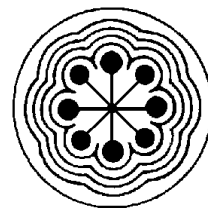




**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE  
INVESTIGACIONES NUCLEARES**



**ININ**

FACULTAD DE MEDICINA

*Título de la Tesis*

**Comparación de la  
radiosensibilización inducida por  
siRNA transportado en  
nanopartículas orgánicas**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN FÍSICA MÉDICA**

PRESENTA

***Ulises Paredes Hernández***

Comité de Tutores: Dra. Liliana Aranda Lara  
Dra. Keila Isaac Olivé  
Dr. Enrique Morales Avila



**TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO**

**2022**

ESTE TRABAJO DE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN TERANÓSTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO COMO PARTE DE LAS ACTIVIDADES DEL PROYECTO CONACYT 263397 Y DE LA RED DE INVESTIGACIÓN EN FARMACIA Y TERANÓSTICA.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>11</b>
1.1. Planteamiento del problema . . . . .	13
1.2. Hipótesis . . . . .	13
1.3. Objetivos . . . . .	13
1.3.1. Objetivo general . . . . .	13
1.3.2. Objetivos específicos . . . . .	13
<b>2. Marco teórico</b>	<b>15</b>
2.1. Mecanismos de reparación de las células . . . . .	15
2.1.1. RAD51 . . . . .	15
2.2. ARN de Interferencia pequeños (siRNA) . . . . .	17
2.3. Sistemas de transporte de fármacos . . . . .	18
2.3.1. Liposomas . . . . .	18
2.3.2. Lipoproteínas de alta densidad reconstruidas (rHDL) . . . . .	19
2.3.3. Sistema de administración autonanoemulsificantes (SNEDDS) . . . . .	21
2.4. Medida del efecto de la radiación . . . . .	22
2.4.1. Supervivencia celular . . . . .	22
<b>3. Metodología</b>	<b>25</b>
3.1. Preparación de liposomas catiónicos con siRNA (siRNA-Cy3 o siRNA-RAD51) . . . . .	25
3.2. Preparación de mHDL/siRNA-Cy3 y mHDL-siRNA-RAD51 . . . . .	25
3.3. Preparación de SNEDDS/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-RAD51 . . . . .	26
3.4. Caracterización fisicoquímica de la mrHDL y los SNEDDS preparados . . . . .	27
3.5. Estudios <i>in vitro</i> . . . . .	28
3.5.1. Cultivo celular . . . . .	28
3.5.2. Liberación intracelular de mrHDL . . . . .	28
3.5.3. Verificación de la transfección de siRNA-Cy3 <i>in vitro</i> . . . . .	28
3.5.4. Evaluación de la radiosensibilidad . . . . .	28
<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>31</b>
4.1. Preparación y caracterización fisicoquímica de mrHDL/siRNA-Cy3 . . . . .	31
4.1.1. Espectrometría UV-Vis . . . . .	32
4.1.2. Tamaño de partícula . . . . .	33

4.1.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la liberación de la carga contenida en el núcleo de la mrHDL . . . . .	34
4.2. Preparación y caracterización fisicoquímica de SNEDDS/siRNA-Cy3 . . . . .	36
4.2.1. Tamaño de partícula . . . . .	37
4.2.2. . . . .	37
4.2.3. Espectrometría UV-Vis y de Fluorescencia . . . . .	37
4.3. Evaluación de la capacidad de transfección de mrHDL/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-Cy3 . . . . .	37
4.4. Evaluación de la radiosensibilidad . . . . .	41
4.4.1. Ensayo de viabilidad celular . . . . .	41
4.4.2. Ensayo Clonogénico . . . . .	42
<b>5. Conclusiones</b>	<b>45</b>

## Resumen

El cáncer es un grave problema de salud debido, entre otras causas, a que un gran porcentaje de los pacientes muere por radioresistencia, recurrencia del tumor o metástasis. Esto se debe a la sobreexpresión de la proteína RAD51 que contribuye en gran medida, a la resistencia de las células tumorales. Una estrategia terapéutica potencial para una variedad de enfermedades es el silenciamiento de genes específicos mediante ARN de interferencia pequeño (siRNA). Estos siRNA pueden reducir o bloquear la expresión de un gen alterado o sobreexpresado en las células por lo que constituyen una herramienta efectiva en la terapia génica. Sin embargo, su uso requiere de un sistema de transporte y entrega pues los siRNA se degradan rápidamente en su camino al sitio de interés. Existen diversos sistemas de transporte y entrega de siRNA como lo son las lipoproteínas de alta densidad reconstruidas (rHDL) que se utilizan ampliamente para la entrega de fármacos. La vía de entrega de fármacos más conveniente y preferida es la oral, ya que es un método cómodo y no invasivo para el paciente. Los sistemas de administración autonanoemulsificantes (SNEDDS) han demostrado ser capaces de transportar proteínas y material genético, pero hasta ahora no se han utilizado para el transporte y liberación de siRNA en tumores. El objetivo de este trabajo es comparar la radiosensibilización inducida por siRNA transportado en SNEDDS y rHDL. Se realizó la preparación y caracterización de mrHDL y SNEDDS cargados con siRNA-Cy3 y se evaluó la transfección utilizando como referencia Lipofectamina 2000. Sin embargo, se encontró que la formulación de mrHDL utilizada no es capaz de encapsular de forma eficiente el siRNA por lo que se requiere continuar las investigaciones en este sentido. Por último, se realizó un ensayo de viabilidad y un ensayo clonogénico utilizando  $^{177}Lu$  para evaluar la radiosensibilización inducida por siRNA transportado en el SNEDDS. Los resultados demuestran que el siRNA transportado por el SNEDDS radiosensibiliza las células T47D en mayor proporción que el siRNA transportado en los liposomas.

## Abstract

Cancer is a serious health problem due, among other causes, to the fact that a large percentage of patients die from radioresistance, tumor recurrence or metastasis. This is due to the overexpression of the RAD51 protein, which is a major contributor to tumor cell resistance. A potential therapeutic strategy for a variety of diseases is the silencing of specific genes by small interfering RNA (siRNA). These siRNAs can reduce or block the expression of an altered or overexpressed gene in cells, making them an effective tool in gene therapy. However, their use requires a transport and delivery system as siRNAs are rapidly degraded on their way to the site of interest. There are several siRNA transport and delivery systems such as reconstructed high density lipoproteins (rHDL) that are widely used for drug delivery. The most convenient and preferred route of drug delivery is oral, as it is a convenient and non-invasive method for the patient. Self-emulsifying delivery systems (SNEDDS) have been shown to be capable of transporting proteins and genetic material, but so far have not been used for the transport and release of siRNA in tumors. The aim of this work is to compare the radiosensitization induced by siRNA transported in SNEDDS and rHDL. Preparation and characterization of mrHDL and SNEDDS loaded with siRNA-Cy3 was performed and transfection was evaluated using Lipofectamine 2000 as a reference. However, it was found that the mrHDL formulation used is not able to efficiently encapsulate siRNA so further research in this direction is required. Finally, a viability assay and a clonogenic assay were performed using  $^{177}\text{Lu}$  to evaluate the radiosensitization induced by siRNA transported in SNEDDS. The results demonstrate that SNEDDS-transported siRNA radiosensitizes T47D cells to a greater extent than liposome-transported siRNA.

# Índice de figuras

2.1. Función del RAD51 en células normales y de cáncer en respuesta a daños en el ADN. La expresión de RAD51 en células normales conduce a la reparación de las lesiones de ADN mediante recombinación, mientras que la sobreexpresión provoca la activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores e inestabilidad del genoma, favoreciendo la progresión del cáncer y las metástasis [27]. . . . .	16
2.2. Mecanismo de acción biológica del siRNA. El siRNA se asocia con el complejo RISC y la hebra sentido es degradada por la proteína Argo-2 en el RISC. La hebra anti sentido que queda sirve como guía para reconocer el mRNA correspondiente, después de lo cual Argo-2 corta y degrada el mRNA objetivo (Adaptada de [30]). . . . .	17
2.3. Estructura general de los liposomas (Adaptada de [40]). . . . .	18
2.4. Composición de las lipoproteínas de alta densidad. A) Estructura de las HDL endógenas, la carga viral es el colesterol y B) Una rHDL donde se aprovecha el mecanismo de entre de las HDL endógenas para entregar un fármaco de interés, en este caso siRNA. Adaptada de [48]. . . . .	19
2.5. Mecanismos de los SNEDDS. Al administrar la proteína o material genético de manera directa o mediante un (HIPC), se produce poca estabilidad y degradación en el entorno gastrointestinal (GI). Con el uso de los SNEDDS como sistema de transporte, el material genético puede llegar hasta el entorno GI y depositar su carga útil en este caso en células epiteliales intestinales [61]. . . . .	22
2.6. Curva de supervivencia celular. Definida en la ecuación 2.1 como la relación de la fracción de supervivencia celular (SF) al variar la dosis administrada (D). En la gráfica se muestra dos ejemplos, una curva correspondiente a un sistema control y una curva correspondiente a un tratamiento que modifica la respuesta a la radiación (Adaptada de [65]). . . . .	23
3.1. Metodología de preparación de mrHDL/siRNA adaptada de [47]. . . . .	26
3.2. Metodología de preparación de SNEDDS/siRNA adaptada de [19]. . . . .	27
3.3. Esquema de la preparación para el ensayo de viabilidad. . . . .	29
4.1. Preparación y caracterización fisicoquímica del sistema mrHDL/siRNA. A) Tamaños de partícula del sistema mrHDL/siRNA-Cy3. B) Espectros UV-Vis correspondientes a la poli-lisina, siRNA-Cy3, al complejo siRNA-poli-lisina y al sistema mrHDL/siRNA-Cy3. . . . .	33

4.2. Internalización de la R6G transportada en mrHDL en células de cáncer T47D. A) Imagen de microscopía de fluorescencia de las células tratadas con mrHDL/R6G. B) Imagen de la citometría de flujo de las células tratadas con mrHDL/R6G obtenida con un conteo de 50 000 células. C) Microscopía confocal de las T47D tratadas con mrHDL/R6G donde puede apreciarse con mayor nitidez la internalización de la R6G. D) Internalización de la R6G en células T47D tratadas con mrHDL/R6G sin bloqueo de los receptores SR-B1 y con bloqueo de los receptores mediante adición de 700 ng de un anticuerpo de SR-B1. . . . .	34
4.3. Preparación y caracterización fisicoquímica del sistema SNEDDS/siRNA. A) Metodología para la preparación de SNEDDS/siRNA adaptada de [19]. A) Espectros UV-Vis del sistema SNEDDS/siRNA así como de los componentes de los SNEDDS. B) Tamaños de partículas de los SNEDDS/siRNA-Cy3. C) Espectro de emisión del sistema SNEDD/siRNA-Cy3 cuando es irradiado con una luz de longitud de onda de 550nm. . . . .	36
4.4. Microscopia de fluorescencia para células tratadas con control, siRNA-Cy3, Lipo/siRNA-Cy3 utilizando 100pmoles de siRNA-Cy3. . . . .	38
4.5. Microscopia de fluorescencia en células de cáncer T47D con distintos tratamientos: siRNA puro, Lipo/siRNA-Cy3, mrHDL/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-Cy3. . . .	40
4.6. Ensayo de viabilidad celular con XTT en células de cáncer T47D con Liposomas/siRNA-RAD51 y SNEDDS/siRNA-RAD51 expuestos a distintas actividades de $^{177}Lu$ . . . . .	41
4.7. Curvas de supervivencia obtenidas a partir del ensayo clonogénico en células de cáncer T47D usando como tratamiento a los sistemas Lipo/siRNA-RAD51 y SNEDDS/siRNA-RAD51. . . . .	43



# Índice de cuadros

2.1. Antecedentes de estudios de siRNAs con el uso de rHDLs. . . . .	20
--	----



# Capítulo 1

## Introducción

El daño al ADN causado por la radiación ionizante (IR) y la capacidad de reparación del ADN de las células de cáncer, son factores importantes que determinan el resultado terapéutico[1]. Existen diversos métodos de reparación del ADN en las células, uno de los cuales es la recombinación homóloga que ocurre cuando se producen dobles rompimientos en el ADN. Las proteínas reguladoras como RAD51 son esenciales para iniciar la recombinación homóloga. La mayoría de las células de cáncer tienen una sobreexpresión de RAD51, que se relaciona con la agresividad [2, 3]. Además, se ha demostrado que RAD51 tiene la capacidad de apoyar la división celular y eliminar el estrés replicativo del ADN, lo que conduce a la quimio o radioresistencia. Debido a que RAD51 tiene un papel crucial en la progresión del cáncer, las terapias dirigidas a su inhibición, como el silenciamiento génico, se han utilizado para reducir el crecimiento tumoral y sensibilizar las células de cáncer a la quimio o la radioterapia [4, 5].

El ARN de interferencia (RNAi) es una molécula de ARN que suprime la expresión de genes específicos por lo que se utiliza como estrategia terapéutica. Particularmente, el ARN de interferencia pequeño (siRNA) se ha aplicado en el campo de la terapia génica, pues suprime selectivamente la expresión de genes como RAD51 [6, 7]. Uno de los obstáculos en el uso de siRNA consiste en que son moléculas inestables en los fluidos biológicos y presentan una captación celular deficiente [8]. Para que una terapia basada en siRNA sea efectiva se necesita de un sistema que transporte que proteja y libere al siRNA en el sitio de interés. Tal sistema debe ser biocompatible, biodegradable, no inmunogénico y tener especificidad por las células blanco [9]. Existen diversos sistemas transportadores de siRNA, entre los que se encuentran nanopartículas orgánicas como liposomas catiónicos (LC), lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) o miméticas (mHDL) y sistemas de administración autonanoemulsificantes (SNEDDS).

Los liposomas catiónicos que transportan siRNA, se pueden categorizar, de acuerdo con su estructura, en: lipoplexos, partículas estables de ácido nucleico y lípidos (SNALPS), lipoplipoplexos. En los lipoplexos, los lípidos catiónicos forman una estructura multilamelar en la que los siRNA están embebidos. Varias formulaciones de liposomas catiónicos comerciales (Lipofectina, Lipofectamina y LipoRNAiMAX) forman lipoplexos con alta eficiencia de transfección (capacidad de transferir ADN a las células seguido de expresión) *in vitro*. A pesar de que los liposomas

catiónicos se consideran el vector génico estándar, su eficiencia de transfección *in vivo* es baja con respecto a los vectores virales, por lo que en la actualidad se desarrollan investigaciones destinadas a mejorar su transfección [10, 11, 12].

Las lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) aprovechan el funcionamiento de las HDL endógenas como sistema de transporte para diversas biomoléculas. La entrega de la carga útil de las rHDL a la célula se hace a través del receptor SR-B1, el cual está altamente expresado en células de cáncer. La interacción de las rHDL con el SR-B1 combinado con su biocompatibilidad las convierten en un fuerte candidato para la entrega segura y dirigida de siRNA en el citosol de células blanco [13, 14]. Para optimizar el costo de preparación de las HDL, así como su actividad biológica, han surgido los péptidos miméticos de apoA-I. Estos péptidos miméticos son más accesibles y pueden mejorar la capacidad de las nanopartículas de interactuar con los lípidos. Existen al menos dos péptidos miméticos de apoA-I que se han probado en ensayos clínicos. Uno de ellos es el D-4, que es un péptido de 18 aminoácidos con secuencia Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH<sub>2</sub>, con una estructura helicoidal similar a la apoA-I. El uso de péptido D-4F en lipoproteínas de alta densidad ha demostrado que las lipoproteínas interactúan y liberan específicamente a través del receptor SR-B1. A la fecha, sin embargo, poco se ha explorado acerca de la preparación de HDL/siRNA con y sin péptido mimético [15, 16].

Los nanotransportadores a base de lípidos, como los sistemas de administración autonano-emulsificantes (SNEDDS), son opción para mejorar la permeabilidad celular y la entrega del fármaco en células de cáncer [17, 18]. Recientemente, Morales-Becerril (2021), desarrolló y optimizó una formulación basada en SNEDDS con estabilidad termodinámica suficiente para el transporte de siRNA, así como un tamaño nanométrico adecuado y hemocompatibilidad.

Los nanotransportadores a base de lípidos, como los sistemas de administración autonano-emulsificantes (SNEDDS), constituyen una opción para mejorar la permeabilidad celular y la entrega del fármaco en células de cáncer [17, 18]. Recientemente, Morales-Becerril [19] desarrolló y optimizó una formulación basada en SNEDDS con estabilidad termodinámica suficiente para el transporte de siRNA, con un adecuado tamaño nanométrico y hemocompatibilidad.

Considerando que las HDL y los SNEDDS son sistemas que han mostrado capacidad para transportar siRNA. En este proyecto se utilizarán HDL-miméticas (mHDL) y SNEDDS cargados con siRNA-RAD51, como pretratamiento para evaluar y comparar la sensibilización inducida por siRNA-RAD51 cuando se combina con un emisor beta negativo <sup>177</sup>Lu (radiación de bajo LET).

Considerando que las rHDL y los SNEDDS son sistemas que han mostrado capacidad para transportar siRNA, en este proyecto se evalúa la posibilidad de utilizar rHDL-miméticas (mrHDL) y SNEDDS cargados con siRNA-RAD51, como pretratamiento para evaluar y comparar la sensibilización inducida por siRNA-RAD51 cuando se combina con un emisor beta negativo de baja transferencia lineal de energía (LET) como el <sup>177</sup>Lu. Para ello, se prepararon mrHDL y SNEDDS cargados con siRNA-Cy3 y se evaluaron sus propiedades. La capacidad de carga

del siRNA-Cy3 en la mrHDL fue baja, por lo que la evaluación de la sensibilidad inducida por siRNA-RAD 51 se realizó solamente con el SNEDDS.

