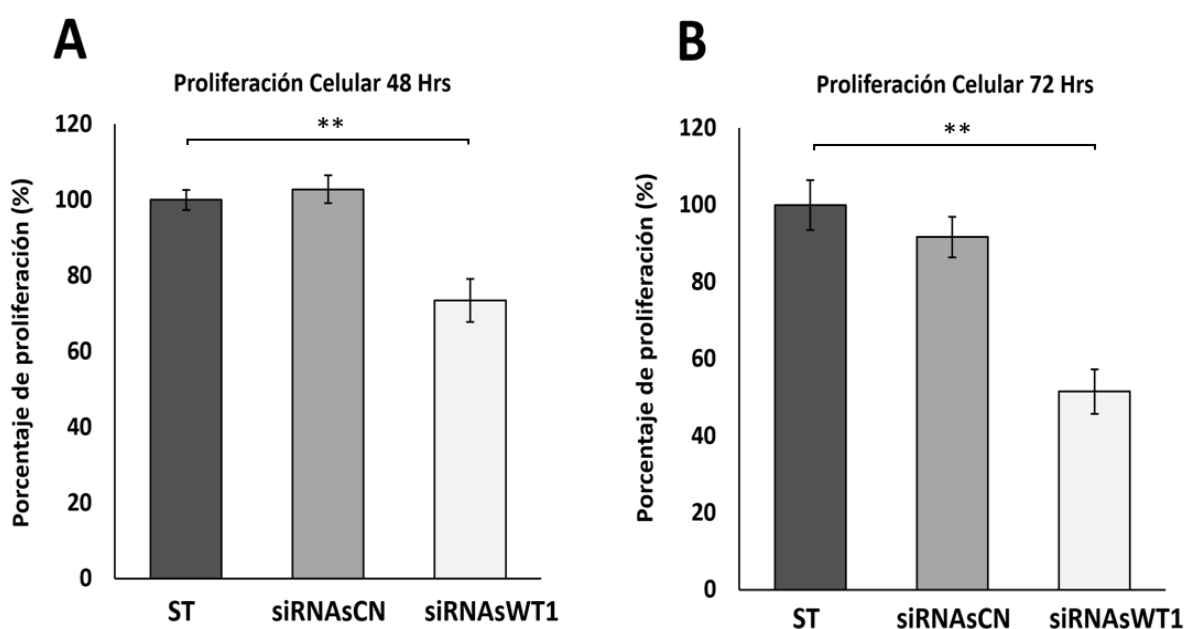
Cuando analizamos la viabilidad basándonos en la actividad metabólica de las células por medio de la técnica de Azul Alamar observamos en el grupo tratado con siRNAsWT1 una caída más pronunciada, obteniendo una disminución de 19% a las 48 horas (Fig. 19C), y hasta 40% a las 72 horas (Fig. 19D). Con estos resultados podemos concluir por el método de Azul Tripano que la gran mayoría de las células se encuentran vivas en ambos tiempos de tratamiento, sin embargo, estas mismas células presentan una disminución en su actividad metabólica medido por Azul Alamar. La caída en la actividad metabólica no se puede atribuir

exclusivamente a una disminución en la viabilidad celular, ya que existe la posibilidad de que simplemente exista un menor número de células en cultivo debido a muerte celular o a una menor tasa de replicación, por lo que se decidió realizar un estudio complementario para abordar esta alternativa.



**Figura 19.** Análisis de viabilidad al silenciar WT1 en la línea celular B16F10 a las 48 y 72 horas de transfección. A) y B) Porcentaje de viabilidad utilizando Azul Tripano. C) y D) Porcentaje de viabilidad utilizando Azul Alamar. Se normalizó al control Sin Tratamiento (ST). Promedio  $\pm$  desviación estándar, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

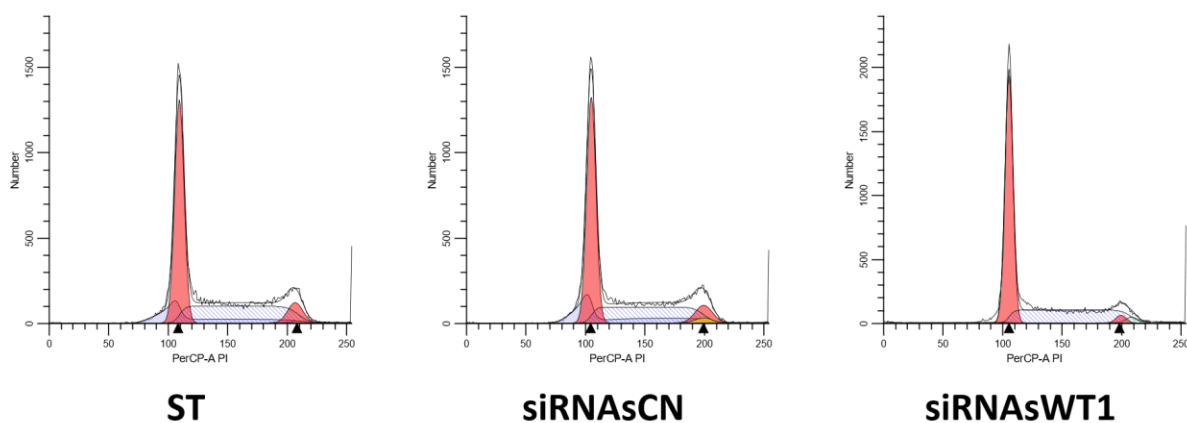
Para permitir una adecuada interpretación de los resultados previamente obtenidos en los estudios de viabilidad realizamos un estudio de proliferación celular para determinar si el silenciamiento de WT1 tenía un efecto restrictivo en la división de las células. Los resultados obtenidos indican una caída en la proliferación del grupo tratado con siRNAsWT1 de 27% a las 48 horas (Fig. 20A) y de un 49% a las 72 horas (Fig. 20B). Ambos porcentajes son similares a los obtenidos previamente con la técnica de azul alamar, lo que sugiere fuertemente que la caída en la medición de la actividad metabólica se debe a la presencia de un menor número de células ya que el tratamiento restringe en cierto grado la división celular.



**Figura 20.** Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la proliferación celular en la línea celular B16F10 a las 48 y 72 horas de transfección. Se normalizó al control Sin Tratamiento (ST). Promedio  $\pm$  desviación estándar, \*\* $p < 0.01$ .

## *Análisis del ciclo celular por citometría de flujo*

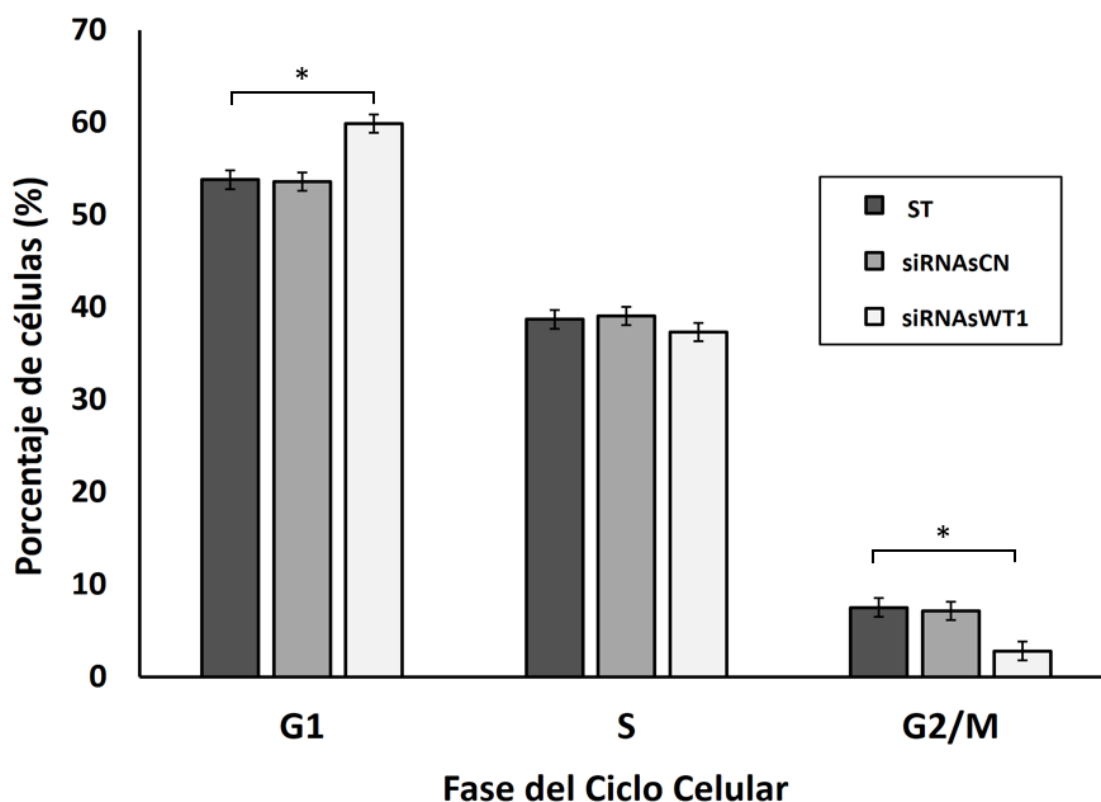
Con el objetivo de dilucidar la importancia de WT1 en la división de las células, así como medir los efectos del silenciamiento de esta proteína en la progresión del ciclo celular, se realizó un estudio del mismo por medio de citometría de flujo utilizando cuantificación del contenido de DNA en cada célula con la tinción de yoduro de propidio. Las células en cultivo se sometieron a los diferentes tratamientos, siendo teñidas y analizadas a las 72 horas obteniendo gráficas características de ciclo celular, las cuales se muestran en la figura 21, resaltando el aumento de tamaño en el primer pico correspondiente a las células en fase G1 (considerar la diferencia de escalas en el eje Y) del grupo tratado con siRNAsWT1, así como la disminución del segundo pico G2/M en comparación con los grupos de control.



**Figura 21.** Análisis del ciclo celular por citometría de flujo en la línea celular B16F10 a las 72 horas de silenciar WT1. El primer pico corresponde a las células en la fase G1, la meseta a las células en fase S y el segundo pico al final representa a las células en fase G2/M.



En la figura 22 se observan los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular con relación al grupo de tratamiento. Las células tratadas con siRNAsWT1 mostraron un aumento del 11% en la fase de G1, así como una disminución de un 63% en las fases G2/M cuando se le compara con el control ST. Este patrón indica un proceso de arresto celular en la fase G1, con una subsecuente disminución de las células en G2/M, lo que señala que al silenciar WT1 se disminuye el número de células en división activa, restringiendo su progresión por puntos de control críticos del ciclo celular. Este resultado concuerda con el experimento anterior donde obtuvimos una disminución en la capacidad de proliferación celular (Fig. 20).



