



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Desarrollo galénico de sistemas nanoparticulados
innovadores para uso como vehículos de pequeños ARN de
interferencia (siRNA)**

Farm. Sebastián Ezequiel Pérez

Trabajo de Tesis Doctoral

Prof. Dra. Adriana Carlucci

Directora

Lugar De Trabajo

Cátedra de Tecnología Farmacéutica I

2015

“El conocimiento no es algo separado y que se baste a sí mismo, sino que está envuelto en el proceso por el cual la vida se sostiene y se desenvuelve” (John Dewey)

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

Agradecimientos:

A la Dra. Adriana Carlucci, por su invaluable guía y constante apoyo durante todos estos años de trabajo en conjunto.

A los dos grupos del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB), que colaboraron con la caracterización del comportamiento biológico presentado en este trabajo: a la Dra. Norma Sterin-Speziale y a los Dres. Lucila Pescio y Nicolás Favale de su grupo; también a las Dras. Lorena González y Yamila Gándola, del equipo del Dr. Daniel Turyn.

A mis colegas y compañeros de la cátedra, especialmente a Diego, Romina, Katia y Julieta, por su ayuda y asesoramiento.

A mis amigos, por apoyarme y acompañarme en todo momento durante este recorrido.

A mi familia, por estar siempre, y especialmente a mi hermana Agustina, por no dejar de darme ánimo.

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

Capítulo de libro

“Innovative strategies for breast cancer therapy: concepts and applications”. Lorena González, Ezequiel Monteagudo, **Sebastián E. Pérez**, Yamila Gándola and Adriana M. Carlucci. *The Research and Biology of Cancer* (2013). iConcept Press. Ltd. ISBN: 978-14775549-9-9.

Trabajos originales

“Development, characterization and in vitro evaluation of phosphatidylcholine-sodium cholate-based nanoparticles for siRNA delivery to MCF-7 human breast cancer cells”. **Sebastián Ezequiel Pérez***, Yamila Gándola*, Adriana Mónica Carlucci and Lorena González. *Journal of Nanoparticle Research* (2015) 17, 3, 1-15. * Contribución igualitaria

“Mitogenic effects of phosphatidylcholine nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells”. Yamila B. Gándola, **Sebastián E. Pérez**, Pablo E. Irene, Ana I. Sotelo, Johanna G. Miquet, Gerardo R. Corradi, Adriana M. Carlucci and Lorena González. *BioMed Research International* (2014) Article ID 687037, 13 pages. doi:10.1155/2014/687037.

“Solubility of amphotericin B in water-lecithin-dispersions and lecithin-based submicron emulsions”. Claudia Salerno, **Sebastián Pérez**, Ezequiel Monteagudo, Adriana Carlucci and Carlos Bregni. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* (2013) 26, 189-193.

“Formulation strategies, characterization and *in vitro* evaluation of lecithin-based nanoparticles for siRNA delivery”. **Sebastián Ezequiel Pérez**, Yamila Gandola, Adriana Mónica Carlucci, Lorena Gonzalez, Daniel Turyn, and Carlos Bregni. *Journal of Drug delivery* (2012) Article ID 986265, 9 pages. doi:10.1155/2012/986265.

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

Índice

1	INTRODUCCION	10
1.1	Nanotecnología farmacéutica	10
1.1.1	Nanotecnología en terapia oncológica	10
1.1.2	Vectores nanotecnológicos propuestos para uso en oncología	14
1.1.3	Nanopartículas para diagnóstico por imágenes y terapia oncológica	17
1.2	Vectores nanotecnológicos usados	22
1.2.1	Caracterización fisicoquímica de sistemas conteniendo fosfatidilcolina	22
1.2.2	Influencia de la naturaleza del medio en la transición vesícula-micela	25
1.2.3	Caracterización fisicoquímica de sistemas mixtos PC-sal biliar.....	27
1.2.4	Los liposomas como sistemas vesiculares más usados	32
1.2.5	Efectos biológicos de los sistemas nanoparticulados	35
1.2.6	Efectos biológicos de nanopartículas basadas en PC	36
1.3	RNA pequeño de interferencia (siRNA)	39
1.3.1	Generalidades	39
1.3.2	Comparativa con otras terapias basadas en RNA.....	40
1.3.3	Detalle del mecanismo de ingreso, liberación y acción intracelular	43
1.3.4	Barreras para el ingreso y tráfico celular	46
1.3.5	Estrategias para mejorar el ingreso celular de siRNA.....	47
1.4	Sistemas de vehiculización/liberación de siRNA propuestos.....	49
1.4.1	Sistemas de vehiculización no virales más destacados	50
1.4.1.1	Vectores basados en polímeros	52
1.4.1.2	Vectores basados en Ciclodextrina.....	53
1.4.1.3	Nanopartículas lipídicas sólidas	54
1.4.2	Vectores de vehiculización/liberación de siRNA basados en liposomas	55
1.4.2.1	Liposomas catiónicos	56
1.4.2.2	Liposomas aniónicos y neutros	58
1.4.2.3	Liposomas de circulación prolongada.....	59
1.4.2.4	Liposomas multifuncionales.....	60
1.4.3	Optimización de la formulación.....	62
1.4.4	Caracterización biofísica	63
1.4.4.1	Morfología de los lipoplexos catiónicos	64

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

1.4.4.2	Eficiencia de encapsulación	66
1.4.4.3	Tamaño de partícula	68
1.4.4.4	Carga superficial.....	69
1.4.5	Liberación del siRNA.....	70
1.4.6	Mecanismo de tráfico intracelular de los lipoplexos.....	71
1.4.7	Estabilidad de los lipoplexos conteniendo siRNA.....	72
1.5	Aplicaciones de RNA de interferencia en oncología.....	74
1.5.1	Estado de arte de la Terapia del Cáncer de mama.....	74
1.5.2	Ensayos clínicos y productos aprobados en oncología	75
1.5.2.1	Generalidades	75
1.5.2.2	Vehiculización de siRNA vía vectorización pasiva	77
1.5.2.3	Vehiculización de siRNA vía vectorización activa.....	79
1.5.2.4	El vector multi-propósito para vehiculización de RNA	80
1.5.2.5	Superando la resistencia a la terapia.....	81
1.5.3	Perspectivas a futuro	82
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	85
2.1	Construcción de la Hipótesis	85
2.2	Objetivos.....	86
3	MATERIALES Y MÉTODOS	89
3.1	Materiales	89
3.1.1	Excipientes	89
3.1.2	Oligonucleótidos	93
3.1.3	Líneas celulares	95
3.1.4	Reactivos	97
3.2	Métodos	98
3.2.1	Técnicas de elaboración	98
3.2.1.1	Lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC).....	98
3.2.1.2	Lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares (LP-PC/SB) ..	98
3.2.1.3	Incorporación de siRNA a las formulaciones.....	99
3.2.2	Técnicas de caracterización fisicoquímica.....	100
3.2.2.1	Determinación del tamaño de partícula.....	100
3.2.2.2	Determinación del potencial zeta	100
3.2.2.3	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	101

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

3.2.2.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	101
3.2.2.5	Ensayos de desplazamiento de SYBR Green	101
3.2.3	Técnicas de evaluación biológicas	104
3.2.3.1	Ensayos <i>in vitro</i> sobre la línea celular MCF-7	104
3.2.3.2	Ensayos <i>in vitro</i> sobre la línea celular MDCK.....	107
3.2.4	Análisis estadístico.....	110
4	RESULTADOS.....	111
4.1	Lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC).....	111
4.1.1	Elaboración y selección inicial de las formulaciones.....	111
4.1.2	Determinación de tamaño de partícula y carga superficial	114
4.1.3	Morfología determinada por TEM y SEM.....	118
4.1.4	Ensayos <i>in vitro</i> sobre la línea celular MCF-7.....	121
4.1.4.1	Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular	121
4.1.4.2	Ensayos de internalización celular del siRNA vehiculizado.....	122
4.1.5	Ensayos <i>in vitro</i> sobre la línea celular MDCK.....	126
4.1.5.1	Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular	126
4.1.5.2	Ensayos de internalización celular del siRNA vehiculizado.....	128
4.1.5.3	Evaluación de eficiencia de silenciamiento génico	130
4.1.6	Estabilidad de las formulaciones.....	134
4.2	Lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares (LP-PC/SB)	136
4.2.1	Elaboración y selección inicial de las formulaciones.....	136
4.2.2	Determinación de tamaño de partícula y carga superficial	140
4.2.3	Morfología determinada por TEM y SEM.....	142
4.2.4	Evaluación de eficiencia y capacidad de carga de siRNA	145
4.2.5	Ensayos <i>in vitro</i> sobre la línea celular MCF-7.....	150
4.2.5.1	Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular	150
4.2.5.2	Ensayos de internalización celular del siRNA vehiculizado.....	153
4.2.5.3	Evaluación de eficiencia de silenciamiento génico	156
4.2.6	Ensayos <i>in vitro</i> sobre la línea celular MDCK.....	158
4.2.6.1	Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular	158
4.2.6.2	Ensayos de internalización celular del siRNA vehiculizado.....	159
4.2.6.3	Evaluación de eficiencia de silenciamiento génico	161
4.2.7	Estabilidad de las formulaciones.....	165

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

4.2.8	LP-PC/SB como posibles vehículos de DNA plasmídico.....	167
5	COLABORACIONES	174
5.1	Colaboraciones con IQUIFIB	174
5.2	Colaboración en Dpto. de Tecnología Farmacéutica.....	182
6	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	185
6.1	Lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC).....	187
6.1.1	Elaboración y evaluación inicial de las formulaciones	187
6.1.2	Caracterización fisicoquímica y morfológica	189
6.1.3	Citotoxicidad de los vehículos	195
6.1.4	Internalización celular y eficiencia de silenciamiento	196
6.1.5	Estabilidad de las formulaciones.....	198
6.2	Lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares (LP-PC/SB)	199
6.2.1	Elaboración y evaluación inicial de las formulaciones	199
6.2.2	Caracterización fisicoquímica y morfológica	200
6.2.3	Evaluación de la capacidad de carga de siRNA.....	203
6.2.4	Citotoxicidad de los vehículos	204
6.2.5	Internalización celular y eficiencia de silenciamiento	206
6.2.6	Estabilidad de las formulaciones.....	207
6.2.7	LP-PC/SB como posibles vehículos de DNA plasmídico.....	208
7	CONCLUSIONES	211
8	RESUMEN.....	215
9	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	218

Introducción

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

1 INTRODUCCION

1.1 Nanotecnología farmacéutica

1.1.1 Nanotecnología en terapia oncológica

La nanotecnología es un campo de investigación multi y trans-disciplinar que involucra a la biología, la química, la física, la ingeniería y la medicina. Los sistemas de liberación nanométricos aplicados a la liberación de fármacos se han convertido en un área de extensa investigación, fundamentalmente porque permiten el mejoramiento de la biodisponibilidad de compuestos pobremente solubles en agua y la liberación vectorizada de los principios activos a varios tejidos y órganos. Se definen como partículas coloidales submicrónicas que oscilan entre 10 y 1000 nm. La Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos, sin embargo, define a la nanotecnología por su escala de trabajo entre 1 y 100 nm o ligeramente superior (Bosselmann & Williams, 2012). Los productos de la nanotecnología con aplicaciones médicas y farmacéuticas se han dado en llamar “nanofarmacéuticos” (Shah, 2010).

Una de las mayores dificultades en la terapia oncológica es la vectorización de drogas anti-neoplásicas a sus sitios de acción en el organismo. Luego de su administración, la mayoría de estos fármacos se distribuye sin selectividad alguna, lo que causa muchos problemas como toxicidad en los tejidos sanos. La vectorización de fármacos puede mejorar la eficacia de la terapia y reducir los efectos asociados con este tipo de productos. Hasta ahora algunos vehículos de fármacos coloidales, tales como liposomas (Drummond et al. 1999), nanopartículas (Brigger et al. 2002), micelas poliméricas (Le Garrec et al. 2004), han sido usados para encapsular drogas quimioterápicos y alterar así sus perfiles farmacocinéticos y de biodistribución. Estos sistemas nanométricos pueden mejorar la acumulación del fármaco en el sitio del tumor y reducir su distribución a tejidos sanos (Miao et al 2015).

Para conseguir logros terapéuticos en los tumores sólidos es necesario dirigir específicamente, es decir vectorizar, al fármaco en cuestión a las células blanco. Desde un primer momento, se estableció la necesidad de desarrollar productos farmacéuticos que

puedan ser vectorizados tanto pasiva como activamente a las células cancerosas (Peer et al., 2007). Esta necesidad se pensó para los nanovehículos que contendrían agentes quimioterápicos, pero hoy también es aplicable a la vehiculización de agentes provenientes de otros tipos de terapia, como la Terapia génica. Es así como hoy la investigación científica está focalizada en el desarrollo de estrategias novedosas de liberación vectorizada de fármacos, capaces de mejorar la eficacia terapéutica de las drogas acarreadas, reduciendo a la vez la toxicidad colateral (Basile et al, 2012). Adicionalmente, los nanofarmacéuticos, por sus tamaños nanométricos, presentan un muy buen potencial tanto para el ingreso a las células como para la interacción con tejidos biológicos (Bosselmann & Williams, 2012).

La vasculatura tumoral es considerablemente heterogénea en cuanto a distribución y más permeable en algunos lugares, sin embargo, grandes áreas del tumor pueden estar pobremente perfundidas. El drenaje linfático dañado de los tumores contribuye a una presión del fluido intersticial aumentada (IFP, del inglés *interstitial fluid pressure*), lo que agrega otra barrera más a la liberación de fármacos. La elevada IFP ha sido descrita como uno de los factores más importantes que contribuyen a la limitada extravasación y al transporte transvascular de las macromoléculas a pesar de la microvasculatura incompleta del tumor, inhibiendo el transporte de moléculas al espacio intersticial tumoral (Barenholz, 2012).

La alta permeabilidad de la vasculatura tumoral y la ausencia de un apropiado drenaje linfático resultan en el llamado efecto de permeabilidad y retención aumentada (en inglés, “*enhanced permeability and retention effect*” (EPR) en el microentorno del tumor. Se ha propuesto que este efecto podría contribuir a mejorar la liberación de drogas a partir de nanopartículas y macromoléculas que tienen la habilidad de circular con una vida media apropiada (Barenholz, 2012). La alta densidad celular del tumor y la densidad del estroma de esos tejidos puede luego entorpecer el movimiento de las drogas dentro del tejido neoplásico (Barenholz, 2012; Cukierman & Khan 2010).

La vectorización pasiva aprovecha este efecto (Chawla & Amiji, 2003); mientras que las drogas libres difunden en forma no específica, un nanovehículo puede extravasarse dentro de los tejidos tumorales vía los vasos incompletos y gracias al efecto EPR. La localización preferencial de las nanopartículas en el sitio de interés es beneficioso por cuanto reduce la ocurrencia de efectos adversos laterales asociados con la distribución no específica de la

droga (Bosselmann & Williams, 2012). El drenaje linfático disfuncional de los tumores puede ayudar luego a retener a los nanotransportadores acumulados (Peer et al., 2007; Cuckierman & Khan, 2010).

La vasculatura tumoral es incompleta con uniones entre las células epiteliales que varían entre 100 y 600 nm dependiendo del tipo de tumor. Por lo tanto, el tamaño óptimo de las nanopartículas se pensó que debía ser entre 10 y 100 nm (Bosselmann & Williams, 2012), pero se ha visto que en cáncer de mama, el tamaño de las nanopartículas tiene un efecto sobre la depuración de las partículas y los tiempos de circulación, por lo que estos factores deberían ser considerados también en los estudios de vectorización. Los últimos reportes indican que las partículas de 30, 50, 70 y 100 nm se distribuyeron de manera similar en tumores hiperpermeables como el adenocarcinoma de colon murino, pero sólo nanopartículas menores a 70 nm se pudieron acumular eficientemente en tumores poco permeables como el adenocarcinoma pancreático humano (Bertrand et al, 2014)

Las moléculas de vectorización, tales como los anticuerpos o los ligandos de pequeño peso molecular adosados a la superficie de nanovehículos contribuyen a la liberación de los fármacos en los tumores, porque permiten la unión específica de los mismos a las células neoplásicas. La hidrofobicidad presente en la superficie de las nanopartículas puede presentar interacciones no específicas con las células. Por un lado, las nanopartículas con vectorización activa sin estabilización estérica pierden su capacidad de unión a sustrato cuando las proteínas se adsorben sobre su superficie. Por otro lado, mientras que la funcionalización de la superficie con polietilenglicol (PEG) puede retrasar la adsorción de opsoninas y proteínas plasmáticas, el uso de cadenas largas o densas de PEG también puede prevenir a los ligandos de alcanzar eficientemente sus blancos (Bertrand et al, 2013). Es así que este efecto protector externo (“stealth effect”) que es necesario para la distribución selectiva del nanotransportador y el efecto de vectorización a nivel del tumor son difíciles de conseguir en forma simultánea (Gullotti & Yeo, 2009). En la figura 1 se muestra una representación de los mecanismos de liberación de fármacos quimioterápicos a partir de nanovehículos.

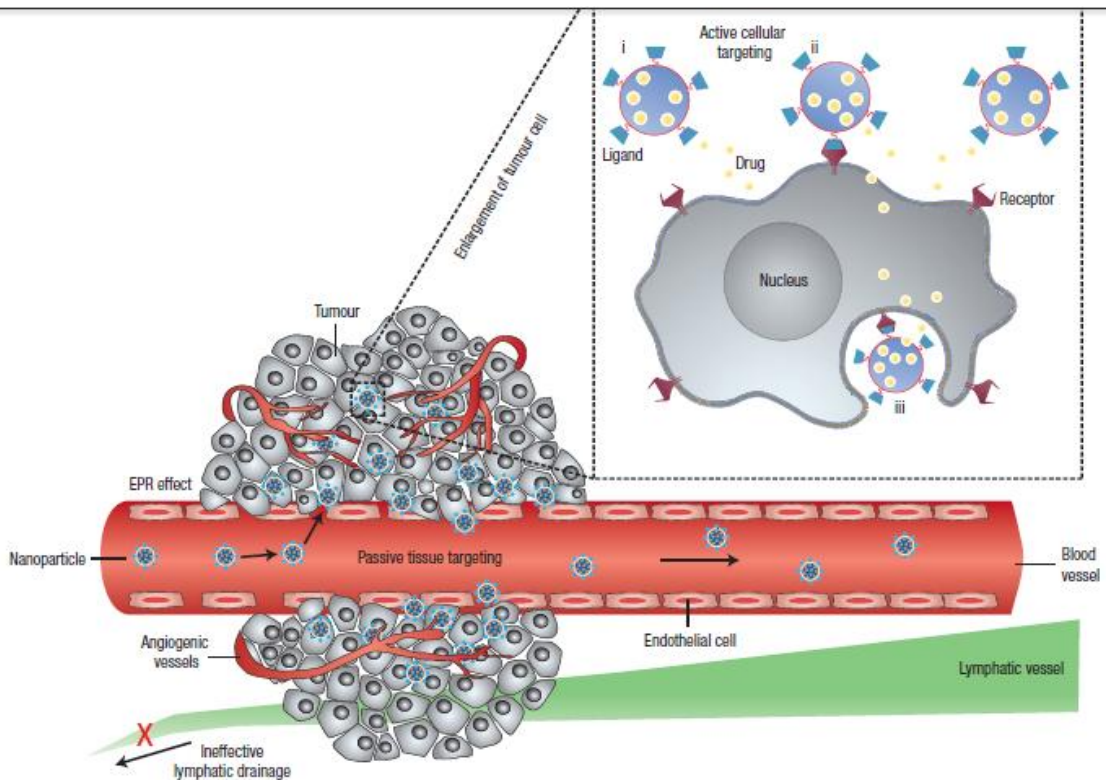


Figura 1: representación esquemática de diferentes mecanismos por los cuales los nanovehículos pueden liberar drogas a los tumores. Las nanopartículas poliméricas se muestran como nanotransportadores representativos (círculos). La vectorización pasiva se consigue por extravasación de las nanopartículas a través del efecto EPR. La vectorización celular activa (recuadro) puede ser conseguida funcionalizando la superficie de las nanopartículas con ligandos que promueven el reconocimiento y unión específico a la célula. Las nanopartículas pueden i) liberar sus contenidos en la proximidad de las células blanco; ii) adosarse a la membrana celular y actuar como un depósito de droga extracelular de liberación sostenida; o iii) internalizarse en la célula. (Extraído de Peer et al 2007).

Finalmente y retomando el aspecto tecnológico de la formulación, existe consenso actual en requerir un diseño de formulación racional que permita obtener características farmacéuticas deseables; es decir formas farmacéuticas que resulten seguras, eficaces, estables y fáciles de ser administradas. También se recomienda una caracterización fisicoquímica detallada así como evaluaciones funcionales para avalar procesos de elaboración fácilmente reproducibles. El mínimo set de características de nanopartículas que deben ser medidos y reportados incluyen tamaño, morfología, estado de dispersión, propiedades físicas y químicas, área superficial y química superficial ya que contribuyen significativamente con la actividad biológica *in vivo* de las nanopartículas vectorizadas (Grombyera et al, 2012).

Según Barenholz y colaboradores, una nanomedicina ideal debe presentar las siguientes características: 1) comprensión detallada de los componentes críticos y de sus interacciones; 2) identificación de las características claves y la relación que presentan con su performance; 3) habilidad para reproducir características claves bajo condiciones de manufactura; 4) facilidad para ser producido en forma estéril; 5) habilidad para vectorizarse o acumularse en el sitio de acción deseado superando las restricciones impuestas por las barreras biológicas; 6) buena estabilidad durante el período de uso y facilidad para ser almacenado y administrado (Barenholz, 2012).

Los nanocarriers que proveen control espacio-temporal de la liberación de la droga contribuyen a reducir toxicidad y mejorar la eficacia terapéutica de la misma. Para desarrollar nanovectores con cinética de liberación deseable para aplicaciones vectorizadas es importante entender los mecanismos por los cuales el vehículo libera la droga, los efectos de la composición y la morfología del sistema sobre la cinética de liberación del fármaco y las técnicas actuales para la preparación y modificación de nanocarriers. Acaba de publicarse una revisión que provee una visión global de los mecanismos de liberación de fármaco en varios nanocarriers con especial énfasis en los abordajes para controlar la cinética de la liberación de la droga (Lee & Yeo, 2015).

1.1.2 Vectores nanotecnológicos propuestos para uso en oncología

En la figura 2 se presentan sistemas de vectorización de fármacos y estrategias para dirigir drogas hacia tejidos neoplásicos.

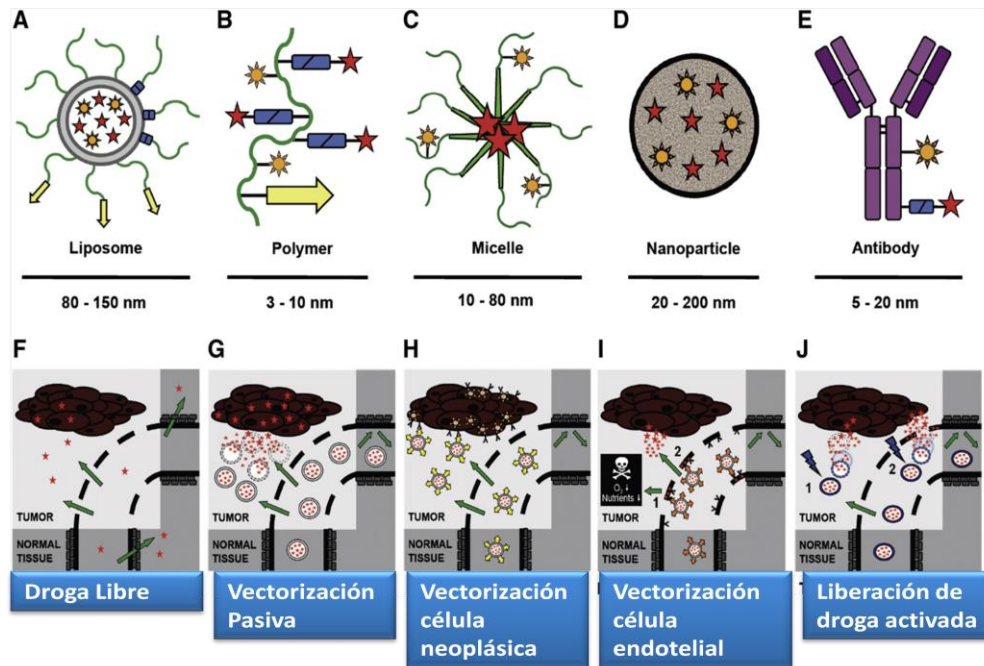


Figura 2: A–E: Sistemas de vectorización de fármacos. Los liposomas figuran en gris, los polímeros y las cubiertas poliméricas en verde, los conectores que permiten la liberación de la droga y la cubierta protectora en azul (rectángulos), los ligandos de vectorización en amarillo (flechas), los anticuerpos en púrpura, los agentes de imágenes para monitorear la biodistribución y el sitio blanco de acumulación en naranja (soles) y los agentes (quimio)terapéuticos en rojo (estrellas). **F–J: Estrategias de vectorización de drogas.** **F:** luego de la inyección endovenosa de un agente quimioterápico de bajo peso molecular, sólo bajos niveles de la droga se acumulan en las células tumorales, mientras que su localización en tejidos normales puede ser relativamente alto. **G:** luego de la implementación de un sistema de liberación de droga vectorizado pasivamente, por medio del efecto EPR, la acumulación del agente activo en las células tumorales puede ser sustancialmente aumentada, por lo que su localización en tejidos sanos puede ser atenuada. **H:** la vectorización activa de droga hacia receptores de la superficie celular susceptibles de internalización y que están sobre-expresados en las células cancerosas generalmente intenta mejorar el ingreso celular de la nanomedicina, y es particularmente útil para la liberación intracelular de DNA y RNA pequeño de interferencia. **(I-1):** vectorización activa de drogas a receptores sobre-expresados por las células endoteliales angiogénicas privándolas de oxígeno y nutrientes. **(I-2):** la vectorización a células endoteliales también podría ser empleada para mejorar la acumulación global del agente quimioterápico. **J:** nanomedicinas sensibles a estímulos (Thermodox®) pueden ser activadas por disparadores físicos aplicados externamente, como hipertermia, ultrasonido, campos magnéticos y luz. Esto puede ser realizado tanto después de la acumulación en el sitio blanco (**J-1**), como durante la circulación en la vasculatura tumoral (**J-2**). (Extraído de Lammers et al 2012).

Abraxane® es una nanopartícula que contiene paclitaxel comercializada y compuesta por un núcleo del fármaco hidrofóbico rodeado por una cubierta de albúmina hidrofílica representada por nanopartículas de diámetro medio de 130 nm (Bosselmann & Williams, 2012; Shen et al 2013). Esta nanopartícula puede abandonar la circulación a través de las interrupciones de la microvasculatura tumoral y acumularse en el intersticio. Además, la cubierta de albúmina facilita la interacción con los receptores de las células endoteliales

(gp60) y con la glicoproteína SPARC (del inglés, *secreted protein acidic rich in cysteine*) del intersticio tumoral. Específicamente, la unión de la albúmina con gp 60 conduce a transcitosis endotelial del nanovehículo dentro del espacio extravascular, donde SPARC, que está sobre-expresada, atrapa la albúmina resultando en alta acumulación intratumoral (Bosselmann & Williams, 2012; Barenholz, 2012; Ernsting et al, 2012).

Afortunadamente, la nanotecnología ha sido usada en la terapia del cáncer de mama por décadas. Doxil®, la primera formulación liposomal de doxorubicina aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) ha mostrado prolongado tiempo de circulación del fármaco y capacidad para evitar al Sistema reticuloendotelial (SRE) gracias al uso de nanoliposomas pegilados y a la alta capacidad de carga y de estabilidad de la doxorubicina. Esta es una potente droga antineoplásica para el tratamiento del cáncer de mama, sin embargo, tiende a acumularse en el corazón, causando severos efectos colaterales cardíacos. La formulación nanotecnológica de doxorubicina redujo estos efectos adversos dramáticamente, preservando o aún aumentando el efecto terapéutico del activo (Shen et al 2013). Debido al efecto EPR, Doxil® es vectorizado pasivamente a los tumores y muestra superioridad con respecto a la performance clínica exhibida por la droga libre; presenta, además, el uso clínico más extensivo. Aunque Doxil® es un excelente ejemplo para demostrar el rol esencial y obligatorio del estudio de la fisicoquímica de los lípidos y de la biofísica de los mismos en la correcta aplicación de la nanotecnología (Barenholz, 2012), su uso en cáncer de mama metastásico debería ser mejorado en cuanto a eficiencia (Lammers et al, 2012).

La nueva generación de liposomas conteniendo doxorubicina es termosensible; Thermodox® (Figura 2J), por ejemplo, libera al fármaco encapsulado en regiones donde la temperatura local del tejido es elevada; estos liposomas sufren un cambio de fase de gel a líquido cristalino cuando son calentados, dando así, liposomas más permeables que liberan la droga vehiculizada (Yarmolenko et al, 2012).

Genexol-PM® es una micela polimérica que contiene paclitaxel y está compuesta de bloques copoliméricos que incluyen PEG como cubierta protectora externa y un núcleo formado por ácido poliláctico para solubilizar la droga hidrofóbica. Basado en resultados clínicos de Fase I y II, la dosis terapéutica recomendada es 300 mg/m², mucho mayor que Taxol® (la formulación basada en Cremophor EL®) que es de 175 mg/m² (Oerlemans et al,

2010). Estaba previsto continuar con los estudios clínicos de Fase II patrocinado por el Centro Nacional del cáncer de Corea, pero fue suspendido antes del reclutamiento de los voluntarios. (Disponible a <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01169870?term=Genexol-PM&rank=1>)

1.1.3 Nanopartículas para diagnóstico por imágenes y terapia oncológica

A pesar de décadas de investigación, aún existen necesidades médicas no cubiertas en el diagnóstico y la terapia oncológica. Por otro lado, existen un número alto de agentes terapéuticos, tanto pequeñas moléculas como biofarmacéuticos, que son o muy grandes en tamaño, o altamente cargados, o metabólicamente inestables, y/o muy insolubles para llegar a las células blanco neoplásicas sin la asistencia de un vehículo apropiado. Hoy día, esta situación es vista como una oportunidad para la nanotecnología oncológica para brindar avances claves en la detección, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad (Miller, 2013).

Existe también la posibilidad de que la nanotecnología aplicada a la oncología pueda abrir oportunidades para regímenes de diagnóstico y tratamientos personalizados del cáncer. Esto se propone por medio de nanopartículas multifuncionales para: i) la detección de biomarcadores específicos de la enfermedad; ii) la visualización por imagen de los tumores y sus metástasis; iii) la liberación funcional de agentes terapéuticos a células blanco; y iv) el monitoreo en tiempo real del tratamiento implementado (Miller, 2013).

Las nanopartículas basadas en lípidos (LNPs) han sido ideadas para la liberación funcional de ácidos nucleicos terapéuticos con cierto éxito. Cuando las LNPs fueron diseñadas exitosamente y usadas para mediar la liberación funcional de los mismos *in vivo*, se constituyeron en un nuevo paradigma denominado ABCD (Figura 3).