## 1.1. Planteamiento del problema

La resistencia intrínseca de las células de cáncer a diferentes terapias ha conducido al desarrollo de estrategias que modulen la respuesta celular con el fin de aumentar el daño o la muerte celular. El silenciamiento génico mediado por siRNA ha mostrado ser una estrategia viable para inducir la sensibilización de las células de cáncer. La liberación de siRNA en sitios específicos requiere disponer de sistemas de transporte y entrega en el sitio deseado. Los sistemas de transporte de fármacos basados en lípidos, como los SNEDDS y las rHDL, son nanosistemas con capacidad de liberación citosólica. Sin embargo, hasta la fecha son limitados los estudios que los han utilizado para el transporte de siRNA-RAD51, o como estrategia para sensibilizar células en radioterapia con radionúclidos de baja LET, o en terapia fotodinámica. Considerando que las rHDL y los SNEDDS son sistemas que tienen capacidad para transportar siRNA, en este proyecto se evalúa la posibilidad de utilizar rHDL-miméticas (mrHDL) y SNEDDS cargados con siRNA-RAD51 como pretratamiento para evaluar y comparar la sensibilización inducida por el silenciamiento de RAD51 cuando se combina con un emisor beta negativo de baja LET como el  $^{177}\text{Lu}$ .

## 1.2. Hipótesis

La diferente composición y mecanismo de liberación de siRNA de sistemas de transporte basados en SNEDDS y en mrHDL provoca diferencias significativas en la radiosensibilización celular.

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo general

Comparar la radiosensibilización inducida por la liberación de siRNA-RAD51 transportado en mrHDL y en SNEDDS.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Preparar y caracterizar fisicoquímicamente los sistemas mrHDL/siRNA-Cy3, y SNEDDS/siRNA-Cy3.
- Comparar la transfección de siRNA-Cy3 inducida por mrHDL y SNEDDS utilizando liposomas catiónicos como referencia.
- Evaluar la radiosensibilidad inducida por mrHDL/siRNA-RAD-51 y SNEDDS/siRNA-RAD51.



## Capítulo 2

# Marco teórico

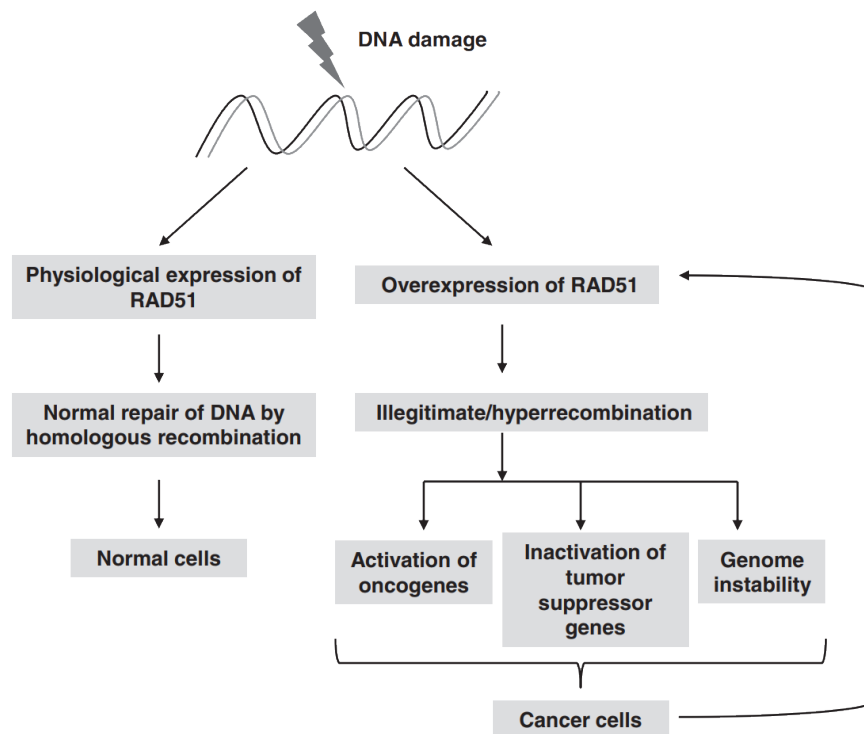
### 2.1. Mecanismos de reparación de las células

Para preservar la integridad génica y el funcionamiento de las células, existen estrategias de reparación del ADN que detectan el tipo de daño e inician la vía de reparación apropiada. Si el daño es irreparable, inducen la detención del ciclo celular o la apoptosis [20]. Las roturas de doble hebra del ADN (DSBs), que son las lesiones más graves del ADN, pueden surgir espontáneamente como resultado de horquillas de replicación colapsadas, o por eventos programados durante la recombinación meiótica y la recombinación. Los agentes exógenos como las radiaciones ionizantes (IR) y los agentes químicos generan las DSBs en el genoma [1, 21]. Las células de los mamíferos tienen dos mecanismos principales para reparar estas roturas: 1) recombinación no homóloga de ADN (NHR): Los DSBs se reparan en todas las etapas del ciclo celular, es una vía propensa a errores debido a inserciones o deleciones de pocos nucleótidos en el punto de ruptura y 2) recombinación homóloga (HR): Usa secuencias intactas en la cromátida hermana o el cromosoma homólogo como plantilla para reparar el ADN roto [22]. La HR es considerada como una vía libre de errores para la reparación de los DSB y para dar mantenimiento a la integridad del genoma. Sin embargo, también puede ser perjudicial si el extremo del ADN roto copia información de secuencias erróneas que están presentes en los cromosomas no homólogos, o de secuencias repetitivas que están presentes en abundancia en el genoma [23]. Tal HR aberrante o desregulada puede inducir reordenaciones del genoma como translocaciones cromosómicas, deleciones, amplificaciones o pérdida de heterocigosidad, produciendo células cancerosas [24].

#### 2.1.1. RAD51

Diversos tipos de cáncer como los de ovario o de mama, presentan una deficiencia en la reparación de HR, debido a alteraciones genéticas y epigenéticas en los genes que regulan la reparación por HR. Los cánceres deficientes en HR mejor caracterizados presentan mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. Por tanto, utilizan vías de reparación alternativas que dependen de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Se han diseñado distintos tipos de inhibidores de la PARP para regular la deficiencia de HR y proporcionar una terapia eficaz mediante la inducción de la letalidad sintética. Existen varios inhibidores de PARP como Olaparib, Rucaparib y Niraparib. Sin embargo, en

pacientes tratados durante un largo periodo de tiempo se ha observado resistencia a los inhibidores de PARP. Esta resistencia se adquiere de diferentes maneras como restauración de la HR en las células. Debido a que RAD51 también está implicado en la resistencia de las células cancerosas a los inhibidores de PARP, la modulación de RAD51 es de gran interés en la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer [20, 25]. La proteína RAD51 tiene un papel importante en la HR y es crucial para la estabilidad del genoma y el ciclo celular normal. RAD51 se polimeriza en extremos de ADN resecaos para formar un filamento de nucleoproteína y promueve el intercambio de hebras entre dúplex de ADN homólogos [26].



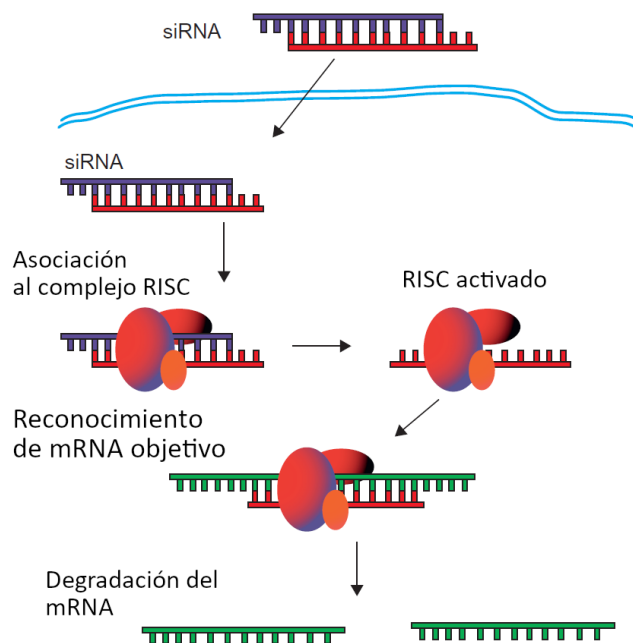
**Figura 2.1:** Función del RAD51 en células normales y de cáncer en respuesta a daños en el ADN. La expresión de RAD51 en células normales conduce a la reparación de las lesiones de ADN mediante recombinación, mientras que la sobreexpresión provoca la activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores e inestabilidad del genoma, favoreciendo la progresión del cáncer y las metástasis [27].

La expresión de RAD51 aumenta en las fases S y G2 del ciclo celular, lo que se correlaciona con la actividad predominante de HR observada en estas etapas. En varios tipos de cáncer se ha observado una sobreexpresión de RAD51. Tal sobreexpresión manifiesta una mayor supervivencia celular, hiper-recombinación, resistencia a la radiación y a varios tipos de fármacos, que inducen DSBs. Por estas razones se ha propuesto que el RAD51 puede ser un objetivo potencial para desarrollar estrategias terapéuticas que supriman la quimio y la radio resistencia en el tratamiento de cáncer [27, 28].



## 2.2. ARN de Interferencia pequeños (siRNA)

El ARN de interferencia (RNAi) es una herramienta de silenciamiento cuyo objetivo es un ARN mensajero específico (mRNA). Los siRNA son moléculas de ARN de doble hebra de 20-25 nucleótidos perfectamente complementarias, que se generan, de forma natural, a partir de un ARN largo de doble hebra (dsRNA). [29]. Los siRNA tienen la ventaja de trabajar exclusivamente a nivel citoplásmico produciendo una unión complementaria completa a un mRNA específico. Cada molécula de siRNA puede silenciar múltiples blancos de mRNA, por lo que constituye un fármaco muy específico y potente. Estos siRNA también se pueden producir sintéticamente para iniciar RNAi[30].



**Figura 2.2:** Mecanismo de acción biológica del siRNA. El siRNA se asocia con el complejo RISC y la hebra sentido es degradada por la proteína Argo-2 en el RISC. La hebra anti sentido que queda sirve como guía para reconocer el mRNA correspondiente, después de lo cual Argo-2 corta y degrada el mRNA objetivo (Adaptada de [30]).

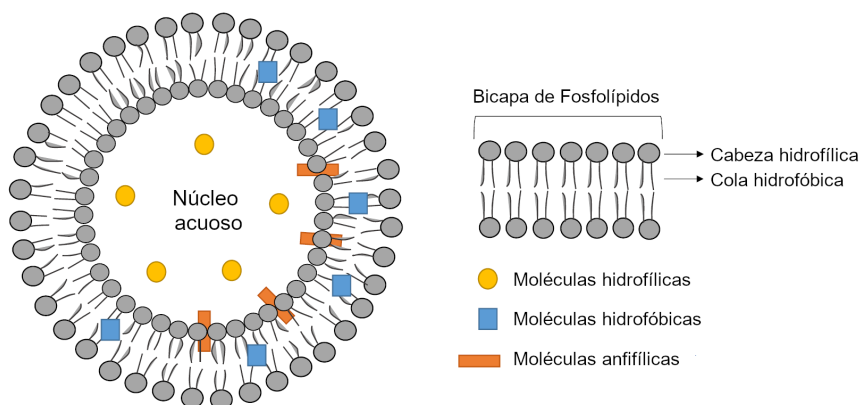
Los siRNA bloquean la expresión específica de genes endógenos en varias líneas celulares de mamíferos. Además, se puede lograr el silenciamiento génico a largo plazo sin interrumpir las vías de microRNA endógenos a través de múltiples administraciones de siRNA sintéticos [31]. El alto potencial de los siRNA para la terapia se debe a su capacidad para inducir RNAi que interfiere sólo con la traducción y no con la transcripción del ADN. Debido a que el siRNA no interactúa con el ADN cromosómico, reduce la posibilidad de alteraciones genéticas adversas, que se producen en la terapia génica basada en ADN [32].

## 2.3. Sistemas de transporte de fármacos

Los ARN de interferencia (RNAi) son una herramienta potencialmente eficaz para la terapia contra el cáncer. Esto se debe a la capacidad de los RNAi (por ejemplo, siRNA) para silenciar genes que son difíciles de atacar con enfoques convencionales, como anticuerpos o inhibidores de moléculas pequeñas [33]. Para lograr efecto terapéutico usando siRNA, éste debe administrarse de manera selectiva y eficaz en el tejido blanco y alcanzar el citoplasma a través de las membranas celulares de las células blanco. El problema es que los siRNA cuando se inyectan por vía intravenosa se degradan en la sangre por nucleasas endógenas y se eliminan rápidamente de la circulación [34]. Para superar estos inconvenientes se han desarrollado sistemas para depositar siRNA en tejidos blanco [35]. A pesar de que se han estudiado varios métodos de administración utilizando liposomas u otras nanopartículas, sus aplicaciones terapéuticas pueden verse limitadas debido a toxicidades y otras complicaciones. Por lo tanto, se necesitan métodos nuevos y más específicos para la administración sistémica de siRNA [36].

### 2.3.1. Liposomas

Los liposomas son un tipo de nanotransportadores orgánicos que se componen de fosfolípidos en forma de vesículas lipídicas (bicapa o multicapa) que al ensamblarse son capaces de encapsular agentes terapéuticos, ya sea atrapando moléculas hidrofílicas en su núcleo acuoso o moléculas hidrofóbicas en las capas lipídicas [37]. El componente principal de los liposomas son los fosfolípidos que, como se metabolizan fácilmente por el sistema reticuloendotelial, hace que sean biodegradables y biocompatibles. Los liposomas se clasifican dependiendo de la carga de fosfolípidos que contienen, pueden ser neutros, cargados positiva o negativamente [38, 39].



**Figura 2.3:** Estructura general de los liposomas (Adaptada de [40]).

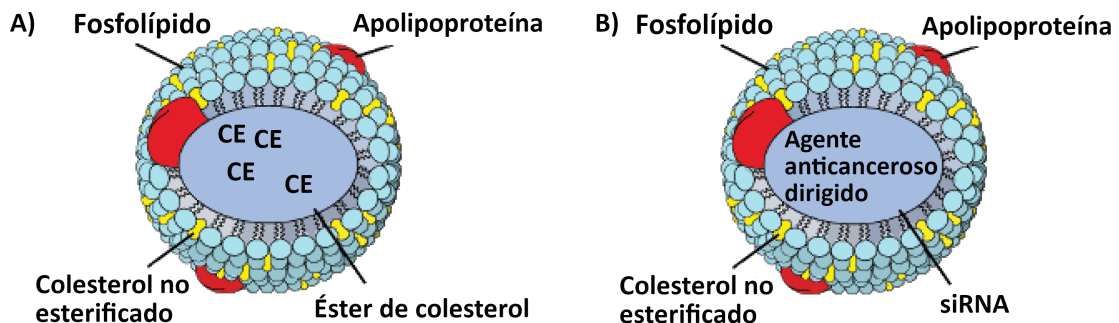
Los liposomas catiónicos (fosfolípidos con carga positiva) forman complejos mediante interacciones electrostáticas con los ácidos nucleicos (DNA, RNA o siRNA), lo que permite el encapsulamiento de éstos de forma eficaz [41]. A pesar de que en varios estudios se ha demostrado que los liposomas son un adecuado sistema de transporte de ácidos nucleicos como el siRNA, existen diversos retos que complican su aplicación en la clínica como son la hepatotoxicidad y la inflamación pulmonar que se produce a causa de la liberación de especies reactivas de oxígeno y los aumentos en los niveles de

calcio intracelular [42]. Además, se pueden presentar interacciones de los liposomas catiónicos con agentes endógenos cargados negativamente produciendo hemólisis [43, 44].

La Lipofectamina 2000 es un liposoma catiónico comúnmente utilizado para la entrega de siRNA. Al interactuar con la estructura siRNA, con carga negativa, crea un complejo que mejora la captación del oligonucleótido. Al ser eficiente y aplicable a una amplia gama de oligonucleótidos, la entrega con Lipofectamina 2000 se ha utilizado comúnmente como estándar para comparar la eficacia de otros vehículos de entrega de siRNA. Sin embargo, con excepción de la citotoxicidad, resulta limitado el número de estudios que evalúan otras respuestas celulares inadvertidas causadas por los complejos Lipofectamina 2000-siRNA [45, 46].

### 2.3.2. Lipoproteínas de alta densidad reconstruidas (rHDL)

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son nanopartículas que se encuentran de forma natural en el organismo. Sirven, entre otras funciones, para el transporte inverso de colesterol. La carga de las HDL circulantes se deposita a través de un mecanismo mediado por receptores a través del receptor eliminador de clase B tipo 1 (SR-B1) que está expresado de forma natural en el hígado para la eliminación del colesterol de las células [13]. Se ha observado una sobreexpresión de SR-B1 en varios tipos de células de cáncer. Factores como el tamaño pequeño, el núcleo hidrófobo protegido y la posibilidad de captación mediada por receptores por las células tumorales blanco, convierte a las HDL en portadores ideales de fármacos. Para aprovechar las ventajas de las HDL, éstas se pueden reconstruir (rHDL) a partir de los componentes de las HDL endógenas. Como las rHDL tienen una composición similar a las HDL endógenas, son completamente biodegradables y, hasta el momento, no se conoce que provoquen respuestas inmunológicas [47].