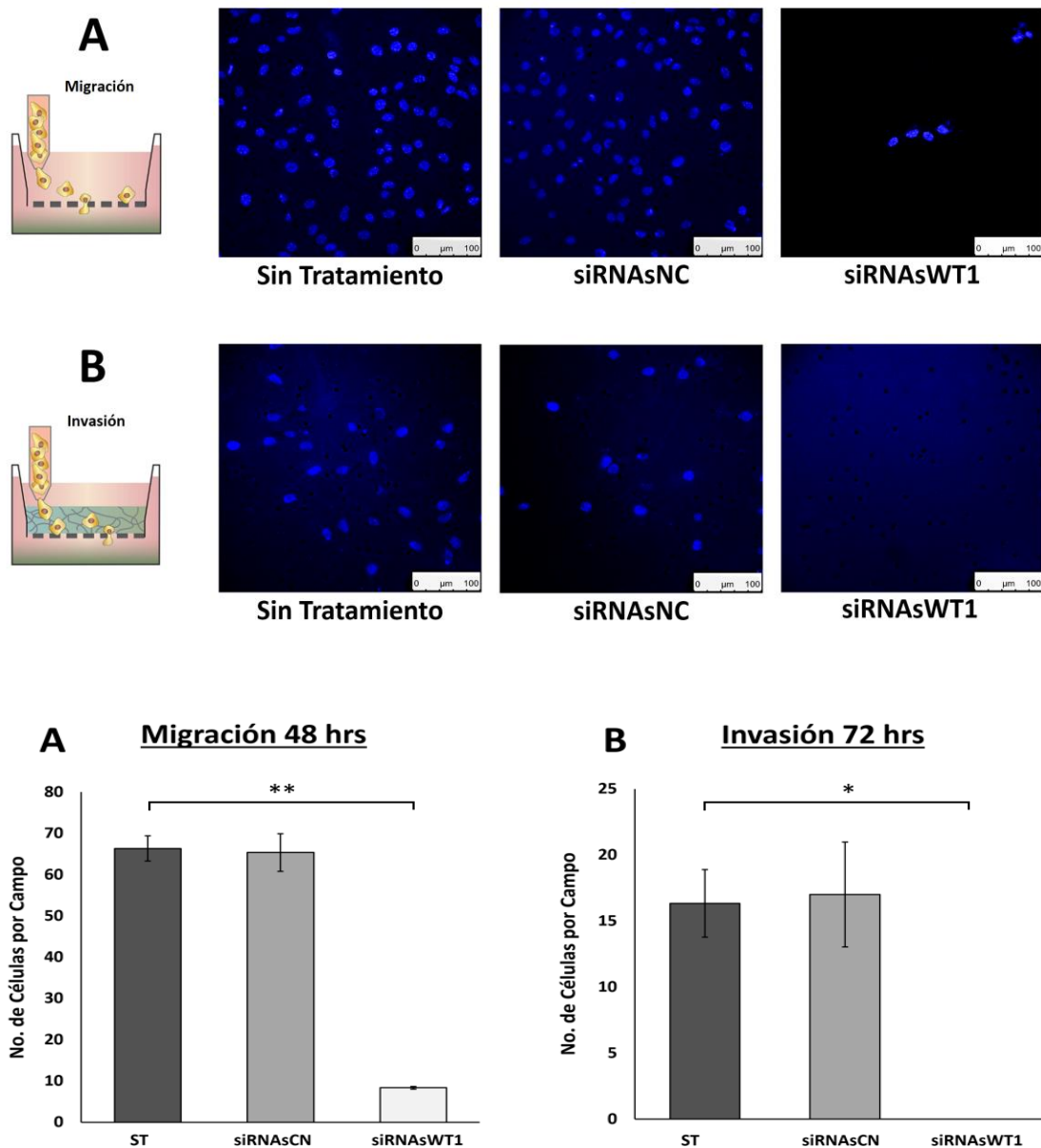
**Figura 22.** Efecto del silenciamiento de WT1 en la línea celular B16F10 sobre las fases del ciclo celular a las 72 horas de transfección. Se normalizó al control Sin Tratamiento (ST). Promedio  $\pm$  desviación estándar, \* $p < 0.05$ .

## ***Ensayos de migración e invasión***

Para conocer los efectos del silenciamiento de WT1 sobre los mecanismos implicados en el proceso de metástasis de las células, se llevó a cabo un ensayo de migración e invasión, que nos permitió evaluar directamente las capacidades de la célula para trasladarse hacia lugares con un ambiente más propicio para su crecimiento. Las células migraron estimuladas por un gradiente de nutrientes a través de una membrana fenestrada con poros de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, proceso que requiere de un movimiento activo de la célula a través de interacciones de las proteínas de adhesión celular.

En la figura 23 observamos campos representativos de cada grupo de tratamiento donde se aprecian los núcleos en azul teñidos con el fluorocromo DAPI y que corresponden a las células que pudieron migrar a través de los poros de la membrana. En el panel A se muestra un diagrama y las imágenes del experimento de migración a 48 horas, se observa que las células tratadas con siRNAs<sup>WT1</sup> perdieron en gran medida su capacidad para migrar, cruzando únicamente un 12% del número de células en comparación con el grupo control.

En el estudio de invasión (Fig. 23B) las células antes de pasar por los poros de la membrana deben atravesar una capa adicional de Matrigel que simula la matriz extracelular, siendo este proceso dependiente de la secreción de metaloproteinasas por las células. Las células fueron incubadas durante 72 horas con los siRNAs, observando un número más limitado de células que atraviesan debido a esta barrera extra, sin embargo, las células tratadas con siRNAs<sup>WT1</sup> no son capaces de atravesar el Matrigel, por lo que pierden completamente su capacidad de invasión.

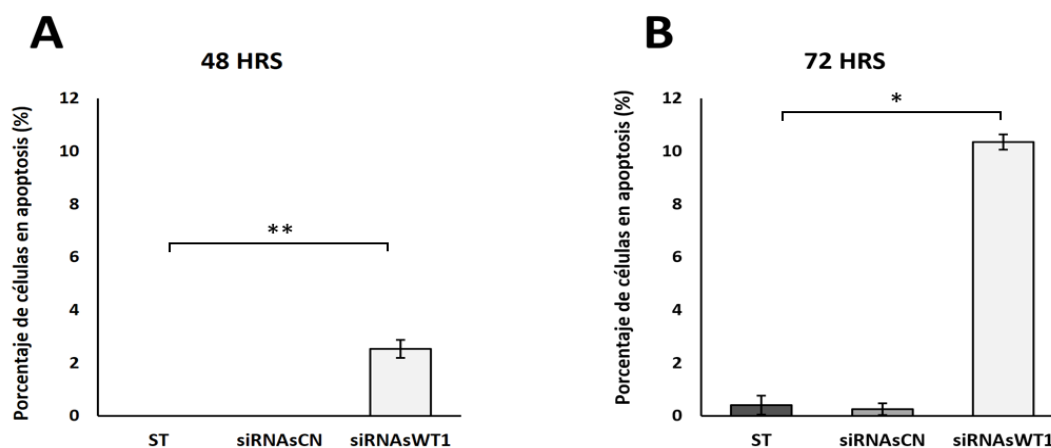


**Figura 23.** Ensayo de migración e invasión silenciando WT1 en la línea celular B16F10. Se muestran campos representativos de cada grupo de tratamiento observando los núcleos que pudieron atravesar la membrana teñidos con DAPI en azul. A) Imágenes y gráficas correspondientes al ensayo de migración e B) invasión. Las gráficas muestran el porcentaje de células de 3 experimentos considerando el promedio de 5 campos de cada uno. Se normalizó al control Sin Tratamiento (ST). Promedio  $\pm$  desviación estándar, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

## *Análisis de apoptosis por TUNEL*

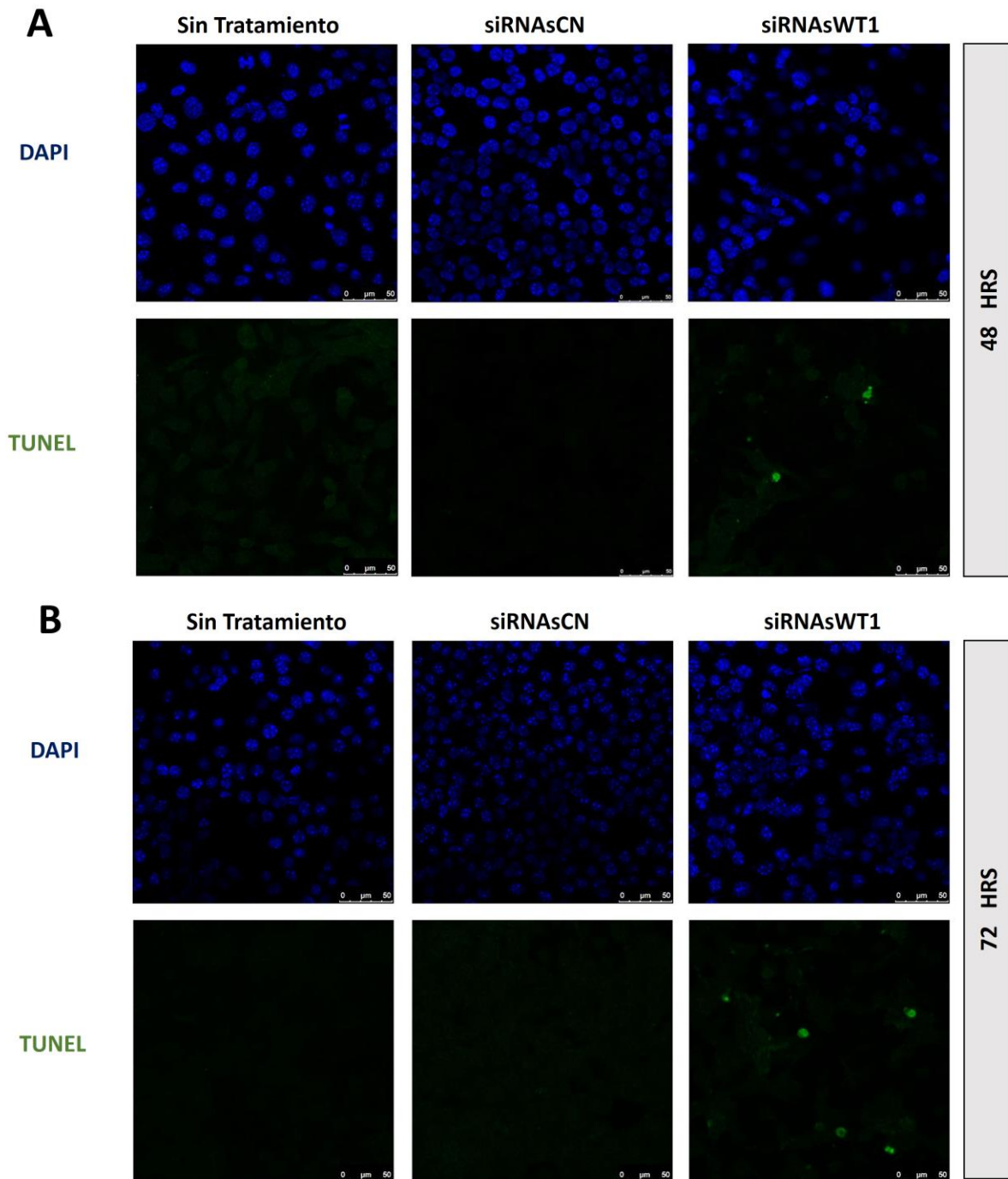
Otra característica importante de las células tumorales es la generación de mecanismos para evadir el proceso de apoptosis, mecanismo en el que WT1 también está involucrada. Debido a esto, se realizó un estudio para detectar si el silenciamiento de WT1 alteraba las propiedades de las células para activar el proceso de apoptosis.

En las imágenes de la figura 24 se aprecian campos del microscopio con los núcleos de todas las células correspondientes a los diferentes grupos teñidos con DAPI en azul, mientras que los núcleos de las células en apoptosis muestran una tinción verde. Se realizaron análisis a las 48 y 72 horas de tratamiento. En las células del grupo tratado por 48 horas con siRNAsWT1 se aprecian algunos núcleos con señal positiva para apoptosis representando el 2.5% del total de células, no encontrando núcleos positivos en los grupos de control (Fig. 24A). Posteriormente, a las 72 horas de tratamiento el número de núcleos positivos para apoptosis se incrementa a un 10% del total de células tratadas con siRNAsWT1 (Fig. 24B). Esto nos indica que el silenciamiento de WT1 promueve la activación del proceso de apoptosis.