De acuerdo a este paradigma general las nanopartículas de liberación funcional consisten en ingredientes farmacéuticos activos (API, del inglés *active pharmaceutical ingredient*) que constituyen el componente A, rodeado inicialmente de agentes de compactación/asociación (componentes B que serían los lípidos en este caso) diseñados para ayudar a secuestrar, cargar y promover la liberación funcional del componente A. Tales nanopartículas núcleo AB pueden tener alguna utilidad *in vivo* pero más comúnmente

requieren ser recubiertas con una capa polimérica biocompatible (el componente C - usualmente el PEG) diseñado para que las nanopartículas ABC resultantes adquieran estabilidad coloidal en los fluidos biológicos e inmunoprotección del SRE, además de los sistemas de respuestas inmunitarias. Finalmente, un agente de vectorización biológico opcional (el componente D – los ligandos específicos de receptores biológicos) pueden ser agregados para darle a la nanopartícula ABCD resultante una especificidad con el blanco celular (Miller, 2013).

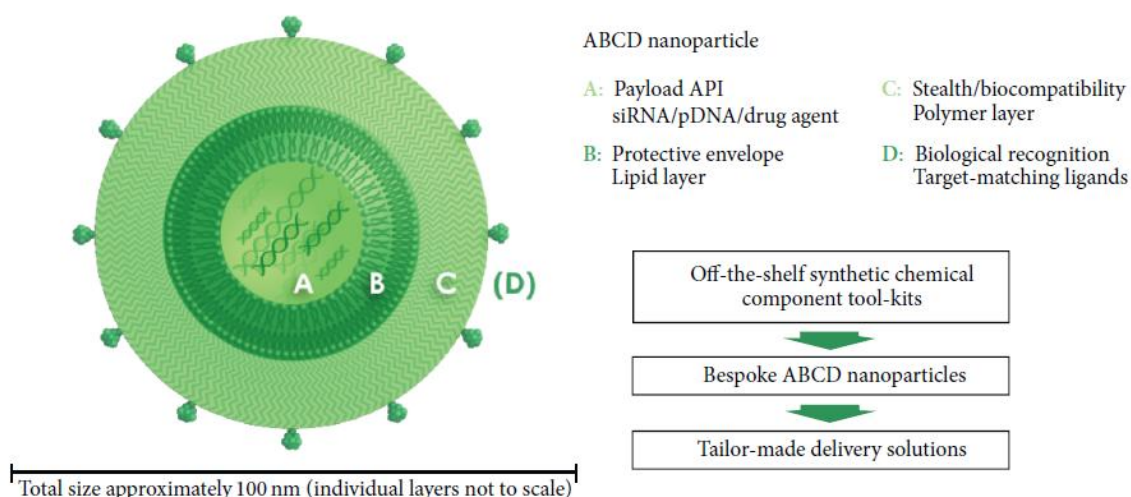


Figura 3: Ingrediente farmacéutico activo (API) (producto biofarmacéutico o fármaco de síntesis) condensado dentro de capas concéntricas funcionales de componentes químicos que constituyen una estructura nanoparticulada diseñada para permitir una eficiente vehiculización del agente terapéutico activo a las células blanco.

El paradigma de las nanopartículas ABCD representa un set de principios bien fundamentados de diseño que son implementados en la práctica con la formación de las LNPs, que son sistemas de vehiculización reales, y que conducen a propiedades funcionales reales demostradas al menos en estudios preclínicos. También es importante aclarar, con los objetivos clínicos en mente, que las nanopartículas tienen que ser consideradas diferentes de las drogas moleculares ya sean éstas pequeñas o grandes. En primera instancia, la regulación de la FDA establece que los estudios de absorción, distribución, metabolismo y excreción necesitan ser rediseñados en caso de las nanopartículas para tener en cuenta las características de agregación de su química superficial (Zolnik & Sadrieh, 2009).

Desafortunadamente, el conocimiento actual de estos parámetros es pobre debido a los pocos productos de este tipo que han sido testeados clínicamente. Lo que representa una limitación mayor en el crecimiento del campo de la nanotecnología oncológica.

La capacidad de las LNPs de ser preparadas en forma confiable a través de un proceso de auto-ensamble espontáneo de componentes químicos confiables, la mayoría de los cuales son lípidos naturales o sintéticos es debido a la capacidad incomparable de los lípidos estructurales en solución acuosa para sufrir asociación y ensamblado controlado en una vasta variedad de organizaciones macromoleculares tridimensionales.

Lípidos estructurales seleccionados se autoensamblan en liposomas que típicamente presentan un diámetro aproximado de 100 nm y consisten en una bicapa lipídica que rodea una cavidad acuosa. Esta cavidad puede ser usada para entrapar drogas solubles en agua en un volumen cerrado resultando en una nanopartícula AB (Allen & Cullis, 2004; Torchilin 2005).

A este tipo de formulaciones pertenece Doxil®, que se corresponde con un sistema nanoparticulado droga-ABC, es decir liposomas pegilados que encapsulan doxorubicina.

Las nanopartículas multimodales de uso teragnóstico (terapéutico y diagnóstico simultáneamente) pueden ofrecer beneficios sustanciales para el cáncer en el futuro pero sólo en combinación con nuevos avances en las tecnologías de liberación de nanopartículas. Teniendo en cuenta que todo lo que se requiere para el diagnóstico es la acumulación de las LNPs dentro de las lesiones cancerosas, las tecnologías actuales de nanopartículas para diagnóstico por imágenes serían suficientes. Sin embargo para que la medicina personalizada sea factible, la detección de biomarcadores específicos de enfermedades oncológicas *in vivo* es requerida. Mientras tanto, el paradigma actual presenta una debilidad en que la capa polimérica de recubrimiento o bien inhibe el ingreso celular de la nanopartícula o impide la liberación intracelular del agente terapéutico, a menos que sea apropiadamente removida al momento de la entrada a la célula blanco o en algún momento durante el proceso de ingreso celular (Kenny et al, 2011).

Por este motivo es que ya se ha comenzado a trabajar en la propiedad de sensibilizar a las nanopartículas frente a distintos estímulos (*triggerability*, en inglés). Estas partículas son

diseñadas para altos niveles de estabilidad en fluidos biológicos a partir de puntos de administración a las células diana después de lo cual se activan para controlar la liberación del agente terapéutico que vehiculizan por cambios en las condiciones endógenas locales, tales como pH, tiempo de vida media, enzimas, estado redox o temperatura (Figura 2); o a través de la aplicación de estímulos externos, como interacción con luz, ultrasonido, radiofrecuencia y radiación térmica provenientes de fuentes definidas (Kenny et al 2011).

Hoy día, el camino a este tipo de productos teragnósticos está muy avanzado para la teapia oncológica. Unos años atrás, un sistema nanoparticulado tipo droga-ABC estimulable térmicamente lo constituyó el producto ThermoDox® mencionado en la sección anterior. Las nanopartículas de ThermoDox® fueron formuladas usando composiciones lipídicas que incluyeron liso-fosfolípidos para encapsular doxorubicina dentro de membranas lipídicas bicapa termosensibles (Pon & Borys, 2009).

A temperaturas inductoras mayores a 37°C, estas membranas se hicieron porosas permitiendo una liberación del fármaco local controlada. Needham et al fueron los primeros en demostrar el uso de tales sistemas *in vivo*, habilitando de esta manera el tratamiento de tumores de forma más eficiente que las conseguidas siguiendo administración no sensible a la temperatura (Needham et al, 2000). ThermoDox® está actualmente siendo evaluado en estudios de fase II para administración envovenosa en combinación con ablación por radio frecuencia de tejido tumoral. La compañía continúa el estudio del producto para ser usado en el tratamiento de lesiones cancerosas de mama, colorectales, y hepáticas primarias (Wood et al, 2012).

La droga conjugada está normalmente inactiva, y luego de su sensibilización por el mecanismo disparador, recupera su actividad terapéutica. Estos valores carecen de información relacionada con el tiempo de liberación, la cinética y la ubicación de la droga. De este modo, el monitoreo no invasivo en tiempo real de la liberación de la droga es requerido para el uso de un producto teragnóstico. Este abordaje de la co-liberación de dos sistemas complementarios sirve como una prueba de concepto para el monitoreo ortotópico del tejido profundo en tiempo real y puede tener un uso potencial en la clínica como nanomedicina teragnóstica (Ferber et al, 2014) (Figura 4).

Trig-anostic drug-ABC nanoparticles; design principles

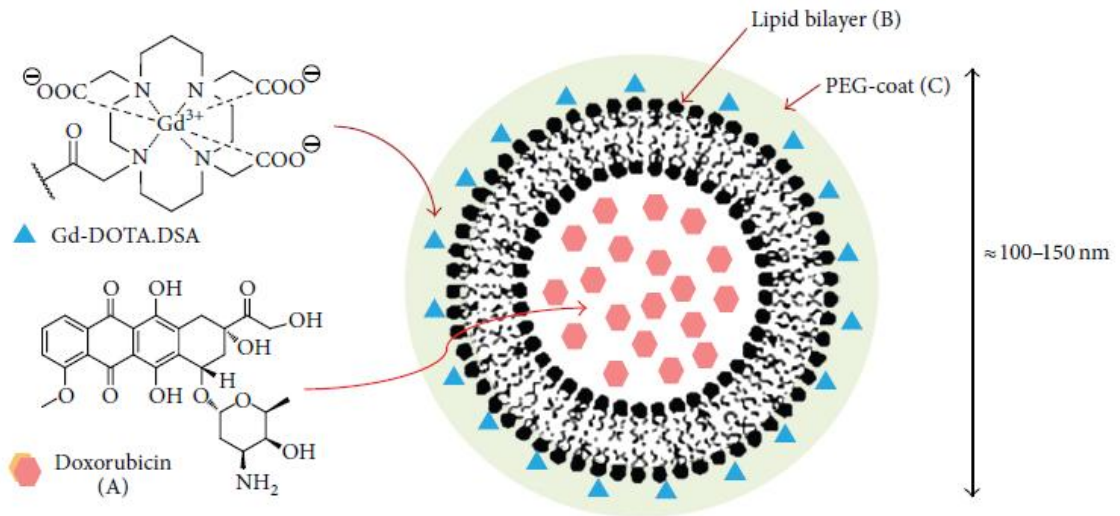


Figura 4: Representación esquemática de nanopartículas ABC teragnósticas para liberación activada térmicamente de la droga encapsulada en tumores por medio de ultrasonido, en conjunto con diagnóstico por imagen en tiempo real de la biodistribución de la nanopartícula por resonancia magnética. (Extraído de Miller 2013)

La nanotecnología es una investigación y un desarrollo revolucionario en el campo del cuidado de la salud. Actualmente, las nanomedicinas más avanzadas en ensayos clínicos en oncología son las LNPs. Pero hay que reconocer que todavía existe escepticismo dentro de la industria farmacéutica y del ámbito médico en cuanto a la eficacia y seguridad de estas nanotecnologías. Este escepticismo sólo será resultado con el advenimiento de procesos de elaboración en grado GMP y de datos preclínicos de ADME/toxicológicos confiables, seguidos de un número de estudios exitosos en humanos.

1.2 Vectores nanotecnológicos usados

1.2.1 Caracterización fisicoquímica de sistemas conteniendo fosfatidilcolina

La fosfatidilcolina es un fosfolípido compuesto por una molécula de colina y una de glicerol, y un grupo fosfato que constituyen lo que se conoce como “cabeza polar”; dicha fracción hidrofílica está unida a una “cola” compuesta por dos ácidos grasos, que conforman la sección hidrofóbica del fosfolípido (Figura 5). Los ácidos grasos unidos a la molécula de glicerol son variables; en mamíferos se suele encontrar un ácido graso saturado en la posición sn-1 y uno insaturado en la posición sn-2. La fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante en animales, el primer constituyente de la membrana celular (mayormente ubicada en la parte externa de la bicapa) y es el principal fosfolípido presente en el plasma en circulación, formando parte de lipoproteínas (Johnson & Lewis, 2002).

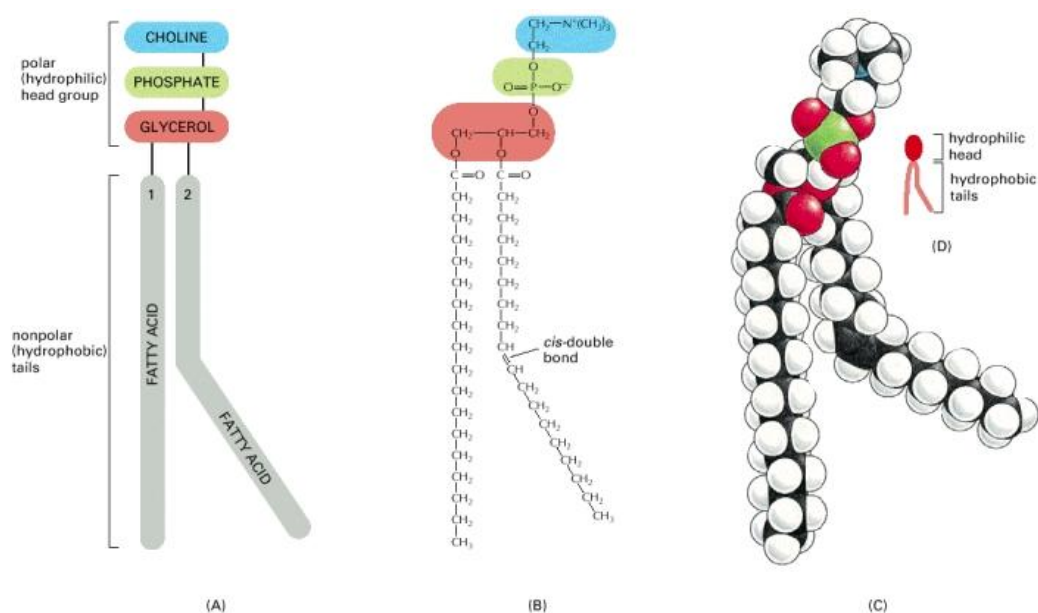


Figura 5: Esquema representando la molécula de fosfatidilcolina (Extraído de Johnson & Lewis 2002).

En 1997 Shchipunhov definió modernos conceptos con respecto al auto-ensamble de anfifílicos a partir del ejemplo de estructuras auto-organizables del producto natural lecitina (mezcla compleja de glicerofosfolípidos compuesta principalmente por fosfatidilcolina (PC)).

Prácticamente presentó todas las estructuras formadas por la lecitina: micelas, micelas hinchadas, microemulsiones, emulsiones, organogel, vesículas (liposomas) y cristales líquidos liotrópicos. Este trabajo sirvió para definir la dependencia del auto-ensamblado a nivel macroscópico de las interacciones a nivel molecular, de la forma de las moléculas, y de la solvatación y empaquetamiento en la interfase de todos estos sistemas, que hoy constituyen, sin excepción, formas farmacéuticas/cosméticas de carga/liberación de fármacos.

Por otra parte, Silvander et al indicaron, a partir de confirmaciones de estudios previos, que los cambios producidos por la adición de surfactante a vesículas lipídicas pre-formadas se pueden dividir en tres estadios diferentes. A baja concentración, el surfactante sólo se distribuye entre las fases lipídica y acuosa y particiona dentro de la membrana vesicular sin causar ninguna alteración importante en la arquitectura de la bicapa. Luego a una relación molar lípido/surfactante crítica para cada sistema específico, la bicapa comienza a saturarse con surfactante y se inicia la ruptura de la estructura vesicular. El tercer y final estadio se caracteriza por la solubilización completa del componente lipídico en micelas mixtas lípido/surfactante.

Así este grupo preparó vesículas unilamelares pequeñas por irradiación ultrasónica de muestras conteniendo 25 mg de lecitina en 5 mL pH 7.4 buffer (10mM Tris-HCl conteniendo 150mM NaCl). Las muestras fueron sonicadas durante 1 hora, luego de lo cual fueron diluidas con buffer a la concentración deseada. Se concluyó, usando técnicas de Dispersión de luz estática y Microscopía electrónica de transmisión criogénica que se formaron vesículas en estas condiciones. Luego de agregar diferentes tensioactivos aniónicos, alquil-sulfatos de cadena 10 a 14, demostraron la transición de vesículas a micelas a través de distintos intermediarios. Las micrografías de crio-TEM revelaron que se pueden formar micelas de varios tipos y formas durante la solubilización de vesículas de lecitina por estos surfactantes (Figura 6) (Silvander et al, 1996).

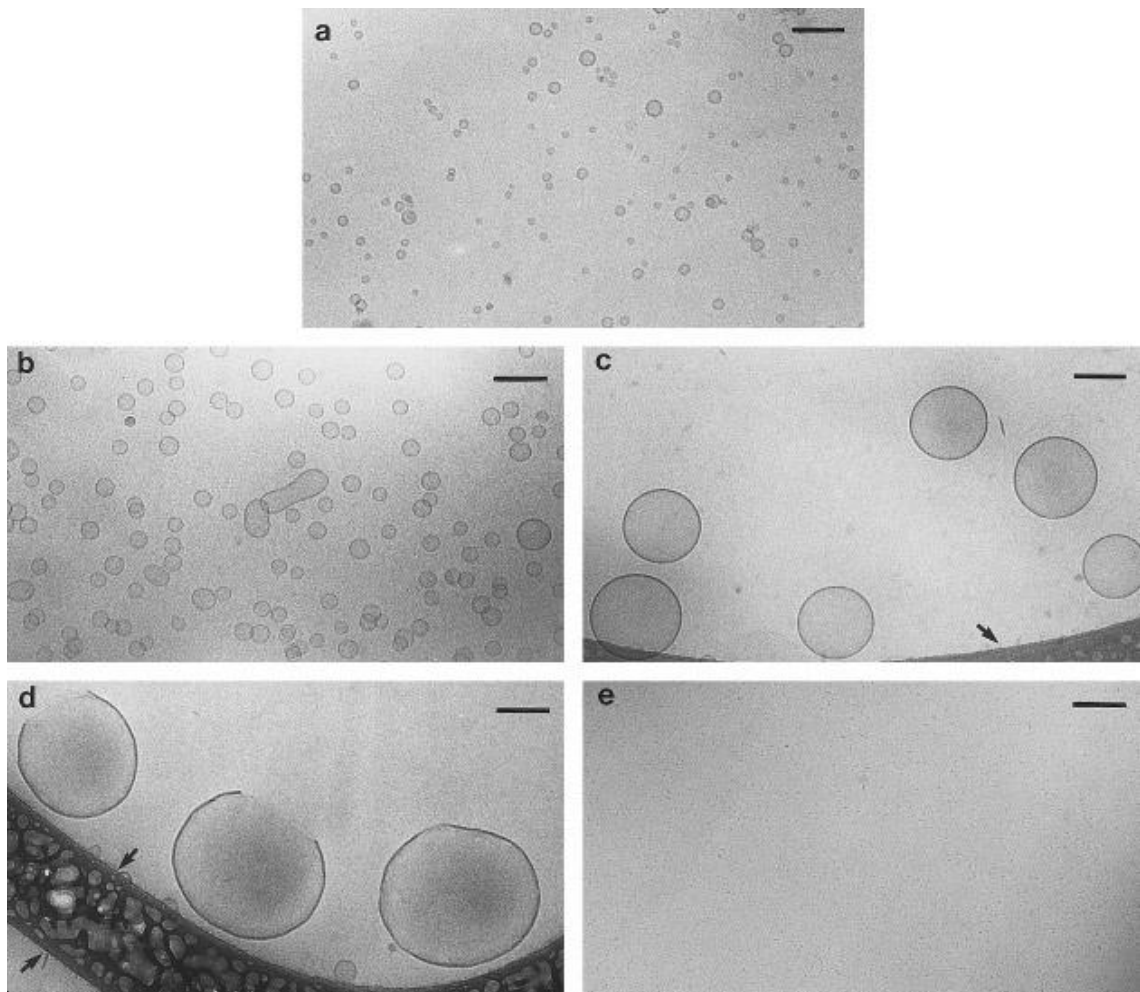


Figura 6: Micrografías obtenidas por Microscopía electrónica de crio-transmisión para investigar la naturaleza de los cambios en el tamaño de agregación y/o estructura sugeridos por cambios evidentes en turbidez y Dispersión de luz estática. (a) Vesículas de lecitina pura sonicadas; (b) $[C_{10}SO_04] / [\text{lecitina}] = 2.3$; (c) $[C_{12}SO_04] / [\text{lecitina}] = 3.2$; y (d) $[C_{14}SO_04] / [\text{lecitina}] = 4.5$; (e) micelas globulares formadas en una muestra conteniendo lecitina y $C_{12}SO_04$, $[C_{12}SO_04] / [\text{lecitina}] = 6.7$. Se observan vesículas abiertas en (d). Todas las muestras fueron observadas 7 días después de la preparación. $[NaCl] 150 \text{ mM}$. Barra= 100 nm.

Más tarde, Almgren y colaboradores también estudiaron el fenómeno de auto-ensamble de la PC en diferentes condiciones experimentales, y demostraron la presencia de estructuras hexagonales cilíndricas y en algunos casos la coexistencia de éstas con vesículas y micelas. (Almgren, 2000).

1.2.2 Influencia de la naturaleza del medio en la transición vesícula-micela

Aunque la transición vesícula o bicapa a micela ha sido bien estudiada para tensioactivos no iónicos y fosfolípidos, relativa poca atención le ha sido dado a los efectos, si existieren, de la composición de la fase acuosa sobre esta transición. Los tensioactivos no iónicos, como el octilglicósido y dodecilmaltósido, son considerados relativamente insensibles a los efectos de la fuerza iónica porque no tienen carga neta, y se espera que los efectos de solutos sobre la solubilidad de la región hidrocarbonada sean independientes del estatus iónico que estos promueven. Sin embargo, Walter et al demostraron que los solutos no iónicos tal como sacarosa y urea pueden alterar las interacciones del grupo cabeza especialmente, así como también actuar en forma no específica a través del aumento de la fuerza osmótica de la solución (Walter et al, 2000).

Por estas razones, es de gran valor práctico conocer qué efectos de estos solutos en fase acuosa podrían actuar sobre el proceso de solubilización de vesículas por tensioactivos no iónicos. El efecto de la composición de la fase acuosa es también interesante desde el punto de vista teórico. La tendencia de los anfifílicos a agregarse formando estructuras particulares es debido al balance de fuerzas, que incluyen la energía de posicionamiento de las regiones hidrofóbicas dentro del medio acuoso, la solubilidad acuosa de los grupos cabeza y las interacciones positivas (puente H, van der Waals) o negativas (repulsión electrostática, impedimento estérico) entre los anfifílicos.

La forma particular de un dado anfifílico y las formas de los agregados de una mezcla de anfifílicos ayuda a determinar la forma real de las estructuras que forman. En el caso de la transición vesícula o bicapa a micela con la adición de tensioactivos, la forma del agregado o la curvatura espontánea de la población de anfifílicos, fosfolípidos y tensioactivos cambia desde una que tiene un mínimo de energía en la configuración bicapa a otra que es más estable en una estructura micelar. Como es sabido por trabajos previos, las formas de las vesículas y micelas también evolucionan con el cambio de composición del anfifílico. En el sistema examinado por estos autores, octilglicósido (OG)/ fosfatidilcolina de huevo (EPC), las micelas evolucionan desde estructuras elongadas tipo gusano a varillas más cortas flexibles y a micelas elipsoidales a medida que la proporción de tensioactivo aumenta.

El primer paso para entender la transición vesícula-micela es determinar la composición de lípido y tensioactivo a la cual la estructura vesicular comienza a desestabilizarse y a la cual el sistema está completamente compuesto de micelas mixtas. El modelo que usan estos autores es el modelo simple de tres estados que consiste de un estado vesicular o bicapa, una región de coexistencia con estructuras bicapas mixtas y micelas y finalmente una región micelar mixta.

Para entender los cambios en parámetros que describen la transición vesícula-micela, se deben separar los efectos de solutos sobre la solubilidad del tensioactivo en agua (y así su coeficiente de partición entre las fases acuosa y lipídica), de los efectos tales como curvatura espontánea de un dado ensamble mixto que son específicos de la transición vesícula-micela en sí misma. Para hacer esto, se determinaron los parámetros vesícula-micela para una variedad de condiciones y luego independientemente se consideraron los efectos de los solutos (NaCl, sacarosa y urea) sobre la solubilidad o Concentración micelar crítica (CMC) de los tensioactivos no iónicos.

Como era de esperar, el aumento de osmolaridad de NaCl, sacarosa o urea en el buffer afectó la solubilidad de los tensioactivos en la fase acuosa, lo que luego alteró los parámetros asociados con la transición vesícula -micela. Con la excepción de NaCl, los efectos de estos solutos fueron coligativos, directamente proporcional a su osmolaridad en la solución.

Los parámetros que reflejan la estabilidad tensioactivo - bicapa saturada y estructuras micelares mixtas saturadas en lípidos aumentaron con el incremento de NaCl, también el ancho de la región de coexistencia; la sacarosa afectó al sistema del mismo modo pero en términos significativamente mayores. En contraste, la urea disminuyó la estabilidad de las estructuras y también marcadamente la región de coexistencia de transición de bicapa a micelas mixtas.

Se determinó que los efectos del NaCl son de dos tipos, primero es un ente osmóticamente activo que disminuye la actividad del agua y así aumenta la actividad de todos los otros solutos en el medio acuoso. Pero también provee significativo escudo electrostático a medida que su concentración aumenta, así a altas concentraciones, el Na⁺ se une al grupo fosfato de la PC. Por esto, una razón para la mayor estabilidad de la bicapa en presencia de

OG y la necesidad de más OG/PC para formar micelas mixtas, podría ser este escudo electrostático. Aunque los grupos cabeza de la PC son zwitteriónicos, las cargas actúan independientemente. Así, un escudo en estas cargas podría permitir un empaquetamiento del grupo cabeza que cambie efectivamente la forma del lípido en una manera que decrece el radio espontáneo de la curvatura. A su vez el efecto puede ser indirecto debido a la deshidratación en la superficie disminuyendo la solubilidad de la cabeza del grupo colina.

En resumen, esta exploración de los efectos de la fase acuosa sobre el comportamiento de los anfifílicos no iónicos y zwitteriónicos claramente indica que el efecto de las sales, azúcares y urea no pueden ser ignorados. Estos experimentos sugieren la necesidad de abordajes experimentales adicionales que puedan ayudar a entender el balance de fuerzas que determinan la solubilidad, micelación, estructura micelar y el comportamiento de sistemas mixtos en las configuraciones bicapa y micelar (Walter et al, 2000).

Huang et al reportaron que en una solución acuosa conteniendo lecitina, las sales de cloruro primero aumentaban moderadamente la CMC y luego la disminuían a medida que la fuerza iónica se hacía más importante (Huang 1997).

También, se propuso que la cabeza polar fosfo-colina es zwitteriónica entre los pH 3 y 11; esto significa que en este rango de pH el grupo fosfato de la cabeza polar tiene una carga neta negativa de electrones, y el grupo colina tiene una carga igual positiva a una determinada separación espacial. Asimismo se reportó que en solución acuosa, de 3 a 5 moléculas de agua están unidas al grupo fosfato, mientras que no existe ninguna unida al grupo colina (Huang et al, 2001).

1.2.3 Caracterización fisicoquímica de sistemas mixtos PC-sal biliar

En condiciones fisiológicas las sales biliares son esencialmente biosurfactantes aniónicos, por lo que es entendible, entonces, que formen micelas. En ese sentido, se ha reportado que el aumento de la fuerza iónica induce cambios en la carga negativa de las sales biliares, disminuyendo la CMC de las mismas. Otra consecuencia del aumento de la fuerza

iónica es la disminución de los efectos electrostáticos con la consecuente solubilización facilitada de las micelas en las membranas (Hofmann & Mysels, 1987).

En 1991 se utilizó la técnica de Dispersión dinámica de luz para monitorear los cambios estructurales de vesículas de fosfatidilcolina al ir agregando colato de sodio (Walter, 1991). En este trabajo se llegó a la conclusión que la PC, al ser dispersada en soluciones acuosas, forma estructuras de tipo bicapa compatibles con vesículas, y que el agregado de la sal biliar provoca la transición a estructuras más pequeñas y uniformes consistentes con una estructura micelar que se evidencia por la disminución de la turbidez de la solución.

Chen reafirmó estas observaciones al estudiar la influencia de iones La^{3+} sobre agregados mixtos de PC de yema de huevo/ taurocolato de sodio. Demostró que esta influencia depende de la estructura y composición de los agregados. Así vio que los iones La^{3+} no tuvieron efecto sobre la estructura y tamaño de micelas mixtas esféricas pequeñas. Para vesículas formadas en mezclas en las cuales la concentración de la sal biliar es mucho menos que la CMC, los iones de La^{3+} no cambian la estructura de la vesícula, pero inducen agregación de las mismas, resultando en un aumento del tamaño por unión de los grupos fosfato de la PC. La influencia de los iones La^{3+} sobre las micelas mixtas tipo disco fue la más importante. La interacción de estos cationes con los grupos funcionales hidrofílicos del taurocolato de sodio causó destrucción de este tipo de micela mixta y promovió la formación de pequeñas micelas mixtas esféricas. En este proceso, se observaron varias estructuras intermedias, tales como vesículas multilamelares y micelas cilíndricas. Luego de la adición de La^{3+} , la estructura y composición de los agregados finales fueron dependientes de la relación PC/sal biliar y de la concentración de cationes (Chen et al, 2008).

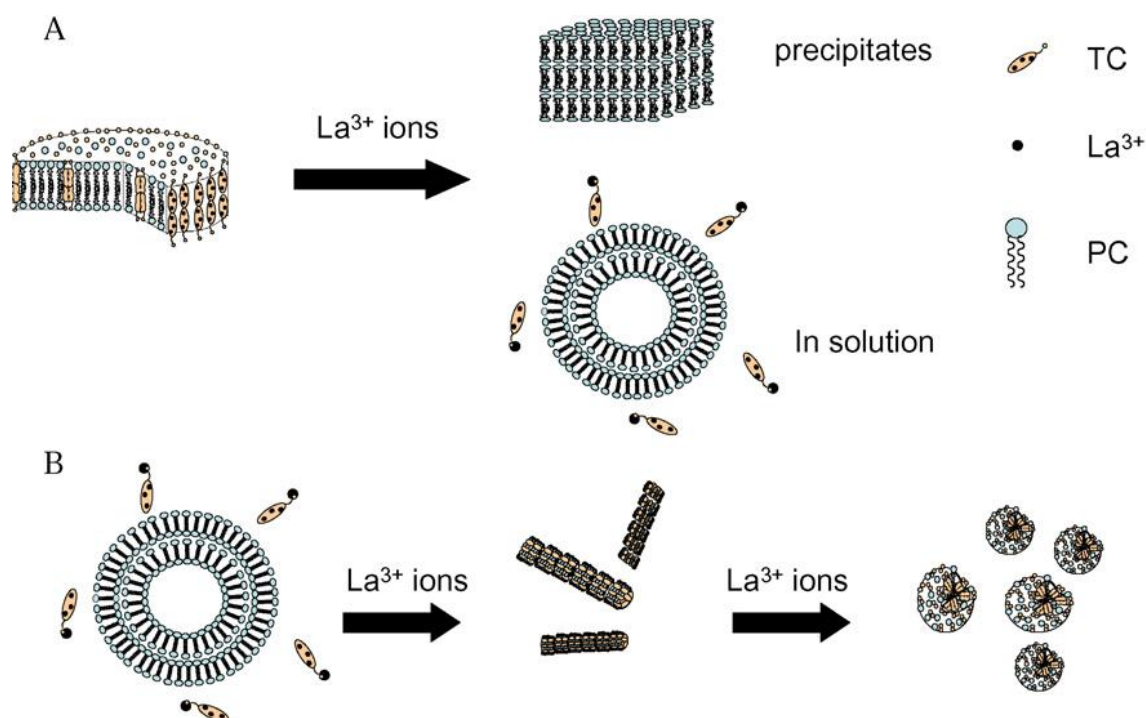


Figura 7: Diagrama esquemático de los procesos de transformación de micelas mixtas tipo disco de fosfatidilcolina de yema de huevo y taurocolato de sodio inducidos por cationes de La^{3+} a pequeñas micelas esferoidales. (A) Destrucción de micela mixta tipo disco. (B) Formación de micela mixta esferoidal (*Extraído Chen et al 2008*)

Otros autores demostraron que una bicapa fosfolipídica puede ser desintegrada debido a la adición de altas concentraciones de sales biliares (a relaciones PC: sal biliar ≥ 4), formándose micelas mixtas (Venneman et al, 2002). Estos resultados concuerdan con evidencias previas que demostraron que el tamaño y la estructura, de los agregados resultantes de la mezcla de fosfolípidos con sales biliares, dependen de la relación entre ambos componentes (Müller 1981). Gracias a los estudios de estos autores se pudo demostrar la influencia del pH y la fuerza iónica del medio sobre las distintas estructuras adoptadas por las patículas.