**Figura 2.4:** Composición de las lipoproteínas de alta densidad. A) Estructura de las HDL endógenas, la carga viral es el colesterol y B) Una rHDL donde se aprovecha el mecanismo de entre de las HDL endógenas para entregar un fármaco de interés, en este caso siRNA. Adaptada de [48].

Las rHDL son pequeñas partículas con un diámetro aproximado de 12 a 18 nm compuestas por fosfolípidos, apolipoproteína A-1, colesterol y ésteres de colesterol (2.4) muy utilizadas en la actualidad como vehículo de transporte de fármacos. Para la administración dirigida de siRNA utilizando rHDL se han examinado varios receptores de células tumorales, en particular el receptor SR-B1. Este receptor se expresa principalmente en el hígado y, en menor medida, en las glándulas suprarrenales y en los tejidos ováricos normales. Se expresa también en una gran variedad de células de cáncer.

Se ha demostrado que la HDL puede alterar la homeostasis de las células cancerosas y ejercer un efecto inmunomodulador beneficioso [49, 50]. Las células tumorales muestran una alta captación de ésteres de colesterol provenientes de la HDL debido a su alta expresión de SR-B1, lo que convierte a las rHDL en un medio específico de entrega de fármacos antitumorales y macromoléculas terapéuticas como el siRNA [49], cuyo uso para el silenciamiento terapéutico es particularmente atractivo para genes que son difíciles de apuntar con otros enfoques normales [51]. Como las rHDL pueden reconstruirse a partir de los componentes de la HDL endógena, son biocompatibles y no tóxicas. Además, tienen la capacidad de transportar cargas hidrofóbicas como los siRNA [52]. De ahí que las rHDL constituyen un sistema de transporte muy efectivo para los siRNA.

En la Tabla 1 se muestran algunos trabajos relevantes en la investigación con rHDL. En [47] se demostró que las rHDL facilitan la entrega sistémica in vivo de siRNA con alta eficiencia, debido al mecanismo de entrega mediada por SR-B1. En [49, 53] las rHDLs muestran eficacia para silenciar la expresión de dos proteínas que son clave para el crecimiento y la metástasis del cáncer de ovario y cáncer colorrectal. Utilizando modelos de ratón ortotópicos se ha demostrado que las rHDL son transportadores eficientes de siRNA y que podrían servir como base para nuevos enfoques terapéuticos contra el cáncer.

Nanopartícula	Células	Blanco	Terapia	Ref
1. STAT3-siRNA/rHDL. 2. FAK-sRNA/rHDL.	1. HeyA8. 2. SK-OV3ip1. 3. HeyA8-MDR. 4. HCT116 (Colon).	STAT3 y FAK	Docetaxel	[47]
CHOL-si-BCL-2	1. KB de carcinoma epidermoide humano. 2. HT1080.	BCL-2	N/A	[49]
CHOL-siRNA-VEGF	1. MCF-7. 2. HT1080.	VEGF	N/A	[53]
siRNA-GAPDH	HepG2	GAPDH	N/A	

**Cuadro 2.1:** Antecedentes de estudios de siRNAs con el uso de rHDLs.

Aunque diversos estudios han demostrado que las rHDL son un sistema de transporte orgánico prometedor, existen factores que afectan la incorporación de los fármacos en su interior. Los fármacos con alta hidrofobicidad tienen más compatibilidad con los triglicéridos y ésteres de colesterol del núcleo interior por lo que pueden encapsularse en el núcleo de la rHDL con mayor facilidad y con una alta eficiencia de carga, en tanto que las moléculas más hidrofílicas se pueden absorber o conjugar en la superficie, donde se encuentran los fosfolípidos. Como los fosfolípidos pueden ser neutros, negativos o positivos tienen facilidad para encapsular cargas de distinta naturaleza. La introducción de una molécula en la rHDL puede realizarse utilizando diferentes métodos [53, 54].

### Apolipoproteína A1 (apoA-I)

La apolipoproteína A-I (apoA-I) es uno de los principales componentes de la HDL. Esta proteína establece su estructura y estabilidad. La apoA-I constituye aproximadamente el 70% de la masa

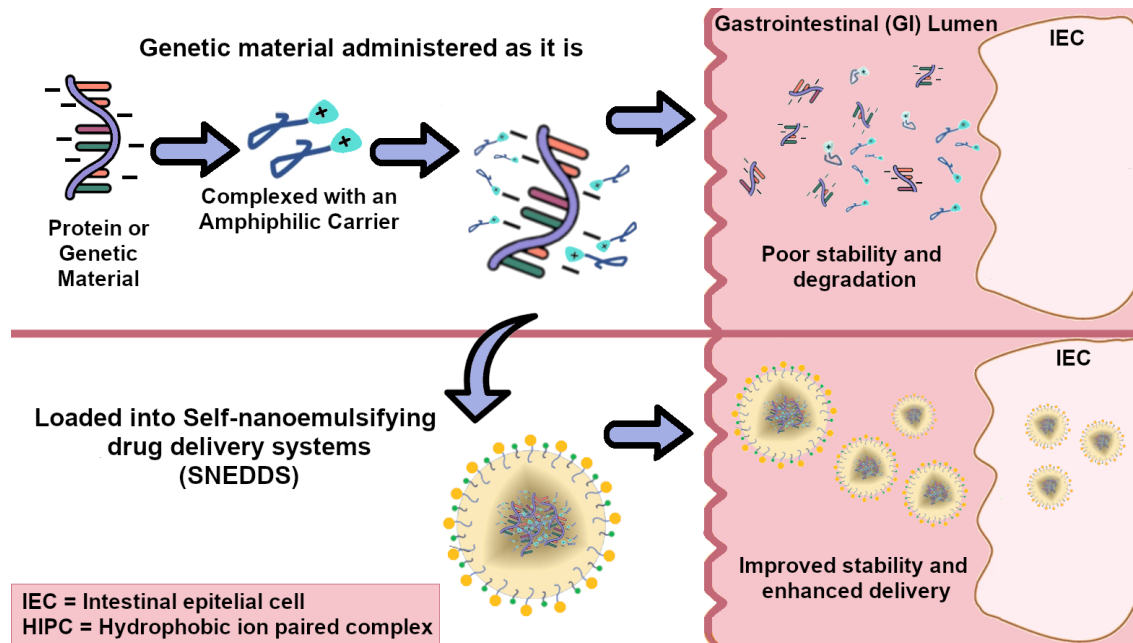
proteica total de las HDL [55]. De forma endógena, en el cuerpo humano, la apoA-I se sintetiza por el hígado y el intestino. Su peso molecular de 28.3 kDa y contiene diez hélices alfa [56]. La mayoría de las hélices son anfipáticas de clase A, que se caracterizan por una gran cara hidrofóbica y una cara polar con residuos de aminoácidos cargados negativamente en el centro y aminoácidos cargados positivamente en la frontera entre la cara hidrofóbica y la cara polar. Esta es la característica estructural que permite a las apolipoproteínas intercambiables unirse a los lípidos [57]. La cara hidrofóbica está enterrada en las cadenas acilo de los fosfolípidos de la superficie de la partícula y los aminoácidos cargados positivamente, como la lisina y la arginina, forman interacciones iónicas con los grupos de cabeza de los fosfolípidos, cargados negativamente. Los aminoácidos con carga negativa interactúan con el medio acuoso [58].

### **Péptidos Miméticos de la apoA-I**

La búsqueda de péptidos más pequeños que la apoA-I que conserven muchas de las propiedades de unión a lípidos de la apoA-I ha llevado a la síntesis de los llamados péptidos miméticos (MP), que son más accesibles y pueden mejorar la capacidad de las nanopartículas de rHDL de interactuar con los lípidos [16]. Diversos trabajos han demostrado que los pequeños MP de apoA-I sintéticos pueden ser usados para producir partículas similares a HDL funcionales para el transporte de colesterol. El uso de MP en terapia ha demostrado tener múltiples ventajas sobre el uso de apoA-I. Existen al menos dos MP de apoA-I que se han probado en ensayos clínicos [59, 58]. Uno de estos péptidos es el D-4F, contiene 18 aminoácidos con secuencia Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH<sub>2</sub> y una estructura helicoidal similar a la apoA-I. Trabajos previos han demostrado que el péptido D-4F puede formar rHDL capaz de entregar específicamente su carga a través de SR-BI [15, 16].

### **2.3.3. Sistema de administración autonanoemulsificantes (SNEDDS)**

De todos los métodos de administración de fármacos la vía oral es la más conveniente y preferida, ya que es cómoda y no invasiva para el paciente. Sin embargo, la mayoría de los fármacos que se administran por vía oral tienen una eficacia terapéutica limitada debido a su escasa solubilidad en agua. Los problemas de la vía oral incluyen deficiente biodisponibilidad, errático perfil de absorción, gran variabilidad intra e interindividual, mala permeabilidad e inestabilidad en el entorno gastrointestinal (GI) [60]. Los sistemas de administración de fármacos auto-nanoemulsificantes (SNEDDS) son mezclas isotrópicas anhidras de aceite, surfactantes y fármacos que cuando se introducen en un medio acuoso agitándolos suavemente, forman espontáneamente nanoemulsiones de aceite y agua. Los SNEDDS también pueden contener co-emulsificantes o co-surfactantes y/o solventes para facilitar la nanoemulsificación y mejorar la incorporación de fármacos. Estas características de los SNEDDS han motivado el interés para la administración de material genético por vía oral [61][60].



**Figura 2.5:** Mecanismos de los SNEDDS. Al administrar la proteína o material genético de manera directa o mediante un (HIPC), se produce poca estabilidad y degradación en el entorno gastrointestinal (GI). Con el uso de los SNEDDS como sistema de transporte, el material genético puede llegar hasta el entorno GI y depositar su carga útil en este caso en células epiteliales intestinales [61].

Hay que señalar, sin embargo, que el contenido de agua de las nanoemulsiones puede promover la hidrólisis y la anticipación de ciertos medicamentos en el almacenamiento a largo plazo, lo que podría afectar su utilidad en la administración oral.

## 2.4. Medida del efecto de la radiación

La radioterapia es una de las principales estrategias de tratamiento del cáncer. Se utiliza en más del 50% de los pacientes. Sin embargo, la exposición a las radiaciones ionizantes también se asocia con consecuencias negativas para la salud debido a la inevitable dosis de radiación que se administra a los tejidos sanos. Los esfuerzos de investigación se han centrado en desarrollar estrategias para optimizar la eficacia de la radioterapia.

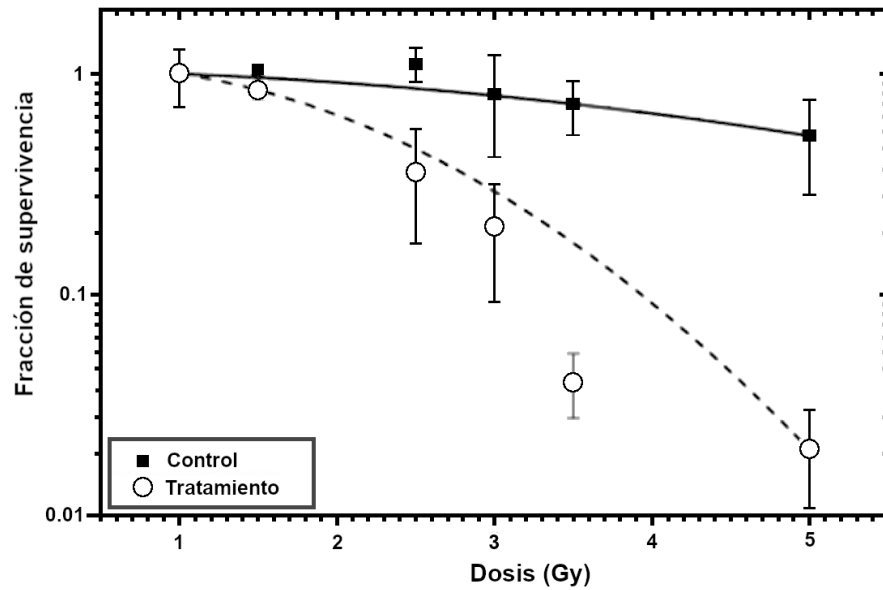
### 2.4.1. Supervivencia celular

La técnica más utilizada en radiobiología para estudiar la efectividad de un tratamiento es el ensayo clonogénico (o formación de colonias). Esta técnica *in vitro* permite la evaluación de la citotoxicidad de la radiación probando la capacidad de una sola célula para crecer en una colonia. La célula se considera radiobiológicamente muerta si ha perdido su viabilidad reproductiva para producir descendencia. Convencionalmente, los resultados de los ensayos de formación de colonias se presentan mediante las llamadas curvas de supervivencia que representan la fracción de supervivencia  $SF(D)$ , es decir, el número de colonias que se forman después del tratamiento, en función de la dosis de

radiación D. La curva experimental de los datos de supervivencia generalmente se ajusta con un modelo lineal cuadrático (LQ), que viene dado por [62, 63]:

$$SF = \exp^{-(\alpha D + \beta D^2)}, \quad (2.1)$$

donde  $SF(D)$  es la fracción de células supervivientes,  $\alpha$  y  $\beta$  son parámetros lineales y cuadráticos del modelo, respectivamente y D es la dosis de radiación administrada. Aunque el modelo lineal-cuadrático es el más utilizado para describir la curva de supervivencia celular, cabe señalar que también se emplean modelos alternativos[64].



**Figura 2.6:** Curva de supervivencia celular. Definida en la ecuación 2.1 como la relación de la fracción de supervivencia celular (SF) al variar la dosis administrada (D). En la gráfica se muestra dos ejemplos, una curva correspondiente a un sistema control y una curva correspondiente a un tratamiento que modifica la respuesta a la radiación (Adaptada de [65]).





## Capítulo 3

# Metodología

### 3.1. Preparación de liposomas catiónicos con siRNA (siRNA-Cy3 o siRNA-RAD51)

Para utilizar como referencia en los estudios de transfección y citotoxicidad con las nanopartículas obtenidas (mrHDL y SNEDDS) se prepararon liposomas catiónicos cargados con siRNA-Cy3 y con RAD51 a partir de una solución comercial de Lipofectamina 2000. Para formar el complejo liposomas /siRNA se prepararon dos mezclas, la primera se preparó con 1 picomol de siRNA diluido en 25  $\mu\text{L}$  de Medio Opti-MEM e incubando por 5 min a temperatura ambiente. La segunda mezcla se preparó con 0.25  $\mu\text{L}$  de Lipofectamina 2000 diluidos en 25  $\mu\text{L}$  de medio Opti-MEM. Ambas preparaciones se mezclaron suavemente y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente.

### 3.2. Preparación de mHDL/siRNA-Cy3 y mHDL-siRNA-RAD51

La mrHDL cargada con siRN-Cy3 se preparó según el procedimiento descrito por [47] ligeramente modificado para nuestros propósitos. En un vial de vidrio se preparó una mezcla con 300 $\mu\text{L}$  de fosfatidilcolina de yema de huevo (PC, 10mg/mL), 7 $\mu\text{L}$  de colesterol libre (FC, 10mg/mL), 7.5 $\mu\text{L}$  de éster de colesterol (CE, 4mg/mL), todas ellas en cloroformo. El cloroformo se evaporó para formar una película de lípidos. Previo a la adición de la fase acuosa, se preparó el complejo siRNA/poli-lisina al incubar 6.6 $\mu\text{g}$  de siRNA (500pmoles/10 $\mu\text{L}$ ) con 100 $\mu\text{g}$  de poli-lisina (1mg/ml) en agua libre de RNasas a 30°C por 30 min. El complejo siRNA/poli-lisina, se agregó a la fase de lípidos junto con 140 $\mu\text{L}$  de colato de sodio (100mg/mL en PBS 1x) agregando 60 $\mu\text{L}$  de DMSO. Posteriormente, se agregaron 240 $\mu\text{g}$  de péptido mimético, MP D-4F (1mg/mL). Se ajustó el volumen a 2mL con buffer Tris-EDTA (10mM Tris buffer, 1mM EDTA, 0.1MKCl, pH 8) para obtener una mezcla con una relación molar 1:1.6 de PC-colato. La mezcla se incubó a 4°C por 12 h y se dializó con 2 L de PBS1x por 48 h haciendo 3 cambios de buffer.