**Figura 24.** Análisis de apoptosis por TUNEL al silenciar WT1 en la línea celular B16F10 a 48 y 72 horas. Las gráficas muestran el porcentaje de células en apoptosis de 3 experimentos considerando el promedio de 5 campos de cada uno. Se normalizó al control Sin Tratamiento (ST). Promedio  $\pm$

desviación estándar, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Se muestran imágenes de fluorescencia donde el canal azul representa los núcleos celulares teñidos con DAPI, y en el canal verde se aprecian los núcleos positivos para apoptosis.

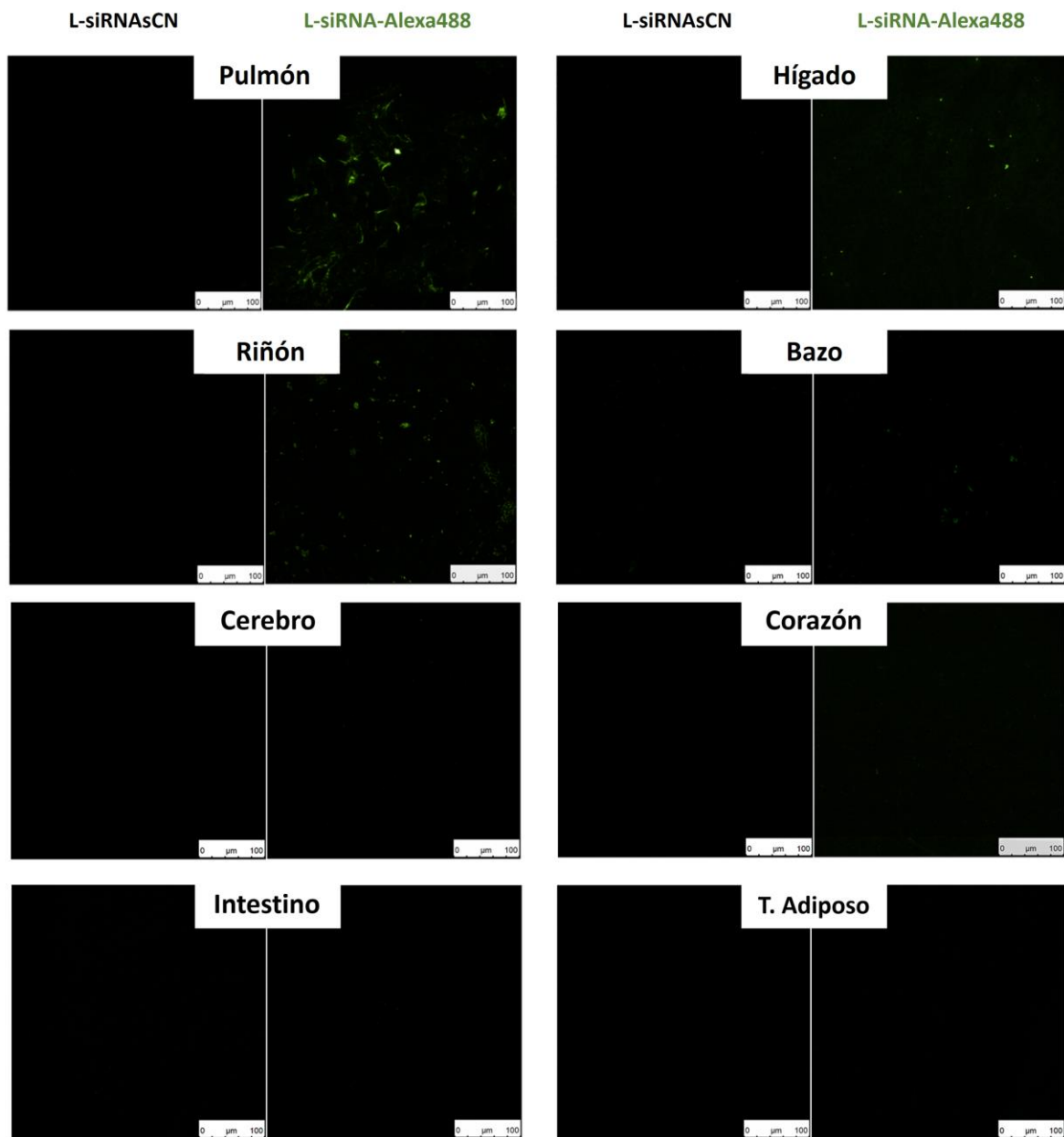


## *IN VIVO*

### *Estudio de Biodistribución*

Una vez comprobada la efectividad de los siRNAs para producir el silenciamiento de WT1 y su consiguiente disminución de las características de malignidad de la línea celular B16F10, se procedió a evaluar el potencial de biodistribución hacia diferentes órganos utilizando nuestro sistema liposomal administrado por vía respiratoria. En la figura 25 se observan campos representativos de cortes histológicos para cada órgano en el canal de Alexa 488, siendo el color verde la señal del siRNA marcado. Los campos correspondientes a cortes histológicos de órganos provenientes de ratones tratados con L-siRNAsCN no presentan señal, lo que permite descartar la presencia de fluorescencia endógena en los tejidos. Como era de esperar debido a la vía de administración, observamos que la mayor concentración de L-siRNAs se encuentra distribuida en los pulmones, así también encontramos una cantidad considerable en hígado, riñón y en menor medida en bazo, estos últimos considerados órganos de depuración sanguínea.

No fue posible detectar presencia de L-siRNAs en el resto de los órganos analizados, lo que nos indica que la mayor parte de estos se quedan atrapados en nuestro órgano blanco, el pulmón. Aun así, no se descartó la presencia de L-siRNAs en pequeñas cantidades no detectables por fluorescencia que pudieran tener un efecto en órganos distantes, por lo que en experimentos posteriores se siguió contemplando esta modalidad de tratamiento.

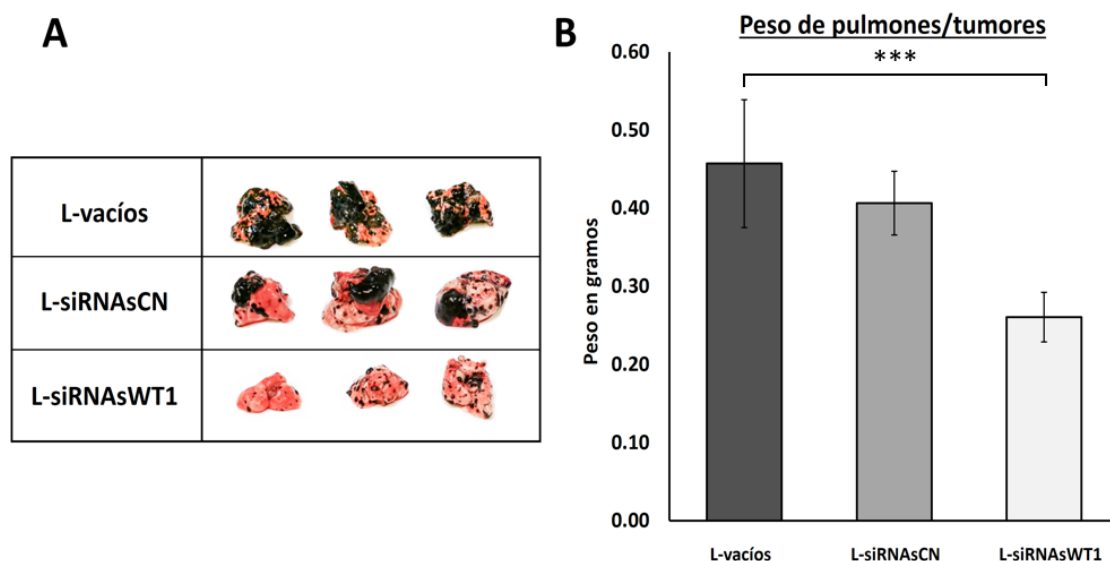


**Figura 25.** Estudio de Biodistribución. Se compara un campo del grupo con L-siRNAsCN sin marca contra los que poseen Alexa488. En verde se observa la presencia de los siRNAs liposomales en los diferentes órganos evaluados. Las barras de tamaño representan 100 μm.

### ***Tratamiento a corto plazo con L-siRNAs en el modelo de metástasis a pulmón***

Habiendo comprobado la amplia distribución de los L-siRNAs en los pulmones procedimos a realizar el experimento a corto plazo con el tratamiento nebulizado de nuestro sistema liposomal administrado por vía respiratoria, incluyendo los 2 grupos de control correspondientes a liposomas vacíos (L-vacíos) y siRNA Control Negativo (L-siRNAsCN), así como la secuencia silenciadora para WT1 (L-siRNAsWT1).

Cada grupo contó con una población de 10 ratones que fueron inoculados con la línea celular B16F10, recibieron tratamiento 2 veces por semana durante 3 semanas y concluido el esquema se sacrificaron para la extracción de los órganos. En la figura 26A se muestran fotos representativas de cada grupo de tratamiento incluyendo el paquete respiratorio (pulmones, tráquea, bronquios) extraídos a cada ratón.



**Figura 26.** Tratamiento a corto plazo por vía aérea con L-siRNAs de tumores metastásicos de melanoma en pulmón. A) Comparación del efecto de silenciamiento de WT1 en el tamaño y número de metástasis en pulmones entre grupos de tratamiento. B) Peso promedio en gramos de los pulmones/tumores considerando una n=10. Se normalizó al control de L-vacíos. Promedio  $\pm$  desviación estándar, \*\*\*p<0.001.

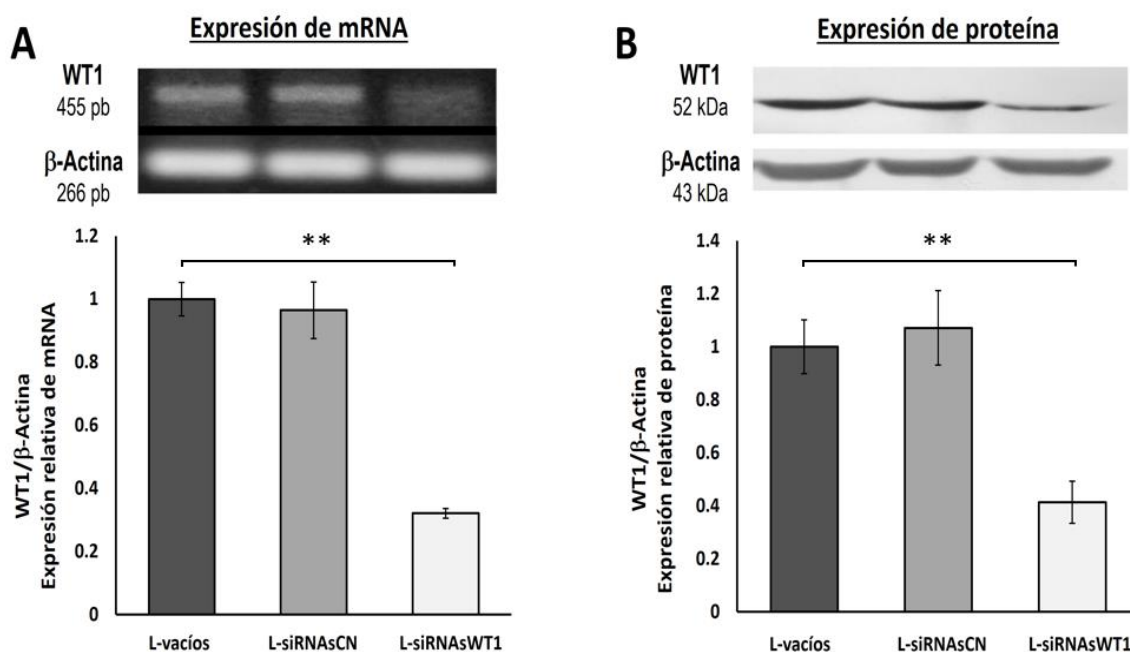


Es destacable la extensa afectación a simple vista de los pulmones en ambos grupos de control, observando la presencia de grandes nódulos tumorales oscuros y en mayor número, a diferencia del grupo que recibió los L-siRNAsWT1 donde podemos encontrar la mayor parte del tejido pulmonar respetado.