Es bien claro, entonces, que las moléculas anfifílicas se autoensamblan espontáneamente en solución para formar una variedad de agregados. Mientras significativo progreso se ha hecho en la comprensión de las propiedades de equilibrio como la secuencia de estructuras en función de la composición de la solución, limitada información está disponible acerca de la existencia de estados de no-equilibrio o metaestables y la vía y cinética asociada con las transiciones estructurales observadas.

Egelhaaf & Schurtenberger (1997) hicieron mediciones de Dispersión neutrónica de pequeño ángulo (SANS, del inglés *Small angle neutron scattering*) de diluciones de una solución stock de micelas mixtas (Figura 8). Luego de la dilución la forma de las estructuras cambia de micelas casi esféricas a micelas elongadas flexibles tipo poliméricas y a micelas cilíndricas. Esto es causado por disminución de la relación sal biliar/lecitina en los agregados debido a dilución, que parece disminuir la curvatura espontánea de las micelas mixtas. A diluciones aún mayores, el valor resultante de dicha curvatura favorece la formación de estructuras localmente lamelares y una transición de micela a vesícula es inducida. Más allá de los límites de la fase micelar, los datos indican primero coexistencia de vesículas y micelas cilíndricas. En esta región los tamaños de vesículas y micelas se mantienen constantes y sólo sus cantidades relativas cambian. A diluciones aún mayores existe una única fase de vesículas relativamente monodispersas cuyo tamaño decrece a medida que se diluye.

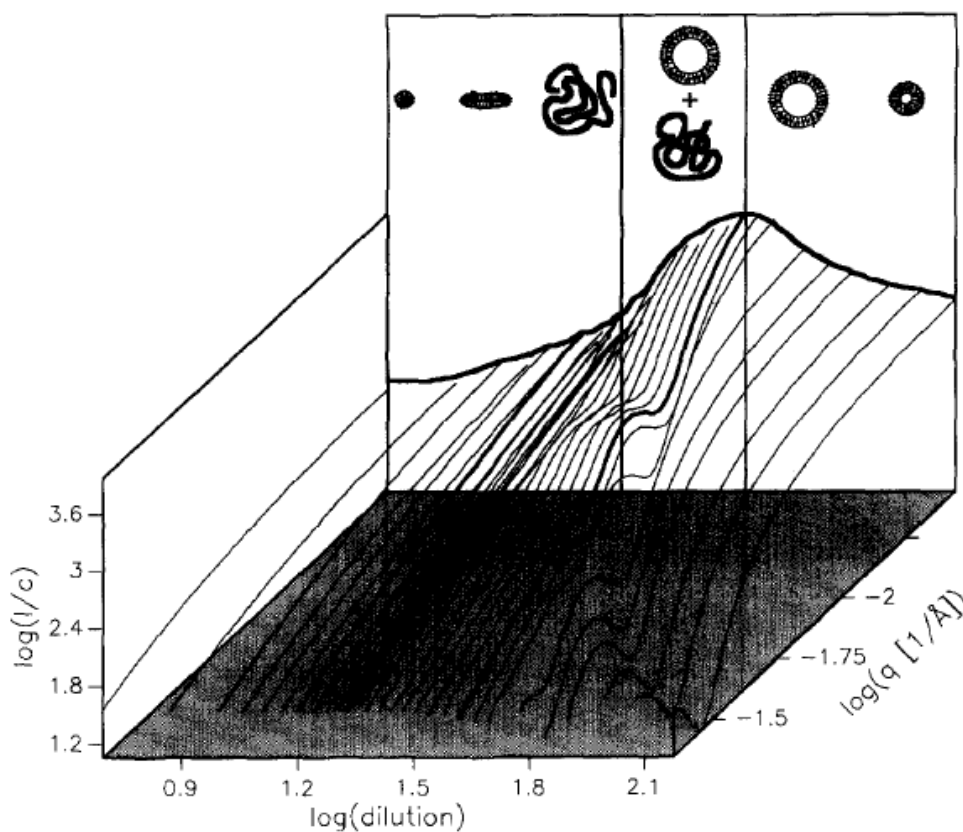


Figura 8: Intensidad de dispersión normalizada $I(q)/c$ en función del vector de dispersión q para una serie de diluciones de mezclas acuosas equilibradas de lecitina y sal biliar medidas por SANS. Los agregados observados se representan esquemáticamente (Extraído de Egelhaaf & Schurtenberger 1997).

Mientras que la transición micela a vesícula ha sido observada en un número de sistemas surfactantes, varios aspectos de la misma siguen siendo altamente controversiales. No sólo la cuestión de si las vesículas representan verdaderas estructuras de equilibrio está planteada de forma ambigua, sino que también sigue sin respuesta la cuestión de la exacta secuencia de la evolución estructural y la existencia de estructuras intermedias como redes conectadas o bicapas perforadas.

Basados en el comportamiento de fase bien establecido, ellos hicieron una investigación sobre los aspectos cinéticos de la transición micela a vesícula usando Dispersión de luz resuelta por tiempo y SANS. Ambas técnicas proveyeron por primera vez en escalas de longitud molecular un detallado análisis de la evolución de la estructura durante esta importante transición (Epelhaaf & Schurtenberger, 1997).

Por otro lado es bien conocido que el colato tiene, en condiciones fisiológicas, un pKa igual a 4.63 (25 ° C, 150 mM defuerza iónica). Sin embargo, esta constante es mayor en presencia de otros lípidos o surfactantes, con los que tiende a formar hetero-agregados. Esto se debería a la menor polaridad y al menor potencial de repulsión electrostática en la superficie de tales agregados. Así, se sabe que el valor cambia a 6.91 cuando el colato es unido a bicapas de PC electroneutras, en las mismas condiciones de medición. En la Figura 9 se muestra la fórmula química estructural de la molécula de colato, diferenciando la superficie hidrofóbica de los grupos hidrofílicos presentes (Elsayed & Cevc, 2011).

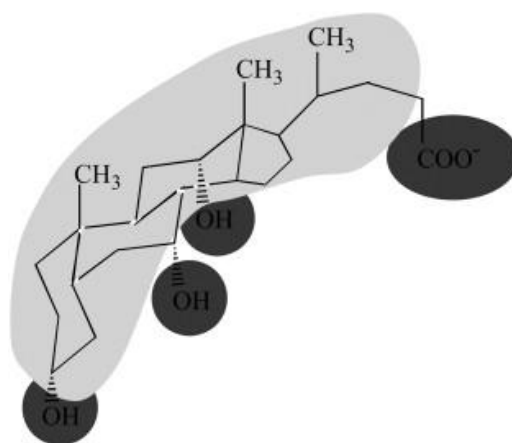


Figura 9: Fórmula química estructural de la molécula de colato, diferenciando la superficie hidrofóbica (gris claro) de los grupos hidrofílicos (gris oscuro) (Extraído de Elsayed & Cevc, 2011).

1.2.4 Los liposomas como sistemas vesiculares más usados

Los liposomas son pequeñas vesículas artificiales de forma esférica que pueden ser creadas a partir de colesterol y fosfolípidos naturales no tóxicos. Debido a su tamaño y características hidrofóbicas e hidrofílicas, además de su biocompatibilidad, constituyen sistemas promisorios para la liberación de fármacos. Las propiedades de los mismos difieren considerablemente con la composición lipídica, la carga superficial, el tamaño y el método de preparación. Además de esto, la elección de los componentes de la bicapa determina la “rigidez” o “fluidez” y la carga de la misma. Las especies de fosfatidilcolina insaturadas provenientes de fuentes naturales como huevo o soja, dan bicapas más permeables y menos estables.

El tamaño de los liposomas puede variar desde un tamaño tan pequeño como 25 nm a uno tan grande como 2.5 μm . El tamaño es un parámetro exacto en la determinación de la vida media de circulación de los liposomas y tanto el tamaño como el número de bicapas afecta la cantidad de droga encapsulada dentro de los mismos. En base a su tamaño y número de bicapas, los liposomas también pueden ser clasificados en una de dos categorías: (1) vesículas multilamelares (MLV, del inglés *multilamellar vesicles*) y (2) vesículas unilamelares. Estas últimas, pueden también ser clasificadas en dos subcategorías: (1) vesículas unilamelares grandes (LUV, del inglés *large multilamellar vesicles*) y (2) vesículas unilamelares pequeñas (SUV, del inglés *small unilamellar vesicles*). En liposomas unilamelares, la vesícula está constituida por una única esfera bicapa fosfolipídica que rodea una solución acuosa. En los liposomas multilamelares, las vesículas tienen una estructura tipo “cebolla”. Clásicamente, varias vesículas unilamelares se formarán en el interior de la otra adquiriendo un menor tamaño, constituyendo una estructura multilamelar de esferas fosfolipídicas concéntricas separadas por capas de agua (Figura 10).

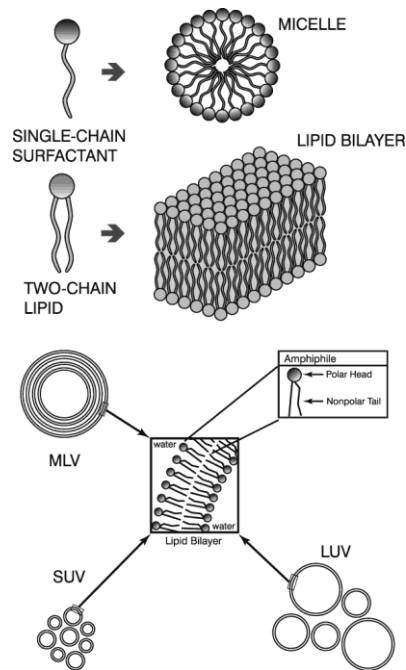


Figura 10: Representación esquemática de los distintos tipos de liposomas (*Extraído de Lasic, 1997*)

Existen varios métodos de preparación de liposomas, pero todos ellos involucran cuatro pasos básicos:

1. Llevar a sequedad lípidos a partir de un solvente orgánico.
2. Dispersar el lípido en medio acuoso.
3. Purificar el liposoma resultante.
4. Analizar el producto final.

El encapsulamiento de drogas a vehicular se lleva a cabo generalmente a través de tres métodos alternativos:

1. Método de dispersión mecánica.
2. Método de dispersión de solvente.
3. Método de remoción del tensioactivo.

A su vez, dentro del método de dispersión mecánico, se pueden realizar distintas técnicas alternativas: (a) soncación, (b) extrusión, (c) congelamiento-descongelamiento, (d) hidratación del film lipídico, (e) microemulsificación, (f) extrusión por membrana, (g) vesículas secas reconstituídas (Akbarzateh et al, 2013).

En el método de remoción del tensioactivo, un detergente soluble es removido de las micelas lípido-detergente por diálisis o dilución, resultando en formación espontánea de una vesícula, en un ejemplo clásico de la transición micela-vesícula. Este procedimiento es ampliamente aplicado, sin embargo, no existe suficiente comprensión de su formación y qué determina las propiedades de su estado final; los cálculos en equilibrio indican una fuerte dependencia del tamaño del liposoma con la composición de la bicapa. Se ha sugerido un mecanismo cinético con vesículas de estructuras metaestables en el estado final, pero la cuestión de si las vesículas representan estructuras de equilibrio no está, sin embargo, inequívocamente resuelto. Leng et al. combinaron experimentos de dispersión de luz con un modelo cinético cuantitativo, y establecieron concluyentemente un mecanismo cinético, por lo menos para el sistema que ellos estudiaron, que comprende mezclas de lípido (lecitina) y un detergente natural (sal biliar) (Leng et al, 2002)

Debido a que la sal biliar es mucho más soluble que la lecitina, la subsecuente dilución causa cambios en la composición de los agregados, de manera que la curvatura monocapa espontánea decrece. Con factor de dilución creciente se observan micelas cilíndricas progresivamente más largas, hasta que a factores de dilución más altos el estado final comprende vesículas unilamelares casi monodispersas. Los experimentos de luz de resolución temporal y dispersión neutrónica sugieren que a una dada dilución, las micelas esféricas o elongadas cambian rápidamente a micelas tipo disco, que luego se transforman en vesículas en un proceso mucho más lento (Fig. 11).

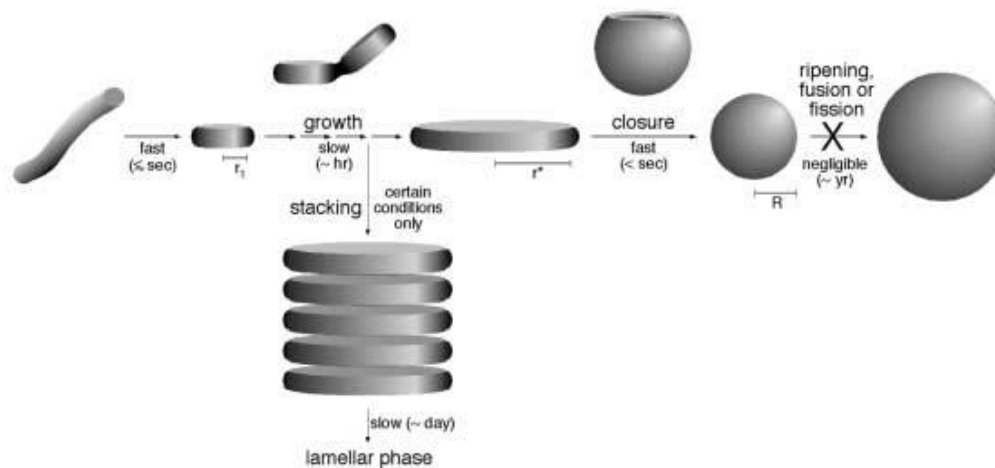


Figura 11: Representación esquemática del modelo cinético propuesto para la transición micela – vesícula. Los pasos fundamentales y sus escalas de tiempo típicas son mostradas: rápida formación de micelas intermedias tipo disco, crecimiento sucesivo de estas micelas hasta su tamaño crítico, seguido por su cierre para formar vesículas. La madurez de estas vesículas hacia su tamaño de equilibrio no fue observada, pero podría ocurrir en una escala de tiempo muy larga. Bajo ciertas condiciones el crecimiento y el cierre se hacen más lentos que el apilado, lo que puede conducir a formación de fase lamelar. La transición de estados de coalescencia, dos discos unidos por un cuello y la vesícula incompleta de cierre con un borde circular, están también indicados (*Extraído de Leng et al 2002*).

1.2.5 Efectos biológicos de los sistemas nanoparticulados

Como ya se ha reportado, la captación celular de la nanopartícula depende en parte del tamaño y la carga superficial de esta (Wang et al., 2010; Kulkarni & Feng, 2013). En este sentido es importante tener en cuenta que las moléculas más pequeñas tienen una relación superficie/volumen mayor, lo cual podría convertirlas en más reactivas (Nel et al., 2009) y por lo tanto más disruptivas para la homeostasis celular.

Por su parte, los sistemas nanoparticulados interaccionan diferencialmente con la membrana celular, dependiendo de su composición y características físico-químicas y superficiales; esto puede resultar en la inducción de distintos mecanismos de endocitosis de las nanopartículas y una eficiencia de internalización diferencial (Oh & Park, 2014)

Las nanopartículas, además de su rol activo respecto a fenómenos de la dinámica de la membrana celular, pueden activar receptores de membrana como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Unfried et al, 2008).

Se ha publicado que la regulación de la actividad de las proteínas de membrana dependería de la composición lipídica de la membrana plasmática, en particular de microdominios lipídicos llamados “lipid rafts” (Simons & Sampaio, 2011). Estos dominios habían sido descritos como meramente estructurales (Simons & Ikonen, 1997), aunque más recientemente se observó que están implicados en señalización intracelular, adhesión y remodelación del citoesqueleto (Pike, 2008). Varios receptores de tipo tirosina kinasa serían regulables por parte del microambiente lipídico que los rodea: FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), IR (Insulin Receptor), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) entre otros (Coskun et al, 2011).

El tamaño de la nanopartícula empleada es muy importante, ya que puede ser determinante en la distribución *in vivo*, la estabilidad, la toxicidad y la llegada al sitio blanco (Singh & Lillard, 2009)

La morfología y la carga asociada a las nanopartículas, resultan también parámetros interesantes de conocer para, de ser posible, correlacionarlos con los mecanismos de interacción entre las distintas composiciones de los nanocarriers y los elementos constitutivos de la membrana celular, de los que resultarán la naturaleza y magnitud de los efectos biológicos que se disparen.

Recientemente, Barichello et al. demostraron que un apropiado procedimiento de preparación de lipoplexos conteniendo un oligonucleótido antisentido está fuertemente relacionado tanto con la eficiencia de ingreso celular, como con la eficiencia de silenciamiento de la proteína blanco. Estos estudios sugirieron que los resultados obtenidos usando agitación durante la preparación del lipoplexo podrían tener implicancias en el diseño de un sistema de vehiculización más eficiente (Barichello et al, 2010).

1.2.6 Efectos biológicos de nanopartículas basadas en PC

El principal rol de la fosfatidilcolina es mayormente estructural, formando parte de la membrana celular (y aportando fluidez a la misma), aunque también en los últimos años se ha evidenciado un rol en señalización intracelular. Este rol está en realidad mediado por el ácido

fosfatídico (PA - Phosphatidic Acid), un reconocido segundo mensajero participante en el metabolismo lipídico y en diversas vías de transducción de señales. PC es también sustrato de la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC); la hidrólisis de PC mediada por esta enzima da diacilglicerol (DAG) y fosfocolina (P-Chol). Esta enzima ha sido implicada en proliferación, diferenciación y apoptosis en diferentes tipos celulares mamíferos. Los segundos mensajeros lipídicos, el PA y el DAG, también pueden afectar el tráfico en la membrana por alteración directa de la curvatura de membrana o, en forma indirecta, por reclutamiento y/o activación de mediadores de señalización. Un metabolismo aberrante de la PC en células cancerosas fue señalado como favorecedor de la expresión en membrana de receptores específicos o proteínas relevantes para la proliferación y supervivencia celular (Cecchetti et al, 2007; Paris et al, 2010). Del mismo modo, se demostró que la composición en fosfolípidos de la membrana afecta la endocitosis del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Weber et al, 2003). La composición lipídica no sólo afecta el tráfico de EGFR, sino que también tiene efectos regulatorios relevantes sobre la activación del dominio quinasa y su señalización (Weber et al, 2003; Coskun et al, 2011).

Por lo tanto, la PC no es un vehículo inerte, sino que es un compuesto biológicamente activo; los fosfolípidos y sus segundos mensajeros derivados están involucrados en tráfico y proliferación celular, y el aumento de fosfocolina y de compuestos conteniendo colina ha sido descrito en células tumorales. Considerando que la fosfatidilcolina es cada vez más usada en formulaciones nanotecnológicas y para liberación de agentes antineoplásicos, se deberían estudiar los efectos biológicos de dichas nanopartículas sobre señalización y proliferación celular de células de cáncer a tratar.

Aunque las sales biliares pueden disolver los lípidos de membrana y alterar la barrera mucosa gastrointestinal (Duane & Wiegand, 1980), la misma no es dañada por la bilis bajo condiciones fisiológicas (Martin et al., 1992). Se ha sugerido que la PC previene la toxicidad de las sales biliares en la membrana y epitelio gastrointestinal (Dial et al., 2008). La fosfatidilcolina o fosfolípidos en la bilis podrían prevenir el daño inducido por las sales biliares mediante la formación de micelas mixtas menos tóxicas o mediante la restauración de las propiedades hidrofóbicas de la mucosa.

Tan et al. (2013) realizaron estudios para investigar la citotoxicidad de micelas mixtas de lecitina y sales biliares en un modelo celular Caco-2, siendo el tamaño de partícula obtenido menor a 100 nm en todos los casos. El tratamiento de las células con desoxicolato de sodio (SDC) produjo inhibición en la proliferación, disrupción de las uniones estrechas y apoptosis, efectos que fueron atenuados por el agregado de lecitina y formación de micelas mixtas. Cuando la concentración de SDC fue superior a 0.4mM y la relación de lecitina:SDC fue menor a 2:1, las micelas mixtas causaron cambios significativos en la viabilidad y proliferación celular. Asimismo, las uniones estrechas intercelulares (“tight junctions”) fueron afectadas, siendo abiertas transitoriamente por las micelas mixtas conteniendo SDC entre 0.2 y 0.6 mM. Aunque la apertura transitoria de las uniones estrechas no induce toxicidad permanente del tracto gastrointestinal, pueden generar toxicidad debida a la ausencia temporaria de las barreras. Se requirió más lecitina para mayores concentraciones de micelas mixtas y prevenir la toxicidad del SDC. Las micelas mixtas con más lecitina también indujeron menos apoptosis. Estos resultados demostraron que relativamente altas concentraciones de micelas mixtas resultan tóxicas en células Caco-2, mientras que los fosfolípidos pueden atenuar la toxicidad aportada por las sales biliares. Es por ello que el contenido de lecitina en las micelas mixtas debe ser optimizado a fin de reducir la toxicidad en su versatilidad de aplicaciones.

1.3 RNA pequeño de interferencia (siRNA)

1.3.1 Generalidades

Este fenómeno fue descrito por primera vez en 1998 por Fire y Mello haciéndolos merecedores del premio Nóbel años después. Se trata de un proceso post-transcripcional eficiente y altamente controlado que implica la regulación de genes con pequeños fragmentos de RNA (siRNA, *del inglés small interference RNA*) (Fire et al., 1998). En este proceso, las moléculas de RNA inhiben la traducción proteica disparando la degradación de la molécula de RNAm (RNA mensajero) vía catalítica, advirtiéndose, así, un potencial para aplicación terapéutica corroborado luego por un creciente interés en el tema.

Esta alternativa terapéutica mostró ya en etapas tempranas ser un gran avance en el campo de la administración de ácidos nucleicos. Comparada con otras del estilo como plásmidos recombinantes y oligonucleótidos, las moléculas de siRNA conducen a una disminución selectiva y eficiente de la expresión de los genes debido a su mecanismo único y específico de y hacia su sitio de acción. A diferencia de la terapéutica de ácidos nucleicos basada en plásmidos, las moléculas de siRNA ejercen su función en el citoplasma y por lo tanto no requieren ingreso en el núcleo celular. Además, el mecanismo del siRNA es entre 10 y 100 veces más potente que el de oligonucleótidos antisentido, que también tiene su blanco en el citoplasma, debido a que una molécula de siRNA puede interferir con la traducción de varias moléculas de RNAm de un tipo (Ozpolat et al., 2010).

Actualmente, se la considera como una de las estrategias más potentes para el tratamiento de los desórdenes genéticos causados tanto por un único defecto genético como por una combinación de defectos genéticos múltiples. Estas moléculas constituyen una importante promesa para los tratamientos de patologías asociadas con alteraciones por exceso en la síntesis de proteínas. Las enfermedades consideradas actualmente huérfanas de terapéutica y las crónicas son también objetivos interesantes para esta clase de terapia.

En contraste con la eficiencia demostrada por siRNA *in vitro*, el silenciamiento *in vivo* por administración exógena ha sido una tarea muy desafiante debido a múltiples barreras, que incluyen rápida excreción, baja estabilidad en suero sanguíneo, acumulación no específica en

tejidos, pobre ingreso celular e ineficiente liberación intracelular (Shim & Kwon, 2010; Schroeder et al., 2010).

El campo del desarrollo de la formulación de siRNA también ha experimentado avances y obstáculos para la liberación del material similares a los que se vieron con el desarrollo de productos comerciales de otras terapias basadas en ácidos nucleicos. De los vectores de vehiculización/liberación de siRNA en desarrollo, los sistemas no-virales están comenzando a emerger en prominencia con respecto a los virales. Esto es debido a que ofrecen ventajas significativas en términos de control, consistencia y superioridad durante el diseño, junto con una mejor manufacturabilidad, actividad biológica, inmunogenicidad y seguridad (Patil et al., 2005).

Por lo tanto, la traslación del siRNA a ensayos clínicos es altamente dependiente del desarrollo de un apropiado sistema de vehiculización que sea capaz de corregir sus propiedades farmacocinéticas y de biodistribución (Kim et al., 2008; Gomez de Silva, 2012).

1.3.2 Comparativa con otras terapias basadas en RNA

Desde los descubrimientos hitos de los RNAs catalíticos en los ´80s y el RNA de interferencia en los ´90s, la comprensión biológica de RNA ha evolucionado desde ser considerado un simple intermediario entre DNA y proteína, a ser hoy día una molécula reconocida como dinámica y versátil capaz de regular las funciones de los genes y las células en los organismos vivos.

La terapia basada en RNA puede ser clasificada por el mecanismo de actividad, e incluye a inhibidores de la traducción del RNAm (antisentido), los agentes de RNA de interferencia (RNAi), las moléculas catalíticamente activas de RNA (ribosomas), y los RNAs que unen proteínas y otros ligandos moleculares (aptámeros).

El RNA es inestable *in vivo* debido a la abundante presencia de ribonucleasas en el suero y en las células; las modificaciones químicas pueden mejorar sus propiedades deseables sin reducir su actividad. De esta manera, las modificaciones químicas realizadas en RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), aptámeros, ribozimas, oligonucleótidos (ONs)

antisentido (AS), y miRNAs pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas y reducir su inmunogenicidad (Shukla et al., 2010).

Agentes de RNA de interferencia

El proceso celular de RNAi usa pequeños RNAs para silenciar la expresión génica a través del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) o del silenciamiento génico transcripcional (TGS), aunque esta última vía no es actualmente explorada con propósitos clínicos. PTGS está regulado por dos mecanismos distintos: represión traduccional y degradación de los RNAm con complementariedad imperfecta, y clivaje secuencia-específico de RNAm perfectamente complementarios. Los microRNAs endógenos (miRNAs) inducen represión traduccional y degradación de RNAm cuando la hebra guía (antisentido) tiene complementariedad limitada con el RNAm blanco. El mecanismo de clivaje secuencia-específico es explotado por los siRNAs exógenos o RNAs pequeño de horquilla (shRNAs, del inglés *short hairpin RNAs*) con apareamiento de bases Watson-Crick perfecto o casi perfecto con el RNAm blanco previsto.

La producción y procesamiento de miRNAs requiere un ensamble de la maquinaria huésped que es finalmente guiada por uno de las dos hebras miRNA al RNA blanco. Asimismo, siRNAs y shRNAs utilizan muchos de los mismos factores endógenos, y la terapéutica siRNA/shRNA puede rivalizar con la producción/función de los miRNAs naturales.

El PTGS puede ser inducido por liberación de moléculas de siRNA a células en la forma de RNA de doble hebra, dsRNA (del inglés, *double strand RNA*) o por shRNAs que son transcriptos dentro de la célula y procesados en siRNAs (Burnett & Rossi 2012).

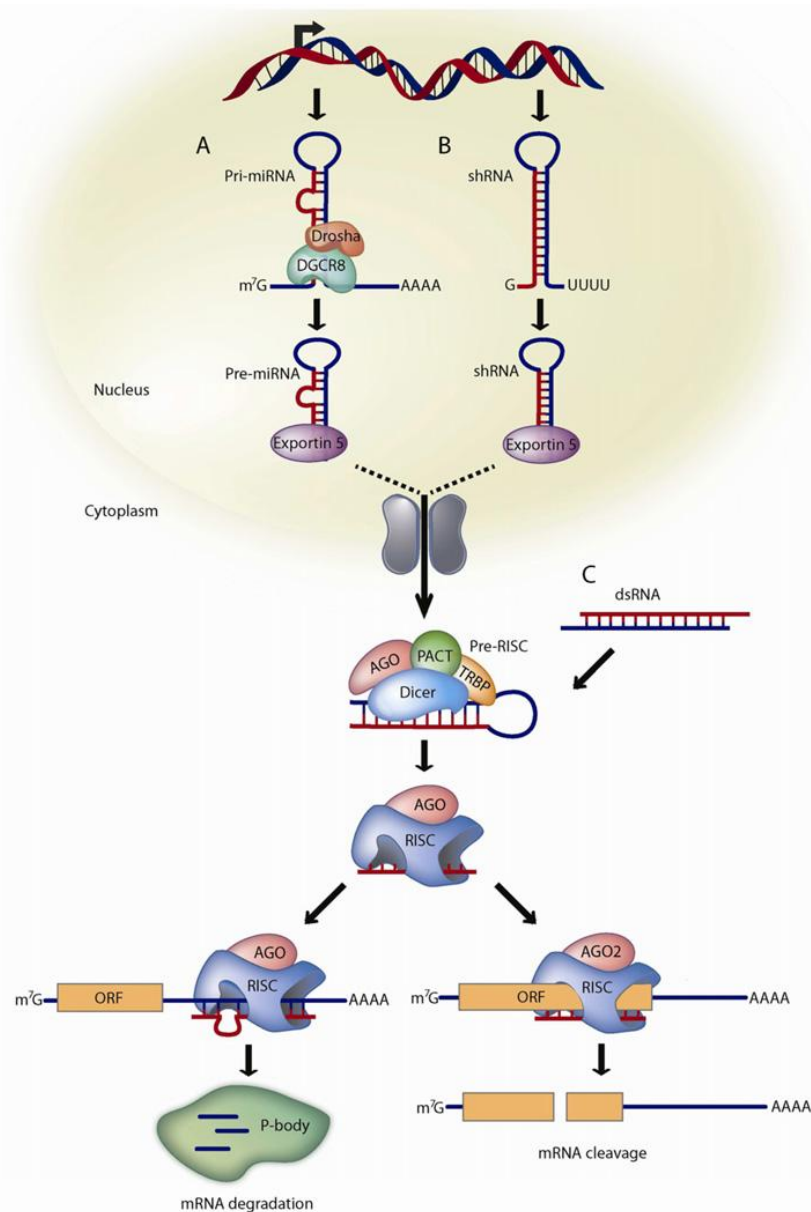


Figura 12: Vía PTGS en mamíferos para miRNAs, shRNAs, y siRNAs. (A) Los miRNAs son transcritos a partir del DNA como miRNAs primarios (pri-miRNAs) y procesados en miRNAs precursores helicoidales-madre de 70 nt (pre-miRNAs) por Drosha y DGCR8. Los pre-miRNAs son transportados al citoplasma por la proteína exportina 5 que se une al dsRNA, donde son procesados en miRNA duplex de 22 nt por el complejo Dicer TRBP. Los duplex miRNA imperfectamente complementarios se asocian con la proteína AGO y son cargados dentro de RISC, donde la hebra pasajera es removida y la hebra guía permanece para vectorizar mRNA para silenciamiento. El complejo RISC resultante maduro puede silenciar la expresión génica tanto por inhibición de la iniciación de la traducción o por transporte del complejo hacia los cuerpos de procesamiento (P-body) citoplasmático donde el RNAm es destruido. (B) Tal como los miRNAs, los shRNAs son transcritos a partir de DNA y sufren un procesamiento similar. Sin embargo, el apareamiento de base perfecto entre la hebra guía y el RNAm blanco dispara el clivaje mediado por AGO-2 del RNAm blanco. (C) En contraste a shRNAs, siRNAs son artificialmente introducidos dentro del citoplasma. Todos los pasos de siRNA y shRNA son los mismos luego del procesamiento por Dicer/TRBP. Al contrario de los siRNAs, que silencian la expresión génica en forma transitoria luego de cada aplicación del tratamiento, los shRNAs, que son constitutivamente expresados a partir de promotores, pueden inducir silenciamiento génico de largo plazo durante el tiempo que dure su transcripción y biogénesis (*Extraído de Burnett & Rossi 2012*).