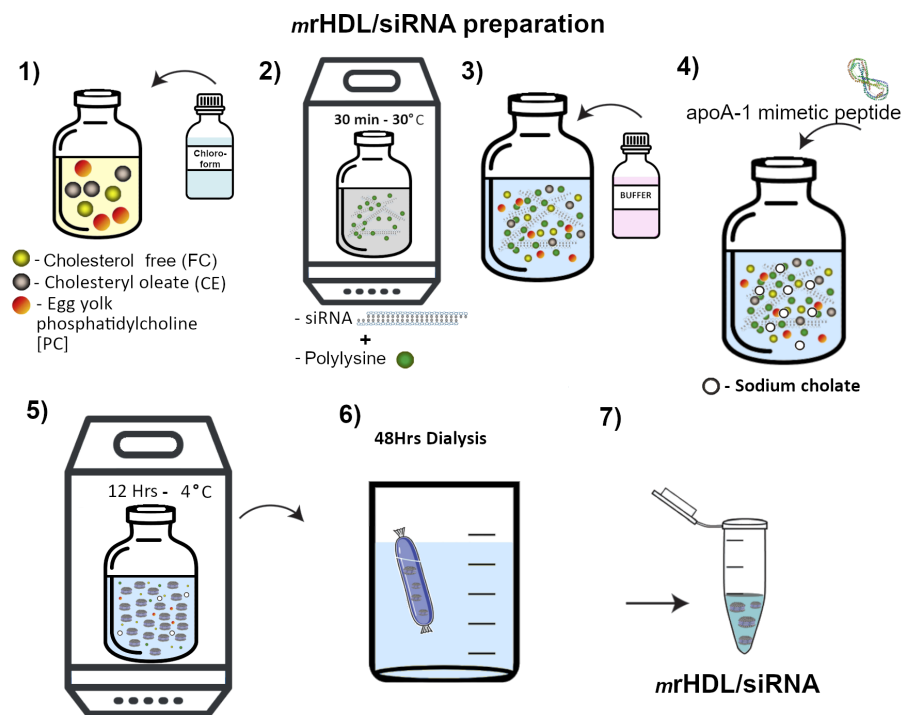
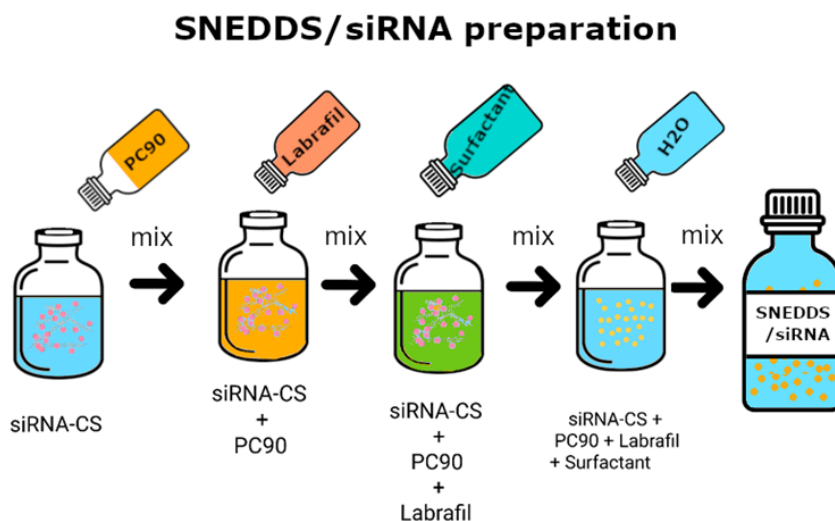


Figura 3.1: Metodología de preparación de mrHDL/siRNA adaptada de [47].

### 3.3. Preparación de SNEDDS/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-RAD51

La preparación de los SNEDDS/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-RAD51 se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por [19]. Para la incorporación del siRNA en los SNEDDS primeramente se preparó el poliplexo de siRNA/quitosano (siRNA-CS) con 2500 pmoles de siRNA re-suspendidos en 25  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa en una proporción 5:4. La solución se agitó por 5 min y se mantuvo en agitación a 120 rpm por 30 min. La mezcla se centrifugó a 1500 rpm por 30 min y 4 °C. El poliplexo siRNA-CS se formó después de 30 min ¿de reposo o de agitación? a temperatura ambiente. Una vez formado el poliplexo siRNA/CS, se prepararon los SNEDDS siguiendo la metodología ilustrada en la figura 3.2: a la mezcla de siRNA-CS se añadieron 80  $\mu\text{L}$  del cosolvente PC90 (A: 21 %), 148  $\mu\text{L}$  del excipiente lipídico Labrafil (B: 39 %) y 152  $\mu\text{L}$  del surfactante Cremophor RH 40 (C: 40 %). Se agitó durante 2 min para obtener la fase oleosa del SNEDDS y a continuación se añadieron 10 mL de agua libre de RNasa. El SNEDDS se obtuvo luego de agitar a temperatura ambiente.



**Figura 3.2:** Metodología de preparación de SNEDDS/siRNA adaptada de [19].

### 3.4. Caracterización fisicoquímica de la mrHDL y los SNEDDS preparados

La caracterización fisicoquímica de la mrHDL y los SNEDDS preparados se realizó con mrHDL/siRNA-Cy3. Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

*Espectro UV-Vis.* El espectro de absorción UV-Vis de las suspensiones de las mrHDL se obtuvieron en el espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis en un rango de 200 a 800 nm e intervalo de 0.5 nm.

*Presencia de siRNA-Cy3 en la mrHDL y los SNEDDS.* Se realizó por espectrometría de fluorescencia en un espectrofluorímetro Horiba Jobin (Fluoromax-3). Los espectros de emisión se registraron a una longitud de onda de excitación de 550 nm haciendo un barrido desde 550 nm hasta 800 nm, con resolución de 2 nm, tiempo de integración de 0.5 s y slit de 2nm.

*Tamaño de partícula e índice de polidispersión.* El tamaño de partícula y el índice de polidispersión se midió con el analizador Nanotracs (Nanotracs Wave, modelo MN401, Microtract, FL, EE. UU) utilizando una muestra de 100  $\mu$ L de la solución coloidal de cada nanopartícula utilizando como diluyente PBS 1X, pH 7.4. Las mediciones se realizaron con una longitud de onda de 657 nm, temperatura de 20°C, corriente de 15.79 mA, campo eléctrico de 14.35 V/cm y tiempo de muestreo de 128  $\mu$ s.

*Eficiencia de carga.* La eficiencia de carga del siRNA-Cy3 en las mrHDL y en los SNEDDS se determinó como la razón entre la concentración del siRNA-Cy3 en el nanosistema (mrHDL o SNEDDS) entre concentración inicial de siRNA-Cy3 usada para su preparación, medidas en

un fluorímetro Victor 2 D (Perkin Elmer). Para ello, en 9 pocillos de una placa de 96 pocillos se añadieron (n=3): (a) 100  $\mu\text{L}$  de la solución de siRNA-Cy3 utilizada en la preparación de las NP; (b) 100  $\mu\text{L}$  de la preparación de mrHDL/siRNA-Cy3; (c) 100  $\mu\text{L}$  de la preparación de SNEDDS/siRNA-Cy3 y se midió la fluorescencia debida al siRNA-Cy3. Previamente se construyó una curva de calibración fluorescencia vs concentración de siRNA-Cy3.

### 3.5. Estudios *in vitro*

#### 3.5.1. Cultivo celular

Las células T47D se cultivaron a 37°C en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Sigma-Adrich Co) suplementado con suero fetal bovino hasta una concentración final del 10 %, con 1 % de (anfotericina B, penicilina estreptomycin) en atmósfera 5 % de CO<sub>2</sub> y 85 % de humedad.

#### 3.5.2. Liberación intracelular de mrHDL

La liberación intracelular de la mrHDL se evaluó por microscopía de fluorescencia utilizando rodamina 6G (R6G) en lugar de siRNA-Cy3. Se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células T47D y se incubaron por 24 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se colocaron 45  $\mu\text{L}$  de una solución 1  $\mu\text{M}$ -rHDL-R6G preparada en iguales condiciones que la mrHDL-siRNA.Cy3 (epígrafe 3.1.) pero añadiendo la R6G en lugar del siRNA-Cy3, y se incubó a 37°C durante una hora. Se retiró el medio y se lavó con PBS 1x. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se enjuagó 2 veces con PBS 1X. Se agregó el marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e incubó a 37°C por 5 min. Las muestras se cubrieron con cubreobjetos. Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon eclipse.

#### 3.5.3. Verificación de la transfección de siRNA-Cy3 *in vitro*

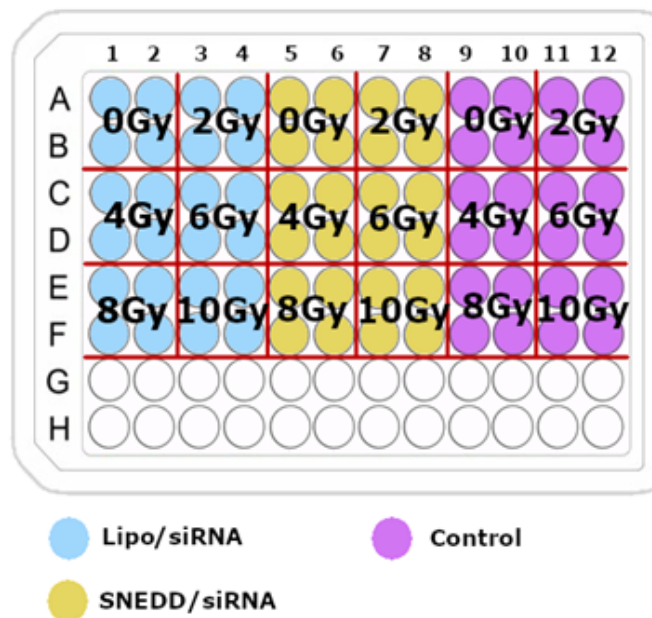
Las células T47D se sembraron en una placa de 6 pozos ( $2.5 \times 10^5$  células/pozo) con medio EMEM (10 %SFB y 1 % de anfotericina B/estreptomycin/penicilina). La placa se incubó a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h o hasta alcanzar el 80 % de confluencia. Posteriormente, se incubaron con 100 pmoles (experimento 1) o 1 pmol (experimento 2) de siRNA-Cy3 contenido en SNEDDS/siRNA-Cy3, rHDL/siRNA-Cy3 o liposomas/siRNA-Cy3 durante 1 h a 37°C. Seguidamente, cada pocillo se lavó dos veces con PBS 1x. Las células se fijaron con 1 mL de paraformaldehído al 2 % durante 15 min. Se agregó el 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), 1:1000) a 37°C por 5 min para la tinción nuclear. La liberación de siRNA-Cy3 se evaluó con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti con el objetivo de 60x.

#### 3.5.4. Evaluación de la radiosensibilidad

##### Ensayo de viabilidad

Para este ensayo se sembraron células T47D en una placa de 96 pozos con una densidad de  $8 \times 10^3$  células/pozo las cuales se incubaron en CO<sub>2</sub> al 5 % por 24 h (n = 4). Las células se incubaron durante 24 horas con 5 pmoles de RAD51 en la forma SNEDDS/siRNA-RAD51 o liposomas/

siRNA-RAD51. Después de 24 h de la transfección, las células se expusieron durante una hora a diferentes actividades de  $^{177}\text{Lu}$  para alcanzar dosis de 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy. Como grupos control se usaron: células con SNEDDS/siRNA-RAD51 o liposomas/siRNA-RAD51, células sin irradiar (3.3). La actividad por mililitro de  $^{177}\text{Lu}$  necesaria para administrar las dosis experimentales se calculó con la ecuación 3.7. Posteriormente, se retiró el medio y lavó dos veces con PBS 1x. Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1x en cada pozo y se agregó 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción XTT (50  $\mu\text{L}$  de XTT + 1  $\mu\text{L}$  electrón coupling). Después de 24 h, la viabilidad celular se midió por absorbancia en el espectrofotómetro Epoch



**Figura 3.3:** Esquema de la preparación para el ensayo de viabilidad.

### Ensayo clonogénico

Las células se transfectaron primeramente con SNEDDS/siRNA-RAD51 y con Lipo/siRNA-RAD51 y 48 h después de la transfección se expusieron a diferentes actividades de  $^{177}\text{Lu}$  correspondientes a (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy y 8 Gy). Las células sin tratamiento se usaron como grupo control. Después de los tratamientos, las células se despegaron y contaron para preparar diluciones con  $10^2$  a  $10^4$  células. Para estudiar la reparación de daños potencialmente letales después de la exposición a la radiación ionizante, las células se sembraron en cajas Petri inmediatamente (IP) o tiempo después (DP) de la exposición al radionúclido. Posteriormente, se colocaron las placas en una incubadora y se dejaron en reposo hasta que las células de las placas del grupo control formaron colonias suficientemente grandes. Después se fijaron, tiñeron con cristal violeta y se contaron las colonias. Se calculó la fracción de colonias de las células no expuestas a tratamientos (PE):

$$PE = \frac{\text{número de colonias formadas}}{\text{número de células sembradas}} \times 100\% \quad (3.1)$$

La fracción de supervivencia ( $SF$ ) después de cualquier tratamiento se calculó tomando en cuenta el PE del grupo control.

$$SF = \frac{PE \text{ de la muestra tratada}}{PE \text{ del grupo control}} \times 100 \% \quad (3.2)$$

A partir de la fracción de supervivencia se construyeron las curvas de supervivencia celular y se ajustarán a una función cuadrática lineal dado por la ecuación 2.1.

### Estimación de la actividad de $^{177}Lu$ a añadir en los experimentos de evaluación de la radiosensibilidad.

Para calcular la actividad de  $^{177}Lu$  necesaria para obtener dosis de 0, 2, 4, 6 y 8 Gy, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$D = \tilde{A} \cdot S(r_t \leftarrow r_s) \quad (3.3)$$

donde  $S(r_t \leftarrow r_s)$  es la dosis absorbida por actividad acumulada y  $\tilde{A}$  es la actividad acumulada hasta un tiempo  $T$  dada por :

$$\tilde{A} = \int_0^T A(t) dt \quad (3.4)$$

Sustituyendo  $A = A_0 e^{-\lambda t}$  en 3.4 se tiene:

$$\tilde{A} = \int_0^T A(t) dt = \frac{A_0}{\lambda} \cdot (1 - e^{-\lambda T}) \quad (3.5)$$

donde  $A_0$  es la actividad inicial administrada de  $^{177}Lu$  y  $\lambda = 1.20717 \times 10^{-6} s^{-1}$  es la constante de semidesintegración, sustituyendo 3.5 en la ecuación 3.3: Para calcular  $S(r_t \leftarrow r_s) = 1.19 \times 10^{-4} Gy/Bq \cdot s$  del  $^{177}Lu$  se utilizó el Software MIRDCELLver 3.0, sustituyendo estos valores en la ecuación 3.3 se tiene:

$$D = 0.42767 \cdot A_0 \cdot Gy/Bq \quad (3.6)$$

Al multiplicar por el número de células  $N$ , se calcula la actividad inicial  $A_0$  que se debe de introducir para alcanzar una dosis  $D$ :

$$A_0 = (2.338 \cdot D \cdot N \cdot Bq/Gy) \cdot 2 = 4.6765 \cdot N \cdot D \cdot Bq/Gy \quad (3.7)$$

Donde  $A_0$  dependerá únicamente de la dosis que se desea alcanzar y del número de células a irradiar. Se hizo la aproximación que el 50% de la actividad administrada es la que se adhiere a la capa celular, por esta razón se multiplicó por 2 en la ecuación 3.7 .

## Capítulo 4

# Resultados y Discusión

La terapia con radiación de baja LET como, por ejemplo, con radionúclidos emisores beta negativos, es una modalidad de tratamiento oncológico. Sin embargo, las dosis en tejidos sanos limitan la respuesta terapéutica. Otro factor limitante es la activación de diferentes mecanismos biológicos inherentes a las células de cáncer, como la radioresistencia. A la fecha, se han descrito numerosos marcadores moleculares implicados en la radioresistencia como: alteraciones en el crecimiento celular, proliferación y reparación del ADN, hipoxia, aumento de la capacidad de invasión y migración, alteraciones del ciclo celular y expresión de proteínas de choque térmico, entre otros [66]. Es bien conocido que la radiación ionizante produce DSB en los enlaces fosfodiéster del ADN, y que el nivel y complejidad del daño está determinado por la dosis de radiación [67]. En las células existen diversos métodos de reparación del daño al ADN, siendo uno de ellos la recombinación homóloga que tiene lugar cuando se producen dobles rompimientos en el ADN. Las proteínas reguladoras como RAD51 son esenciales para iniciar la recombinación homóloga. Se ha demostrado que la inhibición de RAD51 por siRNA sensibiliza las células a la radioterapia y la quimioterapia. La preparación de las mrHDL y los SNEDDS cargados con siRNA se realizó con el objetivo de evaluar y comparar la sensibilización inducida por el silenciamiento de RAD51 cuando se combina con un emisor beta negativo de baja LET como el  $^{177}\text{Lu}$ .

### 4.1. Preparación y caracterización fisicoquímica de mrHDL/siRNA-Cy3

Para que la mrHDL pueda transportar y entregar en la célula tumoral el siRNA, de manera eficiente, debe reunir varias características fisicoquímicas importantes, entre las que destacan la forma, el tamaño, la estabilidad de la estructura, la ausencia de fugas del producto transportado y la entrega de la carga útil mediada por receptores [47, 48, 68]. La forma de la NP es decisiva desde el punto de vista fisiológico y farmacológico pues las NP discoidales se metabolizan de manera diferente a las esféricas [48]; el tamaño y la estabilidad de la estructura influyen en el tiempo de circulación sanguínea y el aclaramiento renal [69, 47, 68], el producto transportado no debe fugarse y debe ser entregado a la célula diana mediante el receptor SR-B1 para lograr una acumulación selectiva en el tumor con mínima captación aquellos tejidos sanos que también expresan el receptor SR-B1 como hígado (principal

receptor), riñones, bazo, corazón, aorta, pulmones, médula ósea y órganos esteroideogénicos [69, 70, 71]. Todos estos parámetros influyen en la eficacia terapéutica del agente transportado por la NP [68].