Para tener una idea de la afectación en el interior de los pulmones se procedió a pesar cada paquete respiratorio, donde una mayor extensión tumoral añadía un mayor peso. La figura 26B muestra que los grupos de control presentaban pesos similares, así también observamos que el grupo de tratamiento contra WT1 estaba afectado en menor medida por el crecimiento tumoral, presentando una disminución en su peso de hasta un 44% comparado con los controles.

Para poder atribuir este efecto antitumoral al silenciamiento de WT1 por medio de los siRNAs específicos se analizaron las muestras de tejido pulmonar cuantificando los niveles de expresión de WT1 tanto a nivel de mRNA como de proteína. En la figura 27A se muestra en la parte superior las bandas obtenidas por RT-PCR de la expresión de WT1, las cuales se normalizaron al control de  $\beta$ -actina obteniendo el nivel de expresión relativa representado en la gráfica. Ambos grupos de control presentaron niveles similares de expresión de mRNA de WT1, mientras que se observó una disminución del 68% en el grupo tratado contra WT1.

En la figura 27B observamos de igual manera en la parte superior las bandas de expresión de proteína obtenidas por Western Blot para WT1 y  $\beta$ -actina. En este caso observamos un silenciamiento a nivel de proteína WT1 del 60%, lo que nos permite corroborar que nuestro sistema de L-siRNAs contra WT1 silenció de forma efectiva esta proteína, produciendo un efecto antitumoral apreciable a simple vista en los pulmones y cuantificable por el peso de los mismos.

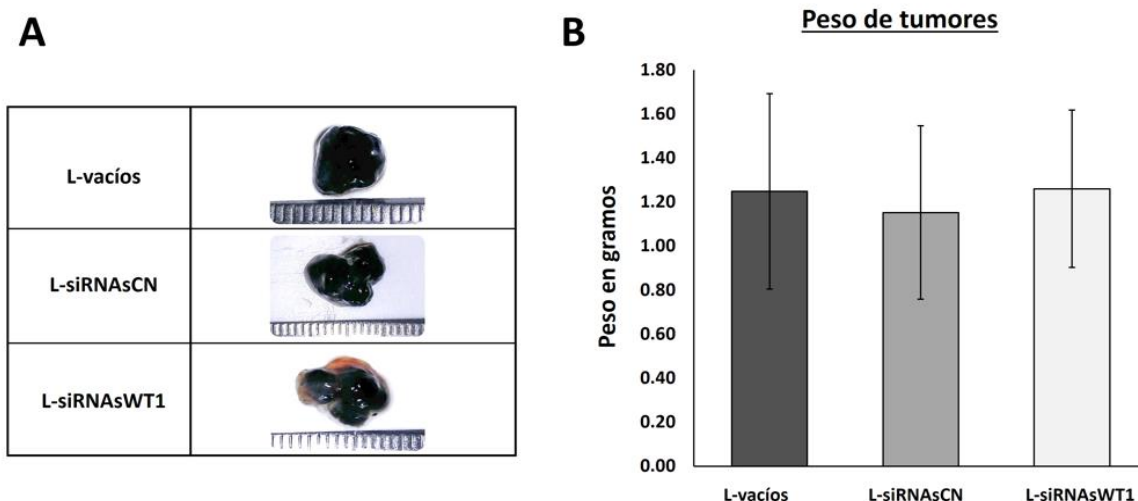


**Figura 27.** Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la expresión de mRNA y proteína en tumores metastásicos de melanoma en pulmón a corto plazo. A) Expresión de mRNA por RT-PCR y su gráfica correspondiente. B) Nivel de expresión de proteína WT1 por Western Blot en los diferentes grupos de tratamiento. Se normalizó al control de L-vacios. Promedio  $\pm$  desviación estándar, \*\* $p < 0.01$ .

### ***Tratamiento a corto plazo con L-siRNAs en el modelo de tumor subcutáneo***

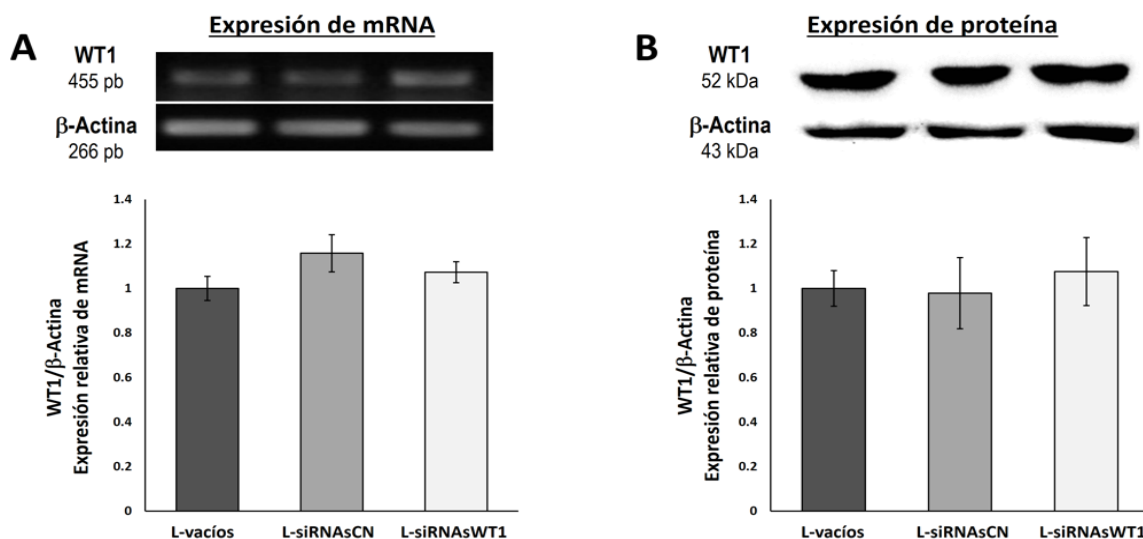
Con la intención de comprobar si los L-siRNAs administrados por nebulización podían ser absorbidos en los pulmones y llegar a sitios distantes en concentraciones suficientes para tener un efecto terapéutico, nos dimos a la tarea de diseñar un experimento inoculando ratones con la línea celular B16F10 de forma subcutánea en la región dorsal posterior, lo que produce un tumor sólido de contornos definidos y delimitado debajo de la piel. Se siguió el mismo esquema de tratamiento seguido para el modelo de metástasis pulmonar. Transcurrido el tiempo de tratamiento los ratones fueron sacrificados y los tumores y órganos extraídos para su análisis. En la figura 28A observamos tumores subcutáneos correspondientes a cada grupo de tratamiento, la apariencia variaba entre redondo a lobulado, de tamaños similares entre los diferentes grupos. Al pesar los tumores se encontró una gran variación de tamaños, pero sin

encontrar diferencias significativas entre los grupos, lo que se puede apreciar en la gráfica de la figura 28B.



**Figura 28.** Tratamiento a corto plazo por vía aérea con L-siRNAs de tumores subcutáneos de melanoma. A) Comparativa de tumores subcutáneos extraídos de cada grupo de tratamiento. B) Peso promedio en gramos de los tumores considerando una n=10. Se normalizó al control de L-vacíos. Promedio  $\pm$  desviación estándar.

De cada tumor extraído se obtuvo una muestra que fue procesada para la extracción de RNA y proteínas con el objetivo de llevar a cabo el análisis de expresión de WT1. En la figura 29A se observa que la expresión de mRNA se mantiene a niveles similares entre los diferentes grupos, al igual de lo obtenido a nivel de proteína en la figura 29B donde los niveles de expresión no presentan diferencias a pesar del tratamiento. En base a estos resultados podemos concluir que nuestro sistema L-siRNAs no está llegando al sitio de localización del tumor subcutáneo y, por lo tanto, no es posible inducir un silenciamiento del gen WT1 ni producir un efecto terapéutico en este modelo de tumor estudiado.



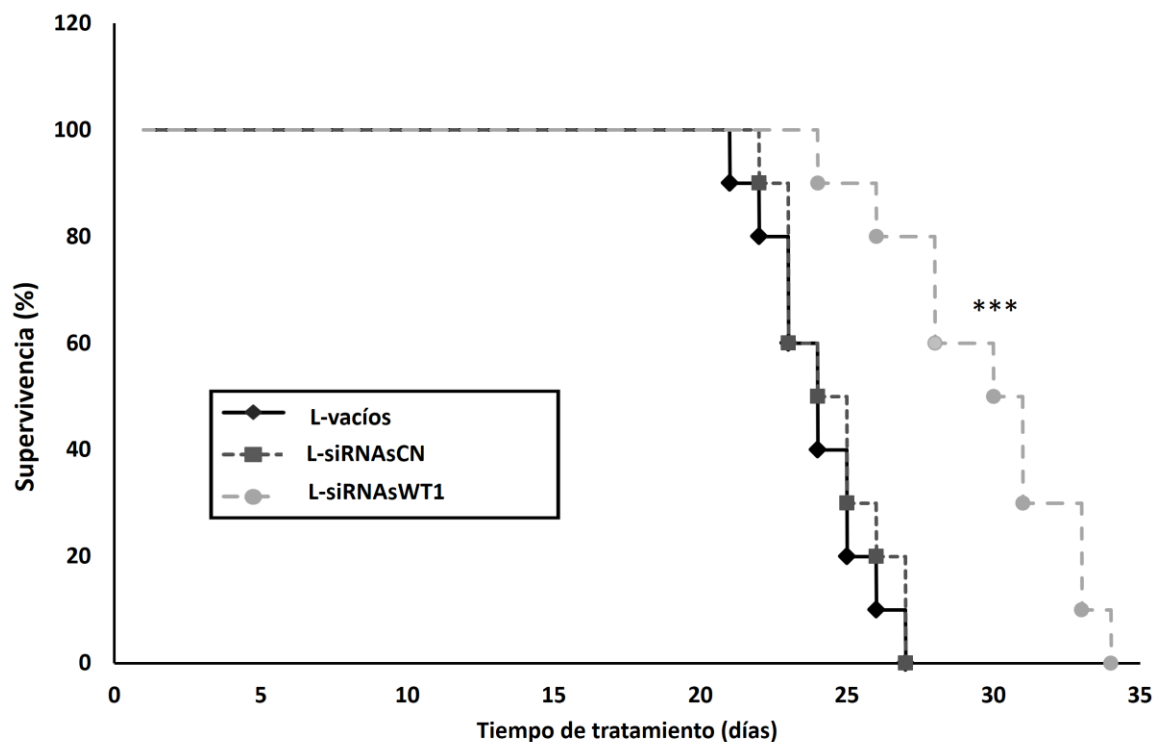
**Figura 29.** Efecto del silenciamiento de WT1 sobre la expresión de mRNA y proteína en tumores subcutáneos a corto plazo. A) Expresión de mRNA por RT-PCR y su gráfica correspondiente. B) Nivel de expresión de proteína WT1 por Western Blot en los diferentes grupos de tratamiento. Se normalizó al control de L-vacíos. Promedio  $\pm$  desviación estándar.

### *Estudio de sobrevida con tratamiento a largo plazo en el modelo de metástasis a pulmón*

El tratamiento a corto plazo con L-siRNAsWT1 tuvo un efecto antitumoral importante sobre las metástasis de melanoma pulmonar, sin embargo, al final de los experimentos aún se observaban pequeños focos tumorales. Esto nos hizo pensar que tal vez un tratamiento a largo plazo podría mejorar el efecto terapéutico, eliminando por completo los tumores y resultando en la sobrevivencia de los ratones. Para este fin ratones portando tumores metastásicos en pulmones recibieron los tratamientos utilizados previamente, sólo que por un periodo de tiempo más prolongado de hasta un máximo de 8 semanas.