Aproximadamente 22 siRNA/shRNA terapéuticos diferentes han alcanzado la instancia de ensayos clínicos para el tratamiento de al menos 16 enfermedades. De forma similar a otras terapias basadas en RNA, la eficacia de las drogas siRNA/shRNA reside en la maximización del vector de liberación así como en minimizar los efectos de toxicidad y degradación. Los métodos de liberación pueden ser categorizados como ex vivo, locales o sistémicos, a su vez los sistémicos pueden ser clasificados como de vectorización activo o pasiva (Peer & Lieberman, 2011).

1.3.3 Detalle del mecanismo de ingreso, liberación y acción intracelular

El ingreso celular de siRNA ha sido identificado como una barrera para su eficacia. Esto es atribuido al peso molecular relativamente alto (aproximadamente 14000 Da) comparado con fármacos convencionales y a la presencia de un esqueleto estructural con una carga netamente negativa, por lo que el ingreso celular del siRNA desnudo es prácticamente imposible. El uso de vectores de vehiculización facilita este ingreso, no obstante para obtener la eficiencia deseada es necesario que ocurra su liberación en el sitio de acción.

El mecanismo de ingreso más típico descrito para un siRNA junto a su vector de liberación ha sido el correspondiente al de los complejos siRNA-liposoma (o lipoplexo) e involucra el ingreso vía el proceso de endocitosis. Otros procesos tal como macro-pinocitosis y vías mediadas por receptores también han sido implicados en la internalización celular usando otros vehículos (Figura 13).

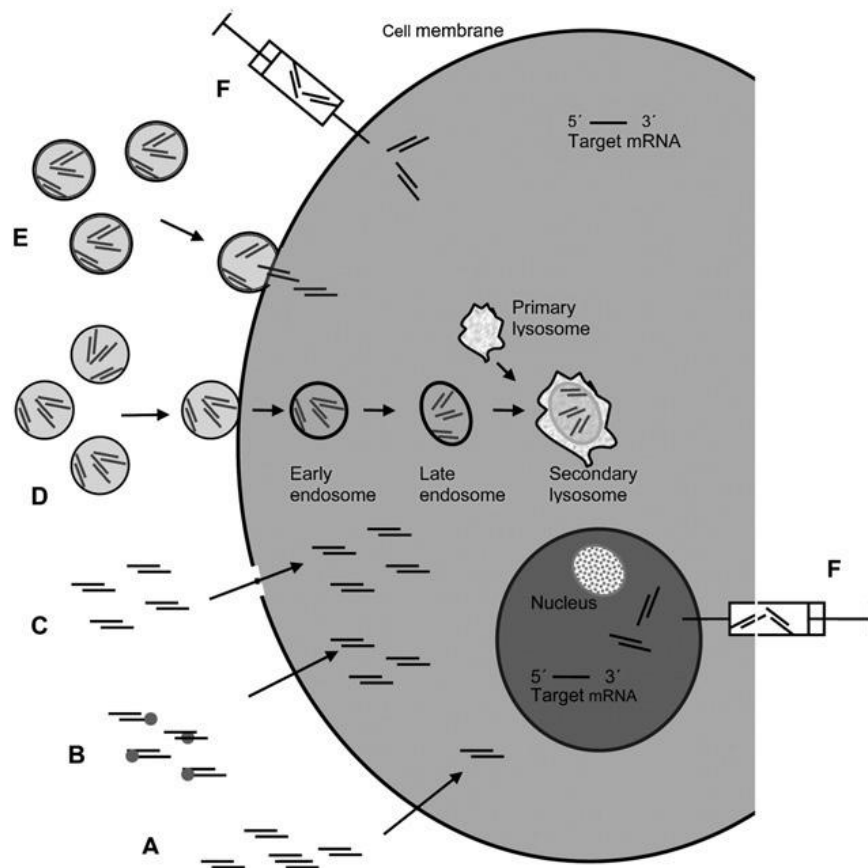


Figura 13: Ilustración esquemática de diferentes vías de ingreso celular del siRNA dentro de la célula. (A) Ingreso espontáneo de siRNA. (B) Péptidos con capacidad de penetración celular. (C) Electroporación. (D) Nanopartículas, nanocápsulas, liposomas. (E) Liposomas fusogénicos. (F) Microinyección. (Extraído de Reischl & Zimmer, 2009).

En este proceso los complejos de siRNA son atrapados en endosomas tempranos luego de la internalización. Estos endosomas luego maduran o se fusionan para formar endosomas tardíos más ácidos (pH 5.5). Luego, los complejos de siRNA son transportados a lisosomas altamente ácidos (pH 4.5) donde pueden ser degradados. Para evitar tal degradación, es importante que las moléculas de siRNA escapen de los endosomas tempranos/tardíos usando estrategias de formulación que se comentan más adelante (Kapoor et al., 2012).

Luego de la liberación endosomal en el citoplasma, el siRNA se une a Argonata2 (y otras) proteínas también conocidas como Ago2 o slicer y forma complejos de silenciamiento inducidos por RNA (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*) (Figura 14). La

interacción de siRNA ocurre con las proteínas Ago2 cuando el grupo 5-Fosfato de la hebra menos apareada (conocida como guía o antisentido) de siRNA se une al dominio Piwi de las proteínas Ago2 vía el ión divalente Mg²⁺. La formación de RISC activa la proteína slicer, ésta desenrolla al siRNA que de este modo deserta de la hebra guía. A continuación, la hebra guía dirige el RISC hacia la secuencia de RNAm diana que le es complementaria. Luego, el dominio PIWI de las proteínas Ago2 cliva la unión fosfodiéster del RNAm, que está enfrentando la región media de los nucleótidos 10° y 11° de la hebra guía, dando de esta manera RNAm disfuncional. Este proceso de clivado del RNAm ocurre varias veces para la misma hebra guía, la velocidad y la extensión de la cual depende de la afinidad de unión del extremo 5' de la hebra guía de siRNA con las proteínas Ago2 y la velocidad de la disociación de RNAm clivado a partir de RISC (Kapoor et al., 2012).

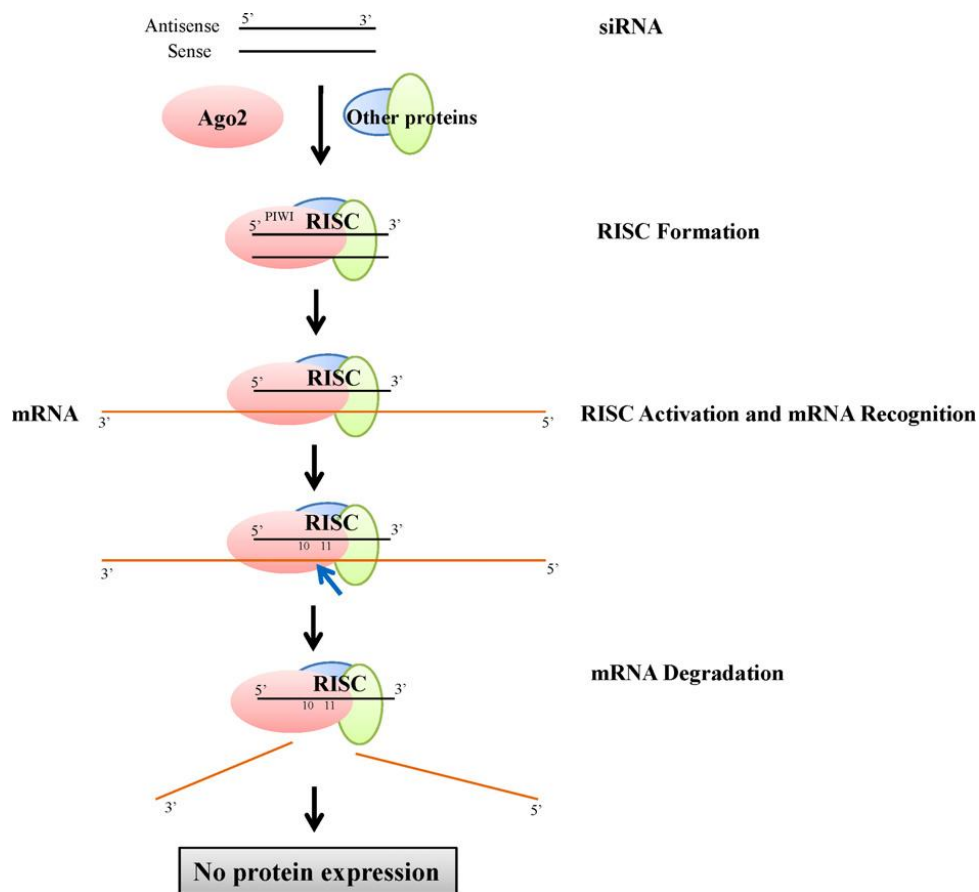


Figura 14: Mecanismo de acción del silenciamiento de RNA (siRNA) iniciado por reconocimiento de la hebra antisentido del dominio PIWI de las proteínas Ago2, seguido por formación de RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA). La activación de RISC causa el reconocimiento del RNAm, la unión de RNAm complementario y el clivaje del RNAm impiden la expresión de la proteína correspondiente. (Extraído de Kapoor et al, 2012)

1.3.4 Barreras para el ingreso y tráfico celular

La eficacia *in vivo* de las moléculas de siRNA es directamente dependiente de su habilidad para superar barreras que prevengan la absorción, distribución y tráfico intracelular. En principio y como todo ácido nucleico, son susceptibles a degradación enzimática por enzimas nucleasas en el suero, y aunque la sustitución química o las estrategias basadas en modificaciones son usadas para mejorar su estabilidad, estas pueden también causar un aumento de la toxicidad dependiendo del grado de sustitución (Figura 15) (Li & Szoka, 2007).

Otro desafío relacionado con la eficacia *in vivo* de siRNA es su inmunogenicidad. Esto es porque las moléculas de siRNA son reconocidas como foráneas y sospechadas de estar asociadas con patógenos tales como bacteria y virus. Por lo tanto, las moléculas de siRNA pueden activar los receptores inflamatorios tales como TLR (receptores tipo Toll). Se encontró que son principalmente el TLR7 y/o TLR 8 los que causan la activación del interferón (IFN- α) e interleuquinas (IL-6) (Gorden et al., 2005), respectivamente, una vez que reconocen la molécula de RNA. Esta activación también puede disparar otras citoquinas asociadas con la inmunidad innata. Se observó que el componente estructural clave en el siRNA responsable de tal mecanismo disparador, es el azúcar ribosa y las múltiples bases uridina, que son predominantemente identificados por TLR7. Por lo tanto se han hecho intentos para sintetizar siRNA modificado en tales grupos y prevenir, así, la respuesta inmune asociada.

Debido a que las moléculas de siRNA carecen de propiedades disruptivas endosomales innatas, son incapaces de escapar luego de la internalización, por lo que quedan concentradas y de ese modo, sujetas a degradación. La primera razón para que esto ocurra así es la falta de habilidad del siRNA cargado negativamente para interactuar con la membrana endosomal, también cargada negativamente, y de acuerdo con esto el siRNA es retenido en estas vesículas endosomales altamente acídicas con su consecuente degradación por hidrólisis ácida de las uniones fosfodiéster (Oivanen et al., 1998). Además, el bajo pH endosomal también inhibe el apareamiento de base del RNA doble hebra, debido a ionización desfavorable de las bases en el bajo pH del entorno.

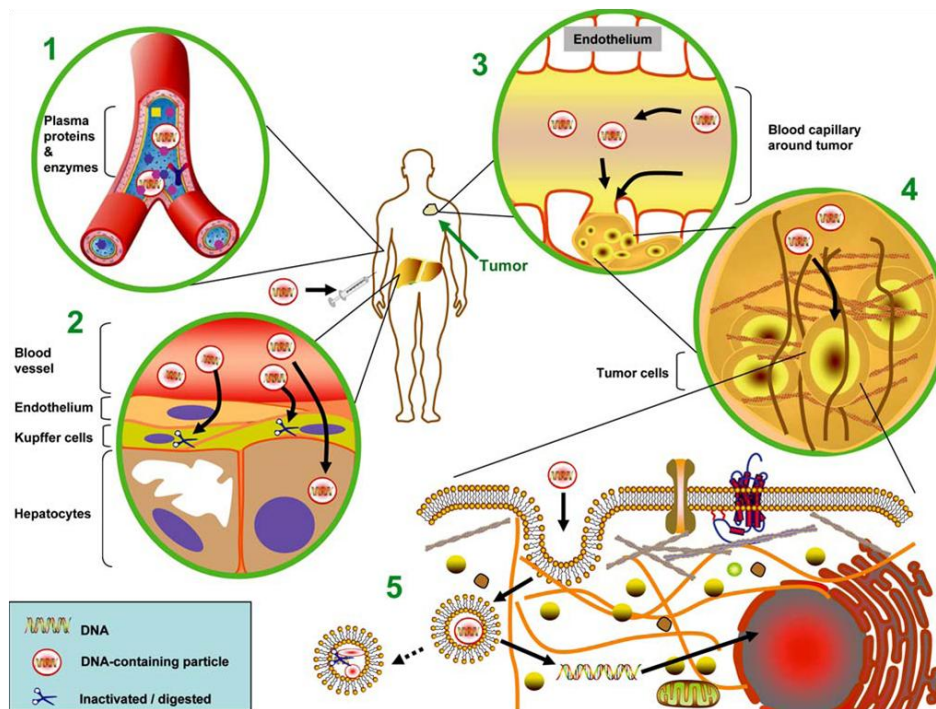


Figura 15: Ilustración de las barreras para la liberación génica vía endovenosa. Las nanopartículas (NPs) conteniendo DNA son inyectadas vía IV en el organismo humano. Las proteínas séricas pueden unirse a las NPs, entrecruzarse con ellas y aumentar el tamaño de las mismas. Esto puede resultar en una rápida eliminación de las NPs (inserto 1). Las células de Kupffer (SER) pueden tomar las NPs, promoviendo una rápida eliminación de las mismas a partir de la circulación y disminuyendo su acceso a los hepatocitos (inserto 2). Las NPs circulantes pueden extravasarse en el tejido tumoral a través de los vasos tumorales discontinuos (efecto EPR) (inserto 3). Las NPs luego necesitan pasar por la densa matriz extracelular para contactar la superficie celular (inserto 4). Cuando las partículas son internalizadas dentro de las células, el DNA debe escapar desde el endosoma y encontrar su camino hacia el núcleo (inserto 5) (Extraído de Li & Szoka, 2007).

1.3.5 Estrategias para mejorar el ingreso celular de siRNA

Las moléculas de siRNA desnudas pueden retener algún grado de habilidad de silenciamiento si pueden superar las barreras para ingresar y mantener la estabilidad, situación que ocurre cuando son administradas directamente en el sitio de acción. Las formulaciones basadas en liberación directa se intentan normalmente por administración local o regional en tejidos específicos tales como ojos o por administración directa en el tumor (Nishikawa & Huang, 2001).

Dos estrategias claves han sido adoptadas para superar las barreras descritas para el ingreso celular y el tráfico intracelular y tratar de mejorar, así, la interacción con el blanco y

la eficacia de la molécula de siRNA; estas estrategias son i) conjugación directa y ii) utilización de vectores de vehiculización/liberación.

La conjugación directa de las moléculas de siRNA involucra modificación covalente de la secuencia de nucleótidos por agregado de otros grupos químicos. Existen reportes de varias conjugaciones covalentes de siRNA con grupos tales como lípidos (colesterol, ácido litocólico y ácido láurico); polímeros (ej. polietilenglicol (PEG)); péptidos penetrantes y aptámeros que han resultado en un significativo mejoramiento en la liberación del siRNA (Liu et al., 2012). Sin embargo, existen ciertas limitaciones para esta estrategia que incluyen el impacto sobre la actividad del siRNA como consecuencia del proceso de conjugación, además del potencial aumento en la citotoxicidad comentado en el ítem anterior.

La utilización de vectores de vehiculización/liberación de las moléculas de siRNA puede relacionarse *a priori* con mejores chances de evitar la rápida digestión por nucleasas luego de la administración endovenosa y la consecuente rápida depuración del torrente sanguíneo. Y obviamente también con la facilitación del ingreso intracelular vectorizado e incluso con la posibilidad de promover el escape endosomal. Así, varios vectores o sistemas de liberación categorizados en dos grandes grupos, virales y no virales, han sido propuestos para conseguir el objetivo último de mejorar la eficiencia de silenciamiento a través de una apropiada liberación del siRNA (Alexis et al., 2008).

1.4 Sistemas de vehiculización/liberación de siRNA propuestos

Los vectores virales emplean virus atenuados que pueden liberar ácidos nucleicos atrapados en sus genomas dentro de células. Algunos de los ejemplos de virus atenuados usados en Terapia génica, incluyen lentivirus, adenovirus, virus de herpes simples y retrovirus. Con millones de años de evolución a su favor, los virus han mostrado tener una eficiencia de transfección extremadamente alta (más del 99%) en liberar ácidos nucleicos atrapados. Sin embargo los sistemas de liberación virales pueden ser tóxicos e inmunogénicos (Yang et al., 1994). Ellos pueden conducir a integración genómica y a efectos no específicos. Más aún, las preparaciones de virus pueden resultar difíciles durante la elaboración y estandarización en escala industrial. Sin embargo y a pesar de estos obstáculos técnicos, la regulación génica usando vectores adenovirales recombinantes ha alcanzado el máximo éxito clínico y actualmente son tratamientos de Terapia génica en el mercado (Patil et al, 2005).

Aunque los vectores virales ofrecen actualmente mayor eficiencia, los no virales son preferibles debido a los problemas asociados con la falta de seguridad de los primeros. Los vectores no virales han podido transfectar células *in vitro*, pero la mayoría de los nanovehículos propuestos están aún en ensayos clínicos preliminares. Un área de investigación muy activa actualmente es la que estudia cómo superar los obstáculos asociados a los vectores no virales para mejorar su eficiencia de encapsulamiento y el efecto terapéutico de los ácidos nucleicos acarreados. Las dificultades son múltiples, incluyen interacción demasiado fuerte de los sistemas de vehiculización catiónico con los componentes de la sangre, captación por parte del Sistema Retículo Endotelial (SRE) y toxicidad, además de la necesidad de manejar la habilidad de vectorizarlos hacia las células de interés (Xia & Huang, 2012).

Además de más seguros, los vectores no virales pueden ser no inmunogénicos y ofrecen un alto nivel de control con respecto a sus propiedades fisicoquímicas y un interesante potencial de fabricación a escala industrial. Los vectores no virales comúnmente usados para liberación de siRNA son micro y nanopartículas poliméricas tanto catiónicas como aniónicas, sistemas basados en lípidos (tales como liposomas y nanopartículas lipídicas sólidas),

micelas, conjugados y complejos con péptidos que tienen capacidad de penetración celular, y complejos con ciclodextrinas y proteínas (Kim et al., 2009; Midoux et al., 2009).

Reischl & Zimmer (2009) presentaron un esquema de los diferentes mecanismos de ingreso celular propuestos para drogas vehiculizadas en nanopartículas (Figura 16).

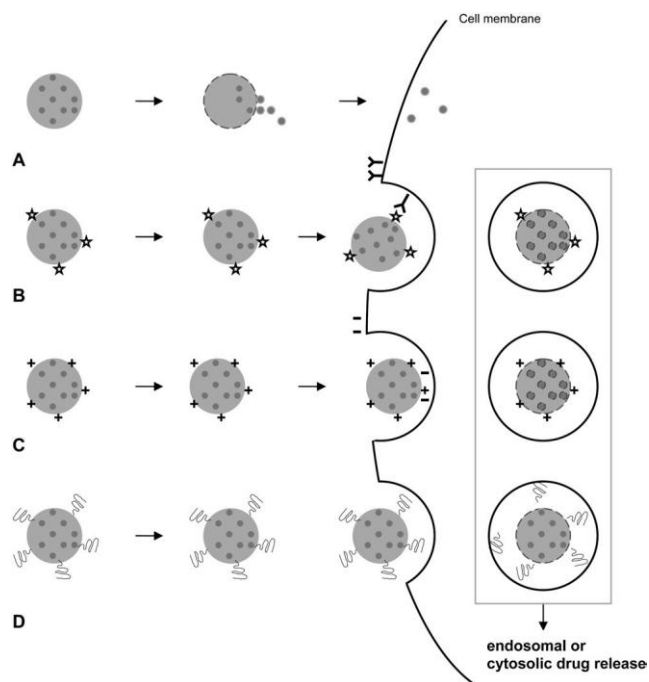


Figura 16: Ilustración esquemática de diferentes mecanismos de ingreso celular para drogas vehiculizadas en nanopartículas. (A) Liberación extracelular de la droga. (B) Liberación de droga con ligandos de vectorización. (C) Exposición de una carga superficial positiva. (D) Liberación de droga a partir de una nanopartícula estéricamente estabilizada (Extraído de Reischl & Zimmer, 2009)

A continuación se resumirán los esfuerzos de formulación más promisorios de la última década que condujeron a la exitosa traslación de este tipo de moléculas biológicas a la terapia.

1.4.1 Sistemas de vehiculización no virales más destacados

Para las indicaciones por vía sistémica, es necesaria una formulación que ayude a superar los desafíos de la estabilidad además del ingreso celular (Li & Szoka, 2007).

El tipo de sistema de vehiculización que se indique, depende del entorno biológico del sitio de aplicación (ejemplo local/sistémico). El excipiente seleccionado debe proteger al siRNA de la degradación química o enzimática y de la exposición a TLR3, a la vez que debe liberar la carga una vez que llegue al sitio blanco. Si se requiere administración sistémica, la rápida depuración renal puede ser evitada asegurando un tamaño de partícula mayor a 10 nm. Por otro lado, el tamaño de las nanopartículas no deberían exceder los 150 nm, para permitir la extravasación y la adecuada penetración en el tejido. La carga superficial de la nanopartícula debería ser lo suficientemente alta como para evitar la auto-agregación pero no debería disparar interacciones inespecíficas con membranas celulares y proteínas plasmáticas ni ser captada por el SRE (Davis, 2009; Gooding et al., 2012).

En relación específica a los excipientes usados para efectivizar el potencial terapéutico de siRNA, algunos han sido capaces de interactuar a través de interacción electrostática, encapsular pasivamente al siRNA o unirse covalentemente para permitir una vehiculización segura y específica de la molécula biológica. El control del delicado balance entre acomplejamiento protector y liberación del siRNA en el lugar y momento exactos es realizado a través de la comprensión de las interacciones excipientes-siRNA. Los más extensa y exitosamente usados han sido lípidos, polímeros preferentemente biocompatibles y ciclodextrinas (Kim et al., 2009; Bruno, 2011).

Los excipientes que tienen el potencial de acomplejar al siRNA en forma no covalente, mayormente debido a interacción electrostática, tienen la ventaja de usar esta tecnología de vehiculización como herramienta modular, sin alteración química alguna de la molécula terapéutica, manteniendo así la biodegradabilidad de los componentes y la facilidad de producción a nivel industrial. Por otro lado, estas interacciones no son tan estables como las que involucran excipientes unidos covalentemente, lo que en primera instancia estos últimos se podrían asociar con más probabilidad de liberar la carga en forma segura en el tejido blanco. Sin embargo, las modificaciones covalentes crean nuevas entidades químicas, las que deben ser extensamente caracterizadas desde el punto de vista toxicológico cada vez que la formulación es cambiada. Esto se debe a que cuando se apela a la modalidad de conjugación, la estrategia puede ser considerada, por la entidad regulatoria, como parte del principio activo y no sólo un excipiente.

A pesar de todos los requerimientos descritos, existen motivos que alientan el optimismo en la obtención de resultados promisorios. Por un lado, ya existen una amplia variedad de excipientes que proveen algunas de las propiedades óptimas señaladas anteriormente y que están en diferentes instancias de exploración preclínica y clínica (Bruno, 2011). Y por otro lado, tan sólo en Estados Unidos, se están llevando adelante en este momento 39 ensayos clínicos que involucran la administración de siRNA por distintas vías; aunque la mayoría implican vías de liberación locales tales como intra-vitreal o intra-nasal.

A continuación se hace un pequeño resumen de los mecanismos de interacción entre excipientes y/o sistemas de vehiculización y siRNA que están actualmente bien descritos y que han dado resultados preliminares exitosos en ensayos preclínicos y/o clínicos.

1.4.1.1 Vectores basados en polímeros

También en este tipo de excipientes, las cargas múltiples catiónicas de los polímeros ayudan a la efectiva condensación del ácido nucleico gracias a interacciones basadas en cargas electrostáticas y esto mejora la liberación; sin embargo y por otra parte, aumenta su citotoxicidad. Por esta razón, los polímeros de bajo peso molecular (PM) son preferidos a los de alto PM. Otro inconveniente adicional frecuente de este tipo de excipiente, es que tienen alta polidispersión y es difícil de controlar su distribución de PM (Patil et al, 2005).

Volviendo al caso de los polímeros con múltiples cargas, estas facilitan puntos multi-contacto con el ácido nucleico retardando de esta manera la disociación del siRNA de los mismos luego del escape endosomal. Las micro y nanoesferas más estudiadas están basadas en ácido poli(láctico co-glicólico) y son biocompatibles, es decir no tóxicas; sin embargo, requieren del uso de un grupo catiónico para interactuar con el siRNA (Howard et al., 2006).

Una clase de estos excipientes ampliamente usados para la vehiculización de ácidos nucleicos es el polímero sintético polietilenimina (PEI), un polímero orgánico lineal o ramificado con PM de 1 a más de 1000 kDa. La capacidad de PEI para unir ácidos nucleicos y formar nanocomplejos auto-ensamblados es similar a los lípidos catiónicos debido a su carga positiva. La toxicidad de los policationes puede deberse a la interacción con las membranas de células o mitocondrias cargadas negativamente que provocan daño en la misma y promueven

activación dependiente del sistema de complemento. La PEI ha mostrado ser segura en ensayos clínicos luego de la vehiculización de DNA plasmídico vía infusión intravesical, así como en aplicaciones dérmicas. Sin embargo, la administración sistémica segura en humanos permanece aún como un obstáculo a superar (Lammers et al., 2012; Bruno, 2011).

1.4.1.2 Vectores basados en Ciclodextrina

Dentro del reducido número de excipientes que llegaron con éxito a ensayos clínicos en humanos se cuenta la ciclodextrina (CD) que constituye la base de una formulación registrada como Rondel®. Por la ventaja adicional de ser uno de los excipientes más usados en Tecnología farmacéutica, se logró evitar la realización de estudios toxicológicos caros y demandantes de tiempo para llegar a los ensayos clínicos. Las CDs son oligosacáridos cíclicos solubles en agua usados en formulaciones farmacéuticas por sus propiedades de solubilización, biocompatibilidad, y baja toxicidad (Davies & Brewster, 2004).

Category of particle	Type, form and composition of carrier	Natural versus		Comments
		synthetic	siRNA/shRNA	
Lipid complex	Cationic liposomes	Synthetic	siRNA	Lung toxicity
	Neutral liposomes (DOPC)	Synthetic	siRNA	Biodegradable-nontoxic
	Lipoplexes	Synthetic	siRNA	
	Stable nucleic acid-lipid particles	Synthetic	siRNA	
Conjugated polymers	Polymer-functional peptides	Synthetic	siRNA	
	Polymer-lipophilic molecules (e.g., cholesterol)	Synthetic	siRNA	
	Polymer-PEG	Synthetic	siRNA	
Cationic polymers	Chitosan	Natural	siRNA/shRNA	Biodegradable-nontoxic
	Atellocollagen	Natural	siRNA/shRNA	Biodegradable-nontoxic
	Pegylated	Synthetic	siRNA/shRNA	Cytotoxicity
	Cyclodextrin	Synthetic	siRNA/shRNA	
	Poly-L-lysine	Synthetic	siRNA/shRNA	

Tabla 1: Nanopartículas seleccionadas que han sido utilizadas para vehiculización de siRNA (*Extraído de Ozpolat et al., 2010*).

Nanopartículas de siRNA basadas en polímeros que contienen CDs han sido desarrolladas y caracterizadas desde el punto de vista biofísico. La CD fue premezclada con un conjugado adamantano-PEG5000 a relaciones equimolares antes de agregar el ácido

nucleico en apropiada relación para alcanzar la carga deseada. El adamantano formó un complejo de inclusión con β -CD que presentó una constante de asociación alta y la formación de las nanopartículas se logró por auto-ensamble. Las moléculas pegiladas fueron modificadas con transferrina para permitir vectorización activa. Los grupos imidazol unidos al esqueleto de la CD asistieron a la liberación endosomal del siRNA debido a su efecto regulador de pH. Las partículas requirieron una relación de carga ligeramente positiva de 1 a 5 para una completa complejación y protección de siRNA de las enzimas séricas. Basado en este vehículo multicomponente, la formulación Rondel® ha entrado a la fase clínica como la primera que vectoriza siRNA activamente (Bruno, 2011; www.clinicaltrial.gov).

1.4.1.3 Nanopartículas lipídicas sólidas

Además de los liposomas, las nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) representan una clase emergente de vectores no virales para las aplicaciones de liberación de siRNA. En contraste a la estructura bicapa observada en liposomas, las NLSs son matrices lipídicas monolíticas hechas a base de triglicéridos, ceras o colesterol. Son partículas de tamaño submicrónico estables que pueden encapsular moléculas de siRNA en el núcleo lipídico o en la superficie de la partícula. Estos sistemas protegen al siRNA de la degradación *in vivo*, mejoran la vida media de circulación y facilitan la liberación. En forma similar a los liposomas, estos sistemas también demuestran destacadas propiedades en el diseño de la formulación como factibilidad de control, versatilidad, además pueden ser hechos a medida y necesidad para asegurar liberación vectorizada/localizada de las moléculas de siRNA.