La preparación de la mrHDL se realizó de manera similar a la descrita por Shahzad y col., 2011 [47] con la diferencia de que en lugar de apoA-1 se empleó el MP D-4F (epígrafe 3.1.). Se sabe que la apo A-1 es crucial para garantizar la integridad estructural y la funcionalidad de la mrHDL ya que las diferentes conformaciones que puede adoptar influyen su comportamiento [48], en particular en la unión a los receptores celulares [74]. El MP D-4F utilizado en sustitución de la apo A-1 contiene estructuras helicoidales anfipáticas similares a ésta por lo que se consideró que al sustituir la apo A-1 por este MP no debía variar significativamente la interacción de la mrHDL con los receptores SR-B1 ya que mimetiza ampliamente las propiedades biológicas de la HDL [72]. La introducción del siRNA en la mrHDL se realizó utilizando como modelo el siRNA-Cy3 previamente incubado con polilisina (epígrafe 3.1.) en lugar del siRNA incubado con oligosina que utilizó Shahzad y col [47]. El uso de oligosina (o polilisina) permite neutralizar la alta carga iónica negativa del siRNA debida, principalmente, a los grupos fosfato, e inducirle mayor estabilidad. El resto de los componentes (fosfatidil colina, colesterol y ésteres de colestrilo) de la rHDL se mantuvo sin variaciones (figura 3.1) Los resultados de caracterización de las mrHDL obtenidas se detallan a continuación.

#### 4.1.1. Espectrometría UV-Vis

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica valiosa para evaluar los componentes de una mezcla siempre que sus bandas de absorción no se superpongan. En la figura 4.1A se muestran los espectros UV-Vis de los componentes de la mrHDL por separado y de la NP cargada con el siRNA-Cy3. El espectro de la polilisina muestra la fuerte banda de 225 nm característica de los aminoácidos no aromáticos disueltos en agua [73]. Esta banda de 225 nm se debe también al corrimiento batocrómico que sufren los enlaces amida ( $\lambda_{max} < 200$  nm) que se forman durante la polimerización de la lisina [76]. Aunque no se aprecia con claridad en la figura, también está presente una banda muy débil a 270-280 nm que se extiende hasta 360 nm, y que se debe también a la polilisina [73].

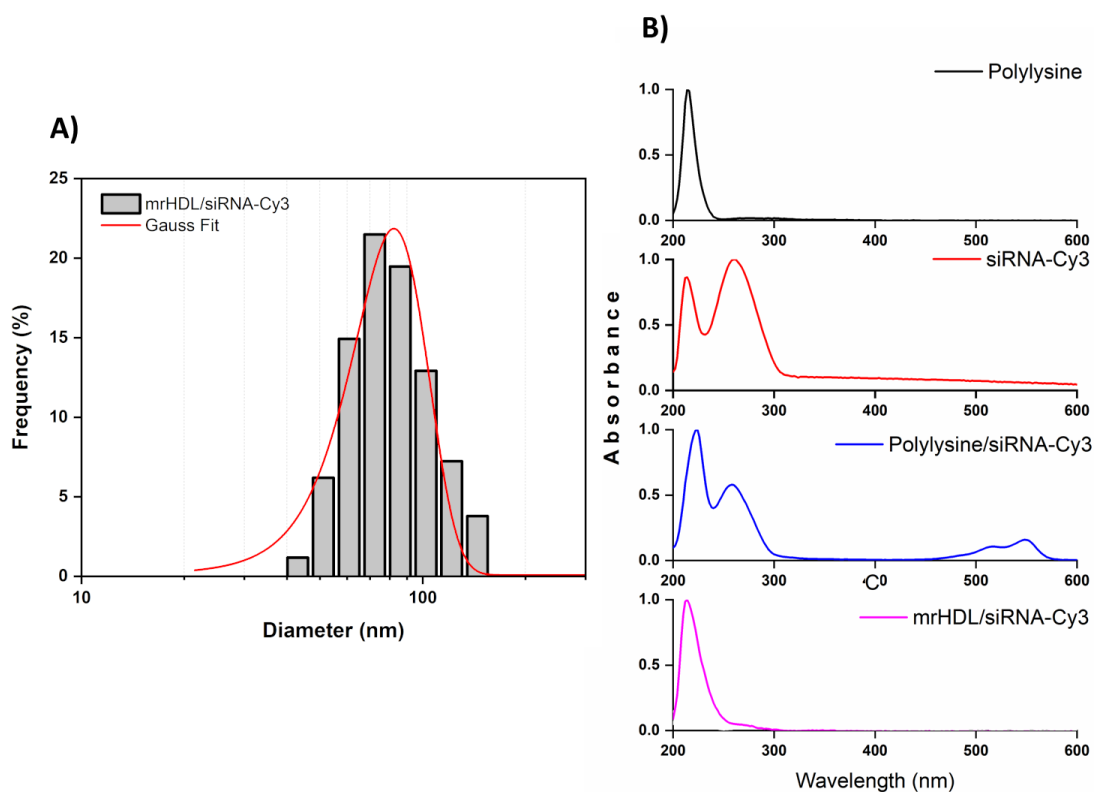
El espectro del siRNA-Cy3 muestra dos picos bien definidos uno a 210- 220 nm y el segundo a 270 nm. El pico de 210-220 nm se debe a la presencia de Cy3, cuya absorción a esta longitud de onda ha sido reportada, aunque su principal absorción se encuentra a 553 nm, donde las cianinas absorben preferentemente [74, 75]. La no observancia del pico de 553 nm característico del Cy3 pudiera estar relacionada con (a) los cambios que se producen debido a su interacción con el siRNA o (b) una baja concentración de siRNA-Cy3 en la solución. El pico de 270 nm, característico del siRNA [76], indica que ambas moléculas (siRNA y Cy3) están unidas. El espectro del conjugado siRNA-Cy3 con la polilisina (polilisina/siRNA-Cy3) (4.1A) revela nuevamente los picos de 210-220nm y 270 nm observados en las soluciones de polilisina y de siRNA-Cy3, así como el hombro de 520 nm y el pico de 553 nm característicos del Cy3 [77]. Sin embargo, una vez que este complejo polilisina/siRNA-Cy3 se introduce en la mrHDL no es posible distinguirlo mediante UV-Vis ya que el espectro muestra solamente una fuerte banda cercana a 225 nm debida a la unión de las bandas de la polilisina (225 nm), el siRNA-Cy3 (210-220 nm) y el colesterol (230-235 nm, según [77]) que forman parte de la mrHDL. La banda de 270 nm del complejo siRNA-Cy3



se observa en forma de un hombro muy débil que sugiere que la carga de polilisina/siRNA-Cy3 introducida en la mrHDL fue muy pequeña.

#### 4.1.2. Tamaño de partícula

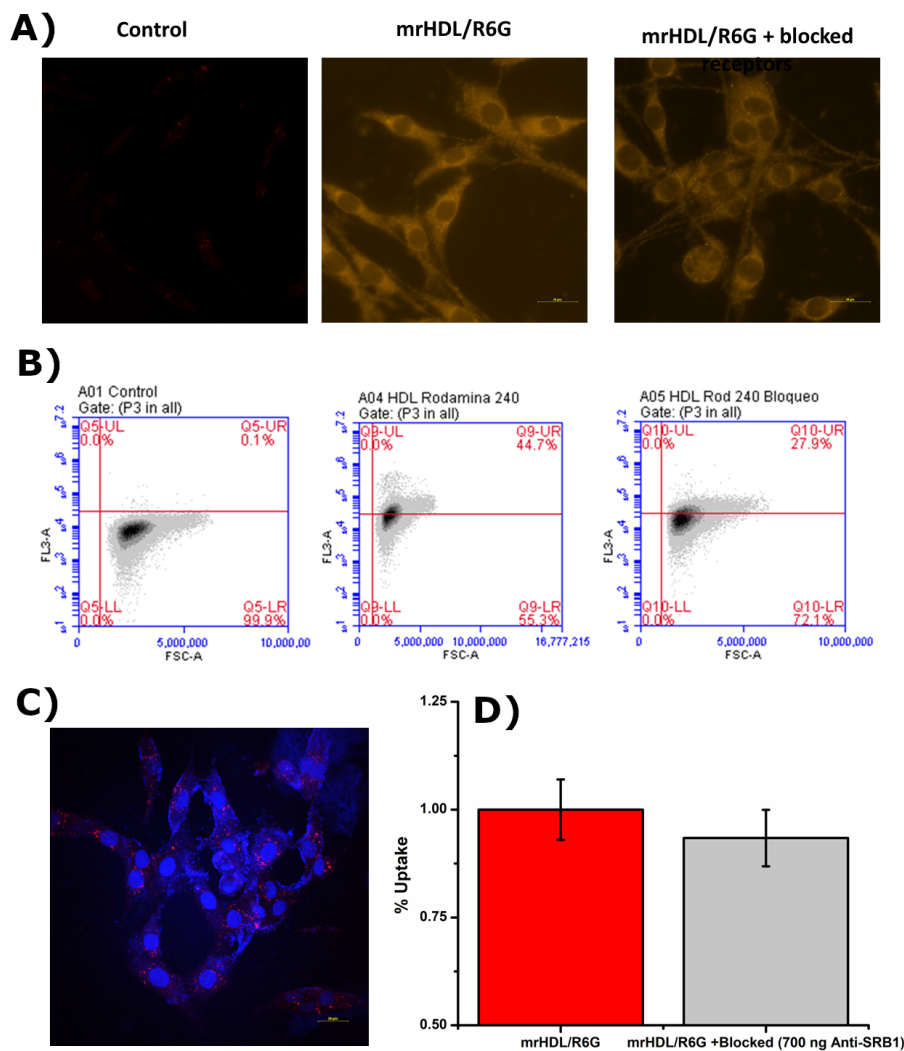
Las mrHDL cargadas con siRNA-Cy3 (mrHDL/siRNA-Cy3) se obtuvieron con un tamaño de  $49.08 \pm 4.40$  nm y un índice de polidispersidad de 0.39 (figura 4.1A). Este tamaño, muy homogéneo, es adecuado para atravesar las fenestraciones de los vasos sanguíneos de los tumores cuyo diámetro se encuentra entre 40 y 200 nm [68]. Igualmente resulta adecuado para permanecer durante un tiempo prolongado en circulación y evitar la eliminación renal rápida [68], características muy deseables para aplicaciones terapéuticas.



**Figura 4.1:** Preparación y caracterización fisicoquímica del sistema mrHDL/siRNA. A) Tamaños de partícula del sistema mrHDL/siRNA-Cy3. B) Espectros UV-Vis correspondientes a la poli-lisina, siRNA-Cy3, al complejo siRNA-poli-lisina y al sistema mrHDL/siRNA-Cy3.

### 4.1.3. Evaluación *in vitro* de la liberación de la carga contenida en el núcleo de la mrHDL

Para comprobar si la sustitución de la apoA-1 por el MP D-4F no varió de modo significativo las características biológicas de la mrHDL preparada se realizó un ensayo *in vitro* para determinar si la carga transportada por la mrHDL en su núcleo interno se internaliza en la célula. El mecanismo de internalización de la carga contenida en el núcleo de la rHDL más aceptado es la vía endocítica mediada por el receptor SR-B1 [78, 79].



**Figura 4.2:** Internalización de la R6G transportada en mrHDL en células de cáncer T47D. A) Imagen de microscopía de fluorescencia de las células tratadas con mrHDL/R6G. B) Imagen de la citometría de flujo de las células tratadas con mrHDL/R6G obtenida con un conteo de 50 000 células. C) Microscopía confocal de las T47D tratadas con mrHDL/R6G donde puede apreciarse con mayor nitidez la internalización de la R6G. D) Internalización de la R6G en células T47D tratadas con mrHDL/R6G sin bloqueo de los receptores SR-B1 y con bloqueo de los receptores mediante adición de 700 ng de un anticuerpo de SR-B1.

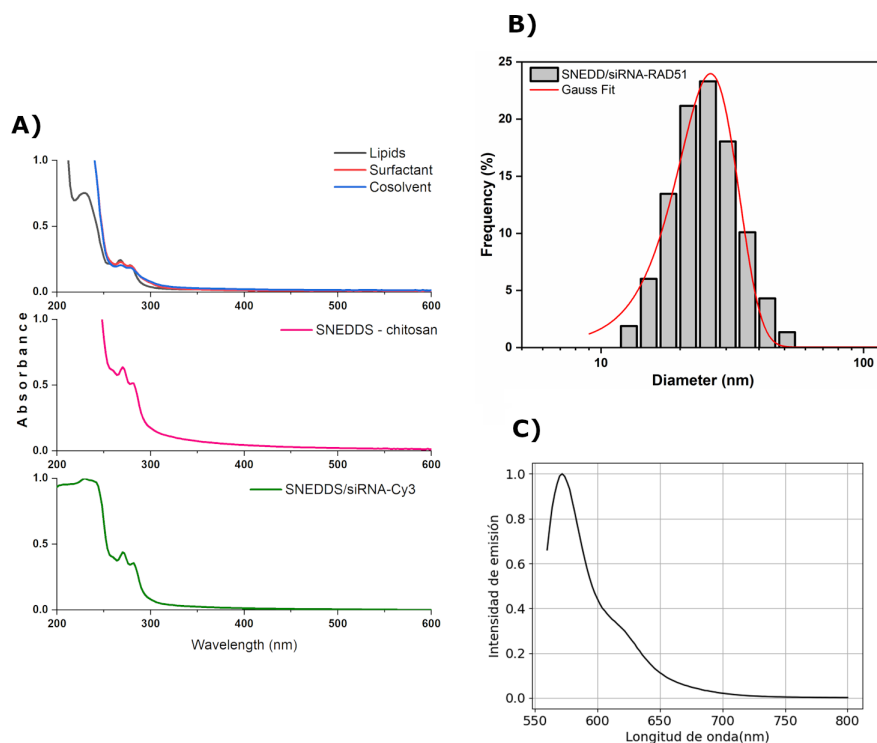
Para el ensayo se utilizaron células T47D de cáncer de mama cuya alta expresión de receptores SR-B1 es conocida. Se prepararon mrHDL cargadas con R6G (mrHDL/R6G) en lugar de siRNA-Cy3. La R6G es un trazador fluorescente muy utilizado para ensayos de internalización celular pues tiende a acumularse en las mitocondrias con alto grado de especificidad, sin afectar las propiedades biológicas de la nanopartícula [79]. Sus propiedades fluorescentes permiten evaluar la internalización celular, de manera sencilla, por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Los resultados del experimento se muestran en la figura 4.2.

Como se aprecia en la figura 4.2A la mrHDL, es capaz de liberar en el interior de las células la R6G transportada en su núcleo. En la figura se aprecia un patrón difuso que sugiere que la R6G no solo se ha acumulado en la mitocondria, sino también en otros compartimentos subcelulares. La imagen de microscopía confocal (figura 4.2C) permite apreciar con mayor nitidez la acumulación interna de la R6G. Tal resultado es similar al reportado en [79] donde se evaluó la liberación in vitro de R6G encapsulada en rHDL reconstruida con apoA-1, lo que indica que el MP D-4F utilizado no modificó de modo significativo las propiedades de la mrHDL con relación a la rHDL preparada con la apoA-1 completa. Las células control no muestran autofluorescencia, en tanto que cuando los receptores SR-B1 se bloquean se observa una menor fluorescencia que demuestra que la internalización de la carga se realiza mediante los receptores. La citometría de flujo (figura 4.2B) muestra idénticos resultados. Al internalizarse la R6G en las células se observa un cambio en el patrón de citometría que se revierte parcialmente cuando una parte de los receptores SR-B1 se bloquea para evitar la internalización. El efecto de bloqueo se aprecia mejor en la figura 4.2D, construida a partir de los resultados de captación celular en ausencia y presencia del bloqueo de los receptores SR-B1. La figura revela que la internalización celular es menor ( $\approx 10\%$ ) cuando se bloquean los receptores SR-B1, lo que confirma el MP D-4F no varió las propiedades biológicas de la NP. Otros autores han reportado similares resultados [72] La mrHDL obtenida es adecuada para transportar siRNA ya que la sustitución de la apoA-1 por el MP D-4F no varió su capacidad de reconocer los receptores celulares y depositar su carga en el interior de la célula, con la ventaja de que los MP son menos sensibles a la contaminación con patógenos que la apoA-1 [80].

Sin embargo, la eficiencia de carga del siRNA-Cy3 en la mrHDL resultó baja (10.3%), lo que hace suponer que al sustituir el siRNA Cy3 por siRNA-RAD-51 también se obtendrá una baja eficiencia de carga. Esta baja eficiencia de carga del siRNA-Cy3 en la mrHDL puede estar relacionada con la polilisina utilizada. Las moléculas de polilisina son más grandes que las de siRNA lo que pudiera haber afectado la estabilidad del complejo polilisina/siRNA-Cy3. Otros autores han empleado lisinas de menor tamaño como la oligolisina [47], o complejos de siRNA con el colesterol (Chol/siRNA) [33, 81]. Se requieren, por tanto, estudios complementarios para evaluar variantes alternativas que incrementen la eficiencia de carga de siRNA en la mrHDL.