La evolución de los ratones en los diferentes grupos con respecto al tiempo se presenta en una gráfica de Kaplan-Meier (Fig. 30) donde podemos observar que el comportamiento de ambos

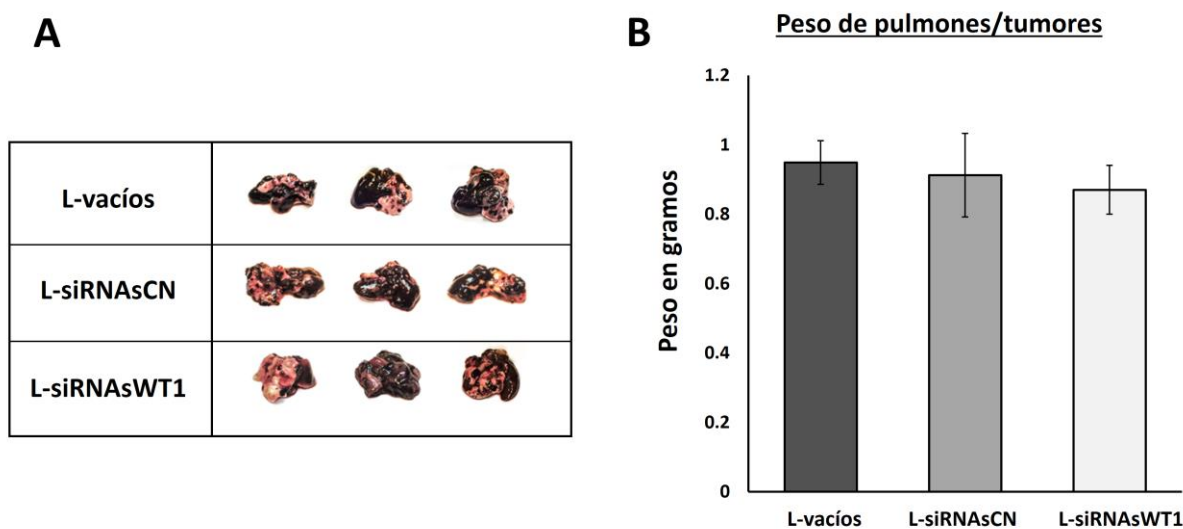
grupos control (L-vacíos y L-siRNAsCN) es muy similar. Se presentaron las primeras muertes en los días 21 y 22 postratamiento, respectivamente, y se alcanzó un 100% de mortalidad al día 27. En cambio, el grupo de tratamiento con L-siRNAsWT1 tiene un mayor espaciamiento de las muertes en relación con los grupos control, observando la primera muerte hasta el día 24 y alcanzando la mortalidad total hasta el día 34 posterior al inicio del tratamiento. El 80% de los ratones tratados con L-siRNAsWT1 seguían vivos al momento en que todos los ratones de los grupos control habían muerto (día 27), lo que indica que el tratamiento extendió en un 25% la sobrevida total de los ratones.



**Figura 30.** Estudio de sobrevida a largo plazo con tratamiento de L-siRNAs por vía respiratoria. Se muestra el porcentaje de supervivencia para cada grupo de tratamiento en relación al día de tratamiento. \*\*\* $p < 0.001$ .

A medida que los ratones eran sacrificados por presentar afectaciones clínicas de las metástasis pulmonares se les extraía el paquete respiratorio documentando el aspecto macroscópico de la

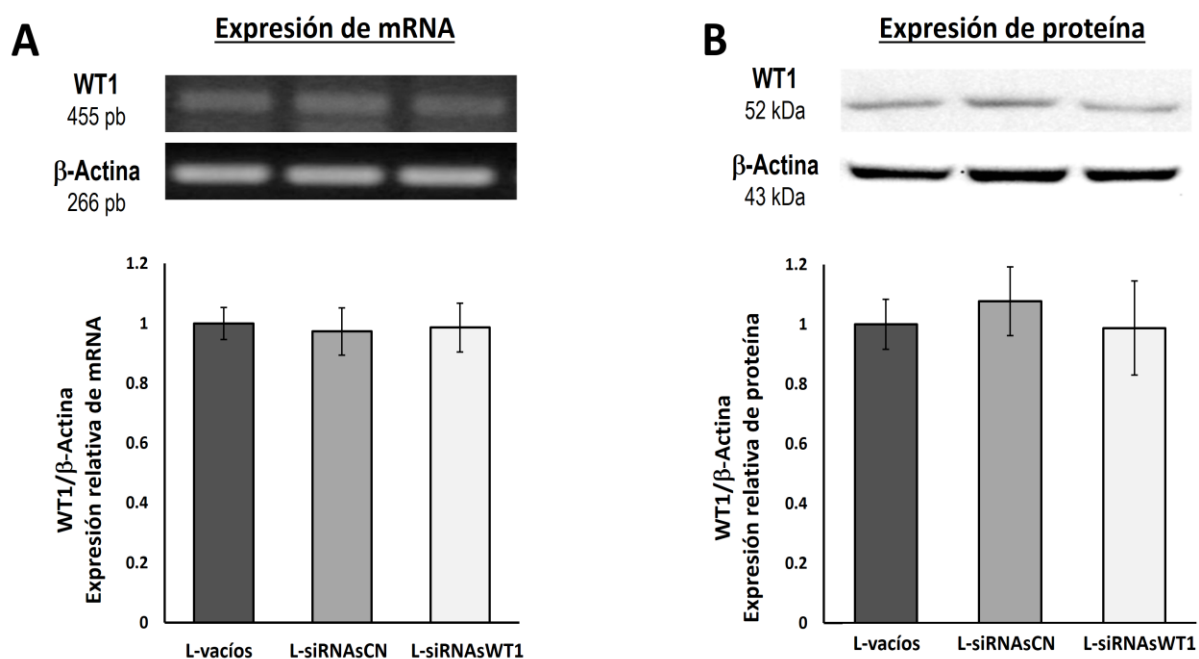
invasión tumoral, lo cual podemos observar en la Fig. 31A pulmones representativos que fueron obtenidos en cada grupo de tratamiento. En su aspecto exterior eran muy similares todos los pulmones presentando un gran número de nódulos tumorales, así como una amplia invasión del tejido sin importar el grupo de tratamiento. Una vez cuantificado el peso se corrobora que tampoco existe diferencia significativa entre los grupos (Fig. 31B). En base a estos resultados podemos asegurar que nuestro tratamiento con L-siRNAsWT1 en un esquema de largo plazo, si bien mejora la sobrevivencia de los ratones tratados, al momento en que los ratones mueren todos presentan grados similares de afectación, aunque el grupo de tratado contra WT1 tarda más en llegar a ese estado.



**Figura 31.** Tratamiento a largo plazo por vía aérea con L-siRNAs de tumores metastásicos de melanoma en pulmón. A) Comparativa de las características externas de los pulmones al momento en que fueron sacrificados los ratones. B) Peso promedio en gramos de los pulmones/tumores con una n=10. Se normalizó al control de L-vacíos. Promedio  $\pm$  desviación estándar.

En los pulmones con tumores metastásicos se evaluaron los niveles de expresión de WT1, tanto a nivel de mRNA como de proteína. En la parte superior de la Fig. 32A se muestran los

amplicones de un RT-PCR representativo mostrando la expresión del mRNA de WT1. Se observa que no existe una diferencia apreciable entre los 3 diferentes grupos de tratamiento y al comparar la gráfica correspondiente al análisis densitométrico se comprueba que no hay una diferencia significativa entre los grupos. El mismo comportamiento se observa al comparar la expresión a nivel de proteína de WT1 en la Fig. 32B, donde no es posible detectar diferencias significativas entre los diferentes grupos.



**Figura 32.** Efecto del tratamiento a largo plazo con L-siRNAs inhalados sobre la expresión de mRNA y proteína de WT1 en tumores metastásicos de melanoma a pulmón. A) Expresión de mRNA por RT-PCR y su gráfica correspondiente. B) Expresión de la proteína WT1 por Western Blot. Se normalizó al control de L-vacíos. Promedio  $\pm$  desviación estándar.

## DISCUSIÓN

El cáncer representa uno de los principales problemas de salud pública y una de las principales causas de muerte en todo el mundo debido, en la mayoría de los casos, a la falta de terapias efectivas para combatirlo. Las terapias convencionales, incluidas la cirugía, la quimio y la radioterapia, en pocas ocasiones permiten eliminar el tumor o detener el proceso de metástasis. Entre los principales órganos afectados por los procesos neoplásicos se encuentra el pulmón, siendo uno de los sitios donde se originan tumores altamente letales y el segundo sitio en frecuencia de afectación por metástasis (54). En este trabajo nos enfocamos en un modelo murino de metástasis de melanoma en pulmón dada la importancia de este órgano como uno de los blancos más atractivos para las células metastásicas, debido a su gran disposición de espacio, amplia irrigación sanguínea y acceso a nutrientes, así como una elevada oxigenación, características que lo hacen un sitio propicio para el desarrollo de tumores.

Una de las propiedades que nos permiten diferenciar a las células tumorales de las células sanas es la presencia de ciertos marcadores tumorales específicos, tales como oncogenes y genes supresores de tumores. Algunos de estos marcadores pueden ser manipulados con las herramientas moleculares adecuadas con la intención de debilitar a los tumores y hacerlos más susceptibles de ser identificados por el sistema inmune o reactivar mecanismos de control del ciclo celular y/o apoptosis. En este sentido es de nuestro interés la modulación de la expresión del oncogén WT1 debido a que ha mostrado ser un blanco terapéutico bastante promisorio, ya que se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer humano, entre los que destaca su papel en la transformación de los melanocitos normales a células de melanoma (55) (56) (57). En muchos de estos casos WT1 actúa como un oncogén por su efecto sobre la angiogénesis, progresión del ciclo celular y escape de apoptosis (58).

El mecanismo de RNA de interferencia por medio de la administración de siRNAs se encuentra entre las principales herramientas disponibles para modular los niveles de expresión de alguna



proteína de interés. Ofrece la posibilidad de silenciar la expresión de un gen degradando su mRNA o bloqueando su traducción, evitando así la producción de la proteína final.

A nivel de experimentación, tanto *in vitro* como *in vivo*, numerosos trabajos han demostrado la eficacia de utilizar siRNAs como tratamiento contra diversos tipos de cáncer por medio del silenciamiento de oncogenes. Los esfuerzos se han enfocado en distintos blancos, por ejemplo: atacando el proceso de angiogénesis (59), inhibiendo los mecanismos de metástasis (60) o apoptosis (61) e incluso inhibiendo proteínas virales en algunos tipos de cáncer inducidos por virus (62).

En la mayoría de estos trabajos la vía de administración empleada no representa una opción viable al momento de querer extrapolar los tratamientos hacia el ámbito clínico, ya que se administran siRNAs desnudos de manera intratumoral lo cual no es aplicable a la práctica clínica debido a que no todos los tumores son de fácil acceso. Para la opción de una administración sistémica es necesario utilizar un vehículo que proteja los siRNAs para ser inyectados en el torrente sanguíneo y evitar su degradación por nucleasas y su posterior excreción por la orina. En todo el mundo se han probado diferentes entidades químicas y biológicas buscando que protejan a los siRNAs, sin embargo, la mayoría en alguna medida presentan desventajas tales como la inducción de tolerancia en cápsulas virales debido a activación de respuesta inmune (63), el riesgo de integración genómica en plásmidos (64), la toxicidad celular ocasionada por el uso de partículas con carga electrostática (53) o la citotoxicidad derivada del uso de liposomas catiónicos (65).