Como ejemplo se pueden citar a NLSs conteniendo siRNA compuestas de éster colesterilo, colesterol, triglicérido, DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) y DC-colesterol (relación de peso 45:3:10:14:28) que mostraron eficiente ingreso celular de siRNA en células de cáncer de próstata (Kim et al., 2008). La liberación y la vectorización de siRNA usando NLSs ha sido también exitosamente demostrada en un amplio rango de modelos de cáncer de mama, hígado y pulmón en animales (Oh & Park, 2009). ALN-RSV® y Atu-027®, son ejemplos de NLSs en ensayos clínicos de Fase 1 para el virus sincial respiratorio y para tumor sólido avanzado, respectivamente (Zamora et al, 2011).

Como conclusión parcial surgida del uso de sistemas de vehiculización no virales es de destacar que hoy día existen numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* que están tratando de arrojar luz sobre el perfil toxicológico de los nuevos sistemas de liberación propuestos; sin embargo en ausencia de comparación sistémica y debido a diferentes protocolos, líneas celulares, tipos de ensayos y modelos *in vivo* usados, los resultados son a menudo inconsistentes y controversiales. Más aún, los requerimientos de escalado y Buenas Prácticas de Manufactura industriales así como los protocolos de elaboración son raramente tomados en consideración cuando se inician las investigaciones con nuevas tecnologías de vehiculización (Bruno, 2011).

1.4.2 Vectores de vehiculización/liberación de siRNA basados en liposomas

Entre los vectores no virales, los liposomas son, por lejos, los más avanzados debido a su eficiente interacción con las membranas celulares lipídicas y efectiva facilitación del escape endosomal que conduce a eficiente liberación del ácido nucleico entrampado. Además, desde una perspectiva de desarrollo del producto, la existencia desde hace décadas de un número importante de productos liposomales comercializados es un detalle importante muy favorable. Los liposomas han resultado ser seguros y bien tolerados para uso clínico humano; están sustentados, además, por una sólida base de conocimientos científicos así como de experiencia técnica (Kapoor et al., 2012).

Los sistemas de liberación basados en lípidos y los liposomales han demostrado su potencial a través de un ingreso rápido y un crecimiento sostenido en los programas de ensayos clínicos para moléculas de siRNA. Sin embargo y a pesar de su extendido uso, no existen todavía Guías regulatorias oficiales que avalen una estrategia de desarrollo consistente para este tipo de productos. Aunque existe una Guía técnica preliminar para el desarrollo de productos liposomales, el diseño experimental y la estrategia de control de los mismos sigue siendo empírica y depende generalmente de un abordaje caso por caso (www.fda.gov, Guidance for Industry, Liposome Drug Products, 2002).

La liberación de siRNA usando liposomas tiene requerimientos estructurales únicos e implicancias en la estabilidad comparables a las observadas para pequeñas moléculas o para otras moléculas biológicas. Debido al creciente énfasis de las entidades regulatorias en diseñar

y optimizar formulaciones usando estrategias basadas en la evaluación de riesgo, existe una clara necesidad de desarrollar sistemas de liberación bien caracterizados y estables para la terapéutica basada en siRNA.

La idea no incluye la mera aplicación de estos principios sólo durante el diseño de las formulaciones, sino también durante la etapa de comprensión de resultados asociada; de manera que resulte en un proceso sistemático para el desarrollo, la optimización y la aprobación de un producto comercial consistente. Más aún, las estrategias de desarrollo de sistemas bien caracterizados pueden ser usadas para mejorar la manufacturabilidad y reducir la variabilidad lote a lote durante la elaboración industrial, el escalado y de esa manera mejorar la probabilidad de conseguir resultados consistentes en la clínica (Kapoor et al., 2012).

Los liposomas son estructuras bicapas esféricas con un núcleo acuoso que ayuda a encapsular las moléculas de siRNA ya sea debido a la complejación con las bicapas lipídicas y/o al entrapamiento en el compartimiento acuoso. Los lípidos pueden formar complejo directamente con el siRNA vía interacción electrostática mejorando la eficiencia de entrapamiento del sistema. Más aún, las propiedades de los sistemas liposomales pueden ser diseñadas y modificadas para promover el entrapamiento, el ingreso celular, la vectorización y el escape endosomal de las moléculas de siRNA. Es debido a la versatilidad en el diseño de las formulaciones y a su eficiencia en la liberación, que los vehículos de liberación de siRNA basados en lípidos son los más avanzados en la clínica entre todos los sistemas de vectores propuestos (Lammers et al., 2012; Bruno, 2011; Kundu et al., 2012).

1.4.2.1 Liposomas catiónicos

Siguiendo el trabajo pionero de Felgner et al (1987) sobre la síntesis del lípido catiónico DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio) comercializado como Lipofectin®, otros lípidos han sido sintetizados y usados para liberación de ácidos nucleicos. Ellos son: i) DOTAP, N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio metilsulfato, comercialmente disponible como DOTAP:DOPE (Dioleil-L-R-fosfatidiletanolamina), o DOTAP:colesterol; ii) DOSPA (2,3-dioleiloxi-N-

[2(esperminocarboxamido)etil]-N,Ndimetil-1-propanamonio trifluoroacetato) usado en Lipofectamine®. Estos lípidos han resultado muy efectivos en mejorar el ingreso celular de los ácidos nucleicos. Además, la incorporación de lípidos fusogénicos tales como DOPE en los sistemas liposomales catiónicos han mejorado notablemente el escape endosomal resultando, en consecuencia, en un mejoramiento de la eficiencia de transfección.

Varias otras formulaciones liposomales tales como Oligofectamine® también fueron luego utilizadas para la liberación de ácidos nucleicos en modelos preclínicos (Kapoor et al., 2012). Sin embargo, los lípidos catiónicos son citotóxicos debido a que su carga es responsable de la interacción no específica con componentes celulares cargados negativamente, como opsoninas, proteínas séricas y enzimas, conduciendo a inactivación sérica (Liu et al., 1997), y a que presentan interferencia con la actividad de los canales iónicos y reducción de la adhesión celular (Burger et al., 1992).

Recientes estudios de Kedmi et al (2010) que usaron nanopartículas basadas en lípidos catiónicos para vehicular el siRNA revelaron significativa hepatotoxicidad y también pérdida de peso en ratones cuando se los compara con nanopartículas neutras o cargadas negativamente. Además, hubo aumento en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-2, TNF- α , vía activación de los receptores TLR4 que puede resultar en progresión a cáncer y riesgo aumentado de angiogénesis (Ikebe et al., 2009). Otro estudio mostró que los lípidos catiónicos generan especies reactivas de oxígeno que disparan indirectamente TLR4 (Park et al., 2004).

Para superar esta limitación, el foco actual está centrado en la síntesis de lípidos catiónicos de segunda generación de mínima toxicidad pero que retengan su eficiencia de transfección. Se propuso así, la modificación de la estructura del lípido en uno o más dominios (grupo cabeza, conector y cola hidrofóbica) para estudiar la relación estructura – actividad.

Los reportes de modificaciones en la cola hidrofóbica concluyeron que la eficiencia de transfección aumenta con la insaturación, con una longitud de cadena menor y con lípidos de doble cola. Con respecto al grupo cabeza del lípido, la presencia de guanidino, grupos hidroxialquilos, o cíclicos, aumentan la eficiencia de transfección. En lo relacionado al enlace

o conector entre la cola hidrofóbica y la cabeza hidrofílica, los enlaces ésteres han resultado de menor toxicidad debido a su biodegradabilidad en comparación con enlaces no biodegradables como éter y carbamato. Sin embargo, los enlaces éter han resultado ser más eficientes que los ésteres. Los nuevos reactivos de transfección Lipofectamine 2000® y RNAiMax® son dos de los más usados hoy día, siendo eficientes y relativamente más seguros en comparación con los reactivos iniciales Lipofectin® y Lipofectamine®.

Para evitar la degradación de los complejos lípido-siRNA en los lisosomas tardíos altamente ácidos (pH 4.5), es importante que las moléculas de siRNA escapen de los endosomas tempranos/tardíos. Esta capacidad es promovida actualmente con la inclusión en la membrana lipídica de un vector de liberación, tal como un lípido catiónico o uno fusogénico (ejemplo diC14-arnidina y DOPE, respectivamente) (Kapoor et al., 2012).

1.4.2.2 Liposomas aniónicos y neutros

Debido a la toxicidad exhibida por los lípidos catiónicos, se evaluó la factibilidad de uso de lípidos aniónicos o zwitteriónicos para actuar como vectores de liberación de siRNA potencialmente seguros. El entrapamiento de siRNA y la eficiencia de liberación con estos lípidos por sí mismos, es sin embargo, debatible debido a la ausencia de interacciones electrostáticas que mejoren el acomplejamiento con el siRNA. Esto está en relación con que el siRNA está negativamente cargado y los lípidos son de naturaleza aniónica o neutra. Tradicionalmente se ha requerido de un tercer grupo químico para obtener una asociación apropiada y formar así los lipoplexos. Así se pueden mencionar como ejemplos a lipoplexos aniónicos para liberación de DNA usando calcio como agente de unión que mostró buena actividad en células CHO-K1 (Patil et al., 2005a). También se usó al polímero catiónico poli L-lisina con alto nivel de eficiencia (Lee & Huang, 1996).

Se prepararon liposomas aniónicos conteniendo siRNA sin utilizar un agente adicional, pero las formulaciones mostraron pobre eficiencia de encapsulación (7-9%). Sin embargo, Halder et al. (2006) prepararon lipoplexos asociados a liposomas neutros (DOPC) que dieron eficiente silenciamiento para el gen de la quinasa de adhesión focal en un modelo de tumor de ovario en ratones. La inhibición del crecimiento del tumor fue observado por 4 días con una

reducción global en el peso del mismo del 72%, aunque se presentaron inconvenientes con la estabilidad coloidal a largo plazo por ausencia de fuerzas de repulsión entre las partículas.

1.4.2.3 Liposomas de circulación prolongada

Los liposomas con superficies sin decorar interactúan con los componentes de la sangre (tales como anticuerpos, fibronectinas, etc), atraen macrófagos y como consecuencia son rápidamente depurados de la circulación sanguínea (Gregoriadis, 1988); las velocidades de depuración de los liposomas aniónicos y catiónicos son mayores que para los neutros (Kabanov, 1999). Sin embargo, para propósitos de administración *in vivo*, los liposomas deben permanecer en sangre por períodos mayores, por lo menos hasta que alcancen su sitio de acción. Esto ha sido logrado con el uso de polímeros tales como el polietilenglicol (PEG).

El PEG es un polímero hidrofílico que cuando es colocado sobre las superficies de los liposomas, reduce el reconocimiento del liposoma y el ingreso al sistema retículo-endotelial aumentando de esta manera el tiempo de circulación de los mismos (Woodle, 1993). La circulación prolongada también ayuda a la localización de los liposomas en el sitio del tumor donde existen fenestraciones de entre 200 y 780 nm de tamaño, fenómeno conocido como vectorización pasiva. Adicionalmente las cadenas de PEG también proveen estabilización estérica a las partículas de los liposomas y se ha observado que la eficiencia de los mismos depende de la longitud de la cadena de PEG (Kapoor et al., 2012).

Importantes avances de silenciamiento de genes a largo plazo se han conseguido con nanovehículos basados en lípidos y estabilizados por PEG conocidos como SNALP (del inglés “*stabilized nucleic acid lipid particles*”). Morrissey et al obtuvieron un eficiente silenciamiento del virus de la Hepatitis B; una única dosis de inyección en ratones mostró silenciamiento durante 7 días y la administración semanal de una dosis fue eficiente hasta por 6 semanas (Morrissey et al., 2005). Otros autores lograron un efecto aún mayor de silenciamiento con una única dosis de inyección endovenosa en la que la supresión del tumor fue conseguida durante tres semanas (Semple et al., 2010).

Los componentes claves de este tipo de sistema de vehiculización son un lípido catiónico y un lípido “colaborador” cubierto por polietilenglicol (PEG); los resultados indican

que este tipo de composiciones fueron capaces de asegurar unión eficiente a siRNA, escape endosomal y estabilidad suficiente de la nanopartícula en circulación (Gooding et al., 2012) (Figura 17). Algunos ejemplos de ensayos clínicos en oncología utilizando este tipo de sistemas son presentados en el ítem correspondiente.

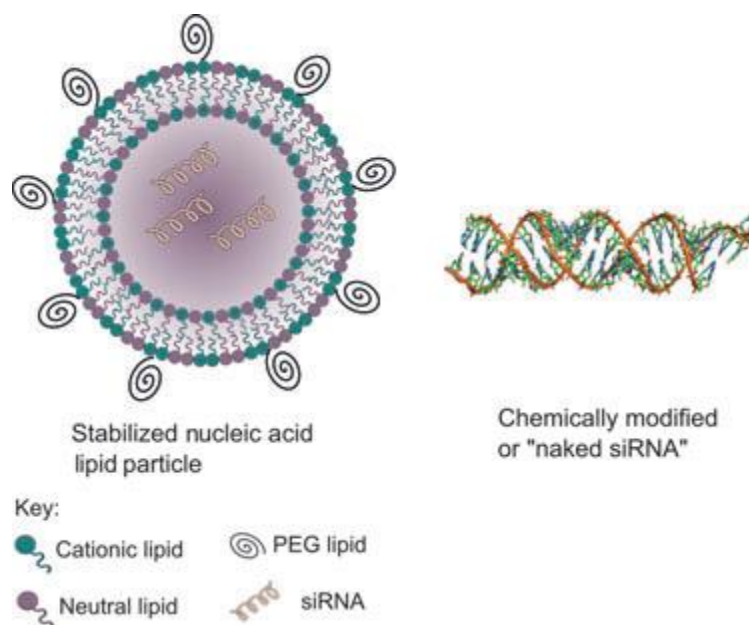


Figura 17: Las formas de liberación de siRNA usados en ensayos clínicos. Los vehículos de liberación de siRNA varían dentro del rango nano-vehículos del tipo de los complejos, como nanopartículas ejemplificadas por los SNALPs (partículas estables conteniendo ácidos nucleicos/LNPs (partículas lípidos ácido nucleicos) a siRNAs simples modificados químicamente (*Extraído de Gooding et al 2012*).

1.4.2.4 Liposomas multifuncionales

La experiencia acumulada reveló que luego de la administración reiterada de liposomas pegilados, éstos pierden su habilidad para circular por largos períodos de tiempo en el torrente sanguíneo, un fenómeno conocido como “depuración sanguínea acelerada”. Además la pegilación impide la internalización del siRNA dentro de la célula blanco y su subsecuente escape de la vía endocítica, lo que reduce su actividad biológica.

Un interesante abordaje para superar estas limitaciones lo constituyó el diseño de lípidos PEG-derivatizados intercambiables. Luego de la administración sistémica, estos lípidos pueden ser liberados de la superficie de la nanopartícula. Más aún, el diseño y la síntesis de lípidos catiónicos novedosos que son más fusogénicos y el uso de ligandos de

vectorización con capacidad de internalización han contribuido a la presentación de formulaciones innovadoras con destacada eficiencia de transfección (Gomez de Silva, 2012; Mendonca et al., 2010).

De esta manera, el diseño de sistemas liposomales multifuncionales utiliza la estrategia conocida como “decoración” sobre la superficie usando un rango de ligandos con propiedades específicas. Estos grupos químicos de superficie incluyen ligandos de vectorización, moléculas fusogénicas, estrategias de ocultamiento y así ofrecen una plataforma altamente derivatizada y bien diseñada con alta eficiencia *in vivo*. La evolución de los liposomas para liberación de droga ha sido bien definida por Torchilin (2005) y se resume en la Figura 18.

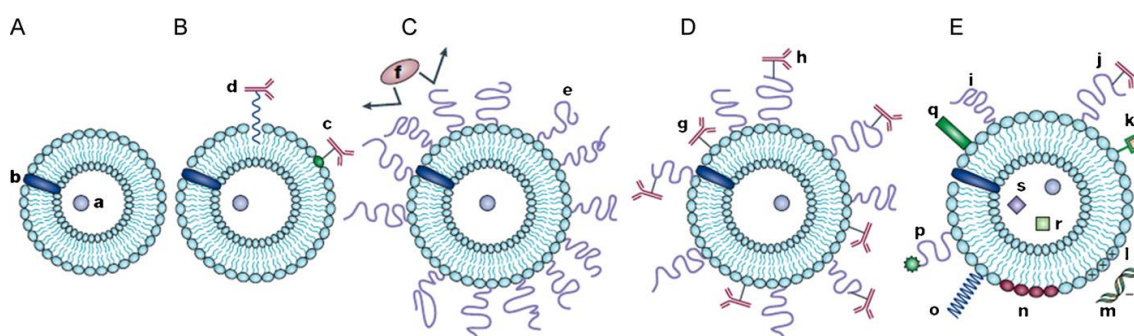


Figura 18: Evolución de los liposomas como sistemas de liberación de drogas: A) los primitivos liposomas “planos” de fosfolípidos con una droga soluble en agua (a) atrapada dentro del interior acuoso del liposoma y una droga insoluble en agua (b) incorporada dentro de la membrana liposomal. (B) Immunoliposoma vectorizado con un anticuerpo unido covalentemente (c) a los fosfolípidos reactivos en la membrana, o anclado hidrofóticamente (d) en la membrana liposomal luego de la modificación preliminar con un grupo hidrofóbico. (C) Liposomas de circulación prolongada injertado con un polímero protector (e) tal como PEG, que recubre la superficie liposomal de la interacción con proteínas opositoras (f). (D) Immunoliposoma de circulación prolongada contempla simultáneamente a ambos agregados, el polímero protector y el anticuerpo, que puede ser agregado a la superficie del liposoma (g) o preferentemente al extremo distal de la cadena polimérica injertada (h). (E) Liposoma de nueva generación, la superficie del cual puede ser modificada (en forma separada o simultáneamente) en diferentes modalidades. Entre estas modificaciones figuran: el agregado de polímero protector (i) o polímero protector y ligando de vectorización, tal como anticuerpo (j); el agregado/incorporación de la etiqueta para diagnóstico (k); la incorporación de lípidos cargados positivamente (l) permitiendo la complejación con DNA (m); la incorporación de lípidos sensibles a estímulos (n); la unión de un polímero sensible a estímulos (o); la unión de péptidos con capacidad de penetración celular (p); la incorporación de componentes virales (q). Además de una droga, los liposomas pueden contener partículas magnéticas (r) para vectorización magnética y/o con oro coloidal o partículas de plata (s) para microscopía electrónica (*Extraído de Torchilin, 2005*).

Hay varios ejemplos en la literatura donde múltiples funciones han sido incorporadas en los sistemas liposomales para obtener nanocarriers multifunción. Se prepararon liposomas

conjugados con transferrina pegilados conteniendo siRNA anti-BCR-ABL para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica en células K562 y LAMA-84. También se sintetizó poli-L-arginina conjugada con PEG (PLR-PEG) y prepararon liposomas usando el lípido catiónico DOTAP, el lípido fusogénico DOPE, colesterol y PLR-PEG. Tales liposomas vectorizados fueron conjugados con arginina y usados para silenciar GFP (Green fluorescent protein) en células H4II-E y HepG2. Concordantemente, se encontró que los liposomas PLR-PEG fueron 30% más eficientes que los liposomas convencionales (no pegilados y no vectorizados) a una relación N/P de 30:1 (Kapoor et al., 2012).

1.4.3 Optimización de la formulación

Los ítems anteriores demuestran que los esfuerzos por mejorar la liberación de moléculas de siRNA han resultado en un amplio rango de sistemas basados en lípidos que varían en términos de su composición y propiedades fisicoquímicas.

Volviendo al planteo inicial de proponer sistemas liposomales con una composición y ensamblado molecular que puedan ser diseñados de manera que estas partículas sean preferencialmente internalizadas por las células conteniendo el siRNA blanco y liberen su contenido en el compartimiento celular deseado. Obviamente, tanto la composición como las propiedades fisicoquímicas de las partículas lipídicas tendrán influencia sobre la funcionalidad y la liberación del siRNA atrapado *in vitro*, así como *in vivo*.

Debido a esta intrincada ingeniería, las partículas basadas en lípidos que atrapan siRNA pueden llegar a presentar una elevada complejidad a nivel estructural y funcional. La inclusión de lípidos con funciones específicas, grupos de vectorización, ligandos de decoración superficial y agentes que modifican las propiedades de liberación del siRNA impactarán, seguramente, sobre la complejidad de las partículas. Y como se comentó anteriormente es crítico desarrollar sistemas bien caracterizados con propiedades consistentes que sean estables durante largos períodos de tiempo para asegurar eficacia, baja toxicidad y eventualmente garantizar la performance clínica deseada.

Evidentemente el diseño global de los sistemas basados en lípidos y las resultantes permutaciones y combinaciones pueden resultar muy desafiantes. El efecto de cambiar el

proceso de elaboración y las composiciones puede ser difícil de identificar hasta convertirse, en algunos casos, en un recurso limitante del desarrollo. La realización de los ensayos fisicoquímicos que, de mínima, deben ser usados para correlacionar con la actividad *in vivo* o en el mejor de los casos para predecir ese comportamiento es, por lo tanto, importante en el diseño de formulación y optimización. Es posible hoy modificar la complejidad de las nanopartículas a medida para conseguir las propiedades de liberación y disposición intracelular deseadas; pero se deberá evaluar también cómo impacta esta complejidad sobre la estabilidad del liposoma y de la molécula de siRNA atrapada. Las propiedades fisicoquímicas son, también, importantes indicadores para monitorear la estabilidad de largo plazo de estas formulaciones (Kapoor et al., 2012).

1.4.4 Caracterización biofísica

Kapoor et al. (2012) hicieron una revisión de las técnicas de caracterización físico-química y ensayos de sistemas de vehiculización/liberación de siRNA basados en lípidos (lipoplexos) y de su uso en general para dar aval y robustez al desarrollo de este tipo de productos (Tabla 2). Demostraron la importancia de la aplicación de estas técnicas para mejorar la comprensión durante el diseño de la formulación. Así, discutieron la importancia de la caracterización fisicoquímica en la comprensión de la correlación (si es que existiera) entre los parámetros de formulación y la actividad de los lipoplexos *in vitro* así como *in vivo*. También presentaron estrategias que dan aval para el desarrollo de liposomas estables para liberar siRNA.

Atributo de la formulación	Técnica fisicoquímica	Atributo recomendado
Estructura lipídica	NMR, MS, FTIR, TLC	Doble cola insaturada preferiblemente con función conectora biodegradable. Composición uniforme en el liposoma individual.
Composición del liposoma	HPLC, UV	Lípido catiónico, aniónico o neutro con asociación a membrana y célula. DOPE: otorga fusogenicidad. Colesterol: disminuye fuga de carga. Lípido pegilado: mejora vida media. Ligandos de vectorización para mejorar selectividad.
Relación N/P	HPLC, UV	Relación molar > 1:1
Tamaño de partícula	DLS, microscopía electrónica	80-100 nm (<i>in vivo</i>) Bajo índice de poli-dispersión
Carga superficial	Electroforesis	< -30 mV o > + 30 mV para prevenir la floculación de las partículas
Eficiencia de encapsulación	UV, fluorescencia	> de 80%, alta relación siRNA: lipido

Abreviaturas: NMR (Resonancia Magnética Nuclear); MS (Espectrometría de masas); FTIR (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier); TLC (Cromatografía en capa fina); HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia); UV (ultravioleta); DLS (Dispersión de luz dinámica).

Tabla 2: Parámetros de formulación para sistemas de liberación de siRNA basados en liposomas (*Extraído de Kapoor et al., 2012*).

1.4.4.1 Morfología de los lipoplexos catiónicos

La caracterización morfológica de los vectores liposomales de siRNA ayuda a entender la estructura relativa, la orientación de las moléculas de siRNA y el ensamblado de los complejos. Estas características pueden influenciar la estabilidad del complejo tanto *in vitro* como *in vivo* pudiendo impactar también sobre la biodistribución. La morfología de los complejos de ácidos nucleicos y liposomas pueden ser estudiados usando técnicas tales como Microscopía de transmisión electrónica criogénica (crio-TEM) y Microscopía electrónica de fractura por congelamiento.

La morfología de los complejos liposomales conteniendo DNA ha sido ampliamente estudiada, pero también estudios morfológicos de lipoplexos compuestos de otros ácidos nucleicos, tales como oligodeoxinucleótido (ODN) antisentido y siRNA han sido reportados (Desigaux et al., 2007). Weisman et al. (2004) caracterizaron complejos lípido-ODN de cadena simple que revelaron estructuras similares a aquellos de los lipoplexos de DNA.

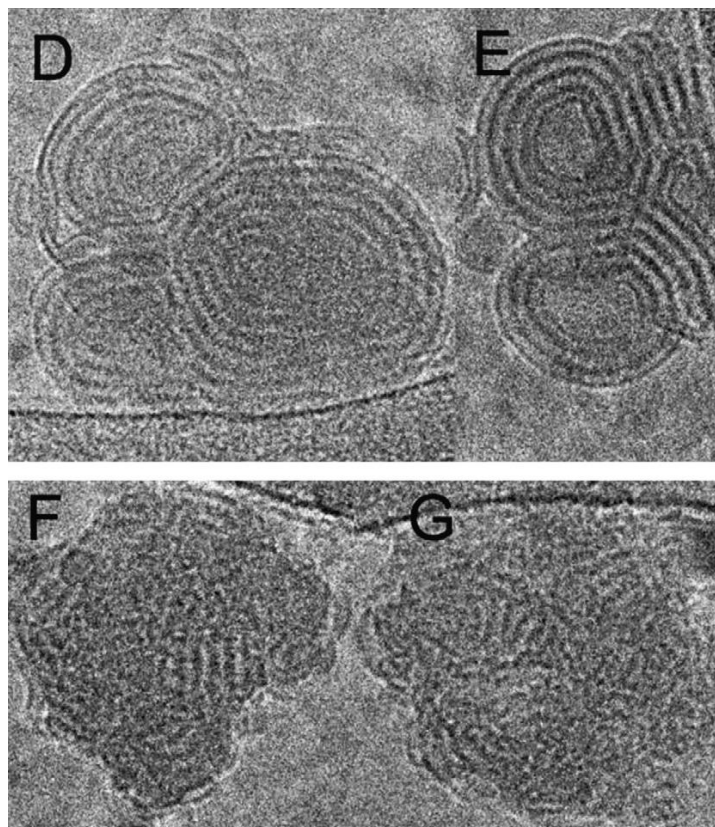


Figura 19: Morfología de los complejos lípidos-siRNA. Estructuras concéntricas “tipo cebolla” como indicaron las micrografías de Crio-TEM. Se observa un arreglo regular de las moléculas de RNA en el borde. **(D y E)** Estructura magnificada de dos complejos DOSK/siRNA. **(F y G)** Estructura magnificada de dos complejos DOSP/siRNA (Escala de barra: 50 nm). (Extraído de *Desigaux et al., 2007*)

Desigaux et al prepararon lipoplexos conteniendo RNA con lípidos catiónicos de diferentes grupos cabeza aminoglicosídica junto con DOPE (Figura 19). Todos los lipoplexos mostraron estructuras multicapas con un espaciado interlamelar de 7 nm (suma del grosor de la bicapa lipídica y el siRNA). Sin embargo, los lípidos como el dioleil succinil kanamicina A (DOSK) dieron estructuras lamelares concéntricas de 200 a 500 nm. El dioleil succinil paromomicina (DOSP) mostró estructuras irregulares de tamaño alrededor de los 60 nm. Esto se explicó en la base de que los lípidos con anillo 4,6 DDS como el DOSK formaron

liposomas más grandes que los que tienen anillo 4,5 DDS, como el DOSP. Este tamaño mayor ayudó a formar estructuras lamelares sobre un amplio rango (tipo anillos de cebolla como en la figura D y E), mientras que los liposomas menores (del DOSP) facilitaron la formación de estructuras ordenadas de poco rango como se observa en la figura F y G.

La optimización de la formulación en base a la caracterización morfológica puede ser útil ya que se ha demostrado la correlación entre la morfología del lipoplexo y su eficiencia de transfección. Desigaux observó que los lipoplexos de siRNA caracterizados como estructuras irregulares más chicas (F y G) son más eficaces en células d2GFP, HeLa y HEK293 comparados con estructuras de capas concéntricas más grandes (D y E). Esto se relacionó con un ingreso endocítico más eficiente de los complejos más chicos y mejor desestabilización endosomal debido a la estructura cónica de los lípidos catiónicos participantes (Desigaux et al., 2007).

Estos ejemplos confirman claramente que la morfología afecta la eficiencia de transfección. Debido a que la morfología es influenciada por la relación de carga y la estructura del lípido catiónico, estos factores afectarán la eficiencia de transfección. Otros factores como tiempo de incubación y contenido de lípido fusogénico también influyen sobre ambos parámetros (Kapoor et al., 2012).

1.4.4.2 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) determina la carga de siRNA en las formulaciones liposomales; es un parámetro crítico ya que puede ser usado para optimizar la composición de la formulación así como el proceso de elaboración.

Desde la perspectiva del diseño de una formulación, una alta EE es ventajosa para maximizar el siRNA a una relación de lípido y para facilitar el desarrollo de una formulación que contenga una dosis exacta. Desde la perspectiva del proceso de fabricación, poder controlar el proceso de entrapamiento se asocia con un alto nivel de consistencia y una reducida variabilidad.

La encapsulación de siRNA en los liposomas puede ser hecha tanto durante como luego de la preparación de los mismos. El primero de estos métodos de cargado resulta en pobres EE (10-20%) si los lípidos son negativos o neutros y por lo tanto pobre silenciamiento. Para mejorarla se incluyeron moléculas catiónicas altamente cargadas tales como protamina o poli-L-lisina, ésta última dio lugar a los exitosos sistemas de liberación conocidos como PLL-R8-MEND (del inglés, *octaarginine modified multifunctional envelope-type nanodevice*) (Nakamura et al., 2007). Hatakeyama y colaboradores propusieron este nano-dispositivo multifuncional “tipo sobre” para la liberación eficiente de siRNA *in vivo* usando DOPE, PEG y un péptido fusogénico GALA sensible a los cambios de pH. El dispositivo facilitó el escape endosomal de la nanopartícula, mejorando así la eficiencia de liberación de siRNA y el silenciamiento génico luego de administración tópica *in vivo* (Hatakeyama et al., 2009).

Si el entrapamiento de siRNA se hace luego de la preparación de los liposomas, este ocurre como resultado de la interacción electrostática lípido-siRNA, seguido por reestructuración de las capas lipídicas. Este método resulta en aumento de la EE a medida que la relación N/P aumenta, mejorando la eficiencia de silenciamiento (Semple et al., 2010; Morrissey et al., 2005; Suh et al., 2009).