## 4.2. Preparación y caracterización fisicoquímica de SNEDDS/siRNA-Cy3

Otra variante de transportadores lipídicos muy utilizados son los SNEDDS, estructuras compuestas por aceites, tensoactivos y cosolventes con gran versatilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad e inmunogenicidad [82, 83]. Los SNEDDS aventajan a las rHDL en (a) su aplicación es oral, lo que resulta más cómodo para los pacientes; (b) la eficiencia de carga del producto a transportar es mayor; y (c) son más fáciles de preparar y escalar [84, 85]. Al igual que la mrHDL, el SNEDDS se preparó cargado con siRNA-Cy3 (SNEDDS/siRNA-Cy3). La preparación y caracterización del SNEDDS/siRNA-Cy3, se basó en el trabajo de Morales-Becerril [19]. A la mezcla de Labrafil <sup>®</sup> M 1944, Phospholipon <sup>®</sup> 90G y Cremophor RH40 se añadió el siRNA-Cy3 en forma de poliplejo con quitosano (siRNA-Cy3-CS). Este complejo de siRNA-Cy3-CS se preparó con el objetivo de incorporar con facilidad el SiRNA-cy3 a la fase oleosa del SNEDDS (3.2. Al igual que en la mrHDL, se obtuvieron los espectros UV-Vis de los componentes aislados del SNEDDS y del nanosistema cargado con el siRNA-Cy3 (Figura 4.3A).



**Figura 4.3:** Preparación y caracterización fisicoquímica del sistema SNEDDS/siRNA. A) Metodología para la preparación de SNEDDS/siRNA adaptada de [19]. A) Espectros UV-Vis del sistema SNEDDS/siRNA así como de los componentes de los SNEDDS. B) Tamaños de partículas de los SNEDDS/siRNA-Cy3. C) Espectro de emisión del sistema SNEDD/siRNA-Cy3 cuando es irradiado con una luz de longitud de onda de 550nm.

#### 4.2.1. Tamaño de partícula

En la figura 4.3B se muestra la distribución del tamaño del SNEDDS/siRNA-Cy3 (OJO EL SNEDDS QUE APARECE EN LA FIGURA ES CON RAD51, NO CON Cy3). El tamaño promedio de la gota (50 nm) es adecuado para atravesar sin dificultad la mucosa gastrointestinal y estimular la absorción del siRNA-Cy3 acarreado. El índice de polidispersidad (0.41), muestra una buena homogeneidad, indispensable para la estabilidad de la emulsión [19].

#### 4.2.2.

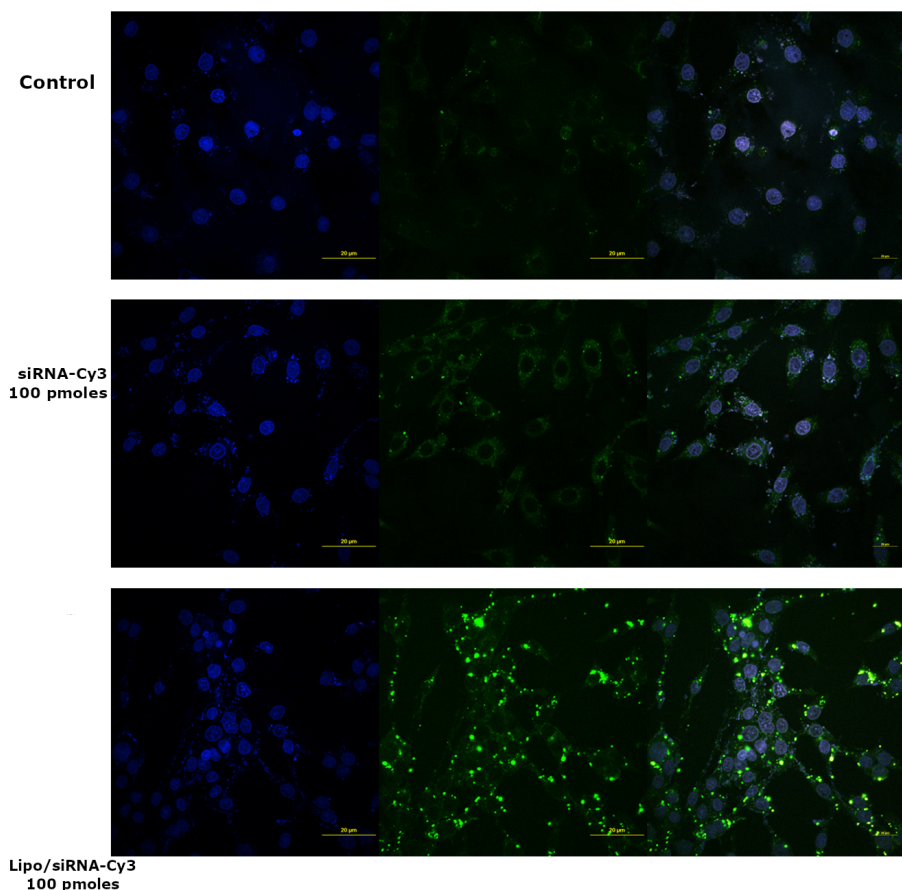
#### 4.2.3. Espectrometría UV-Vis y de Fluorescencia

En la figura 4.3A se muestra el espectro UV-Vis de los componentes aislados del SNEDDS (lípidos, surfactante y codisolvente) y del SNEDDS/siRNA-Cy3. Nuevamente, la espectrometría UV-Vis no permitió observar con nitidez los máximos de absorción de los componentes del sistema debido a que se superponen. Por tal motivo, para evaluar si realmente el siRNA-Cy3 se encontraba dentro del SNEDDS se utilizó un láser de 550 nm para excitar el Cy3 y obtener su espectro de emisión. Como se aprecia en la figura 4.3C la excitación produjo un fuerte máximo de emisión a 560 nm, característico del Cy3 [75] que indica que el siRNA-Cy3 se encuentra formando parte del SNEDDS. La eficiencia de carga del siRNA-Cy3 en el SNEDDS fue del 95 % muy superior al 10.3 % de siRNA-Cy3 cargado en la mrHDL.

### 4.3. Evaluación de la capacidad de transfección de mrHDL/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-Cy3

La terapia génica basada en siRNA es la más utilizada para suprimir la expresión génica y la actividad biológica de una proteína. El siRNA se une con alta selectividad y especificidad a secuencias de genes de mRNA desencadenando la supresión de genes sin alterar las vías endógenas del mRNA diana [86]. Para lograr este efecto, sin embargo, es necesario que el siRNA se libere en el citoplasma de la célula y se una al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) compuesto, a su vez, por un grupo de proteínas encargadas de suprimir la expresión del gen deseado para impedir que el mRNA específico se traduzca a proteína [87].

Para conocer si los nanoacarreadores preparados eran capaces de conducir y facilitar el escape endosómico del siRNA-Cy3 en el citoplasma de las células diana se realizó un ensayo de transfección *in vitro* utilizando células de cáncer de mama T47D. La transfección permite introducir el siRNA en la célula de forma relativamente sencilla. Se diseñó un protocolo de transfección química utilizando como sistema de referencia liposomas (Lipofectamina 2000) cargados también con siRNA-Cy3 (Lipo/siRNA-Cy3). La Lipofectamina 2000 transfecta una amplia variedad de líneas celulares con alta eficiencia y reproducibilidad por lo que se considera el estándar de oro en estudios de transfección *in vitro* [88]. El Cy3 incorporado en la molécula de siRNA permitió evaluar, de manera cualitativa, la eficiencia de la transfección por microscopía de fluorescencia.



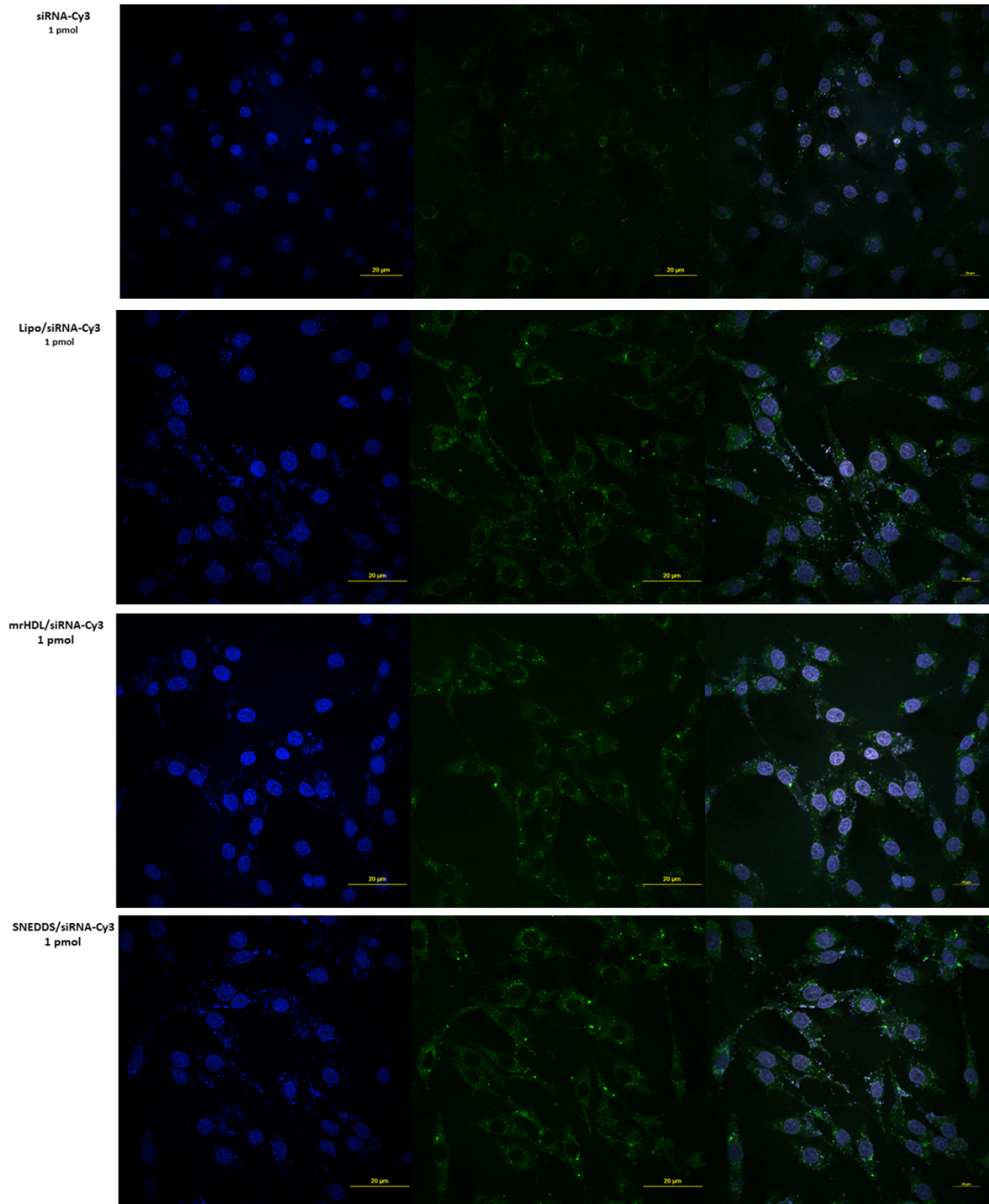
**Figura 4.4:** Microscopía de fluorescencia para células tratadas con control, siRNA-Cy3, Lipo/siRNA-Cy3 utilizando 100pmoles de siRNA-Cy3.

El experimento se ejecutó en dos fases. En la primera (figura 4.4) se determinó si el siRNA-Cy3 puro (reactivo de transfección) y los Lipo/siRNA-Cy3 (control positivo) podían transfectar satisfactoriamente las células T47D. Para ello, las células se incubaron con 100 pmoles de siRNA-Cy3 puro y con liposomas cargados con 100 pmoles de siRNA-Cy3. Como control no transfectado se utilizaron las mismas células en ausencia de siRNA. La figura muestra que el reactivo de transfección es capaz de transfectar las células T47D. Como se esperaba, la eficiencia de transfección de los Lipo/siRNA-Cy3 fue superior a la del siRNA-Cy3 puro. El siRNA-Cy3 puro está cargado negativamente. Como el potencial de membrana plasmática es negativo en el lado interior de la célula (-60 - 30 mV) [89, 90, 91], las moléculas aniónicas como el siRNA-Cy3 no puedan penetrar la membrana celular con facilidad. A esto se une su gran tamaño, su alto peso molecular y su fácil degradación en los lisosomas [92]. Los liposomas, por el contrario, forman con el siRNA agregados lipídicos cargados positivamente que se fusionan con la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular para que el siRNA pueda entrar sin dificultad. Una vez dentro de la célula el siRNA ejerce su efecto terapéutico [93].

Comprobada la posibilidad de transfectar las células T47D con el siRNA-Cy3 se repitió el

#### 4.3 Evaluación de la capacidad de transfección de mrHDL/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-Cy339

experimento utilizando nuevamente siRNA-Cy3 puro, Lipo/siRNA-Cy3, mrHDL/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-Cy3, pero con una concentración de siRNA-Cy3 de 1 pmol. La baja concentración de siRNA-Cy3 utilizada para comparar la capacidad de transfección de los transportadores lipídicos en este segundo experimento fue necesaria debido a la baja eficiencia de carga del siRNA-Cy3 en la mrHDL (10.3%). Los resultados de este segundo experimento se muestran en la figura 4.4. El siRNA-Cy3 puro escasamente penetra al interior de la célula, por las causas ya descritas. Sin embargo, a pesar de la baja concentración de siRNA-Cy3 (1 pmol) utilizada, ambas NP (mrHDL/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-Cy3) pueden transfectar las células T47D. El SNEDDS, incluso, manifiesta una capacidad de transfección ligeramente mayor que los Lipo/siRNA-Cy3 utilizados como control positivo (figura 4.4), debido probablemente a la alta eficiencia de carga obtenida (95%) aunque se requieren experimentos complementarios para confirmarlo. Otros autores han reportado capacidad de transfección de SNEDDS similar a la Lipofectamina 2000 [60] e incluso mayor [88]. El experimento confirmó que tanto la mrHDL como el SNEDDS obtenidos pueden utilizarse para transportar siRNA en su interior en experimentos de silenciamiento de genes ya que son capaces de depositar en el interior de la célula diana el siRNA que transportan. Sin embargo, aunque se demostró previamente que la mrHDL obtenida era capaz de liberar la carga acarreada (R6G) en el interior de las células (epígrafe 4.1.3) debido a la baja eficiencia de carga de siRNA-Cy3 en la mrHDL (10.3%) y teniendo en cuenta que el objetivo final deseado es depositar cantidades apreciables de siRNA en el citosol para que pueda ejercer su efecto silenciador, se decidió continuar la investigación solamente con el SNEDDS/siRNA.



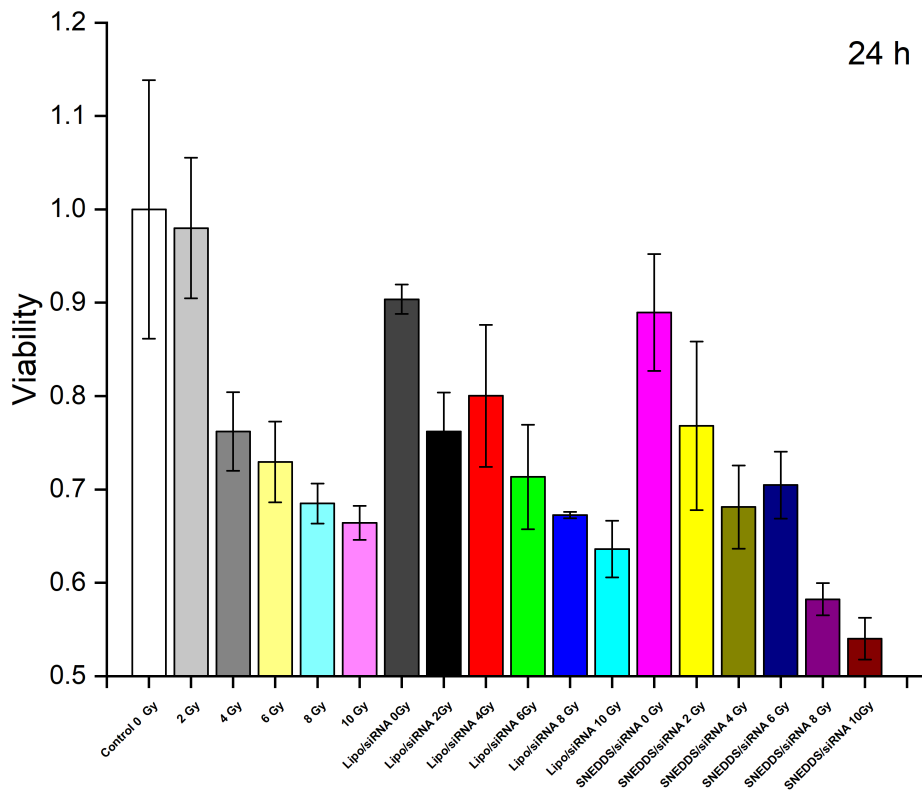
**Figura 4.5:** Microscopia de fluorescencia en células de cáncer T47D con distintos tratamientos: siRNA puro, Lipo/siRNA-Cy3, mrHDL/siRNA-Cy3 y SNEDDS/siRNA-Cy3.



## 4.4. Evaluación de la radiosensibilidad

### 4.4.1. Ensayo de viabilidad celular

Comprobado que el SNEDDS/siRNA-Cy3 era capaz de transfectar con alta eficiencia las células T47D se preparó SNEDDS/siRNA-RAD51 y se evaluó su capacidad de radiosensibilizar las células T47D frente a la radiación del  $^{177}\text{Lu}$ . Para ello se realizó un ensayo de viabilidad celular en el que las células fueron tratadas previamente con SNEDDS/siRNA-RAD51 y con Lipo/siRNA-RAD51 (control positivo) y luego sometidas a diferentes dosis de  $^{177}\text{Lu}$ . Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento previo. El reactivo cromogénico utilizado fue XTT. Los resultados del experimento se muestran en la figura 4.6.