Para superar las limitaciones impuestas por la aparición de efectos tóxicos derivados de la utilización de los vehículos antes mencionados, nuestro grupo de trabajo diseñó y caracterizó un sistema de biodistribución de siRNAs encapsulados en liposomas neutros. Dicho sistema tiene la ventaja de permitir una alta eficiencia de encapsulamiento de siRNAs presentando una muy baja o nula toxicidad celular *in vivo*. Al ser administrados por vía intravenosa los liposomas neutros viajan por el torrente sanguíneo siendo capaces de atravesar las membranas capilares por su pequeño tamaño (menor a 1  $\mu\text{m}$ ) distribuyéndose eficientemente de forma

sistémica, y aún en mayor concentración dentro de los tumores al aprovechar el flujo turbulento ocasionado por la vasculatura caótica en su interior para liberarse de forma efectiva en el tejido afectado y fusionarse con las membranas plasmáticas, liberando así las moléculas de siRNA dentro del citoplasma celular donde inducirán un silenciamiento del oncogén blanco (51).

Una de las principales aportaciones de nuestro trabajo fue validar la eficacia del sistema L-siRNAs como terapia administrada por vía respiratoria para tratar tumores alojados en pulmón, resultando que son fáciles de administrar, no tóxicos, de bajo costo y muy efectivos para entregar siRNAs al sitio de lesión primaria en los pulmones. Utilizando esta metodología se logró el objetivo de silenciar el oncogén WT1, el cual se encuentra sobreexpresado en nuestro modelo murino de metástasis de melanoma en pulmón, de esta forma se disminuyó el fenotipo de malignidad, obteniendo un marcado efecto terapéutico.

En primera instancia evaluamos la eficacia del silenciamiento de WT1 *in vitro* por medio de siRNAs en la línea celular B16F10 de melanoma murino. Se obtuvieron inhibiciones en la expresión a nivel mRNA del 69% y a nivel proteína del 86% luego de 72 horas de tratamiento. Estos resultados son superiores a los alcanzados por Zapata-Benavides en un modelo similar utilizando plásmidos que codifican shRNAs contra WT1 (66). Como resultado del silenciamiento de WT1 en nuestros experimentos la viabilidad de las células presentó una disminución de aproximadamente 50%, que es similar a la alcanzada por los shRNAs. Aunque en el caso de Zapata consiguen una mayor citotoxicidad de hasta el 90% al combinar su tratamiento con agentes quimioterapéuticos, lo que sugiere fuertemente que, de requerirse, nuestro sistema pudiera ser mejorado al utilizar terapias concomitantes.

Resultados similares fueron obtenidos en un estudio realizado por Graziano (67) al silenciar por medio de siRNAs la proteína WT1 en la línea MG-63 de osteosarcoma humano. Respecto a la proliferación celular, ellos obtuvieron una disminución máxima del 44% con el tratamiento, de manera similar a lo observado en nuestros resultados, del 49% de inhibición. Además, cuando analizamos el efecto del silenciamiento de WT1 sobre el ciclo celular encontramos una disminución en el número de células en división activa, presentándose un

arresto en la fase G1, similar a lo reportado anteriormente por Kudoh y colaboradores (68). Este efecto correlaciona bien con lo reportado por Graziano y cols., donde observaron alteraciones en el patrón de expresión de proteínas implicadas en el ciclo celular, como ciclina E, ciclina D1, Retinoblastoma, p27 y p53 (69), que están implicadas en la progresión G1/S del ciclo. Por otro lado, y con respecto al efecto del silenciamiento de WT1 en la apoptosis, ellos encontraron cambios discretos en la relación Bax/Bcl2 y los niveles de procaspasa3, inductores de apoptosis, tras el tratamiento. En concordancia, nosotros encontramos un aumento de solamente un 10% en apoptosis en las células silenciadas y concluimos que el principal mecanismo antitumoral se atribuye al efecto citostático del ciclo celular con solo una pequeña participación de la apoptosis. Cabe resaltar que en el caso del citado estudio utilizan concentraciones de 10 a 100 veces mayores de siRNAs que las nuestras para lograr dicho efecto, sin embargo, debemos considerar también que se utilizó una secuencia anti-WT1 distinta y una línea celular diferente a la empleada por nosotros.

Adicionalmente evaluamos el efecto de utilizar siRNAs<sup>WT1</sup> sobre la migración e invasión celulares, obteniendo resultados bastante promisorios de un 88% de inhibición en la migración y un 100% en la invasión celular. Estudios del efecto del silenciamiento de WT1 en estos mecanismos por microRNAs en células de cáncer de pulmón obtuvieron resultados similares (70). Estos datos sugieren que el silenciamiento terapéutico de WT1 en tumores de grado avanzado que no han llegado a presentar metástasis podría evitar por completo el proceso y facilitar el tratamiento del paciente mejorando así su pronóstico.

Al contrastar nuestros resultados con la literatura disponible, obtuvimos de manera general un panorama bastante completo de los efectos del silenciamiento de WT1 *in vitro* sobre la línea celular estudiada, delimitando así los mecanismos relacionados al desarrollo del fenotipo de malignidad y mal pronóstico.

Considerando que el pulmón es el segundo órgano con mayor frecuencia de afectación por procesos tumorales, sólo por debajo del cerebro, se pensó en una posible aplicación futura de la terapia con siRNAs liposomales (L-siRNAs) a pacientes con afectación pulmonar. Para esto,

nos dimos a la labor de diseñar un sistema de administración de siRNAs encapsulados en liposomas neutros que no fuera invasiva y que fuera fácil de aplicar, eventualmente incluso por parte del mismo paciente, así que decidimos analizar la vía de administración respiratoria. Aplicar L-siRNAs nebulizados por esta vía promete ser una alternativa sumamente cómoda a los tratamientos actualmente ofrecidos, ya que puede ser realizada en cualquier domicilio a un bajo costo, evitando incomodidades a pacientes ya afectados por altos niveles de estrés físico y mental.

Existen algunos antecedentes de la administración de siRNAs por vía respiratoria, la mayoría de ellos obteniendo modestos resultados de silenciamiento para diversos padecimientos pulmonares al aplicar siRNA desnudos (71). Un estudio reciente evaluó un método de inhalación de un polvo de siRNAs desnudos acoplados a l-leucina como forma de mantener la integridad de la molécula sin necesidad de un vehículo externo, pero únicamente se evaluó con perfiles calorimétricos (72). Nuestro trabajo permite resolver en gran medida la necesidad de proteger completamente a los siRNAs dentro de los liposomas, evitando su contacto con el medio extracelular y entregándolos directamente al citoplasma de las células donde llevan a cabo su función.

Para comprobar la eficacia de nuestro sistema de administración por vía respiratoria y que los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* fueran extrapolables como tratamiento en animales, se estableció un modelo murino de metástasis pulmonar de melanoma, así como una variante de tumor subcutáneo con la intención de evaluar si nuestros L-siRNAs podían ser absorbidos por la vasculatura pulmonar y lograban producir su efecto a distancia. Con la experiencia de trabajos previamente realizados por nuestro grupo de laboratorio se elaboraron L-siRNAs liofilizados (51) los cuales podían ser reconstituidos en agua inyectable al momento de administrarse las dosis.

Como un primer paso en el modelo *in vivo*, se evaluó la biodistribución de los L-siRNAs administrados por vía respiratoria. Observamos una gran cantidad de siRNAs distribuidos ampliamente por el tejido pulmonar, lo cual era lo ideal para nuestros propósitos. Así también,

se encontró presencia de siRNAs en hígado, bazo y riñón, que son órganos de depuración sanguínea, pero no fue posible detectar presencia de siRNAs en el resto de órganos estudiados. Debido a la naturaleza lipofílica de los liposomas éstos se fusionan con las primeras capas de células de tejido pulmonar, sin embargo, liposomas multilamelares son capaces de atravesar epitelios y alcanzar la vasculatura para terminar siendo distribuidos por el torrente sanguíneo a otros tejidos y órganos.

Habiendo comprobado que los L-siRNAs llegaban en grandes concentraciones a los pulmones, se llevaron a cabo los experimentos con los diferentes tratamientos inhalados durante 3 semanas. Los ratones tratados con siRNAs contra WT1 mostraron escasos o nulos síntomas de afectación pulmonar durante la duración del tratamiento, a diferencia de los ratones en los grupos control en los cuales se apreciaba agitación y disminución de la actividad física. Al ser sacrificados pudimos percatarnos que los ratones tratados con siRNAsWT1 presentaban un menor número de nódulos tumorales, así como menor tamaño de los mismos, observando extensas áreas de tejido sano. De esta manera comprobamos la eficacia de nuestro sistema L-siRNAs como tratamiento de tumores pulmonares por medio del silenciamiento efectivo de oncogenes consiguiendo un marcado efecto terapéutico. Es de considerar que a pesar de los favorables resultados obtenidos no se lograron eliminar completamente las metástasis en los pulmones con el número de dosis administradas, por lo que fue necesario diseñar un experimento con un esquema de tratamiento prolongado.

En cuanto al modelo de ratones con tumores subcutáneos, es de resaltar que este estudio se diseñó para comprobar si pequeñas cantidades de L-siRNAs administrados por vía respiratoria, pudieran alcanzar órganos distantes y fueran capaces de producir un efecto terapéutico a pesar de no ser detectables con los métodos de imagen debido a su ínfima concentración. Es importante mencionar que los siRNAs suelen tener un potente efecto de silenciamiento y que solo son necesarias unas pocas moléculas por célula para inducir su efecto. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el tamaño ni el peso de los tumores entre los grupos experimentales. Tampoco pudo apreciarse un silenciamiento efectivo de WT1 a nivel de mRNA o proteína. Este resultado concuerda con lo observado en el estudio de biodistribución donde no fue

posible detectar siRNAs en la mayoría de los órganos distantes, siendo así menos factible su presencia en sitios tan distante como lo es el tejido subcutáneo.

Después de comprobar la eficacia terapéutica de la administración respiratoria de L-siRNAsWT1 en los modelos de metástasis pulmonares nos propusimos resolver la interrogante de si prolongando el tratamiento durante más tiempo se podría conseguirse un efecto terapéutico aún más pronunciado, o incluso la remisión total del tumor. Para lo cual se llevó a cabo un estudio de sobrevivencia que consistió en repetir las condiciones y dosis del experimento previo, sólo que el tratamiento se mantendría hasta un máximo de 8 semanas, o hasta que los ratones tuvieran que ser sacrificados por presentar síntomas de afectación pulmonar. Efectivamente los resultados mostraron una importante mejoría en la sobrevida al encontrarse un 80% de los ratones tratados con L-siRNAsWT1 aún con vida al momento en que ya habían muerto todos los ratones de los grupos controles. Este grupo sobrevivió hasta el día 34 después de iniciado el tratamiento, en contraste con los grupos control donde para el día 27 ya habían fallecido todos los animales. Al momento de la muerte de los ratones se concluyó que no existían diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en cuanto al grado de afectación de los pulmones, número, tamaño y peso de los nódulos tumorales, así como tampoco existió diferencia al comparar los niveles de expresión de WT1.

Si bien observamos que el tratamiento con L-siRNAsWT1 mejora la sobrevida y mejora el estado de salud de los ratones, no resultó ser suficiente para limitar el crecimiento de los nódulos tumorales por sí sólo, debido a que el principal efecto del silenciamiento de WT1 en este tipo de tumor es la ralentización del ciclo celular, tal y como se demostró en los estudios *in vitro*. Es plausible sugerir que otros mecanismos a nivel local pudieran estar afectando la correcta distribución de los L-siRNAs, como pudiera ser la formación de fibrosis consecuente a la invasión tumoral del tejido, procesos inflamatorios que engrosarían los espacios intersticiales obstaculizando la libre difusión de los liposomas o incluso la progresiva disminución del volumen tidal de los pulmones afectados por los tumores lo que limitaría la dosis absorbida, siendo la consecuencia de cualquiera de estos escenarios una restricción en la captación de los L-siRNAs por las células.