La EE se calcula usando cualquiera de las dos fórmulas que se presentan a continuación:

$$\text{Fórmula 1: \% EE} = \frac{\text{Concentración siRNA encapsulado}}{\text{Concentración siRNA inicial}} \times 100$$

La concentración de siRNA encapsulado se obtiene luego de solubilizar los liposomas usando surfactants tales como TritonX-100, el más común para esos fines.

$$\text{Fórmula 2: \% EE} = 100 - \left[\frac{\text{Concentración siRNA libre}}{\text{Concentración siRNA inicial}} \right] \times 100$$

La concentración inicial de siRNA es medida en forma teórica o determinada en solución durante los procesos de operación unitaria. Hay varias técnicas para determinar EE, como por ejemplo ensayo de absorbancia/fluorescencia, ultrafiltración centrifugación y ensayo de retraso en gel.

En la primera técnica, la concentración inicial y encapsulada de siRNA (fórmula 1) o siRNA libre (fórmula 2) es determinada usando absorbancia (λ 260 nm) o fluorescencia (ribogreen, 490nm/520nm). El porcentaje de EE es luego calculado usando fórmula 1 (encapsulado) o fórmula 2 (libre), respectivamente.

Otra técnica llamada ultrafiltración centrifugación es similar a la primera. En este método, los lipoplexos son filtrados a través de una membrana de aproximadamente un tamaño de 30-100 kDa, de manera que el siRNA libre pueda pasar a través de la misma, mientras que el siRNA entrampado queda retenido. La concentración de siRNA libre es luego determinada usando un ensayo de absorbancia o fluorescencia para determinar EE (usando la fórmula 2). Se puede usar este método para determinar el efecto de varios parámetros de formulación (composición del liposoma, relación N/P) sobre EE (Zhang et al., 2010).

La tercera técnica para determinar EE es el ensayo de retardo en geles, donde la banda del siRNA libre migra hacia el cátodo (+) bajo electroforesis. Las concentraciones del siRNA inicial y libre son determinadas usando un software de cuantificación de bandas del gel tal como Image J. A menudo, este método es usado con propósitos cualitativos más que cuantitativos debido a la ausencia de un método universal para la cuantificación. Los lipoplexos pueden tener interacciones iónicas débiles y pueden por lo tanto ser incapaces de retener todo el siRNA durante la electroforesis. Consecuentemente, este ensayo no es siempre una representación verdadera de la EE.

La EE depende de un número de factores tales como la relación N/P, con la que aumenta a partir de su incremento (Suh et al., 2009); tamaño del liposoma, ya que a mayor tamaño, mayor EE; también se ve influenciada con el contenido de lípido catiónico (Zhang et al., 2010) y la naturaleza del ácido nucleico.

1.4.4.3 Tamaño de partícula

Las evaluaciones de tamaño medio y distribución de tamaño son parámetros de la formulación que indican homogeneidad de partículas en los liposomas y pueden ser usadas para el proceso de formulación incluida la optimización de la misma. El índice de polidispersión de una formulación refleja el rango de partículas presentes cerca del tamaño de

partícula medio deseado. Se prefieren partículas de tamaño uniforme con un índice bajo de polidispersión (< 0.2). De esta manera, los cambios en el tamaño medio de partícula y en el índice de poli-dispersión pueden ser usados como indicadores de estabilidad de largo plazo.

Desde una perspectiva *in vivo*, el valor de estos parámetros determina qué tan apropiada resulta la vía de administración seleccionada y también permite predecir la depuración de los lipoplexos luego de la misma. La dispersión de luz dinámica (DLS), del inglés *Dynamic light scattering*, y la microscopía de transmisión electrónica (TEM) son las técnicas más comunes para determinar el tamaño de partículas de lipoplexos en el rango nanométrico. La DLS está basada en la medición de fluctuaciones de intensidad (como resultado del movimiento Browniano) y obtiene correlación con el tamaño de partícula usando la ecuación de Stokes-Einstein. Puede determinar el tamaño de partícula de una muestra entera; sin embargo, provee un tamaño hidrodinámico que es mayor que el tamaño real. TEM determina el tamaño real pero debido al tiempo que involucra, sólo puede ser medida una pequeña población de las partículas (Kapoor et al., 2012).

El tamaño de los lipoplexos es usualmente mayor que el de los liposomas debido al reacomodamiento estructural lipídico involucrado en la encapsulación de siRNA (Suh et al., 2009). Varios factores determinan el tamaño de la partícula tales como relación de carga (N/P), composición del liposoma y fuerza iónica media. Relaciones de carga (N/P) altamente positivas o negativas forman complejos menores con respecto a aquellos en los que la carga es cercana a la neutralidad (Almofti et al., 2003; Eastman et al., 1997).

1.4.4.4 Carga superficial

La determinación de la carga de superficie es crítica para entender el ingreso celular de las partículas. Normalmente se considera que los lipoplexos que entrapan siRNA son internalizados dentro de las células vía endocitosis (Zhang et al., 2010).

Sin embargo, los lipoplexos cargados negativamente también han sido asociados a buenas eficiencias de transfección. La eficacia *in vivo* de estos sistemas se especula que se debe a la adsorción de factores de promotores fagocíticos tales como $\alpha 2$ macroglobulina, IgG y proteínas C reactivas sobre la superficie de los liposomas. Alternativamente, la carga

aniónica podría alterar la conformación de las proteínas integrales de membrana que mejora el reconocimiento celular. Los liposomas neutros han resultado eficientes *in vivo*, aunque el mecanismo de su liberación es pobremente entendido (Kapoor et al., 2012).

Generalmente, la carga superficial global de un lipoplexo está primariamente determinada por la relación N/P; Zhang estudió este efecto y como era de esperar el potencial zeta aumentó gradualmente de (-40) mV a + 50 mV cuando la relación N/P fue aumentada de 1:1 a 5:1 (P/P). Más allá de la relación 5:1 hubo un aumento posterior en la carga superficial que indicó saturación (Zhang et al., 2010).

Además, está bien establecido que las partículas con un potencial zeta igual o mayor a ± 30 mV presentan una repulsión suficiente para prevenir su aglomeración. Otro factor que afecta la carga superficial es la fuerza iónica del medio, si es muy alta puede causar neutralización de carga resultando así tamaño medio grande por aglomeración (Li et al, 2010).

1.4.5 Liberación del siRNA

La liberación de siRNA a partir de los lipoplexos es crítica para asegurar que el ácido nucleico pueda interactuar con el blanco de interés y poder inhibirlo consecuentemente. Los estudios de liberación de siRNA *in vitro* pueden ser usados como sustitutos para simular el entorno fisiológico que los lipoplexos de siRNA experimentan antes e inmediatamente a su internalización. Esta liberación no debe ocurrir en circulación antes de la internalización por parte de las células blanco. Luego del ingreso celular, las moléculas de siRNA atrapadas en los sistemas lípidos sensibles a pH deberían, desestabilizar el endosoma (pH 4-5) y liberar el siRNA en el citoplasma (pH 7). Concordantemente, los estudios de liberación de siRNA del lipoplexo deben ser realizados a pH 7 para demostrar que no se libera el siRNA, seguido por un cambio inmediato a pH 4-5 para demostrar la efectiva liberación de la carga.

Para una comprensión a nivel molecular de la interacción lípido-ácido nucleico se han usado isotermas de titulación calorimétricas (ITC, del inglés *isothermal titration calorimetry*) y Calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés *Differential scanning calorimetry*). Pector et al. (2000) observaron que a una alta concentración de lípido/DNA, ocurre una reacción exotérmica rápida seguida de un proceso endotérmico lento, mientras que a

relaciones de carga alta sólo ocurre el proceso endotérmico. Propusieron que el proceso exotérmico es debido a la unión electrostática del lípido catiónico y el DNA, mientras que el endotérmico fue atribuido al reordenamiento estructural de las bicapas lipídicas para encapsular el DNA.

1.4.6 Mecanismo de tráfico intracelular de los lipoplexos

Los estudios de tráfico intracelular son diseñados para identificar barreras a la liberación de siRNA y también para mejorar la comprensión de la farmacocinética de estas moléculas. Estos estudios resultan muy útiles para la exploración sistemática de las formulaciones, del tipo de lípido, de las relaciones de lípidos e identificar así, a las formulaciones candidatas líderes durante el desarrollo.

El tráfico intracelular ha sido estudiado usando Citometría de flujo y Microscopía confocal. La primera de estas técnicas ayuda a determinar la intensidad fluorescente promedio dentro de las células. Concordantemente, una etiqueta fluorescente adosada al siRNA puede ser usada para cuantificar el ingreso celular del mismo. Un ingreso celular eficiente se corresponde usualmente con silenciamiento efectivo a menos que el escape endosomal sea el paso limitante de la velocidad (Mendonca et al., 2010).

El escape endosomal puede ser identificado microscópicamente usando microscopía confocal, técnica que permite la visualización de las células en un plano focal único omitiendo de esta manera la interferencia de la fluorescencia de fondo. Los estudios de cuantificación usando esta técnica se llevan a cabo, también, usando siRNA marcado fluorescente.

Adicionalmente, otros componentes del sistema de liberación, como lípidos y péptidos vectorizantes pueden ser marcados en combinación con organelas celulares, para examinar los pasos limitantes de velocidad en la liberación del siRNA. Estos pasos incluyen ingreso celular, degradación y escape endosomal.

1.4.7 Estabilidad de los lipoplexos conteniendo siRNA

Los lipoplexos conteniendo siRNA pueden ser desestabilizados por medios físicos o químicos. La estabilidad física es indicada por significativo aumento en el tamaño del lipoplexo y la formación de agregados, mientras que la estabilidad química está relacionada con el escape de siRNA encapsulado o pérdida completa del ensamblado del lipoplexo. Además, también puede ocurrir degradación de los lípidos y/o ácidos nucleicos.

La inestabilización física de los sistemas de liberación liposomales conteniendo siRNA se observa cuando ellos no tienen suficiente repulsión interparticular. En esos sistemas generalmente hay un predominio de fuerzas atractivas (interacciones de van der Waals entre lipoplexos) cercanas a la neutralidad. Normalmente se dice que una carga de + 30 mV es suficiente para prevenir inestabilización física. Por lo tanto, este tipo de fenómenos puede ser monitoreado usando el análisis de tamaño de partículas. Y puede ser mejorada con una cubierta de PEG para que las cadenas del polímero ayuden a la dispersión de las partículas.

La estabilidad química de los lipoplexos puede ser afectada tanto por la degradación de los lípidos como por la del ácido nucleico. El primer tipo de estas degradaciones ocurre comúnmente por uno o ambos de los siguientes mecanismos:

(i) Hidrólisis: las cadenas lipídicas que contienen específicamente grupos ésteres o amidas sufren hidrólisis catalizada en medio ácido o básico conduciendo por lo tanto a destrucción de la estructura del lípido y desestabilización del liposoma, lo que causa escape de los contenidos encapsulados. La hidrólisis en una de las cadenas forma lisolípidos que son altamente tóxicos debido a que se incorporan dentro de la membrana celular y causan desestabilización en la misma (Goonasinghe et al., 2005). El uso de un buffer apropiado ayuda a inhibir la hidrólisis de los lípidos. Alternativamente, la hidrólisis puede ser prevenida por liofilización de los lipoplexos de siRNA (Yadava et al., 2008).

(ii) Oxidación: los lípidos insaturados son propensos a la oxidación (forman especies oxígeno reactivas), usualmente catalizada por contaminación con iones metálicos (Fe, Cu), radicales libres, alta temperatura o exposición de la formulación al oxígeno. Aún cantidades en traza (niveles ppm) de oxígeno disuelto en vehículos acuosos puede causar oxidación lipídica, ésta afecta a la fluidez del liposoma porque afecta los dobles enlaces; así disminuye

la eficiencia del lipoplexo y pueden formarse productos tóxicos. El mantenimiento del pH con soluciones reguladoras, el uso de EDTA para quelar iones metálicos, de antioxidantes y de ácidos nucleicos altamente puros son las estrategias usadas para evitar la oxidación lipídica.

Los ácidos nucleicos también pueden sufrir hidrólisis de las uniones fosfodiéster vía reacciones catalizadas en medio ácido o básico, que son aceleradas por nucleasas (fosfodiesterasas).

Así como la presencia de liposomas asegura la protección del siRNA de la degradación, la desestabilización del mismo por medios físicos o químicos puede exponer al siRNA a un entorno desfavorable como bajos pH o enzimas.

La desestabilización de los lipoplexos debido a la combinación de degradación física y química puede resultar en una pérdida de eficiencia de silenciamiento del siRNA entrampado. Por consiguiente, es crítico monitorear la estabilidad de estos complejos con el tiempo (Kapoor et al., 2012).

1.5 Aplicaciones de RNA de interferencia en oncología

1.5.1 Estado de arte de la Terapia del Cáncer de mama

El cáncer de mama es la enfermedad maligna más frecuentemente diagnosticada en mujeres en todo el mundo y la segunda más frecuente de todos los cánceres, con 1.676.000 nuevos casos en 2012. Las tasas de incidencia más altas se observan en Europa occidental (Ferlay et al, 2013).

La disponibilidad de herramientas diagnósticas más modernas y el uso más extensivo de terapias sistémicas adyuvantes, han permitido lograr un avance significativo en el tratamiento de la enfermedad en estadio temprano con el consecuente aumento en las tasas de supervivencia de estas pacientes. Aunque sólo se han alcanzado mejoramientos parciales en pacientes con cáncer metastásico recurrente, siendo esta, una urgente necesidad médica para desarrollar nuevas y efectivas terapias.

En la pasada década, fármacos vectorizados a proteínas quinasas seleccionadas y anticuerpos monoclonales dirigidos a receptores de superficie celular han mostrado resultados promisorios en la lucha contra el cáncer, incluyendo el de mama. Sin embargo, los resultados exitosos se han limitado a menos de una decena de drogas efectivas para el blanco deseado. Muchos de los genes claves causantes de cáncer son considerados no susceptibles de tratamiento con las drogas actuales (*nondruggable*, en inglés) y por esto no se ha dedicado demasiado esfuerzo en ellos. También hay que considerar que la heterogeneidad de los tumores y su inestabilidad genética hacen poco probable que un simple blanco sea suficiente para el tratamiento de largo plazo de la mayoría de los tumores sólidos. Se ha estimado que hay cerca de 80 mutaciones en un tumor de mama individual, de las cuales una docena son mutaciones conductoras del proceso neoplásico. Además de esta complejidad, hay que considerar que cada paciente de cáncer lleva un único espectro de mutaciones genéticas, haciendo el pool de genes mutantes inimaginablemente grande.

Mientras que las drogas basadas en pequeñas moléculas usadas actualmente para el cáncer sólo pueden impactar en una muy pequeña porción de genes que causan cáncer, la disponibilidad de siRNAs especialmente diseñados para vectorizar específicamente a cada

uno de un gran número de genes, mejora la factibilidad de tratamiento personalizado del cáncer de mama basado en cambios genéticos y epigenéticos de cada paciente (Wood et al, 2007).

También se han identificado a los genes y vías de señalización que contribuyen a la resistencia a la actual terapia oncológica. Trastuzumab® ha sido una droga clave para tratar a las pacientes con cáncer de mama Her-2 positivo, pero no todos los que son positivos para Her-2 responden al tratamiento. En una investigación con RNAi a gran escala usando una línea celular de cáncer de mama BT 474 que sobre-expresa Her-2, Berns y colegas descubrieron que la pérdida de la expresión PTEN causa resistencia al tratamiento con Trastuzumab®. Debido a que PTEN es un regulador negativo de vía de señalización de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT, es de esperar que la activación de la señalización de PI3K confiera la mencionada resistencia. Avalando esta situación, se encontró que la sobre-expresión de PI3K también causó resistencia a la terapia (Berns et al, 2007).

Otra aplicación que se ha encontrado para el siRNA es la de sensibilizar a las células malignas para la quimioterapia, esto se puede conseguir por silenciamiento de la expresión de genes resistentes a múltiples drogas en las células de cáncer de mama.

Considerando este importante potencial que demostró el uso de siRNA para la terapéutica oncológica, a continuación se tratan algunos de los productos que están actualmente en ensayos clínicos.

1.5.2 Ensayos clínicos y productos aprobados en oncología

1.5.2.1 Generalidades

El notable progreso en el campo de la terapéutica de ácidos nucleicos se refleja en los más de 2000 ensayos clínicos basados en Terapia génica registrados hasta junio de 2014 en todo el mundo. Casi el 60% de ese total está en Fase I, el 20% en Fase II, aunque sólo 2 productos son actualmente comercializados. El 64% están orientados a oncología, el 9% a enfermedades monogénicas y siguen en el orden decreciente las enfermedades infecciosas y las cardiológicas. Se destacan como vectores de vehiculización más usados los adenovirus

(22.8%), retrovirus (19.1%), DNA desnudo (17.7%); los lipoplexos son usados en 113 protocolos (5.3%) de los ensayos clínicos actuales (Figura 20).

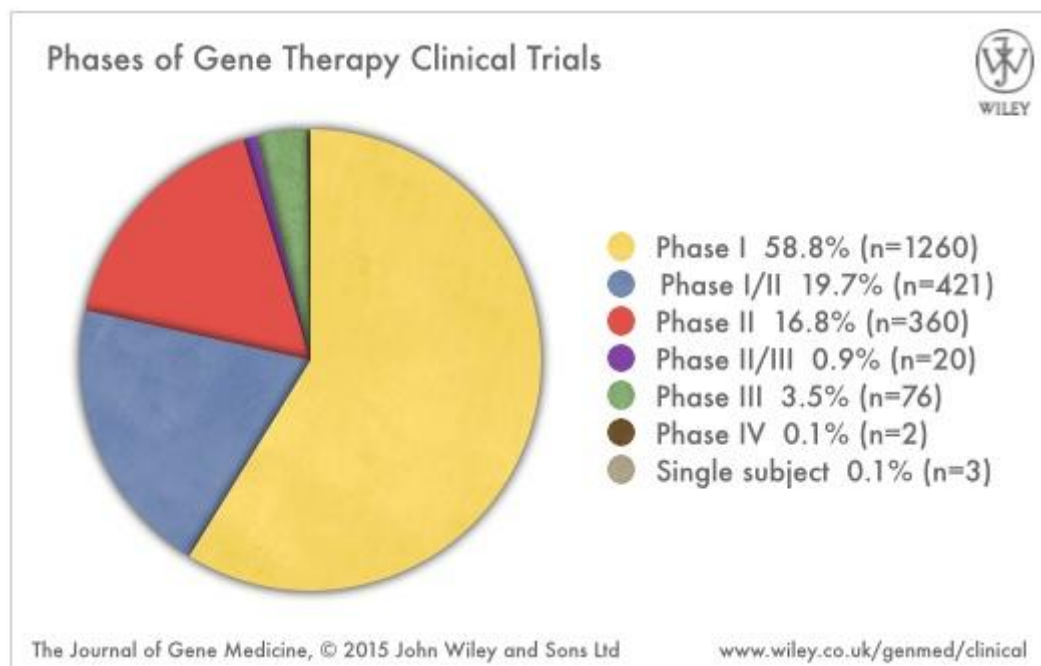


Figura 20: ensayos clínicos basados en Terapia génica registrados hasta junio de 2014 en todo el mundo. (Disponible en <http://www.abedia.com/wiley/phases.php>).

Gendicine® (Ad-p53), fue el primer producto en alcanzar el mercado basado en Terapia génica; fue aprobado en China para el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en conjunción con radioterapia. El factor de transcripción p53 mutado es uno de los marcadores genéticos más comunes para cáncer y está también implicado en la resistencia de las células cancerosas a la quimioterapia. Gendicine® está compuesto por un vector adenoviral recombinante, una modificación del tipo silvestre al cual se le removieron los segmentos virulentos responsables de la inmunogenicidad; fue diseñado para expresar un plásmido del factor de transcripción p53 tipo silvestre en células de cáncer que conduce a la restauración de las vías de supresión tumoral innatas (Huang et al., 2009).

El protocolo de Fase III evaluó la administración de Gendicine® más radioterapia o radioterapia sola. Los resultados indicaron que la velocidad de respuesta global con terapia de

combinación (96%) fue mayor que la de radioterapia sola (80%) usando criterios de disminución tumoral standard establecidos por la OMS (Peng, 2005).

Un segundo producto de Terapia génica (H101 u Ocorine®) basado en viroterapia oncolítica fue aprobado, también en China, para uso clínico en pacientes con cáncer de cabeza y cuello avanzado. La viroterapia oncolítica se basa en la habilidad de los vectores adenovirales recombinantes para replicar selectivamente en células de cáncer lyse p53 deficientes (Xia et al., 2004).

1.5.2.2 Vehiculización de siRNA vía vectorización pasiva

Los oligonucleótidos siRNA han tomado la delantera en alcanzar los ensayos clínicos para la terapia del cáncer. La mayoría de las actuales drogas candidato son formuladas en nanovectores basados en lípidos sin grupos de vectorización activa sobre su superficie. Dentro de los vectores no virales que contienen siRNA actualmente en fase clínica se destacan las tecnologías SNALP®, Atuplex® y Rondel® cuyas aplicaciones en oncología se resumen a continuación.

Los productos TKMPLK-1® y ALN-VSP02® usan sistemas tipo SNALP como vectores de vehiculización. Estos SNALPs consisten de un lípido catiónico ionizable 1,2-dilinoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA) como el componente del núcleo lipídico. Tienen una alta capacidad de encapsulación de siRNA con un tamaño pequeño y uniforme. TKM-PLK-1 ha sido desarrollado como droga antineoplásica que contiene siRNA específico para la quinasa PLK1 (polo-like kinase) empaquetada en SNALPs. Su eficacia ha sido demostrada para un modelo de cáncer de vejiga ortotópico vía instilación intravesical (Seth et al., 2011); en los ensayos clínicos actuales se administra vía endovenosa. PLK1 está involucrada en progresión del ciclo celular, y la vehiculización vectorizada de siRNA PLK1 suprime el crecimiento y la metástasis de cáncer de mama Her2+ en modelos ortotópicos de xenoinjertos.

ALN-VSP2® es el primer producto con agentes de vectorización duales, debido a que contiene siRNA específico para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y para la proteína kinesiana kinasa? del huso mitótico (KSP) para el tratamiento del carcinoma

hepatocelular. Considerando que VEGF es crítico para la angiogénesis tumoral, mientras que KSP es una proteína esencial para la proliferación celular (Judge et al., 2009), la hipótesis es que silenciando ambos genes en las mismas células cancerosas podría tener un efecto aditivo o aún sinérgico sobre el crecimiento y viabilidad celular.

Nuevas moléculas lipídicas catiónicas han sido recientemente propuestas para preparar SNALP más efectivos para la vehiculización de siRNA, lo que anticipa que más productos de silenciamiento génico basados en SNALP se desarrollarán en los próximos años. Debido a que los mismos tienden a acumularse en el hígado, su principal indicación es para tratar cáncer hepático o metástasis hepáticas de otros cánceres sólidos (Shen et al., 2013)

La tecnología Atuplex® es otro nuevo potente sistema liposomal para vehiculización de siRNA basado en el lípido catiónico AtuFECT01, el lípido helper neutro DPhyPE y 1 mol % DSPE-PEG. En estas partículas los siRNAs se asientan en la parte externa positivamente cargada en lugar de ser encapsulados tal como en las partículas SNALPs. Estos novedosos lípidos con grupos cabeza altamente cargados permiten una interacción más fuerte con el siRNA en comparación con DOTAP o DOTMA. Basado en esta composición, el producto Atu027®, que contiene siRNA contra la proteína quinasa 3 (PKN-3) fue desarrollado para vía sistémica con fines antitumorales. PKN-3 es un efector posterior downstream de la vía de señalización de PI3K, una de las vías más importantes en la biología del cáncer de mama. El silenciamiento de PKN-3 impide el crecimiento del tumor primario de mama y de próstata, y bloquea la metástasis tumoral. Un ensayo de fase I con cánceres sólidos avanzados ha sido completado con este agente. Shen et al 2013) (Bruno, 2011).

siRNA-EphA2-DOPC es formulado mezclando el siRNA EphA2 con el lípido neutro 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfocolina en una cantidad excesiva de t-butanol seguido de liofilización. EphA2 codifica para el receptor que es sobre-expresado en múltiples tipos de cánceres, incluyendo el de mama. El bloqueo de la actividad EphA2 por conjugados anticuerpo-droga o a través del silenciamiento de la expresión génica inhibe el crecimiento tumoral. Además, la vectorización dual de EphA2 y otros genes de cáncer ha mostrado inhibición aumentada del crecimiento tumoral. Aunque la mayoría de los estudios iniciales han sido focalizados en cáncer de ovario, la indicación para los actuales ensayos clínicos incluye todos los tumores sólidos (Shen et al., 2013).

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

1.5.2.3 Vehiculización de siRNA vía vectorización activa

La Tecnología Rondel® en la que el excipiente clave es la ciclodextrina fue descrita previamente destacándose las ventajas comparativas de la misma. Usando esta tecnología ha ingresado a ensayos clínicos CALAA-01 que no es sólo el primer producto de siRNA en un ensayo clínico en humanos sino que también está formulado con vectorización activa. Un siRNA específico para la subunidad M2 de la ribonucleótido reductasa (RRM2) está encapsulado en una nanopartícula de ciclodextrina. Un ligando de vectorización constituido por un grupo químico de afinidad con la proteína humana transferrina es decorado sobre la superficie de la nanopartícula. Ha sido bien documentado que la proteína receptora de transferrina está sobre-expresada sobre la superficie de las células cancerosas, y puede ser usada para efectiva vectorización al tumor. Las nanopartículas de 70 nm son lo suficientemente pequeñas como para cruzar la fenestración siguiendo una administración sistémica. Una vez dentro del tejido tumoral, el grupo de vectorización podría dirigir a la nanopartícula a las células tumorales con receptor de transferrina sobre-expresado. El primer ensayo de cáncer en humanos ha demostrado acumulación de siRNA RRM2 en tejidos tumorales y silenciamiento específico de la expresión génica. Las nanopartículas fueron bien toleradas en pacientes con cáncer a la mayor dosis (0.6 mg/kg), que se acumularon en el tumor de los pacientes con melanoma investigados y además se observó que el clivado del RNAm específico se llevó a cabo durante un mes (Bruno, 2011).

Aunque el ensayo clínico fue llevado a cabo con pacientes de melanoma, no hay razón para creer que CALAA-01 no pueda ser usado para tratar otros tipos de cáncer tal como cáncer de mama dado que RRM2 controla la síntesis de DNA y reparación del daño durante el ciclo celular (Shen et al., 2013).

Esta prometedora formulación puede ser producida bajo condiciones cGMP (del inglés, *Current Good Manufacture Practices*) escalables en una forma farmacéutica de dos viales, en la que los complejos son formados espontáneamente luego del mezclado de siRNA con los excipientes.

1.5.2.4 El vector multi-propósito para vehiculización de RNA

Un sistema de vehiculización conocido como vector multi-propósito (MSV, del inglés *multistage vector*) fue diseñado para maximizar la vehiculización al tumor de agentes terapéuticos a través de evasión secuencial de las barreras biológicas. El sistema consiste en una primera instancia de una micropartícula nanoporosa de silicona y de una segunda instancia que comprende a una nanopartícula cargada dentro de los nanoporos de la primera partícula. Para la vehiculización de los agentes de silenciamiento génico, las moléculas de doble hebra de RNA son empaquetadas dentro de liposomas de 30 a 40 nm que son luego cargados dentro de poros de 60 a 80 nm de la silicona porosa. Una vez dentro de la circulación sanguínea, las partículas de primera instancia viajan con el fluido sanguíneo y se instalan a la altura de la vasculatura tumoral, donde los liposomas de siRNAs son liberados. (Shen et al., 2013).

El ritmo de la liberación de siRNA está determinado por el diámetro del nanoporo, el tamaño del liposoma y la velocidad de degradación de la silicona. Las partículas de primera instancia son diseñadas en base a propiedades de tamaño, forma y superficie química para conseguir el máximo enriquecimiento en el tumor. Las partículas semiesféricas y discoidales son más efectivas en la adhesión a la vasculatura tumoral que las partículas con otras formas como las esféricas y las cilíndricas.

El tamaño de la micropartícula es determinante para la acumulación de la partícula. Las partículas discoidales de 1 μm se acumulan más que las submicrométricas o las partículas de 3.2 μm con la misma forma en tejidos de melanoma. Algo interesante es que el tamaño de la partícula también afecta la eficiencia y afinidad de la vectorización (Shen et al., 2013).

Este sistema ha sido exitosamente aplicado en la vehiculización de siRNA para el tratamiento de cáncer con modelos tumorales experimentales. El tratamiento de tumores en ratones con una dosis de MSV con siRNA anti-EphA2 resultó en silenciamiento de la expresión de EphA2 hasta por 3 semanas debido a liberación sostenida de los liposomas.

En un estudio, Xy y colaboradores trataron un modelo ortótopico de un tumor primario de MDA-MB-231 con siRNA dirigido al gen ATM en los MSV. El efecto de silenciamiento

de la expresión de ATM resultó en una significativa inhibición del crecimiento tumoral (Xu et al., 2013).

Debido a que la eficacia y la toxicidad constituyen los dos aspectos mayoritarios de la terapéutica con siRNA, ellos también llevaron a cabo estudios para evaluar sistemáticamente la toxicidad que podría haber causado MSV/ATM. Luego de una evaluación cuidadosa, se determinó que ninguna inmunotoxicidad aguda o toxicidad subaguda fue asociada con el siRNA MSV/ATM, despejando el camino para el desarrollo del mismo como un agente terapéutico para el cáncer de mama.

1.5.2.5 Superando la resistencia a la terapia

Un área de la terapéutica con siRNA que ha creado una gran expectativa es la sensibilización neoplásica para la quimioterapia, que ha sido usada en la práctica clínica con éxito limitado debido al desarrollo de quimioresistencia; por lo tanto, nuevas estrategias terapéuticas deben ser desarrolladas (Forster & Schwenzer 2008). La sobre-expresión de genes resistentes a multi-drogas ha sido atribuida a la resistencia a la quimioterapia (Shen et al., 2013).

Navarro y colegas sintetizaron un conjugado DOPE-PEI para aumentar la capacidad de transfección del PEI de bajo PM. Ellos usaron el conjugado para vehicular siRNA específico contra MDR1 y demostraron sensibilización al tratamiento con doxorubicina de las células MCF-7 resistentes. Este grupo ha demostrado recientemente, también, la sensibilización al tratamiento con docetaxel por siRNA anti-EphA2 en un modelo murino de cáncer de ovario humano (Navarro et al., 2012).

Otro ejemplo de sensibilización a quimioterápicos por siRNA reportados para células de cáncer de mama, lo constituyen las Integrinas, un grupo de proteínas de adhesión celular que consisten en dos subunidades transmembranas unidas no covalentemente (α y β). No sólo están implicadas en la interacción matriz celular-célula y célula-célula, sino que también se ha observado que tienen un rol crítico en la señalización celular, migración, diferenciación, proliferación y supervivencia. Un estudio usando siRNA demostró que el silenciamiento de la integrina alfa, aumentó la radiosensibilidad de las células de cáncer de mama.