**Figura 4.6:** Ensayo de viabilidad celular con XTT en células de cáncer T47D con Liposomas/siRNA-RAD51 y SNEDDS/siRNA-RAD51 expuestos a distintas actividades de  $^{177}\text{Lu}$ .

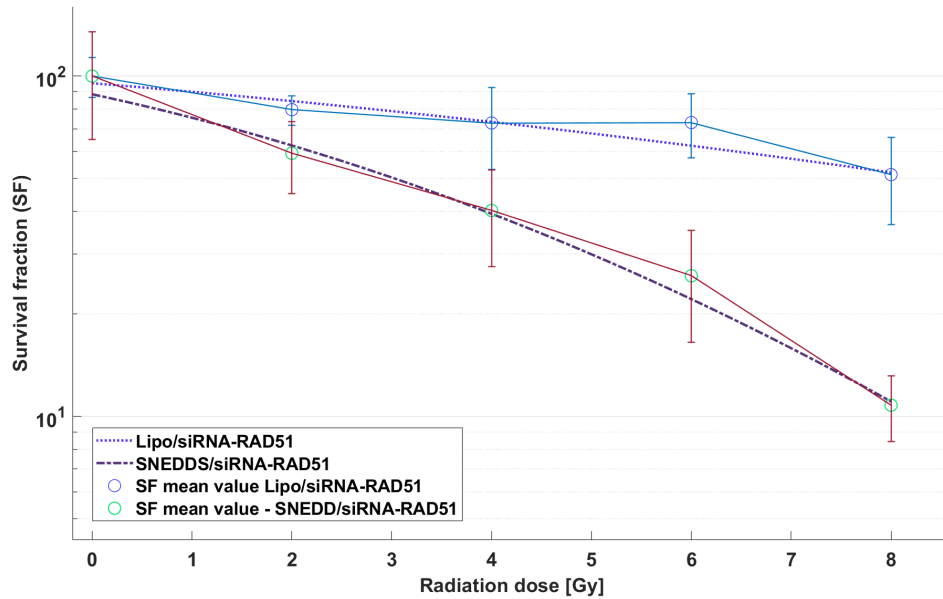
Como se observa en la figura 4.6 en ausencia de radiación (0Gy) no hay diferencias significativas en la viabilidad de las células pretratadas con Lipo/siRNA-RAD51 y SNEDDS/siRNA-RAD51 con relación a las células sin pretratamiento. Para dosis entre 2Gy y 6Gy tampoco se observa una variación significativa entre las células pretratadas con siRNA-RAD51 y las células sin tratamiento previo, pero a 8Gy y 10Gy las células pretratadas con SNEDDS/siRNA-RAD51 muestran una viabilidad inferior al 60 % en tanto que la viabilidad del resto de los grupos está por encima, lo que indica que el silenciamiento génico inducido por el siRNA-RAD51 favorece la radiosensibilidad de

las células pues evita la reparación del ADN, lo que provoca mayor muerte celular y contrarresta los mecanismos de radioresistencia de las células de cáncer T47D empleadas [1, 2, 4]. Se ha descrito que la activación de los mecanismos de reparación celular depende de la magnitud del daño producido [94]. A dosis pequeñas, donde el daño inducido por la radiación es menor, la célula puede ser capaz de reparar parcial o totalmente el daño producido, aun en presencia de siRNA-RAD51. Sin embargo, a dosis mayores (8Gy, 10Gy) la influencia del siRNA-RAD51 introducido impide la reparación celular. Una desventaja del método utilizado es que no permite conocer la cinética de la capacidad de reparación y formación de colonias de las células irradiadas. Por este motivo, se procedió a realizar un ensayo clonogénico. Estos ensayos se desarrollaron para evaluar la capacidad de células tumorales para proliferar y formar colonias después de ser tratadas con un agente citotóxico como las radiaciones ionizantes.

#### 4.4.2. Ensayo Clonogénico

Los ensayos clonogénicos para evaluar in vitro la respuesta celular a las radiaciones ionizantes permiten conocer la capacidad de replicación celular después de un tratamiento con radiaciones en función de la dosis de radiación aplicada [94, 95]. Se consideran el estándar de oro en los ensayos de radiosensibilidad ya que las células destinadas a morir pueden sufrir una o más divisiones celulares después de la irradiación, por lo que la corta duración de los experimentos colorimétricos puede sobreestimar la supervivencia celular [96]. Tiene el inconveniente de que depende de la capacidad clonogénica de las células que se evalúan [96]. El tiempo de demora para la resiembra suele ser de entre 6 y 24 h para que se complete la reparación del daño letal.

Para interpretar los ensayos clonogénicos se han utilizado distintos modelos matemáticos, aunque el que más se aplica en la clínica es el lineal cuadrático (LQ). Este modelo establece que la inactivación celular después de la irradiación se puede describir mediante la ecuación  $SF(D) = e^{(-\alpha D - \beta D^2)}$  (ecuación 2.1), donde SF es la fracción de supervivencia, y los parámetros  $\alpha$  ( $Gy^{-1}$ ) y  $\beta$  ( $Gy^{-2}$ ) representan la radiosensibilidad intrínseca de las células irradiadas.  $\alpha D$  representa la probabilidad de muerte celular causada por el daño a las dos cadenas de ADN producido por un solo cuanto de radiación (o partícula) incidente mientras que  $\beta D^2$  representa la probabilidad de muerte celular debida a la incidencia de dos o más cuantos (o partículas), cada uno de los cuales daña una sola cadena, lo suficientemente juntas para producir el mismo efecto que el rompimiento de la doble cadena [97]. El modelo asume que la muerte celular se debe a que los impactos de la radiación dañan el ADN de la célula y son proporcionales a la dosis de radiación. Si la fracción de supervivencia  $SF(D)$  se representa en una escala logarítmica, se obtiene una curva de respuesta cuadrática, que tiene una región inicial dominada por el término lineal a dosis bajas, seguida de una curvatura creciente para dosis más grandes. El grado de curvatura se define en términos de la relación  $\alpha/\beta$ , término que es una medida de la sensibilidad fraccionada de las células [98]. A mayor índice  $\alpha/\beta$  mayor es la resistencia de la célula a la radiación.



**Figura 4.7:** Curvas de supervivencia obtenidas a partir del ensayo clonogénico en células de cáncer T47D usando como tratamiento a los sistemas Lipo/siRNA-RAD51 y SNEDDS/siRNA-RAD51.

A partir del ensayo clonogénico se obtuvieron las curvas de supervivencia correspondientes a los sistemas Lipo/siRNA-RAD51 y SNEDDS/siRNA-RAD51, que se muestran en la figura 4.7. Como se observa en la figura la relación  $\alpha/\beta$  en las células pretratadas con Lipo/siRNA-RAD51A es mayor que la de las células pretratadas con SNEDDS/siRNA-RAD51 lo que indica que el SNEDDS induce mayor radiosensibilidad. La mayor curvatura que se observa en las células pretratadas con el SNEDDS indica una mayor letalidad de las células. Este resultado está acorde con el ensayo previo de transfección realizado (epígrafe 4.3) en el que se constató una mayor transfección de siRNA en las células expuestas a los SNEDDS (figuras 4.4 y 4.5).



## Capítulo 5

# Conclusiones

- La sustitución de la apoA-1 por el péptido mimético MP D4F para obtener mrHDL no compromete el comportamiento biológico de la rHDL. La mrHDL obtenida internaliza la carga acarreada en el núcleo a través de los receptores SR-B1 sobreexpresados en la membrana de células T47D de cáncer de mama. Sin embargo, debido a la baja eficiencia de carga de siRNA en la mrHDL obtenida es necesario encontrar otras formulaciones que mejoren este parámetro.
- El SNEDDS preparado a base de Phospholipon® 90 G (21%), Labrafil® M 1944 CS (39%) y Cremophor RH 40 (40%), al que se incorporó siRNA en forma de complejo con quitosano (siRNA-CS), es capaz de transfectar siRNA en células T47D de forma eficiente. La mayor transfección celular del siRNA-RAD51 inducida por el SNEDDS en comparación con la Lipofectamina 2000 indujo mayor radiosensibilidad celular ante la irradiación con  $^{177}\text{Lu}$ .
- El siRNA RAD51 es efectivo para radiosensibilizar células de cáncer de mama T47D pues inhibe la reparación del ADN y evita la radioresistencia.



# Bibliografía

- [1] Tohru Yamamori y col. “ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51”. En: *FEBS Letters* (2013).
- [2] Hayley L Rein, Kara A Bernstein y Robert A Baldock. “RAD51 paralog function in replicative DNA damage and tolerance”. En: *Current Opinion in Genetics and Development* 71 (dic. de 2021), págs. 86-91. ISSN: 0959437X. DOI: C.
- [3] Erica J Polleys y Catherine H Freudenreich. “Homologous recombination within repetitive DNA”. En: *Current Opinion in Genetics and Development* 71 (dic. de 2021), págs. 143-153. ISSN: 0959437X. DOI: 10.1016/j.gde.2021.08.005.
- [4] Erik Laurini y col. “Role of Rad51 and DNA repair in cancer: A molecular perspective”. En: *Pharmacology and Therapeutics* (2020).
- [5] Christopher M Hine, Andrei Seluanov y Vera Gorbunova. “Rad51 Promoter-Targeted Gene Therapy Is Effective for In Vivo Visualization and Treatment of Cancer”. En: *Molecular Therapy* 20 (2012).
- [6] Dan Li y col. “Rod-shaped polypeptide nanoparticles for siRNA delivery”. En: *International Journal of Biological Macromolecules* (2020).
- [7] Jonathan J. Chou y col. “A design approach for layer-by-layer surface-mediated siRNA delivery”. En: *Acta Biomaterialia* 135 (nov. de 2021), págs. 331-341. ISSN: 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.08.042.
- [8] Ze Liang y col. “Targeted-delivery of siRNA via a polypeptide-modified liposome for the treatment of gp96 over-expressed breast cancer”. En: *Materials Science and Engineering: C* 121 (feb. de 2021), pág. 111847. ISSN: 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111847.
- [9] Ghanbar Mahmoodi Chalbatani, Hassan Dana y Elahe Gharagouzloo. “Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach”. En: *International journal of nanomedicine* (2019). DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S200253>.
- [10] Sanket Shah y col. “Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process”. En: *Advanced Drug Delivery Reviews* 154-155 (2020), págs. 102-122. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2020.07.002.
- [11] Sriwido y col. “Liposome-polymer complex for drug delivery system and vaccine stabilization”. En: *Heliyon* 8 (2 feb. de 2022), e08934. ISSN: 24058440. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e08934.

- [12] Alison J. Lin y col. “Three-Dimensional Imaging of Lipid Gene-Carriers: Membrane Charge Density Controls Universal Transfection Behavior in Lamellar Cationic Liposome-DNA Complexes”. En: *Biophysical Journal* 84 (5 mayo de 2003), págs. 3307-3316. ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)70055-1.
- [13] Jens B Simonsen. “Evaluation of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) as a drug-delivery platform – a detailed survey of rHDL particles ranging from biophysical properties to clinical implications”. En: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (2016). DOI: 10.1016/j.nano.2016.05.009.
- [14] Yang Ding y col. “A biomimetic nanovector-mediated targeted cholesterol-conjugated siRNA-delivery for tumor gene therapy”. En: *Biomaterials* (2012). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.057.
- [15] Xuelei Song y col. “An apoA-I mimetic peptide facilitates off-loading cholesterol from HDL to liver cells through scavenger receptor BI”. En: *International Journal of Biological Sciences* (2009), págs. 637-646. ISSN: 1449-2288. DOI: 10.7150/ijbs.5.637.
- [16] Mohamad Navab y col. “Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides”. En: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (7 jul. de 2005), págs. 1325-1331. ISSN: 1079-5642. DOI: 10.1161/01.ATV.0000165694.39518.95.
- [17] Tasmina Kanwal y col. “Design of absorption enhancer containing self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for curcumin improved anticancer activity and oral bioavailability”. En: *Journal of Molecular Liquids* (2020).
- [18] Md Khalid Anwer y col. “Improved antimicrobial activity and oral bioavailability of delafloxacin by self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS)”. En: *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 64 (ago. de 2021), pág. 102572. ISSN: 17732247. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102572.
- [19] Aideé Morales Becerril. “Desarrollo y caracterización de un sistema auto-nanoemulsionante de liberación de siRNA”. Universidad Autónoma del Estado de México, 2021.
- [20] Shalini Guha y Sukesh R. Bhaumik. “Transcription-coupled DNA double-strand break repair”. En: *DNA Repair* 109 (ene. de 2022), pág. 103211. ISSN: 15687864. DOI: 10.1016/j.dnarep.2021.103211.
- [21] Andrey Bushmanov y col. “Utilization of DNA double-strand breaks for biodosimetry of ionizing radiation exposure”. En: *Environmental Advances* 8 (jul. de 2022), pág. 100207. ISSN: 26667657. DOI: 10.1016/j.envadv.2022.100207.
- [22] Harry O King y col. “RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells”. En: *Stem Cell Reports* (2017).
- [23] Susan F. Martinez y col. “Targeting human Rad51 by specific DNA aptamers induces inhibition of homologous recombination”. En: *Biochimie* 92 (12 dic. de 2010), págs. 1832-1838. ISSN: 03009084. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.08.006.
- [24] Idit Hazan y Jonathan Monin. “Activation of Oncogenic Super-Enhancers Is Coupled with DNA Repair by RAD51”. En: *Cell Reports* (2019).



- [25] A. Demeyer y col. "Inhibiting homologous recombination by targeting RAD51 protein". En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1876 (2 dic. de 2021), pág. 188597. ISSN: 0304419X. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188597.
- [26] C Cruz y col. "RAD51 foci as a functional biomarker of homologous recombination repair and PARP inhibitor resistance in germline BRCA-mutated breast cancer". En: *Annals of Oncology* 29 (5 2018), págs. 1203-1210.
- [27] Nagaraj S Nagathihalli y Ganesh Nagaraju. "RAD51 as a potential biomarker and therapeutic target for pancreatic cancer". En: *Biochimica et Biophysica Acta* (2011).
- [28] Benjamin Schwarza y col. "Nanoscopic analysis of 53BP1, BRCA1 and Rad51 reveals new insights intemporal progression of DNA-repair and pathway choice". En: *Mutat Res Fund Mol Mech Mutagen* (2019).
- [29] Ray K.M. Leung y Paul A. Whittaker. "RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics". En: *Pharmacology and Therapeutics* 107 (2 ago. de 2005), págs. 222-239. ISSN: 01637258. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.03.004.
- [30] Maneesh Gujrati y Zheng-Rong Lu. *Chapter 4 - Targeted Systemic Delivery of Therapeutic siRNA*. Ed. por Edmund C Lattime y Stanton L Gerson. Third Edition. Academic Press, 2014, págs. 47-65.
- [31] Debabrata Senapatia y col. "Promising approaches of small interfering RNAs (siRNAs) mediated cancer gene therapy". En: *Gene* (2019).
- [32] Ana Rita Sousa y col. "Nanotechnology-based siRNA delivery strategies for metastatic colorectal cancer therapy". En: *International Journal of Pharmaceutics* (2019).
- [33] Penghui Zhang y col. "Recent advances in siRNA delivery for cancer therapy using smart nanocarriers". En: *Drug Discovery Today* (2018).
- [34] Yoshiyuki Hattori y col. "Optimized combination of cationic lipids and neutral helper lipids incationic liposomes for siRNA delivery into the lung by intravenous injectionof siRNA lipoplexes". En: *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (2019).
- [35] Yu-Kyoung Oh y Tae Gwan Park. "siRNA delivery systems for cancer treatment". En: *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (10 ago. de 2009), págs. 850-862. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2009.04.018.
- [36] Nataša Avramović y col. "Polymeric Nanocarriers of Drug Delivery Systems in Cancer Therapy". En: *Pharmaceutics* 12 (2020). DOI: 10.3390/pharmaceutics12040298.
- [37] Yuvraj Singh y col. "Bridging small interfering RNA with giant therapeutic outcomes using nanometric liposomes". En: *Journal of Controlled Release* 220 (dic. de 2015), págs. 368-387. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.050.
- [38] Masaharu Somiya y col. "Cytoplasmic delivery of small interfering RNA by photoresponsive non-cationic liposomes". En: *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 63 (jun. de 2021), pág. 102488. ISSN: 17732247. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102488.
- [39] Rui Sang y col. "Liposome technologies towards colorectal cancer therapeutics". En: *Acta Biomaterialia* 127 (jun. de 2021), págs. 24-40. ISSN: 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.03.055.