En modelos similares a nuestro trabajo, Zapata-Benavides, *et al.* (53) (73) administró complejos de un polímero catiónico PEI con un plásmido que codifica para un shRNA anti-WT1 por vía respiratoria 2 veces por semana por un periodo de 27 días. Ellos observaron que el grupo de ratones tratado con el plásmido codificante para el shRNA anti-WT1 presentan una disminución tanto en el tamaño y como en el peso de los tumores pulmonares. Si bien es un resultado que denota la eficacia del silenciamiento de WT1 como método terapéutico en las metástasis de melanoma, encontramos varios puntos donde nuestro trabajo procura resolver ciertas limitaciones, como lo es el uso de liposomas neutros para evitar la toxicidad de los polímeros catiónicos. Además, el empleo de siRNAs es también una mejor opción ya que la duración del efecto de las moléculas puede ser regulada al momento de administrar la terapia por presentar un efecto transitorio, a diferencia del uso de plásmidos shRNA que carecen de una regulación de su expresión y de potenciales eventos de integración al genoma celular, pudiendo producir daños o mutaciones. Así mismo nuestros objetivos fueron dilucidar de una manera más completa los mecanismos a través de los cuales puede explicarse el efecto antitumoral y terapéutico observado, evaluar el efecto de los silenciamientos sobre diversos mecanismos de malignidad, en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. De igual manera evaluar la biodistribución de los L-siRNAs, su eficacia a nivel local y distante del sitio de absorción y contrastar la terapia a corto y largo plazo con su correspondiente estudio de sobrevida.

El presente trabajo ofrece una visión más amplia de los diferentes mecanismos que intervienen en el proceso de malignidad de la línea celular B16F10 de melanoma murino dependientes de WT1 en comparación con lo actualmente reportado por diversos grupos de investigación, al describir los efectos del silenciamiento y cuantificar los niveles de expresión tanto de mRNA como de proteína WT1, viabilidad, proliferación, ciclo celular, apoptosis, migración e invasión. También proponemos una opción de administración nueva que es viable, segura, cómoda y de bajo costo para la distribución de siRNAs por medio de liposomas neutros, describiendo su biodistribución, sus alcances y limitaciones, así como los efectos terapéuticos de los tratamientos a corto y largo plazo en modelos de cáncer murino.

Entre las principales consideraciones se puede mencionar que existe fuerte evidencia de que la eficacia de nuestro tratamiento pudiera verse ampliamente mejorada con la utilización de terapias conjuntas. Es probable que debido a la sensibilización de las células tumorales al silenciar su oncogén de dependencia podrían usarse dosis de quimio o radioterapias mucho menores, con la consiguiente disminución de muchos de los efectos secundarios que estos acarrearán, mejorando enormemente la calidad de vida de los pacientes y, posiblemente, lograr una remisión completa de los tumores. Además, la aplicación terapéutica de los L-siRNAs nebulizados no se limita al tratamiento de cáncer alojado en pulmón, también puede ser utilizado para controlar expresión de factores inflamatorios en neumonías, mejorar el estado de salud en enfermedades hereditarias e incluso prevenir la diseminación de algún virus silenciando proteínas esenciales para su replicación.



## CONCLUSIONES

1. La administración de siRNAs contra WT1 en la línea celular B16F10 induce un silenciamiento significativo a nivel de mRNA y proteína.
2. El silenciamiento de WT1 *in vitro* disminuye la proliferación, migración e invasión de las células B16F10, induce un ligero aumento en la apoptosis, así como un arresto celular en la fase G1 y una disminución en la fase de G2/M.
3. Los L-siRNAs al ser administrados de forma inhalada tienen una amplia biodistribución en pulmón, siendo detectables en menor medida en hígado, riñón y bazo.
4. El tratamiento durante 2 semanas con L-siRNAsWT1 produce un potente efecto antitumoral asociado al silenciamiento efectivo del gen WT1.
5. La administración inhalada de L-siRNAs no tuvo un efecto terapéutico en tumores subcutáneos distales.
6. El tratamiento con L-siRNAsWT1 a largo plazo retrasa, pero no detiene el crecimiento tumoral.
7. El sistema de siRNAs liposomales administrados por vía respiratoria son una nueva opción en el tratamiento de patologías pulmonares relacionadas a la sobreexpresión de genes.

## PERSPECTIVAS

Se sugiere el uso de nuestro sistema de L-siRNAs en combinación con agentes quimioterapéuticos para potenciar los resultados obtenidos, en base a la evidencia que señala que el silenciamiento de un oncogén del cual es dependiente un tipo específico de cáncer lo sensibiliza contra una terapia adicional. La combinación de ambos tratamientos traería el beneficio añadido de requerir dosis menores de quimioterapia a las que se utilizan comúnmente, disminuyendo los nocivos efectos secundarios y brindando una mejor calidad de vida al paciente.

Es de resaltar que la administración respiratoria de L-siRNAs no se limita únicamente para el tratamiento del cáncer, pudiendo ser utilizado para silenciar proteínas derivadas de trastornos genéticos, inhibir la replicación de virus o bacterias, e inclusive podrían modular la expresión de hormonas o agentes proinflamatorios.

## REFERENCIAS

1. *Tracing the cellular origin of cancer.* **Blanpain, Cédric.** 2013, Nature Cell Biology, pp. Vol.15, No. 2.
2. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation.* **Douglas Hanahan, and Robert A. Weinberg.** 2011, Cell, pp. 646-674.
3. *Hereditary Cancer Predisposition Syndromes.* **Offit, Judy E. Garber and Kenneth.** 2005, Journal of Clinical Oncology, pp. 276-292.
4. *Management of Early Stage Cervical Cancer.* **Somashekhar SP, Ashwin KR.** 2015, Reviews on Recent Clinical Trials, pp. 302-8.
5. *Tumor, metastasis and what's in between.* **Grinshpun A, Ben-Porath I, Peretz T, Salmon A.** 2013, Harefuah, pp. 152(1):30-3, 59, 58.
6. *Biology of cancer metastasis.* **Robert, Jacques.** 2013, Bulletin du Cancer, pp. 333-342.
7. *Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis.* **Ma Li, Weinberg RA.** 2008, Trends in Genetics, pp. 448-456.
8. *Aspectos moleculares y celulares de la metastasis cancerosa.* **F. Arvelo, Marie-France Poupon.** 2001, Acta Científica Venezolana, pp. 304-312.
9. *Primary tumor regulates the pulmonary microenvironment in melanoma carcinoma model and facilitates lung metastasis.* **Mingyong Han, Jiying Xu, Yuli Bi, Man Jiang, Xiaoya Xu, Qi Liu, Jihui Jia.** 2012, J Cancer Res Clin Oncol, pp. 57-65.
10. *Circulating tumor cells.* **Williams, Sarah C. P.** 2013, PNAS, p. 4861.
11. *Psycho-educational interventions for melanoma survivors: a systematic review.* **Jordana McLoone, Scott Menzies, Bettina Meiser, Graham J. Mann, Nadine A. Kasparian.** 2012, Psycho-Oncology.
12. *The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation.* **Wagner N, Panelos J, Massi D, Wagner KD.** 2008, Pflugers Arch, pp. 839-847.

13. *The Fitzpatrick skin type scale: a reliability and validity study in women undergoing radiation therapy for breast cancer.* **Fasugba O, Gardner A, Smyth W.** 2014, *Journal of Wound Care*, pp. 358-364.
14. *Monitoring the process of pulmonary melanoma metastasis using large area and label-free nonlinear optical microscopy.* **Daozhu Hua, Shuhong Qi, Hui Li, Zhihong Zhang, Ling Fu.** 2012, *Journal of Biomedical Optics* 17.
15. *The Evolution of Melanoma Diagnosis: 25 Years Beyond the ABCDs.* **Rigel DS, Russak J, Friedman R.** 2010, *CA Cancer J Clin*, pp. 301-16.
16. *Galangin inhibits tumour growth and metastasis of B16F10 melanoma.* **Wenjing Zhang, Bo Tang, Qilai Huang, Zichun Hua.** 2012, *Journal of Cellular Biochemistry*.
17. *The Role of Genomic Profiling in Advanced Breast Cancer: The Two Faces of Janus.* **Y, Eralp.** 2016, *Translational Oncogenomics*, pp. 1-7.
18. *Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance.* **Gonzalez de Castro D, Clarke PA, Al-Lazikani B, Workman P.** 2013, *Clin Pharmacol Ther*, pp. 252-9.
19. *Personalized Cancer Medicine: Molecular Diagnostics, Predictive biomarkers, and Drug Resistance.* **D Gonzalez de Castro, PA Clarke, B Al-Lazikani and P Workman.** 2013, *Clinical pharmacology & Therapeutics*, pp. 252-59.
20. *WT1 proteins: functions in growth and differentiation.* **Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG.** 2001, *Gene*, pp. 141-61.
21. *Wilms Tumor and the WT1 Gene.* **Sean Bong Lee, Daniel A. Haber.** 2001, *Experimental Cell Research*, pp. 74-99.
22. *The development of Wilms tumor: From WT1 and microRNA to animal models.* **Fang Tian, Gregory Yourek, Xiaolei Shi, Yili Yang.** 2014, *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 180-187.
23. *Wilms Tumor.* **Davidoff, Andrew M.** 2012, *Advances in Pediatrics*, pp. 247-67.
24. *WT1 and kidney progenitor cells.* **Kreidberg, Jordan A.** 2010, *Organogenesis*, pp. 61-70.
25. *The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction.* **Wagner, K. D., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H. and Scholz, H.** 2002, *FASEB J*, pp. 1117-1119.

26. *WT1-AS promotes cell apoptosis in hepatocellular carcinoma through down-regulating of WT1.* **Long Lv1, Gong Chen, Jianping Zhou, Jun Li and Jianping Gong.** 2015, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, p. 34:119.
27. *Life, Sex, and WT1 Isoforms - Three Amino Acids Can Make All the Difference.* **Hastie, Nicholas D.** 2001, Cell, pp. 391-394.
28. *Different isoforms of the Wilms' tumour protein WT1 have distinct patterns of distribution and trafficking within the nucleus.* **J. R. Dutton, D. Lahiri and A. Ward.** 2006, Cell Proliferation, pp. 519-535.
29. *Prevalence and clinical characteristics of N-terminally truncated WT1 expression in acute myeloid leukemia.* **Yuichi Ishikawa, Hitoshi Kiyoi, Tomoki Naoe.** 2011, Leukemia Research, pp. 685-688.
30. *The complex life of WT1.* **Wagner KD, Wagner N, Schedl A.** 2003, J Cell Sci, pp. 1653-8.
31. *A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system.* **Nicole Wagner, Kay-Dietrich Wagner, Annette Hammes, Karin M. Kirschner, Valerie P. Vidal, Andreas Schedl and Holger Scholz.** 2005, The Company of Biologists, pp. 1327-1336.
32. *Down-regulation of WT1/+17AA gene expression using RNAi and modulating leukemia cell chemotherapy resistance.* **Huiling Shen, Wenlin Xu, Zhaoyang Wu, Huarong Tang, Yanyan Xie, Ximing Zhong.** 2007, Haematologica, pp. 1270-1272.
33. *Growth Inhibition of Breast Cancer Cell Line MCF-7 by siRNA Silencing of Wilm Tumor 1 Gene.* **Ruxapon Navakanit, Potchanapond Graidist, Wilairat Leeanansaksiri, Chavaboon Dechsukum.** 2007, J Med Assoc Thai, pp. 2416-21.
34. *Wilms' tumor 1 susceptibility (WT1) gene products are selectively expressed in malignant mesothelioma.* **Amin KM, Litzky LA, Smythe WR, Mooney AM, Morris JM, Mews DJ, Pass HI, Kari C, Rodeck U, Rauscher FJ 3rd.** 1995, Am J Pathol, pp. 344-56.
35. *The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene?* **Loeb DM, Sukumar S.** 2002, Int J Hematol, pp. 117-26.
36. *WT1 and Bcl2 Expression in Melanocytic Lesions of the Conjunctiva.* **Emiko Furusato, Ahmed A. Hidayat, Yan-Gao Man, Aaron Auerbach, Bungo Furusato, Elisabeth J. Rushing.** 2009, Arch Ophthalmol.
37. *A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story.* **L Yang, Y Han, F Saurez Saiz and MD Minden.** 2007, Leukemia, pp. 868-76.