Usualmente las células de cáncer de mama metastizan a los ganglios linfáticos regionales, a médula ósea, pulmones, e hígado en un proceso órgano-selectivo. El receptor de quimiocinas CXCR4 es uno de los factores críticos para la metástasis de cáncer de mama a través de la interacción con su ligando. La inhibición del RNAm de CXCR4 con siRNA impidió la invasión de células MDA-MB-231 en un ensayo de invasión Matrigel y al mismo tiempo, las metástasis en pulmón de estas células fueron bloqueadas *in vivo* (Forster & Schwenzer, 2008).

1.5.3 Perspectivas a futuro

Los agentes de silenciamiento génico continuarán contribuyendo significativamente al tratamiento oncológico de la mama. Los recientes avances en RNAi han resultado en el desarrollo de múltiples siRNA candidatos para esta terapéutica que están siendo evaluados actualmente en instancias preclínicas.

Por otro lado, el desarrollo de vectores de vehiculización eficientes ha sido el factor decisivo en el atraso de los objetivos planteados con la mayoría de los tipos de tumores sólidos. No hay muchas opciones disponibles para vehiculizar siRNA a cáncer de mama primario y es aún más difícil dirigir algún agente terapéutico a órganos en los cuales el cáncer de mama haya metastizado, tal como cerebro y hueso (Shen et al., 2013).

Pero por otro lado, el crecimiento de siRNA subsecuente a su descubrimiento se hace evidente con el rápido progreso a la fase de ensayos clínicos tempranos. El mecanismo molecular del silenciamiento de genes usando siRNA es un fenómeno tan particular e innovador como lo son los sistemas de vehiculización propuestos para liberar a los mismos. El extensivo uso y el predominio que hoy ejercen los sistemas no virales nanoparticulados basados en lípidos se debe a las ventajas de sus formulaciones; estas incluyen: seguridad, baja inmunogenicidad, alto grado de control de las propiedades del material, sintonización de función y habilidad para impactar sobre la farmacocinética y la biodistribución *in vivo*.

Hoy día está debidamente aclarado que los futuros avances de siRNA para lograr estrategias terapéuticas confiables requieren de una performance clínica consistente y robusta.

El tema del diseño y optimización de la formulación deberá ser abordado cada vez más con criterio industrial; para esto será necesario que más terapias basadas en siRNA con sus respectivos sistemas de liberación sean evaluadas en ensayos clínicos aleatorios y controlados con placebo, en poblaciones más grandes de pacientes y para indicaciones de enfermedades complejas. En este contexto, ya hoy podemos asegurar que será deseable el desarrollo de formulaciones bien caracterizadas y basadas en un análisis detallado de diseño, que incluya estabilidad y función de los vehículos, así como la implicancia de estos factores sobre la performance clínica. Será esencial un abordaje sistemático basado en calidad en el diseño de la formulación y en la estimación de los atributos críticos que afectan la performance usando un rango de técnicas de caracterización y métodos analíticos apropiados (Kapoor et al., 2012).

Esta situación subraya la importancia de 1) considerar que los sistemas biológicos son inherentemente muy complejos y variables, 2) los materiales usados para los vehículos deberían ser, entonces, versátiles, flexibles, biocompatibles, bien caracterizados y reproducibles (por ejemplo baja variabilidad de lote a lote) y 3) los productos farmacéuticos deberían ser lo más sencillo posible, con producción relativamente fácil y costo-efectiva. Existe consenso general en que en el futuro se verán avances en el desarrollo de liposomas no tóxicos y otras formas de enfoques basados en nanopartículas debido a que este tipo de vehículos permite cargas de siRNAs relativamente grandes (Lammers et al., 2012).

El estándar del cuidado de pacientes con cáncer comprende más de un agente terapéutico. El tratamiento es complejo ya que diversas drogas administradas por diferentes vías necesitan ser coordinadas, tomando en consideración sus efectos colaterales y mecanismos de resistencia. Los sistemas de liberación de fármacos como polímeros y liposomas son diseñados para mejorar la farmacocinética y eficacia de agentes bioactivos (fármacos de síntesis, proteínas u oligonucleótidos), a la vez que reducen su toxicidad sistémica. El uso de estos sistemas para coliberación de diversos agentes tiene un gran potencial ya que dirigen simultáneamente agentes terapéuticos sinérgicos, incrementando su acumulación selectiva en el sitio del tumor y mejorando su actividad, lo que permite administrar menores dosis de cada agente y reducir sus efectos colaterales.

Concurrente con el concepto de manejar el cáncer por estrategias diferentes, las combinaciones incluyen quimioterápicos con distinto mecanismo de acción y fármacos afectando el estroma tumoral (por ejemplo, drogas antiangiogénicas, agentes activadores del sistema inmune, inhibidores del crecimiento de fibroblastos asociados al cáncer, entre otros). Los agentes terapéuticos pueden incluir un fármaco de síntesis, una proteína, siRNA o miRNA. El índice terapéutico de estos agentes químicos y biológicos puede ser mejorado mediante el uso de sistemas de liberación nanométricos (Eldar-Boock et al., 2013).

Otra gran ventaja asociada a este tipo de estrategias la constituye la posibilidad de superar la resistencia que muchas veces aparece durante los tratamientos quimioterápicos. Así, ya se ha reportado éxito en varios protocolos para el cáncer que incluyeron a paclitaxel y siRNAs (Gao et al., 2012; Creixell & Peppas, 2012). Actualmente se evalúan los resultados obtenidos con administración simultánea o secuencial de ambos tipos de terapia; situación que exige aún más de un trabajo transdisciplinar, organizado y sistemático a fin de que más temprano que tarde la mentada Terapia oncológica combinada sea una alternativa segura y eficiente.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Construcción de la Hipótesis

La hipótesis de este trabajo consiste en desarrollar y estudiar algunas de las formas farmacéuticas nanométricas utilizadas actualmente en sistemas de liberación de fármacos como vectores para la administración *in vitro* de oligonucleótidos en líneas celulares normales y de cáncer de mama. Los sistemas propuestos han sido extensamente estudiados en el campo de la química coloidal y transferidos a la Tecnología Farmacéutica dadas sus ventajas particulares como sistemas de liberación. Hoy día forman parte de la Nanotecnología Farmacéutica, con todas las ventajas y consideraciones particulares que el abordaje de esta disciplina conlleva, y con la expectativa que han generado en la Terapia Génica. El diseño experimental a seguir en este trabajo sostiene que se puede llevar a cabo un apropiado desarrollo farmacéutico racional para que estas formas farmacéuticas nanométricas puedan ser evaluadas por sus efectos biológicos en paralelo a su caracterización biofísica.

La elección inicial de los lipoplexos basados en fosfatidilcolina se fundamenta en que su preparación implica procesos sencillos y en que, a diferencia de otras formulaciones, no requieren la incorporación de componentes adicionales como lípidos catiónicos, surfactantes, o complejantes auxiliares. Además y *a priori*, sus características fisicoquímicas y de biocompatibilidad permiten un apropiado uso para distintas vías de administración, inclusive la parenteral.

Los lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares han sido seleccionados porque comparten las ventajas de biocompatibilidad con los sistemas propuestos anteriormente, pero permitiendo una mayor versatilidad de composiciones y un proceso de optimización que favorece la factibilidad de escalado industrial y la traslación a ensayos preclínicos.

La Hipótesis también sostiene que el estudio criterioso de los efectos biológicos en paralelo puede ser considerado como una herramienta clave durante el desarrollo racional de los sistemas farmacéuticos propuestos. De esta manera se estaría aportando significativamente

al avance de la utilización terapéutica de los oligonucleótidos como mecanismo seguro, eficiente y dirigido en la expresión genética patológica.

Se podría argumentar que con varios agentes terapéuticos propuestos, los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* muchas veces no tienen un correlato con los observados luego *in vivo*, a juzgar por la extensa literatura que avala la factibilidad de uso y luego, en contrapartida un bajo índice de éxitos *in vivo*; sin embargo, desde una perspectiva tecnológica poder conseguir un desarrollo con enfoque farmacéutico/biológico simultáneo, sigue siendo hoy la modalidad de trabajo más apropiada, a juzgar por los requerimientos de las entidades regulatorias internacionales. Es de destacar que la producción de vectores no virales efectivos para uso en Terapia génica constituye el mayor desafío, aún no resuelto, para el paso a la etapa de ensayos clínicos.

Terapia génica por su complejidad, pero también por su potencial como herramienta terapéutica de relevancia mayúscula para el tratamiento de una gran variedad de patologías, y especialmente para el cáncer, es indudablemente un tema a ser abordado en forma inter y trans-disciplinar; de esa manera se podrán integrar los conceptos teóricos de cada disciplina con los resultados generales obtenidos y sumar así este tipo de terapia al arsenal disponible hoy día.

2.2 Objetivos

El objetivo general del trabajo es el estudio, interpretación y optimización de formas farmacéuticas nanométricas utilizadas por la Tecnología Farmacéutica como sistemas de liberación de fármacos convencionales, para la administración *in vitro* de RNA pequeño de interferencia (siRNA) en células normales MDCK y células MCF-7 de cáncer de mama. El desarrollo racional de estas formulaciones promisorias, *a priori*, por estar basadas en excipientes conocidos y aceptables aún para administración endovenosa e involucrar técnicas de elaboración sencilla, permite la correlación entre composición, microestructura y comportamiento biológico, para aportar de esa manera a la comprensión de su potencial uso como propuesta segura, promisorio y no explorado aún para la Terapia Génica Antisentido.

El diseño experimental incluye el desarrollo racional farmacéutico en paralelo a la evaluación biológica para poder alcanzar la optimización de: i) Lipoplexos basados en fosfatidilcolina y, ii) Lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares.

Los lipoplexos basados en fosfatidilcolina constituyen un sistema de reconocida biocompatibilidad abordado por varias ciencias, desde básicas como la Química Coloidal hasta las más aplicadas como la Tecnología Farmacéutica, con un interesante desarrollo también en el área de la Biofísica. La evolución del trabajo intenta ir en consonancia con la aparición/renovación del conocimiento en el campo de la Terapia Antisentido, que exhibe una marcada orientación hacia la aplicación industrial de los vectores no virales propuestos. De esta forma, se plantea la optimización de distintas composiciones caracterizando las mismas desde el punto de vista fisicoquímico a través de los parámetros habituales en uso, así como en cuanto a la interacción y capacidad de carga del oligonucleótido, tratando de relacionar dichas variables con los efectos biológicos asociados en cuanto a citotoxicidad, ingreso celular, escape endosomal y eficiencia de silenciamiento génico.

Siguiendo el razonamiento y la línea de trabajo planteada, los lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares se presentan como formas farmacéuticas biocompatibles que presentan la ventaja adicional de una mayor versatilidad de composiciones junto con un espectro más amplio de aplicaciones, siendo factibles de optimización según la tendencia y requerimientos de la bibliografía específica de este área del conocimiento.

Concretamente se espera desarrollar una metodología de trabajo que incluya la evaluación biológica como una herramienta en paralelo durante todo el proceso de desarrollo farmacéutico para ayudar a descartar formulaciones tóxicas o ineficaces y para colaborar en la selección de las fórmulas candidatas durante el proceso de optimización.

Por lo expuesto, la interpretación de los efectos biológicos de sistemas simples pero versátiles como los usados en el presente trabajo, se encuadra dentro del objetivo de máxima que el trabajo interdisciplinario en Terapia Génica exige hoy día: poder correlacionar las propiedades que resultan de la caracterización biofísica de los nano-vectores con los efectos biológicos observados/deseados.

Parte Experimental

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

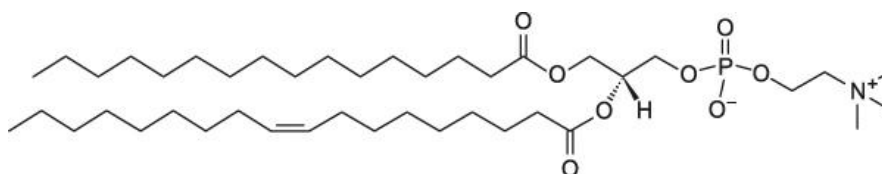
3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Excipientes

Fosfatidilcolina (Phospholipon 90 G ®, Lipoid GmbH)

Estructura:



Formula molecular: C₄₂H₈₂NO₈P

Peso molecular: 760.09 g/mol

La fosfatidilcolina (PC) es el componente principal de la lecitina, mezcla compleja de glicerofosfolípidos compuesta principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. En el caso de la marca comercial utilizada, Phospholipon 90 G® (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemania), se trata de un purificado de soja granular con un contenido de fosfatidilcolina de entre 94.0 y 102.0 %, con un máximo de 4.0% de lisofosfatidilcolina y 0.3% de tocoferol. Como solventes residuales, posee máximos de 0.2% de etanol, 500ppm de etilmetilcetona y 0.05% de material insoluble en hexano y tolueno; presenta humedad máx. 1.5% e índices de acidez máx. 0.5 y de peróxidos máx. 5. Se presenta en envase sellado de aluminio bajo gas inerte y se debe almacenar en condiciones de sequedad a un máximo de 8°C.

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

La fosfatidilcolina es uno de los más importantes constituyentes de la membrana celular y se encuentra mayormente presente en la cara exoplasmática de la bicapa lipídica. Participa de funciones estructurales así como también en procesos de señalización celular.

Es ampliamente usada en la industria farmacéutica como excipiente aprovechando su disponibilidad en grado farmacéutico desde hace mucho tiempo. Gran cantidad de formas farmacéuticas la incluyen en su desarrollo para las vías intramuscular, intravenosa, oral y tópica. Su baja toxicidad es evidenciada por el hecho de que forma parte de fórmulas de nutrición parenteral infantiles aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration, entidad regulatoria estadounidense). Se encuentra codificada asimismo en la USP (Farmacopea estadounidense). Está listada como GRAS (excipiente reconocido generalmente como seguro, del inglés “Generally recognized as safe”) por la FDA y aceptada como aditivo alimentario en Europa. Figura como ingrediente inactivo por la FDA para las vías intramuscular, intravenosa, oral, inhalatoria, tópica y vaginal. Fue incluido en fórmulas parenterales de productos comerciales distribuidos en el Reino Unido.

La lecitina se utiliza como agente emulsionante en cápsulas de gelatina blanda y también en cápsulas duras, debido a que es compatible en ambos casos. Existen productos patentados que se usan como relleno de cápsulas (SPL® y PPL® de Lipoid GmbH) que son fluidos viscosos conteniendo fosfolípidos poli-insaturados derivados de la lecitina de soja. El uso de una lecitina particular conocida como “Galactolecitina” en la que se mezclan galactolípidos y fosfolípidos en proporción 70:30 es usada para la liberación de drogas insolubles como ciclosporina y aciclovir en cápsulas de gelatina blandas (Bottle, 2007).

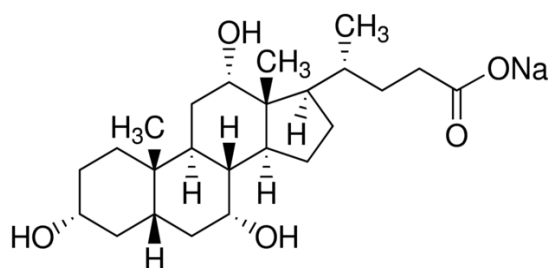
Por otro lado, las emulsiones lipídicas inyectables han sido usadas por décadas como fuente de energía, vitaminas y ácidos grasos a pacientes hospitalizados a través de formulaciones de nutrición parenteral. Los fosfolípidos extraídos de la soja formaron parte de la composición de Intralipid®, la primera formulación de este tipo aprobada y usada con éxito en Europa y USA a partir de 1975. A raíz de este éxito se observó luego un fuerte interés en desarrollar emulsiones como carriers de drogas poco solubles por la vía endovenosa. Dentro de los fármacos representativos que hoy se comercializan bajo esta modalidad farmacéutica se pueden citar: Palmitato de dexametasona (corticoide), Propofol (anestésico), Axetil flurbiprofeno (anti-inflamatorio no esteroideo) que contienen lecitina de huevo y Diazepam

(sedante y relajante muscular) conteniendo fosfolípidos de huevo (Hippalgaonkar et al., 2010).

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

Colato de sodio y Desoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich)

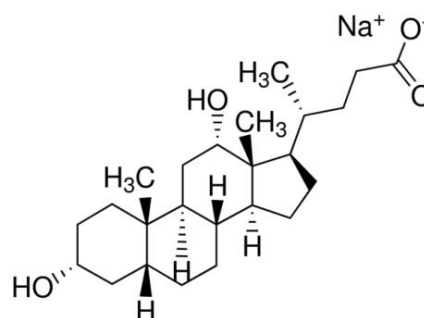
Colato de sodio:



Formula molecular: $C_{24}H_{39}NaO_5$

Peso molecular: 430.55 g/mol

Desoxicolato de sodio:



Formula molecular: $C_{24}H_{39}NaO_4$

Peso molecular: 414.55 g/mol

El colato y desoxicolato de sodio son sales biliares capaces de formar micelas con los lípidos, tal como lo hacen en la bilis hepática, favoreciendo mecánicamente la acción de la lipasa pancreática ya que aumentan la superficie de contacto con los lípidos.

Las sales biliares son moléculas anfifílicas con una estructura química característica derivada del colesterol, capaces de formar micelas pequeñas y cargadas con gran diversidad de compuestos lipídicos solubles e insolubles, cuya estructura y comportamiento son significativamente diferentes respecto de otras micelas basadas en tensioactivos (Carey & Small, 1972). Otras de las ventajas de su uso farmacéutico son la estabilidad termodinámica de estas micelas y capacidad de mejorar la estabilidad química de drogas (Dangi et al, 1998).

Varias formulaciones actualmente comercializadas son micelas mixtas de administración endovenosa compuestas por fosfolípidos de soja y sales de colato. Son usadas como solubilizadoras de fármacos pobremente solubles i) Valium® conteniendo el ansiolítico Diazepam; ii) Cernevit® mezcla vitamínica que se da como suplemento; iii) Konakion® que vehiculiza a la vitamina K (van Hoogevest & Wendel, 2014).

En el plano académico las micelas mixtas fueron propuestas como vehículos de otros fármacos con diferentes propiedades fisicoquímicas. En los '90 se demostró que la vehiculización de la Anfotericina B en micelas mixtas de lecitina de huevo y derivados del colato mostraban mayor actividad antifúngica in vitro que la formulación comercializada en ese momento (Brajtburg et al, 1994).

Más recientemente Liu y col prepararon nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con micelas mixtas de colato de sodio y fosfatidilcolina de soja para vehiculizar insulina; lograron obtener nanopartículas de excelente estabilidad física y demostrar la integridad y un alto grado de entrapamiento de insulina vehiculizada luego de su incorporación (Liu et al, 2007).

3.1.2 Oligonucleótidos

BLOCK-iT™ Alexa Fluor® 555 Red Fluorescent Oligo (Invitrogen, USA)

Fluorescein-labeled BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (Invitrogen, USA)

AllStars™ Negative Control siRNA AF® 488 (Qiagen, USA)

Estos oligómeros RNA doble cadena (dsRNA) marcados se encuentran diseñados para utilizar en análisis de RNAi con el fin de facilitar la evaluación y optimizar la transfección de oligonucleótidos dsRNA mediada por sistemas lipídicos o por electroporación en células de mamífero. Poseen las siguientes características:

- Marca fluorescente (Alexa Fluor® 555, 488 o Fluoresceína)
- Tienen la misma longitud, carga y configuración al siRNA estándar.
- Presentan modificaciones químicas que mejoran su estabilidad y permiten la detección de la señal fluorescente por un período de tiempo significativamente mayor.
- Poseen comprobada correlación de eficiencia de transfección con moléculas de siRNA tradicionales y tipo Stealth™ RNAi
- La secuencia no es homóloga a ningún transcripto conocido en ratones, ratas y humanos, previniendo la inducción de eventos celulares no específicos luego de su ingreso.
- Se han probado en múltiples líneas celulares, sin mostrar impacto significativo en proliferación, apoptosis o morfología celular.

Stealth™ RNAi Actin Positive Control (Invitrogen, CA, USA)

Este dsRNA control silencia la expresión de actina y se encuentra diseñado para utilizar en experimentos de RNA de interferencia (RNAi) con el objetivo de optimizar las condiciones de transfección en cualquier línea celular de vertebrado.

Se trata de un dsRNA modificado químicamente para evitar las limitaciones presentadas por el uso de siRNA tradicional, obteniendo un eficiente efecto de silenciamiento de actina y minimizando la homología de secuencia con cualquier otro transcrito conocido en vertebrados. Posee estabilidad mejorada en cultivos celulares y es altamente específico, evitando la inducción de vías de señalización por estrés celular.

Su identidad y concentración se encuentran verificadas por espectrometría de masas y lecturas de densidad óptica, respectivamente.

siRNA específico para Lámina A/C (Invitrogen, CA, USA)

Este siRNA dúplex es utilizado con el fin de silenciar la expresión de la lámina nuclear y fue encargado a Invitrogen a partir de la siguiente secuencia obtenida de bibliografía: 5´CUGGACUCCAGAAGAACATT3´/ 5´UGUUCUUCUGGAAGUCCAG TT3´ (Pekovic et al, 2007).

La lámina nuclear es una red entremezclada de filamentos intermedios de 15 a 80 nm de grosor compuestos por las proteínas láminas A, B y C, situadas en la periferia del nucleoplasma en contacto con la membrana nuclear interna. La lámina nuclear confiere estabilidad mecánica a la envoltura nuclear. Además, al interactuar con la cromatina participa en la determinación de la organización tridimensional del núcleo interfásico. Las proteínas láminas A y C se sintetizan a partir del mismo gen, llamado LMNA, por procesamiento alternativo (Martin et al, 2009).

3.1.3 Líneas celulares

Células MCF-7

La línea celular MCF-7 de cáncer de mama (ATCC® HTB22™) fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: las células fueron mantenidas en medio mínimo esencial Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 50µg/mL de gentamicina, y L-glutamina 2mM. Las células fueron cultivadas en frascos de 75cm² a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂.

Las MCF7 son células tumorales de mama de una línea estable, obtenidas de efusión pleural de una paciente con adenocarcinoma mamario metastásico [SOU84]. Se caracterizan por poseer interacciones célula- célula, en cultivo, formando agregados muy compactos:

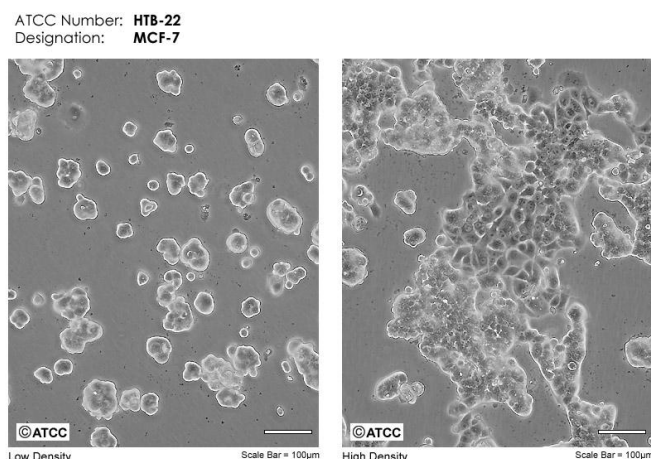


Figura 21: Imágenes de la línea celular MCF-7 en cultivo, en baja densidad (izquierda) o alta densidad (derecha). *Fuente: MCF7 (ATCC® HTB22™) Product Sheet, American Type Culture Collection, USA.*

Las células MCF-7 mantienen características diferenciadas del epitelio mamario, incluida la habilidad de procesar el estradiol vía receptores de estrógeno citoplasmáticos. Son usadas para detectar componentes MAPK y PI3K, y ERK y Akt de fosforilación. Expresan particularmente grandes niveles de p70S6K y pueden ser igual de útiles como marcadores para las partes altas de las quinasas como el mTOR y el PDK-1. *Fuente: MCF7 (ATCC® HTB22™) Product Sheet, American Type Culture Collection, USA.*

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

Células MDCK

La línea celular MDCK (NBL-2) (ATCC® CCL-34™) fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). Las células fueron cultivadas en placas multiwell de 12 pocillos. Se sembraron 1×10^5 células por pocillo en un volumen final de 1 mL de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium-Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina. Luego de 24 h de cultivo en estufa a 37°C gaseada con 5% de CO₂, se procedió a realizar las transfecciones correspondientes.

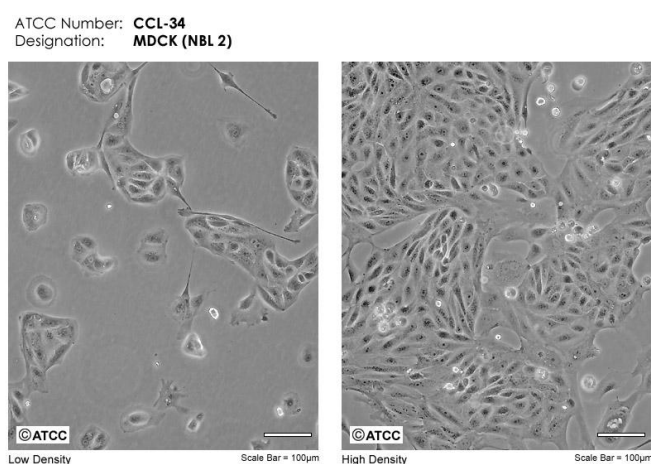


Figura 22: Imágenes de la línea celular MDCK en cultivo, en baja densidad (izquierda) o alta densidad (derecha). *Fuente: MDCK (NBL-2) (ATCC® CCL-34™) Product Sheet, American Type Culture Collection, USA.*

La línea celular MDCK corresponde a células epiteliales de riñón canino, derivadas de riñón de hembra adulta cocker spaniel en 1958 por S.H. Madin y N.B. Darby. Son adherentes y positivas para queratina por tinción con inmunoperoxidasa. Han sido utilizadas para estudiar el procesamiento de la proteína precursora beta amiloide y sus productos proteolíticos. *Fuente: MDCK (NBL-2) (ATCC® CCL-34™) Product Sheet, American Type Culture Collection, USA.*

3.1.4 Reactivos

- El reactivo fluorescente SYBR Green I® nucleic acid gel stain (10000X concentrado en DMSO) fue adquirido de la empresa Sigma-Aldrich Argentina.
- Los reactivos de transfección Lipofectamine® RNAiMAX y HiPerFect® fueron obtenidos de Invitrogen (CA, USA) y Qiagen (CA, USA) respectivamente.
- El reactivo CellTiter 96 ® Aqueous Nonradioactive Cell Proliferation Assay (MTS) fue adquirido de Promega (Madison, WI, USA).
- Seroalbúmina bovina (BSA), Tritón X-100, Hoechst y Faloidina-TRITC fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Missouri, USA).
- El anticuerpo primario (mouse) anti Lámina A/C corresponde a Chemicon V.B.
- El anticuerpo secundario anti mouse conjugado con TRITC fue obtenido de Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA).
- El suero fetal bovino (FBS) fue adquirido de Natocor (Córdoba, Argentina).
- Los medios DMEM y Opti-MEM®, tripsina, gentamicina, L-glutamina, penicilina y estreptomicina se obtuvieron de Invitrogen Argentina.
- Vectashield® Mounting Medium corresponde a Vector Laboratories (CA, USA).
- El colorante azul tripan fue adquirido de Mallinckrodt.
- Las unidades de filtración para jeringa de PTFE de 0.45µm de poro fueron adquiridas de Millipore (USA).
- Se utilizó agua ultrapurificada mediante un equipo Barnstead Easypure II (Thermo Scientific, USA).
- El resto de los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y de la máxima pureza disponible.

3.2 Métodos

3.2.1 Técnicas de elaboración

3.2.1.1 Lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC)

En el laboratorio de Tecnología Farmacéutica I se prepararon dispersiones de fosfatidilcolina (PC) en el rango de concentraciones de 25 a 100 mM (2 a 8 %p/v) en diferentes medios: agua desionizada, solución isotónica de glicerol 2.76% p/p, solución reguladora isotónica de fosfato monoácido/diácido de sodio 67mM pH 7.0 y solución reguladora isotónica de acetato de sodio/acido acético 50mM pH 5.0. Las soluciones reguladoras fueron isotonizadas mediante el agregado de cantidades suficientes de cloruro de sodio de acuerdo a los métodos de Sørensen y White-Vincent.

La fosfatidilcolina fue dispersada en cada medio respectivo mediante agitación mecánica constante a 60°C. Luego, la dispersión obtenida fue procesada durante 2 minutos a 13000 rpm utilizando un homogeneizador mecánico de altas revoluciones (Ultra-Turrax T25 basic, IKA Werke, Staufen, Alemania) y sonicada durante 10 minutos a 20kHz. Las formulaciones obtenidas fueron filtradas mediante membranas de PTFE de 0.45µm de tamaño de poro. El material volumétrico utilizado fue ámbar en todos los casos debido a la fotosensibilidad del excipiente.

Las formulaciones obtenidas fueron esterilizadas por autoclave (121°C, 15 minutos, 1 atm sobrepresión) a fin de evaluar cambios en el aspecto macroscópico y citotoxicidad observada en comparación con las formulaciones sin esterilizar.

3.2.1.2 Lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares (LP-PC/SB)

También en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica I se prepararon mezclas de fosfatidilcolina (PC) y colato de sodio (SC) ó desoxicolato de sodio (SDC) en las siguientes relaciones molares de fosfatidilcolina : sal biliar: 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. La concentración total en

todos los casos fue de 2% p/v.

Las relaciones molares fueron seleccionadas en base a la capacidad máxima de solubilización de la fosfatidilcolina por la sal biliar según reportes previos (Hammad & Müller, 1998; Dürr et al, 1994; Smidt et al, 1994).

Se utilizaron como diferentes medios de dispersión: agua desionizada, solución reguladora isotónica de fosfato monoácido/diácido de sodio 67mM pH 7.4 y solución reguladora isotónica de acetato de sodio/acido acético 50mM pH 5.0. Las soluciones reguladoras fueron isotonizadas mediante el agregado de cantidades suficientes de cloruro de sodio de acuerdo a los métodos de Sørensen y White-Vincent.

La fosfatidilcolina y la sal biliar correspondiente fueron dispersadas en cada medio respectivo mediante agitación mecánica constante a 60°C. Luego, la dispersión obtenida fue procesada durante 2 minutos a 13000 rpm utilizando un homogeneizador mecánico de altas revoluciones (Ultra-Turrax T25 basic, IKA Werke, Staufen, Alemania) y sonicada a 20kHz y 50W utilizando una sonda homogeneizadora ultrasónica (Q700 Sonicator, QSonica LLC, Newtown CT, USA) a un 30% de amplitud controlada. Las formulaciones obtenidas fueron filtradas mediante membranas de PTFE de 0.45 µm de tamaño de poro. El material volumétrico utilizado fue ámbar en todos los casos debido a la fotosensibilidad del excipiente.

3.2.1.3 Incorporación de siRNA a las formulaciones

Las formulaciones obtenidas fueron mezcladas con el siRNA por agitación suave, en cantidades apropiadas de acuerdo a la relación N/P utilizada en cada ensayo, e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos. Esta relación está definida entre el número de grupos catiónicos de amonio cuaternario (N) aportados por las fórmulas y la cantidad de grupos fosfato aniónicos (P) aportados por las moléculas de siRNA (Zhao Q-Q et al. 2009). Así, un valor de relación N/P=1, significa que se agrega un grupo catiónico por cada grupo fosfato en la molécula de siRNA.