- [40] Diana Guimarães, Artur Cavaco-Paulo y Eugénia Nogueira. “Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications”. En: *International Journal of Pharmaceutics* 601 (mayo de 2021), pág. 120571. ISSN: 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120571.
- [41] Hamdi Nsairat y col. “Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications”. En: *Heliyon* 8 (5 mayo de 2022), e09394. ISSN: 24058440. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
- [42] Chunyan Liu y col. “Barriers and Strategies of Cationic Liposomes for Cancer Gene Therapy”. En: *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* 18 (sep. de 2020), págs. 751-764. ISSN: 23290501. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.07.015.
- [43] Kai K. Ewert y col. “Cationic Liposomes as Vectors for Nucleic Acid and Hydrophobic Drug Therapeutics”. En: *Pharmaceutics* 13 (9 ago. de 2021), pág. 1365. ISSN: 1999-4923. DOI: 10.3390/pharmaceutics13091365.
- [44] Mohammad A. Obeid y col. *Lipid-based nanoparticles for cancer treatment*. Elsevier, 2018, págs. 313-359. DOI: 10.1016/B978-0-12-813687-4.00008-6.
- [45] Robert H. Mo y col. “Effects of Lipofectamine 2000/siRNA Complexes on Autophagy in Hepatoma Cells”. En: *Molecular Biotechnology* 51 (1 mayo de 2012), págs. 1-8. ISSN: 1073-6085. DOI: 10.1007/s12033-011-9422-6.
- [46] Helena Sork y col. “Lipid-based Transfection Reagents Exhibit Cryo-induced Increase in Transfection Efficiency”. En: *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 5 (2016), e290. ISSN: 21622531. DOI: 10.1038/mtna.2016.8.
- [47] Mian M K Shahzad y col. “Targeted Delivery of Small Interfering RNA Using Reconstituted High-Density Lipoprotein Nanoparticles”. En: *Neoplasia* 13 (4 2011), 309-IN8.
- [48] Andras G Lacko y col. “HDL as a drug and nucleic acid delivery vehicle”. En: *Frontiers in Pharmacology* (2015).
- [49] Yang Ding y col. “Direct cytosolic siRNA delivery by reconstituted high density lipoprotein for target-specific therapy of tumor angiogenesis”. En: *Biomaterials* (2014).
- [50] Shiva Ganjali y col. “HDL and cancer - causality still needs to be confirmed? Update 2020”. En: *Seminars in Cancer Biology* 73 (ago. de 2021), págs. 169-177. ISSN: 1044579X. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.10.007.
- [51] Pauline Resnier y col. “A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer”. En: *Biomaterials* (2013).
- [52] Xinyi Ma, Qingxiang Song y Xiaoling Gao. “Reconstituted high-density lipoproteins: novel biomimetic nanocarriers for drug delivery”. En: *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8 (1 ene. de 2018), págs. 51-63. ISSN: 22113835. DOI: 10.1016/j.apsb.2017.11.006.
- [53] Mi Yang y col. “Efficient Cytosolic Delivery of siRNA Using HDL-Mimicking Nanoparticles”. En: *Small* 7 (5 2011), págs. 568-573. DOI: <https://doi.org/10.1002/smll.201001589>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/smll.201001589>.
- [54] Dennis Pedersbaek y col. “The Composition of Reconstituted High-Density Lipoproteins (rHDL) Dictates the Degree of rHDL Cargo- and Size-Remodeling via Direct Interactions with Endogenous Lipoproteins”. En: *Bioconjugate Chemistry* 30 (10 oct. de 2019), págs. 2634-2646. ISSN: 1043-1802. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00552.

- [55] Timo Vuorela y col. “Role of Lipids in Spheroidal High Density Lipoproteins”. En: *PLoS Computational Biology* 6 (10 oct. de 2010), e1000964. ISSN: 1553-7358. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000964.
- [56] R. A. Gangani D. Silva y col. “Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (34 ago. de 2008), págs. 12176-12181. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0803626105.
- [57] Kepa B. Uribe y col. “(r)HDL in theranostics: how do we apply HDL’s biology for precision medicine in atherosclerosis management?” En: *Biomaterials Science* 9 (9 2021), págs. 3185-3208. ISSN: 2047-4830. DOI: 10.1039/D0BM01838D.
- [58] Anna Wolska y col. “Apolipoprotein Mimetic Peptides: Potential New Therapies for Cardiovascular Diseases”. En: *Cells* 10 (3 mar. de 2021), pág. 597. ISSN: 2073-4409. DOI: 10.3390/cells10030597.
- [59] Rafique M. Islam y col. “Structural properties of apolipoprotein A-I mimetic peptides that promote ABCA1-dependent cholesterol efflux”. En: *Scientific Reports* 8 (1 dic. de 2018), pág. 2956. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-018-20965-2.
- [60] Sabine Hauptstein, Felix Prüfert y Andreas Bernkop-Schnürch. “Self-nanoemulsifying drug delivery systems as novel approach forpDNA drug delivery”. En: *International Journal of Pharmaceutics* (2015).
- [61] Khaled AboulFotouh y col. “Role of self-emulsifying drug delivery systems in optimizing the oral delivery of hydrophilic macromolecules and reducing interindividual variability”. En: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2018).
- [62] H el ene Riquier y col. “Comparison of X-ray and alpha particle effects on a human cancer and endothelial cells: Survival curves and gene expression profiles”. En: *Radiotherapy and Oncology* 106 (3 mar. de 2013), págs. 397-403. ISSN: 01678140. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.02.017.
- [63] Yaser H. Gholami y col. “Comparison of radiobiological parameters for 90Y radionuclide therapy (RNT) and external beam radiotherapy (EBRT) in vitro”. En: *EJNMMI Physics* 5 (1 dic. de 2018), pág. 18. ISSN: 2197-7364. DOI: 10.1186/s40658-018-0217-8.
- [64] Harminder Kaur y col. “In vitro studies on radiosensitization effect of glucose capped gold nanoparticles in photon and ion irradiation of HeLa cells”. En: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 301 (abr. de 2013), págs. 7-11. ISSN: 0168583X. DOI: 10.1016/j.nimb.2013.02.015.
- [65] Raizulnasuha Abdul Rashid y col. “Radiosensitization effects and ROS generation by high Z metallic nanoparticles on human colon carcinoma cell (HCT116) irradiated under 150 MeV proton beam”. En: *OpenNano* 4 (2019), pág. 100027. ISSN: 23529520. DOI: 10.1016/j.onano.2018.100027.
- [66] Juan C. Alamilla-Presuel y col. “Factors and molecular mechanisms of radiation resistance in cancer cells”. En: *International Journal of Radiation Biology* 98 (8 ago. de 2022), págs. 1301-1315. ISSN: 0955-3002. DOI: 10.1080/09553002.2022.2047825.
- [67] Jehad F. Alhmodud y col. “DNA Damage/Repair Management in Cancers”. En: *Cancers* 12 (4 abr. de 2020), pág. 1050. ISSN: 2072-6694. DOI: 10.3390/cancers12041050.

- [68] Randa Zein, Wissam Sharrouf y Kim Selting. “Physical Properties of Nanoparticles That Result in Improved Cancer Targeting”. En: *Journal of Oncology* 2020 (jul. de 2020), págs. 1-16. ISSN: 1687-8450. DOI: 10.1155/2020/5194780.
- [69] Rui Kuai y col. “High-Density Lipoproteins: Nature’s Multifunctional Nanoparticles”. En: *ACS Nano* 10 (3 mar. de 2016), págs. 3015-3041. ISSN: 1936-0851. DOI: 10.1021/acsnano.5b07522.
- [70] Wen-Jun Shen, Salman Azhar y Fredric B. Kraemer. “SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux”. En: *Annual Review of Physiology* 80 (1 feb. de 2018), págs. 95-116. ISSN: 0066-4278. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021317-121550.
- [71] Yijun Mei y col. “Reconstituted high density lipoprotein (rHDL), a versatile drug delivery nanoplatform for tumor targeted therapy”. En: *Journal of Materials Chemistry B* 9 (3 2021), págs. 612-633. ISSN: 2050-750X. DOI: 10.1039/D0TB02139C.
- [72] David O. Osei-Hwedie y col. “Apolipoprotein mimetic peptides: Mechanisms of action as anti-atherogenic agents”. En: *Pharmacology and Therapeutics* 130 (1 abr. de 2011), págs. 83-91. ISSN: 01637258. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.12.003.
- [73] Luigi Stagi y col. “Thermal Induced Polymerization of <scp>l</scp>-Lysine forms Branched Particles with Blue Fluorescence”. En: *Macromolecular Chemistry and Physics* 222 (20 oct. de 2021), pág. 2100242. ISSN: 1022-1352. DOI: 10.1002/macp.202100242.
- [74] Maksim V. Kvach y col. “A Convenient Synthesis of Cyanine Dyes: Reagents for the Labeling of Biomolecules”. En: *European Journal of Organic Chemistry* 2008 (12 abr. de 2008), págs. 2107-2117. ISSN: 1434193X. DOI: 10.1002/ejoc.200701190.
- [75] Jeffrey T. McPhee y col. “Cy3 in AOT Reverse Micelles I. Dimer Formation Revealed through Steady-State and Time-Resolved Spectroscopy”. En: *The Journal of Physical Chemistry B* 115 (31 ago. de 2011), págs. 9576-9584. ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/jp200126f.
- [76] Giacomo Reina y col. “Graphene oxide size and oxidation degree govern its supramolecular interactions with siRNA”. En: *Nanoscale* 10 (13 2018), págs. 5965-5974. ISSN: 2040-3364. DOI: 10.1039/C8NR00333E.
- [77] NIST. Cholesterol UV-Vis spectrum.
- [78] Sangram Raut y col. “Reconstituted HDL: Drug Delivery Platform for Overcoming Biological Barriers to Cancer Therapy”. En: *Frontiers in Pharmacology* 9 (oct. de 2018). ISSN: 1663-9812. DOI: 10.3389/fphar.2018.01154.
- [79] Marcela A. Ávila-Sánchez y col. “Targeted photodynamic therapy using reconstituted high-density lipoproteins as rhodamine transporters”. En: *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 37 (mar. de 2022), pág. 102630. ISSN: 15721000. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2021.102630.
- [80] Kenneth K. Ng, Jonathan F. Lovell y Gang Zheng. “Lipoprotein-Inspired Nanoparticles for Cancer Theranostics”. En: *Accounts of Chemical Research* 44 (10 oct. de 2011), págs. 1105-1113. ISSN: 0001-4842. DOI: 10.1021/ar200017e.
- [81] Michał Gorzkiewicz y col. “Poly(lysine) Dendrimers Form Complexes with siRNA and Provide Its Efficient Uptake by Myeloid Cells: Model Studies for Therapeutic Nucleic Acid Delivery”. En: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (9 abr. de 2020), pág. 3138. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms21093138.

- [82] María Plaza-Oliver, Manuel Jesús Santander-Ortega y María Victoria. Lozano. “Current approaches in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery”. En: *Drug Delivery and Translational Research* 11 (2 abr. de 2021), págs. 471-497. ISSN: 2190-393X. DOI: 10.1007/s13346-021-00908-7.
- [83] Abdul-Hamid Abubakar Zubair y col. “Lipid Based Drug Delivery System: A Review”. En: *Journal of Applied Life Sciences International* (jul. de 2021), págs. 33-46. ISSN: 2394-1103. DOI: 10.9734/jalsi/2021/v24i330228.
- [84] Yeimy L. Cueto, Wilfrido L. Ortega y Reinaldo G. Sotomayor. “Sistemas de entrega de fármacos autoemulsificables: una plataforma de desarrollo alternativa para la industria farmacéutica colombiana”. En: *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 48 (2 mayo de 2019), págs. 260-313. ISSN: 1909-6356. DOI: 10.15446/rcciquifa.v48n2.82696.
- [85] Boontida Morakul. “Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS): an advancement technology for oral drug delivery”. En: *Pharmaceutical Sciences Asia* 47 (3 2020), págs. 205-220. ISSN: 25868195. DOI: 10.29090/psa.2020.03.019.0121.
- [86] Julia Neumeier y Gunter Meister. “siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects”. En: *Frontiers in Plant Science* 11 (ene. de 2021). ISSN: 1664-462X. DOI: 10.3389/fpls.2020.526455.
- [87] Lu Wang y Yunfeng Yan. “A Review of pH-Responsive Organic-Inorganic Hybrid Nanoparticles for RNAi-Based Therapeutics”. En: *Macromolecular Bioscience* 21 (9 sep. de 2021), pág. 2100183. ISSN: 1616-5187. DOI: 10.1002/mabi.202100183.
- [88] Arshad Mahmood y col. “Cell-penetrating self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral gene delivery”. En: *Expert Opinion on Drug Delivery* 13 (11 nov. de 2016), págs. 1503-1512. ISSN: 1742-5247. DOI: 10.1080/17425247.2016.1213236.
- [89] I Belostotsky y col. “Mitochondrial targeting for photochemotherapy. Can selective tumor cell killing be predicted based on n-octanol/water distribution coefficients?” En: *Biotechnic and Histochemistry* 86 (5 oct. de 2011), págs. 302-314. ISSN: 1052-0295. DOI: 10.3109/10520295.2010.483656.
- [90] Laurie F Mottram y col. “Hydrophobic analogues of rhodamine B and rhodamine 101: potent fluorescent probes of mitochondria in living *C. elegans*”. En: *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 8 (dic. de 2012), págs. 2156-2165. ISSN: 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.8.243.
- [91] Nallely P. Jiménez-Mancilla y col. “Electron transfer reactions in rhodamine: Potential use in photodynamic therapy”. En: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 409 (mar. de 2021), pág. 113131. ISSN: 10106030. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2021.113131.
- [92] Jie Wang y col. “Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers”. En: *The AAPS Journal* 12 (4 dic. de 2010), págs. 492-503. ISSN: 1550-7416. DOI: 10.1208/s12248-010-9210-4.
- [93] Zhi Xiong Chong, Swee Keong Yeap y Wan Yong Ho. “Transfection types, methods and strategies: a technical review”. En: *PeerJ* 9 (abr. de 2021), e11165. ISSN: 2167-8359. DOI: 10.7717/peerj.11165.

- [94] A. Manzano Basalo. “Estudio in vitro de la supervivencia de células tumorales irradiadas con rayos X”. Universidad Politécnica de Madrid, 2019.
- [95] Nicolaas A P Franken y col. “Clonogenic assay of cells in vitro”. En: *Nature Protocols* 1 (5 dic. de 2006), págs. 2315-2319. ISSN: 1754-2189. DOI: 10.1038/nprot.2006.339.
- [96] Bea Pauwels y col. “Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies”. En: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 51 (3 mar. de 2003), págs. 221-226. ISSN: 0344-5704. DOI: 10.1007/s00280-002-0557-9.
- [97] Yaping Zhang y col. “RAD-ADAPT: Software for modelling clonogenic assay data in radiation biology”. En: *DNA Repair* 52 (abr. de 2017), págs. 24-30. ISSN: 15687864. DOI: 10.1016/j.dnarep.2017.02.004.
- [98] Jolanta Marzec y col. “MATLAB®-based fitting method to evaluate survival fractions after multimodal treatment”. En: *Clinical and Translational Radiation Oncology* 10 (mar. de 2018), págs. 36-41. ISSN: 24056308. DOI: 10.1016/j.ctro.2018.03.003.



El Comité Organizador del XII Congreso Nacional y II Internacional  
de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud  
otorga la presente

# CONSTANCIA

a:

Ulises Paredes Hernández, Liliana Aranda Lara, Keila Isaac Olivé,  
Enrique Morales Avila, Cinthia Nayeli Cuero Antolin,  
Edna Divani Gómez Romero

por su valiosa participación con la presentación del cartel intitulado  
“PREPARACIÓN DE UN SISTEMA DE TRANSFECCIÓN DE SIRNA BASADO EN RHDH PARA  
CÉLULAS POSITIVAS AL RECEPTOR SR-B1”  
Puebla, Puebla 09, 10 y 11 de junio de 2022

Dra. Laura Contreras Mioni  
Presidente del Comité Organizador Local  
UPAEP

Dr. Eduardo Tepichin Rodriguez  
Presidente del Comité Organizador Nacional,  
INAOE

# Cell

## siRNA delivery nanosystems based on mimetic HDL and SNEEDS as radiosensitizer strategies --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	siRNA delivery nanosystems based on mimetic HDL and SNEEDS as radiosensitizer strategies
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Keywords:</b>	siRNA-RAD51; gene silencing; mimetic rHDL; autonanoemulsifying delivery systems; radiosensitizer strategies
<b>Corresponding Author:</b>	Liliana Aranda-Lara Universidad Autónoma del Estado de México Facultad de Medicina Toluca, Estado de México MEXICO
<b>First Author:</b>	Ulises Paredes-Hernández
<b>Order of Authors:</b>	Ulises Paredes-Hernández Enrique Morales-Avila Keila Isaac-Olivé Liliana Aranda-Lara
<b>Abstract:</b>	<p>Homologous recombination activates when double strand breaks (DSB) of DNA. Ionizing radiation induces DSB. RAD51 initiates homologous recombination to repair DSB. Expression of RAD51 leading to chemo- or radioresistance. Therapies targeting based on gene silencing is used to sensitize cancer cells to treatments. HDL and SNEEDS transport siRNA. In this project, HDL-mimetics (mHDL) and autonanoemulsifying delivery systems (SNEEDS) loaded with siRNA-RAD51 will be used as pretreatment to evaluate and compare the sensitization induced by siRNARAD51 in presence of low LET radiation. Transfection analysis by fluorescence microscopy indicates that mrHDL/siRNA-Cy3 and SNEEDS/siRNA-Cy3 are capable of releasing siRNA. However, because mrHDL showed low siRNA loading efficiency, it limited the application in viability and clonogenic assays. In the case of SNEEDS/RAD51, these showed a greater effect on viability and colony formation capacity when combined with different doses of Lu-177, compared to the standard transfection method based on cationic liposomes, lipofectamine 2000.</p>
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Suggested Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<b>Original code</b>	No
Does this manuscript report original code?	
<b>Standardized datasets</b>	No
A list of datatypes considered standardized under Cell Press policy is available <a href="#">here</a> . Does this manuscript report new standardized datasets?	