38. *The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells.* **Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L.** 1994, *Leukemia*, pp. 2138-2143.
39. *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.* **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.** 1998, *Nature*, pp. 806-11.
40. *Mechanisms of Disease: Therapeutic Potential of RNA Interference.* **Stevenson, Mario.** 2004, *N Engl J Med*, pp. 351:1772-7.
41. *Gene-silencing potency of symmetric and asymmetric lipid-conjugated siRNAs and its correlation with dicer recognition.* **Kubo T, Yanagihara K, Sato Y, Nishimura Y, Kondo S, Seyama T.** 2013, *Bioconjug Chem*, pp. 2045-57.
42. *Current Progress of siRNA/shRNA Therapeutics in Clinical Trials.* **John C. Burnett, John J. Rossi, and Katrin Tiemann.** 2011, *Biotechnol J*, pp. 1130-1146.
43. *Systemic Leukocyte-Directed siRNA Delivery Revealing Cyclin D1as an Anti-Inflammatory Target.* **Dan Peer, Eun Jeong Park, Yoshiyuki Morishita, Christopher V. Carman, and Motomu Shimaoka.** 2008, *Science*, pp. 627-630.
44. *Effects of Angiogenesis Inhibitors on Multistage Carcinogenesis in Mice.* **Cabriele Bergers, Kashi Javaherian, Kin-Ming LO, Judah Folkman, Douglas Hanahan.** 1999, *Science*, p. Vol 284.
45. *First-in-Humans Trial of an RNA Interference Therapeutic Targeting VEGF and KSP in Cancer Patients with Liver Involvement.* **Burris, Josep Taberero and Howard A.** 2013, *Cancer Discovery*, p. 406.
46. *A novel platform to enable inhaled naked RNAi medicine for lung cancer.* **Yu Fujita, Fumitaka Takeshita, Takayuki Mizutani, Tadaaki Ohgi, Kazuyoshi Kuwano & Takahiro Ochiya.** 2013, *Scientific Reports*, p. 3:3325.
47. *Efficient Biodistribution and Gene Silencing in the Lung epithelium via Intravenous Liposomal Delivery of siRNA.* **Jana McCaskill, Richa Singhanian<sup>1</sup> Melinda Burgess, Rachel Allavena, Sherry Wu, Antje Blumenthal and Nigel AJ McMillan.** 2013, *Molecular Therapy–Nucleic Acids*, pp. 2, e96.
48. *WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI–RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth.* **Zamora-Avila, Zapata-Benavides, Franco-Molina, Saavedra-Alonso, Trejo-Avila, Resendez-Perez, Mendez-Vazquez, Isaias-Badillo, Rodriguez-Padilla.** 2009, *Cancer Gene Therapy*, pp. 892-899.
49. *Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy?* **Samuel Wang, Sherng Young, Martina Stenzel, Yang Jia-Lin.** 2016, *Oncology Hematology*, pp. 159-169.

50. *Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy.* **Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G.** 2014, *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 110-6.
51. *Therapeutic EphA2 Gene Targeting In vivo Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery.* **Charles N. Landen Jr., Arturo Chavez-Reyes, Corazon Bucana, Rosemarie Schmandt, Michael T. Deavers, Gabriel Lopez-Berestein and Anil K. Sood.** 2005, *Cancer Res*, p. 65: 15.
52. *Therapeutic silencing of HPV 16 E7 by systemic administration of siRNA-neutral DOPC nanoliposome in a murine cervical cancer model with obesity.* **Hector Chapoy-Villanueva, Ivonne Martinez-Carlin, Lopez-Berestein G, Arturo Chavez-Reyes.** 2015, *JBUON*, pp. 1471-1479.
53. *WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth.* **Zamora-Avila DE, Zapata-Benavides P, Franco-Molina MA, Saavedra-Alonso S, Trejo-Avila LM, Reséndez-Pérez D, Méndez-Vázquez JL, Isaias-Badillo J, Rodríguez-Padilla C.** 2009, *Cancer Gene Therapy*, pp. 892-899.
54. *Primary tumor regulates the pulmonary microenvironment in melanoma carcinoma model and facilitates lung metastasis.* **Mingyong Han, Jiying Xu, Yuli Bi, Man Jiang, Xiaoya Xu, Qi Liu, Jihui Jia.** 2012, *J Cancer Res Clin Oncol*.
55. *The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation.* **Nicole Wagner, John Panelos, Daniela Massi, Kay-Dietrich Wagner.** 2008, *Eur J Physiol*, pp. 455: 839-847.
56. *Effect of WT1 gene silencing on the tumorigenicity of human glioblastoma multiforme cells.* **Aaron J. Clark, Joy L. Ware, Mike Y. Chen, Martin R. Graf, Timothy E. Van Meter, Wagner G. Dos Santos, Helen L. Fillmore, and William C. Broadd.** 2010, *J Neurosurg*, pp. 112: 18-25.
57. *High Wilms' tumour gene (WT1) expression and low mitotic count are independent predictors of survival in diffuse peritoneal mesothelioma.* **Anna Scattone, Gabriella Serio, Andrea Marzullo, Pietro Nazzaro, Fabrizio Corsi, Antonia Lucia Buonadonna & Antonio Pennella.** 2012, *Histopathology*, pp. 472-481.
58. *The Wilms' tumour suppressor Wt1 is a major regulator of tumour angiogenesis and progression.* **Kay-Dietrich Wagner, Julien Cherfils-Vicini, Naoki Hosen, Peter Hohenstein, Eric Gilson, Nicholas D. Hastie, Jean-Francois Michiels, & Nicole Wagner.** 2014, *Nature Communications*, p. 5: 5852.
59. *Short interfering RNA (siRNA), a novel therapeutic tool acting on angiogenesis.* **Reda Hadj-Slimane, Yves Lepelletier, Nicolas Lopez, Christiane Garbay, Francoise Raynaud.** 2007, *Biochimie*, pp. 1234-1244.
60. *Efficient Oncogene Silencing and Metastasis Inhibition via Systemic Delivery of siRNA.* **Shyh-Dar Li, Sumio Chono and Leaf Huang.** 2008, *Molecular Therapy*, pp. vol 16 no. 5 942-946.

61. *Anti-oncogenic activities of cyclin D1b siRNA on human bladder cancer cells via induction of apoptosis and suppression of cancer cell stemness and invasiveness.* **Chul Jang Kim, Tokio Terado, Yukihiro Tambe, Ken-Ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Akihiro Kawauchi, Hirokazu Inoue.** 2017, International Journal of Oncology.
62. *siRNAs: a new wave of RNA-based therapeutics.* **Cullen, Glen A. Coburn and Bryan R.** 2003, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, pp. 51, 753-756.
63. *In Vivo siRNA Delivery Using JC Virus-like Particles Decreases the Expression of RANKL in Rats.* **Hoffmann DB, Böker KO, Schneider S, Eckermann-Felkl E, Schuder A, Komrakova M, Sehmisch S, Gruber J.** 2016, Mol Ther Nucleic Acids, pp. 5, e298.
64. *CLDN6 promotes chemoresistance through GSTP1 in human breast cancer.* **Minlan Yang, Yanru Li, Xiangfeng Shen, Yang Ruan, Yan Lu, Xiangshu Jin, Peiye Song, Yantong Guo, Xiaoli Zhang, Huinan Qu, Yijia Shao and Chengshi Quan.** 2017, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, p. 36:157.
65. *Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy.* **Bulent Ozpolat, Anil K. Sood, Gabriel Lopez-Berestein.** 2013, Advanced Drug Delivery Reviews.
66. *WT1 silencing by RNAi synergizes with chemotherapeutic agents and induces chemosensitization to doxorubicin and cisplatin in B16F10 murine melanoma cells.* **Zapata-Benavides P, Manilla-Muñoz E, Zamora-Avila DE, Saavedra-Alonso S, Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, Davalos-Aranda G, Rodríguez-Padilla C.** 2012, Oncology Letters, pp. 751-755.
67. *Wilms' tumor gene 1 silencing inhibits proliferation of human osteosarcoma MG-63 cell line by cell cycle arrest and apoptosis activation.* **Graziano AC, Cardile V, Avola R, Vicario N, Parenti C, Salvatorelli L, Magro G, Parenti R.** 2017, Oncotarget, pp. 13917-13931.
68. *G1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes.* **Tetsuhiro Kudoh, Takao Ishidate, Asatsugu Moriyama, Kumao Toyoshimat, and Tetsu Akiyama.** 1995, Cell Biology, pp. 4517-21.
69. *A Novel Wilms Tumor 1 (WT1) Target Gene Negatively Regulates the WNT Signaling Pathway.* **Myoung Shin Kim, Seung Kew Yoon, Frank Bollig, Jirouta Kitagaki, Wonhee Hur, Nathan J. Whye, Christoph Englert, Alan O. Perantoni, and Sean Bong Lee.** 2010, The Journal of Biological Chemistry, pp. 14585-14593.
70. *microRNA-361 targets Wilms' tumor 1 to inhibit the growth, migration and invasion of non-small-cell lung cancer cells.* **Yang S, Zhang Y, Zhao X, Wang J, Shang J.** 2016, Molecular Medicine Reports, pp. 5415-5421.



71. *Nonviral Pulmonary Delivery of siRNA*. **Kissel, Olivia M. Merkel and Thomas**. 2011, *Accounts of Chemical Research*, pp. 961-970.

72. *Inhaled powder formulation of naked siRNA using spray drying technology with l-leucine as dispersion enhancer*. **Chow MYT, Qiu Y, Lo FFK, Lin HHS, Chan HK, Kwok PCL, Lam JKW**. 2017, *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 40-52.

73. *RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line*. **Diana E. Zamora-Avila, Moises A. Franco-Molina, Laura M. Trejo-Avila, Cristina Rodriguez-Padilla, Diana Resendez-Perez and Pablo Zapata-Benavides**. 2007, *Melanoma Res*, pp. 17:341-348.

74. *A novel cell-penetrating peptide derived from WT1 enhances p53 activity, induces cell senescence and displays antimelanoma activity in xeno- and syngeneic systems*. **Mariana H. Massaoka, Alisson L. Matsuo, Carlos R. Figueiredo, Natalia Girola, Camyla F. Faria, Ricardo A. Azevedo, Luiz R. Travassos**. 2014, *FEBS Open Bio* 4, pp. 153-161.

75. *A novel platform to enable inhaled naked RNAi medicine for lung cancer*. **Yu Fujita, Fumitaka Takeshita, Takayuki Mizutani, Tadaaki Ohgi, Kazuyoshi Kuwano, Takahiro Ochiya**. 2013, *Scientific Reports*, p. 3:3325.

76. *Wilms' tumor gene WT1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors*. **Naoya Tatsumi, Haruo Sugiyama et al**. 2007, *International Journal of Oncology*, pp. 32: 701-711.

77. *The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation*. **Wagner, Nicole Wagner & John Panelos & Daniela Massi & Kay-Dietrich**. 2008, *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, pp. 455:839-847.

78. *Wilms' tumor gene WT1-shRNA as a potent apoptosis-inducing agent for solid tumors*. **Naoya Tatsumi, Sumiyuki Nishida, Akihiro Tsuboi, Yoshihiro Oka And Haruo Sugiyama**. 2008, *International Journal of Oncology*, pp. 701-711.