3.2.2 Técnicas de caracterización fisicoquímica

3.2.2.1 Determinación del tamaño de partícula

Se realizó mediante espectroscopia de correlación de fotones (Photon correlation spectroscopy, PCS) utilizando un equipo de dispersión láser dinámica (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) con un láser de 4 mW He-Ne (633 nm), disponible en el Departamento de Tecnología Farmacéutica. Las partículas fueron ultracentrifugadas a 13000xg por 10 minutos (Eppendorf centrifuge 5415R, Hamburg, Alemania), los sobrenadantes descartados y las nanopartículas resuspendidas en agua desionizada. Las mediciones fueron hechas a 25°C utilizando un ángulo de dispersión de 173° y un valor de índice de refracción de 1.33. El índice de polidispersión (PDI) indica la distribución de las poblaciones de tamaño en la fórmula evaluada.

3.2.2.2 Determinación del potencial zeta

El potencial zeta de una partícula cargada se explica de la siguiente manera: Alrededor de la partícula cargada hay iones de carga opuesta; a medida que nos alejamos la concentración de estos disminuye hasta que en un punto de neutralidad, el número de iones de una carga y otra se equiparan. Aquí el potencial eléctrico es cero. Dentro de esta distancia, hay un punto definido el cual delimita a los iones que se moverán junto con la partícula cuando ésta lo haga. El potencial eléctrico en este punto se conoce como potencial zeta ζ (Florence & Attwood, 2006).

La determinación de potencial zeta de las fórmulas fue realizada utilizando un equipo de dispersión láser dinámica (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) con un láser de 4 mW He-Ne (633 nm), disponible en el Departamento de Tecnología Farmacéutica, a 25 °C. Las partículas fueron ultracentrifugadas a 13000xg por 10 minutos (Eppendorf centrifuge 5415R, Hamburg, Alemania), los sobrenadantes descartados y las nanopartículas resuspendidas en agua desionizada. Se utilizaron las celdas capilares exclusivas del equipo para las determinaciones. Los valores de potencial zeta ζ fueron calculados automáticamente

por el equipo de acuerdo a la ecuación de Smolochowski (Smolochowski, 1916).

3.2.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología de las nanopartículas fue estudiada en primera instancia utilizando un microscopio de transmisión electrónica (TEM Philips EM 301, Centro de Microscopia Avanzada, CMA, FCEyN, UBA). Para realizar las observaciones, una gota de la formulación fue colocada en una placa de cobre con cubierta de carbono, estacionada por 90 segundos y el exceso fue eliminado con papel de filtro. Las muestras fueron tratadas con acetato de uranilo al 1% (filtrado por membrana de 0.22 μm) durante 30 segundos, el exceso removido con papel de filtro, y se dejaron secar a temperatura ambiente en un área libre de polvo. Se llevó a cabo además un testigo negativo de tinción de acetato de uranilo sin el agregado de muestra. El diámetro de las nanopartículas fue calculado utilizando una escala calibrada.

3.2.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se complementó el análisis morfológico utilizando un microscopio de barrido electrónico (Zeiss Supra 40 with field emission gun, Centro de Microscopia Avanzada, CMA, FCEyN, UBA). Para realizar las observaciones, una gota de formulación fue colocada en una placa de silicio, se dejó secar a temperatura ambiente y luego se recubrió con una delgada capa de oro. La escala en las imágenes es provista directamente por el software del equipo.

3.2.2.5 Ensayos de desplazamiento de SYBR Green

Con el objetivo de estudiar la interacción de las moléculas de siRNA con las nanopartículas elaboradas se realizaron, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica I, una serie de experimentos en los cuales se buscó determinar su eficiencia y capacidad de unión. Para este propósito, las cantidades evaluadas de cada fórmula fueron expresadas durante los ensayos como relaciones N/P (Nitrógeno/Fosfato), según se describió en el punto 3.2.1.3.

Como técnica cuantitativa para determinar la capacidad de unión de siRNA por las fórmulas, se realizaron ensayos de desplazamiento por fluorescencia con el reactivo comercial SYBR Green I ®. Este reactivo de alta sensibilidad específico para dsDNA y dsRNA, genera una fluorescencia del complejo formado con el ácido nucleico más de cinco veces superior a la generada por el bromuro de etidio, el cual se ha utilizado asimismo para este tipo de ensayos (Pérez et al., 2009; Geall & Blagbrough, 2000).

El ensayo se basa en el desplazamiento de la unión del SYBR Green al siRNA al ir agregando cantidades crecientes del vehículo diseñado. La reducción en la fluorescencia emitida al disociarse el SYBR Green del ácido nucleico es cuantificada en un espectrofluorómetro, observándose valores luego de los cuales el agregado de mayores cantidades de vehículo (es decir, alcanzando superiores relaciones N/P) no implican una mayor pérdida de señal fluorescente; este punto marca el máximo desplazamiento alcanzado del SYBR Green y la asociación máxima del siRNA al vehículo en el sistema propuesto (Dorasamy et al., 2009).

10 pmoles de siRNA (0.5 µL de una solución madre 20 µM) se mezclaron con una cantidad también fija de solución de SYBR Green (150 µL de una dilución 1/10000 del reactivo comercial en buffer Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0, según instrucciones del fabricante) y depositaron en placas transparentes de 96 pocillos (Corning Costar, Fisher Scientific, USA). Luego, cantidades crecientes de formulación fueron agregadas en alícuotas sucesivas de 5 µL alcanzando los distintos valores de N/P (relación entre el número de cargas positivas, amonios cuaternarios de la fosfatidilcolina, y la cantidad de grupos fosfato aniónicos del siRNA) hasta un total de 50 µL. Luego de cada agregado, las muestras son incubadas antes de la lectura de fluorescencia para permitir que las formulaciones interaccionen con el siRNA desplazándolo de su interacción con el SYBR Green. Como consecuencia, se produce una disminución de la fluorescencia emitida por las muestras.

Para el cálculo del porcentaje de fluorescencia, a cada medición se le descontó el valor de fluorescencia intrínseca del SYBR Green medida. Luego, para cada valor de fluorescencia remanente tras el agregado de las fórmulas a los distintos N/P se calculó el porcentaje de fluorescencia respecto del control (100%), dado por la interacción entre el siRNA y el SYBR Green en ausencia de las fórmulas. Este porcentaje se calculó de la siguiente manera:

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

Porcentaje de fluorescencia = $F_m \times 100 / F_t$

Donde:

F_m : es la fluorescencia remanente luego del agregado de la fórmula.

F_t : es la fluorescencia generada por la interacción del SYBR Green y las moléculas de siRNA en ausencia de la fórmula.

La fluorescencia fue leída a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 528 nm, en un lector de fluorescencia de microplacas BioTek FLx800 (BioTek Instruments, USA). Se realizaron pruebas preliminares para asegurar que no ocurriesen variaciones de señal debidas a la dilución sucesiva de la muestra.

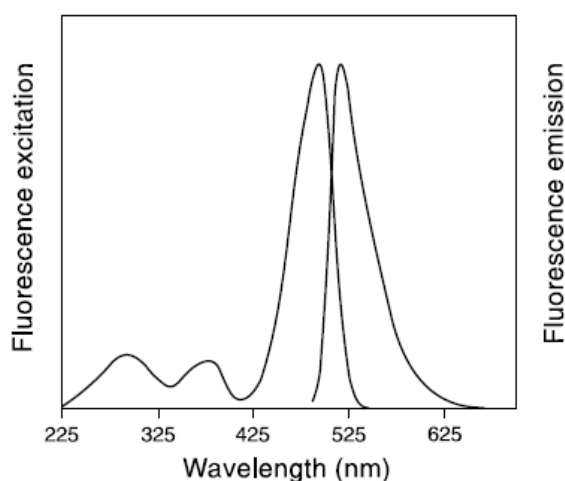


Figura 23: Espectros de excitación y emisión del complejo SYBR Green-dsRNA (Extraído de SYBR Green I® nucleic acid gel stain Product Datasheet).

3.2.3 Técnicas de evaluación biológicas

3.2.3.1 Ensayos *in vitro* sobre la línea celular MCF-7

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con las Dras. González y Gándola del Laboratorio de transducción de señales de hormonas peptídicas del Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB).

3.2.3.1.1 Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular

Para determinar la citotoxicidad de las formulaciones diseñadas se realizaron ensayos *in vitro* sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

Las células fueron cultivadas en placas transparentes de 96 pocillos (Corning Costar, Fisher Scientific, USA) a una densidad de 10000 células/pocillo. Luego de 24 hs, cantidades determinadas de las muestras fueron agregadas a 100 µL de medio de cultivo. Las células fueron luego incubadas a 37°C por 48hs en una atmósfera de 5% CO₂. Finalmente, el medio se renovó y la cantidad de células viables fue determinada utilizando el reactivo CellTiter96® Aqueous Nonradioactive Cell Proliferation Assay (MTS), Promega, midiendo absorbancia a 490 nm en un lector de placas ELISA (Amersham Biosciences Biotrak II). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de las células control sin tratar.

Este ensayo determina la cantidad de células viables luego del tratamiento ya que contiene una sal de tetrazolio (MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazolio, sal), combinada con un copulador de electrones, el metosulfato de fenazina (PMS). Esta sal de tetrazolio es bio-reducida a un producto coloreado de formazán por las células activas siguiendo la siguiente reacción:

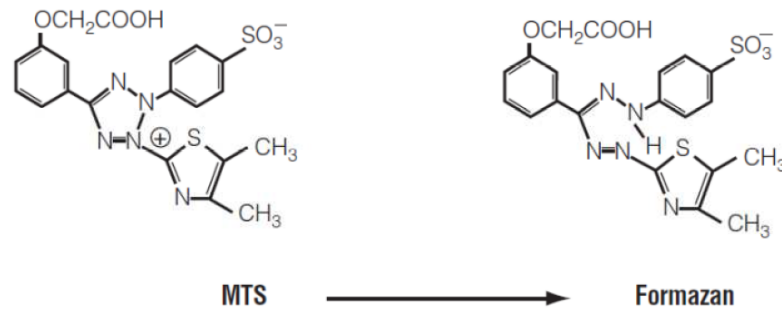


Figura 24: Reacción química en la que la sal de tetrazolio es bio-reducida a formazán por las células activas.

Esta reducción es llevada a cabo por el NADPH y el NADH producidos por oxido-reducetasas citosólicas en células metabólicamente activas. El compuesto coloreado resultante se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm y la cantidad formada es proporcional a la cantidad de células viables.

3.2.3.1.2 Ensayos de internalización celular de los vehículos con siRNA

La internalización del oligonucleótido vehiculizado se evaluó a través de la observación por microscopía de epifluorescencia de la transfección de un dsRNA marcado con un fluorocromo en células MCF-7. Se utilizaron dos tipos de dsRNA marcados:

- BLOCK-iT™ Alexa Fluor® 555 Red Fluorescent Oligo (Invitrogen, CA, USA)
- Fluorescein-labeled dsRNA BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (Invitrogen, CA, USA)

Para experimentos de control el dsRNA marcado con fluorocromo se transfectó en paralelo con el vehículo comercial Lipofectamina® (control positivo). Mientras que la internalización no mediada por los vehículos se evaluó incubando las células con el dsRNA libre marcado únicamente (control negativo). Para llevar a cabo estos experimentos, se realizó transfección reversa según recomendación de los proveedores de la Lipofectamina® (Lipofectamine® RNAiMAX, Invitrogen, CA, USA).

En primer lugar se colocaron cubreobjetos circulares dentro de pocillos de una placa de 24 pocillos. En los mismos se preparó el complejo dsRNA : vehículo de transfección. Para ello, se diluyeron 6 pmol de dsRNA en 100 μ L de medio Opti-MEM® (Invitrogen) sin suero en cada pocillo de la placa de 24 pocillos. Posteriormente se agregó 1 μ L de Lipofectamina® (control positivo), PBS pH 7.4 (control negativo), o los distintos vehículos de transfección diseñados en cantidades adecuadas para alcanzar los valores de N/P. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para favorecer la formación del complejo entre el dsRNA y el vehículo de transfección. Transcurrido el tiempo de incubación, células MCF-7 fueron sembradas en los cubreobjetos en una densidad de 200000 células/pocillo para los LP-PC y 50000 células/pocillo para los LP-PC/SB, e incubaron por 18hs a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Posteriormente se lavaron y fijaron con formaldehído 2% en PBS y se montaron con líquido de montaje conteniendo Hoechst 33342 (1 μ g/mL) - en el caso de las muestras con Alexa Fluor® dsRNA - para visualización de los núcleos. Finalmente la internalización del dsRNA se evaluó en un microscopio de epifluorescencia Leica DM 2000. Un número apropiado de campos fueron examinados y se tomaron fotografías representativas.

El objetivo de este ensayo fue determinar si las moléculas de dsRNA fluorescentes se encontraban dentro de las células cuando eran tratadas con el reactivo de control positivo y con los vehículos diseñados.

3.2.3.1.3 Ensayos de eficiencia de silenciamiento génico

La eficiencia de silenciamiento génico (“gene knock down”) a partir del siRNA transfectado por los vehículos diseñados se investigó a través del silenciamiento de la expresión de actina. Se utilizó para ello un siRNA control anti-actina (Stealth™ RNAi Actin Positive Control, Invitrogen, CA, USA). El silenciamiento de la expresión se evaluó por tinción con faloidina marcada – Faloidina-TRITC (Sigma Aldrich, Missouri, USA).

60 pmoles de siRNA anti-actina se mezclaron con 3 μ L de Lipofectamina® (control positivo), PBS pH 7.4 (control negativo), o con los distintos vehículos de transfección e incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, células MCF-7 fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad de 200000

células/pocillo para los LP-PC y 50000 células/pocillo para los LP-PC/SB, e incubadas con los complejos siRNA: vehículo de transfección por 18hs a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Luego, el medio de transfección fue reemplazado por medio fresco (DMEM 10% suero, con antibiótico) y se incubaron las células por otras 48hs para que se efectivice el silenciamiento del gen de interés. Transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas con PBS 1X, fijadas en paraformaldehído 2 %, permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 0.5 % en PBS 1X durante 10 minutos, y luego se incubaron con solución de bloqueo (Tritón X-100 0.1 %, BSA 2 % en PBS 1X) durante otros 10 minutos. La incubación con faloidina (2 µg/mL) para visualización de actina se realizó durante 20 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente. Por último las células fueron montadas con solución de montaje conteniendo Hoechst 33342 (1 µg/mL) para la tinción de los núcleos celulares, y los resultados se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Leica DM 2000).

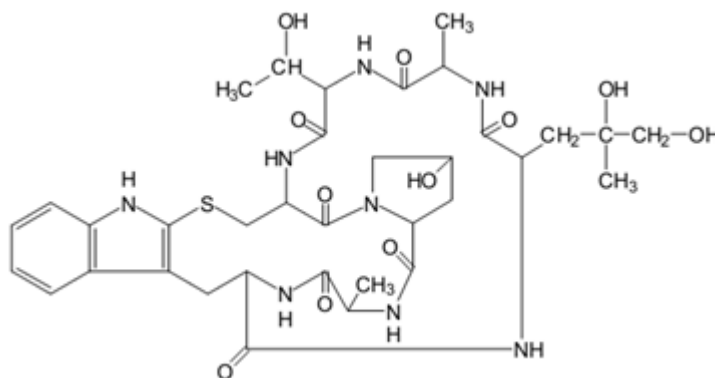


Figura 25: Esquema representando la molécula de Faloidina.

3.2.3.2 Ensayos *in vitro* sobre la línea celular MDCK

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con los Dres. Lucila Pescio y Nicolás Favale del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de Esfingolípidos del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB).

3.2.3.2.1 Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular

Las células fueron transfectadas con los volúmenes de formulaciones utilizados en los ensayos *in vitro* con siRNA para alcanzar la relación N/P escogida. Transcurrido el tiempo de incubación con los agentes transfectantes, las células fueron lavadas dos veces con 1 mL de PBS e incubadas posteriormente con 0.2 mL de Tripsina 0,25 %-EDTA durante 2 minutos a 37°C. Luego de agregar 20 µl de FBS, las suspensiones celulares fueron recogidas en tubos tipo eppendorf. Cada pocillo fue lavado con 200 µL de DMEM/F12. Luego de centrifugar las suspensiones a 13000 rpm durante 1 min, los pellets fueron resuspendidos en 0.2 mL de DMEM/F12 y se determinó el número de células totales presente en cada pocillo mediante el uso de la cámara de Neubauer.

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de exclusión del azul tripan. El colorante se preparó mezclando 4 partes de solución acuosa de azul tripan al 0.2 % y 1 parte de solución salina de NaCl al 4.25 %. Se mezclaron 20 µL de esta solución con 20 µL de cada suspensión celular y se determinó el número de células viables (no coloreadas) y no viables (coloreadas). El porcentaje de viabilidad se determinó calculando el porcentaje de células no coloreadas sobre el total de células contadas.

3.2.3.2.2 Ensayos de internalización celular y eficiencia de silenciamiento génico

Las transfecciones se realizaron en presencia de dos tipos de siRNA:

- *AllStarsTM Negative Control siRNA AF® 488 (Qiagen, CA, USA)*: siRNA marcado con fluorocromo verde que permite evidenciar las células transfectadas. Concentración final utilizada: 5 nM.
- *siRNA específico para Lámina A/C (Invitrogen, CA, USA)*: siRNA utilizado con fin de silenciar la expresión de la lámina nuclear. Concentración final utilizada: 50 nM.

Se mezclaron los volúmenes necesarios para alcanzar una relación N/P 1000 para los LP-PC y N/P 100 para los LP-PC/SB, y para que los siRNA alcancen la concentración final deseada. Estas mezclas se vortexearon y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente.

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

Posteriormente, se agregaron a cada pocillo y el medio de cultivo se suplementó con FBS al 10%. Como control positivo se utilizó como vehículo el reactivo de transfección HiPerFect® (Qiagen) y como control negativo las incubaciones se realizaron en presencia de las formulaciones sin el agregado de los siRNA. Las células fueron incubadas en presencia de las distintas mezclas durante 20 h.

Las células cultivadas en las condiciones antes mencionadas, fueron sembradas y crecidas sobre cubreobjetos de vidrio estériles. Una vez transcurrido el tiempo de incubación con las mezclas, los cubreobjetos fueron trasvasados a otra placa multiwell para su posterior procesamiento. En principio, los cultivos fueron lavados tres veces con PBS tibio, luego se realizó la fijación con una solución de paraformaldehído (Riedel-deHaën) al 4 % en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron dos lavados de 10 min y otros dos de 5 min con PBS tibio. La permeabilización celular se realizó con Tritón X100 0.1 % en PBS durante 20 min y luego se lavó cuatro veces con PBS tibio (10, 10, 5 y 5 min). Los cubreobjetos fueron incubados en solución de bloqueo preparada con seroalbúmina bovina (BSA) al 3 % en PBS durante 60 min en cámara húmeda y posteriormente durante 90 min en presencia del anticuerpo primario (mouse) anti Lámina A/C en dilución 1/50 preparado en solución de bloqueo. La solución del anticuerpo primario fue lavada dos veces durante 10 min y otras dos veces durante 5 min con PBS tibio. Como solución de marcación se utilizó anticuerpo secundario anti mouse conjugado con TRITC (1/200) en conjunto con Hoechst 33258 (1/400) para evidenciar los núcleos, y la mezcla se incubó durante 60 min en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS tibio (10, 10, 5 y 5 min) y finalmente los cubreobjetos se montaron con 25 µL de Vectashield® Mounting Medium (Vector Labs). Los preparados se conservaron a 4°C hasta su visualización.

Obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia

Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia wide-field utilizando un microscopio invertido NIKON Eclipse Ti-U con objetivo 60X acoplado a una cámara monocromática. Las imágenes fueron capturadas en los tres canales (verde, rojo y azul) mediante el programa NIS Element y el procesamiento se llevó a cabo con el programa Image-Pro plus version 5.1.

En la siguiente tabla se resume lo que se espera ver en cada canal:

MOLÉCULA FLUORESCENTE UTILIZADA	MARCADOR DE	COLOR DE DETECCIÓN
siRNA – Alexa 488	Células transfectadas	Verde
Actiuero secundario anti mouse conjugado con TRITC que se une a Actiuero primario (mouse) anti Lámina A/C	Lámina nuclear	Rojo
Hoechst 33258	Núcleos (DNA)	Azul

Tabla 3: Códigos de color de los marcadores fluorescentes utilizados en las células MDCK.

3.2.4 Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos fueron realizados mediante el Software GraphPad InStat 3.01 para Windows® (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EE.UU.). Los datos que se muestran en tablas y figuras se indican como promedio de n determinaciones \pm desvío standard (SD). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student o con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para más de dos grupos. La significancia estadística de las diferencias entre grupos fue calculada usando los Tests de comparaciones múltiples de Newman-Keuls y de Dunnett contra control con un nivel de significación fijado en 0.05.

4 RESULTADOS

4.1 Lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC)

4.1.1 Elaboración y selección inicial de las formulaciones

Se prepararon dispersiones de fosfatidilcolina en diferentes medios: agua desionizada, solución isotónica de glicerol 2.76% p/p, solución reguladora isotónica de fosfato monoácido/diácido de sodio 67mM pH 7.0 y solución reguladora isotónica de acetato de sodio/acido acético 50mM pH 5.0; siendo las soluciones reguladoras isotonizadas mediante el agregado de cantidades suficientes de cloruro de sodio de acuerdo a los métodos de Sörensen y White-Vincent. Las dispersiones obtenidas fueron procesadas mediante homogeneización mecánica de altas revoluciones y sonicación, a fin de obtener las formulaciones nanoparticuladas finales (Tabla 4).

#	Fosfatidilcolina (PC)	Medio
1	25 mM	Agua
2		Glicerol 2.76%
3		Buffer pH 5.0
4		Buffer pH 7.0
5	50 mM	Agua
6		Glicerol 2.76%
7		Buffer pH 5.0
8		Buffer pH 7.0
9	100 mM	Agua
10		Glicerol 2.76%
11		Buffer pH 5.0
12		Buffer pH 7.0

Tabla 4: Composición de las distintas formulaciones de LP-PC.

De las fórmulas desarrolladas, se realizó una selección preliminar mediante electroforesis en geles de agarosa para ser utilizadas como nanovehículos de siRNA. Estos ensayos, que se realizaron en colaboración con la tesis de la Lic. Yamila Gándola, se llevaron a cabo para evaluar la capacidad de unión de siRNA de cada una de las formulaciones, seleccionando así el medio diluyente más apropiado. De estas fórmulas se realizó luego una caracterización fisicoquímica para el estudio de su microestructura, además de la evaluación de su toxicidad *in vitro*, capacidad de captación/internalización celular y eficiencia de silenciamiento génico.

A fin de evaluar la eficiencia de carga de siRNA de acuerdo al medio de formulación utilizado, 0.5 μL (10 pmoles) de una solución madre 20 μM de siRNA se mezclaron con las formulaciones en estudio a una relación N/P 100. Luego, las muestras fueron incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, cada muestra se corrió en un gel de agarosa al 1% a 100 V por 30 minutos, el cual se preparó previamente con bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para revelar. La detección del siRNA libre y asociado se llevó a cabo exponiendo los geles de agarosa a la luz UV con un transiluminador.

El bromuro de etidio (EthBr) es un colorante catiónico que interacciona con DNA y RNA por intercalamiento entre sus pares de bases. Se observa un gran aumento en la fluorescencia cuando el grupo fenantridinio de esta molécula se intercala con el DNA o el RNA. Esta propiedad no está afectada por el peso molecular del DNA/RNA o por la composición de bases; sí se requiere de una estructura de doble hebra para promover una fuerte unión con el EthBr.

Un control negativo compuesto por moléculas de siRNA en agua desionizada y un control positivo en el que se incubó el siRNA con un reactivo comercial (Lipofectamina ®) fueron incluidos y corridos en paralelo (Figura 26).

Como evaluación paralela, se controló que la capacidad de unión de siRNA por las formulaciones no varió apreciablemente con mayores tiempos de incubación (hasta 2 horas), por lo que se decidió continuar con un tiempo de incubación de 20 minutos para los ensayos.

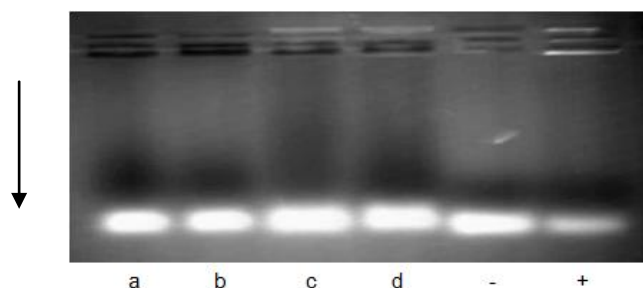


Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa de las formulaciones en distintos medios (a: agua desionizada, b: glicerol 2.76% p/p, c: solución reguladora pH 5.0, d: solución reguladora pH 7.0) cargadas con siRNA a N/P 100. Los controles incluyen siRNA desnudo (-) y asociado a Lipofectamina® (+). *Realizado junto a Yamila Gándola (Tesis doctoral Área Química Biológica) y publicado en Pérez et al., 2012*

De los resultados obtenidos puede deducirse que la capacidad de unión al oligonucleótido de las fórmulas desarrolladas utilizando soluciones reguladoras pH 5.0 y 7.0 es mayor que la presentada por las formulaciones en agua desionizada y glicerol 2.76%. Al comparar los complejos formados y el siRNA libre, se observa que una parte de las moléculas de siRNA está en la siembra unida a la fosfatidilcolina para los primeros casos mencionados, mientras que con las formulaciones en agua o glicerol, todas las moléculas de siRNA libre migraron con el frente y no fueron retenidas. Ensayos realizados a relaciones N/P mayores reprodujeron asimismo estos resultados. Las observaciones surgidas de este ensayo preliminar permitieron así descartar las formulaciones con casi nula eficiencia de unión con el oligonucleótido, avanzando en la evaluación de los otros sistemas propuestos.

Ensayos ulteriores indicaron asimismo asociación de las formulaciones pH 5.0 y pH 7.0 con el oligonucleótido en un amplio rango de relaciones N/P, especialmente por encima de N/P 1000 y hasta un N/P evaluado de 8000. Para valores menores, sólo las formulaciones de pH 5.0 mostraron muy leve unión, mientras que no se observó unión para las formulaciones de pH 7.0 por debajo de N/P 100 (estudios reportados en Pérez et al, 2012).

Tenemos en cuenta, no obstante, que la eficiencia de carga del oligonucleótido surgida a partir de los resultados de este tipo de ensayo para valores de N/P muy bajos puede encontrarse algo subestimada, dado que la asociación del siRNA al lipoplexo puede estar dada por interacciones iónicas débiles, dificultando en algún nivel su retención durante la corrida electroforética (Kapoor et al, 2012). Si bien se intentó complementar el estudio mediante

ensayos de desplazamiento en solución con el reactivo fluorescente SYBR Green, los cuales son de hecho, de referencia a nivel industrial por ser cuantitativos, no fue posible optimizar la metodología para desestimar las interferencias generadas por la turbidez intrínseca de las formulaciones ensayadas a las concentraciones de trabajo necesarias.

4.1.2 Determinación de tamaño de partícula y carga superficial

Se realizaron determinaciones del tamaño de las partículas resultantes en las formulaciones seleccionadas mediante ensayos de dispersión láser dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS) a 25°C y un ángulo de dispersión de 173°, utilizando el equipo disponible en el Dpto. de Tecnología Farmacéutica, provisto de un láser de 4mW He-Ne (633nm).

Como se observa en la Tabla 5 y en la Figura 27, se obtuvieron partículas en el rango de los 180 – 250 nm para los distintos sistemas previo a la carga del oligonucleótido. En cuanto al potencial zeta desarrollado, se obtuvieron valores positivos para las formulaciones preparadas en medio regulado a pH 5.0 y valores negativos para las preparadas en medio regulado a pH 7.0, a las distintas concentraciones de fosfatidilcolina empleadas.

	<i>PC</i>	<i>Tamaño de partícula (d.nm)</i>	<i>Potencial zeta (mV)</i>
pH 5.0	25 mM	232.7 ± 19.6	13.8 ± 2.1
	50 mM	241.4 ± 23.1	23.6 ± 2.8
	100 mM	204.7 ± 37.5	20.3 ± 1.8
pH 7.0	25 mM	189.1 ± 11.9	-40.3 ± 3.0
	50 mM	229.6 ± 11.4	-49.8 ± 3.6
	100 mM	198.6 ± 21.0	-48.0 ± 3.4

Tabla 5: Tamaño de partícula y potencial zeta de las formulaciones no cargadas con siRNA preparadas a pH 5.0 y pH 7.0, reportadas como Media ± SD (n=4).

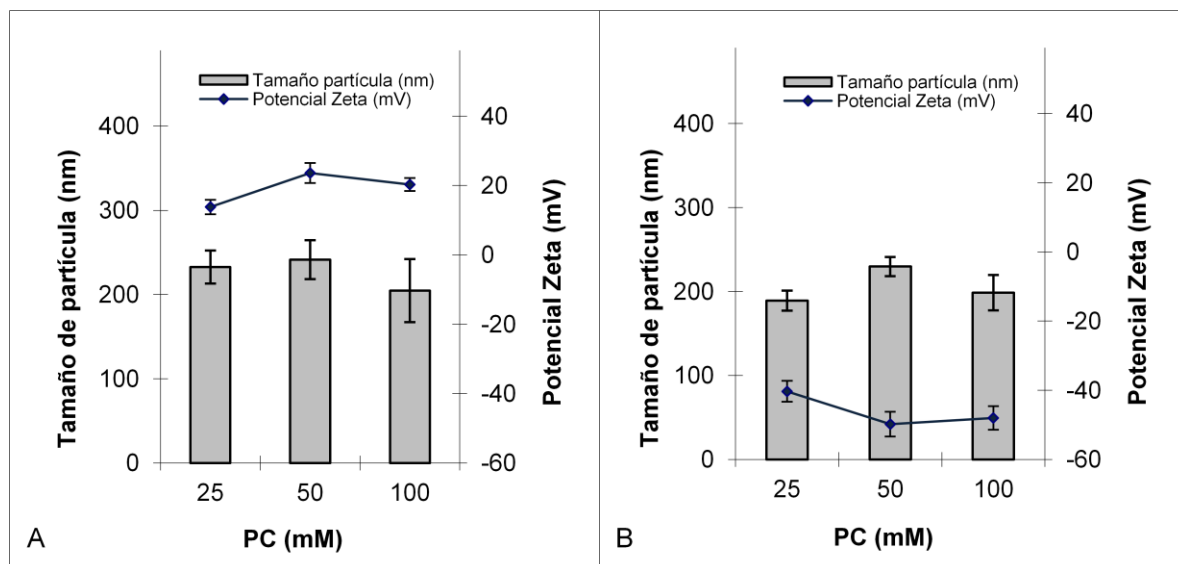


Figura 27: Efecto del pH y la concentración de fosfatidilcolina sobre el tamaño de partícula y el potencial zeta de las formulaciones no cargadas con siRNA, preparadas a pH 5.0 (A) y pH 7.0 (B). Media \pm SD (n=4). Publicado en Pérez et al., 2012.

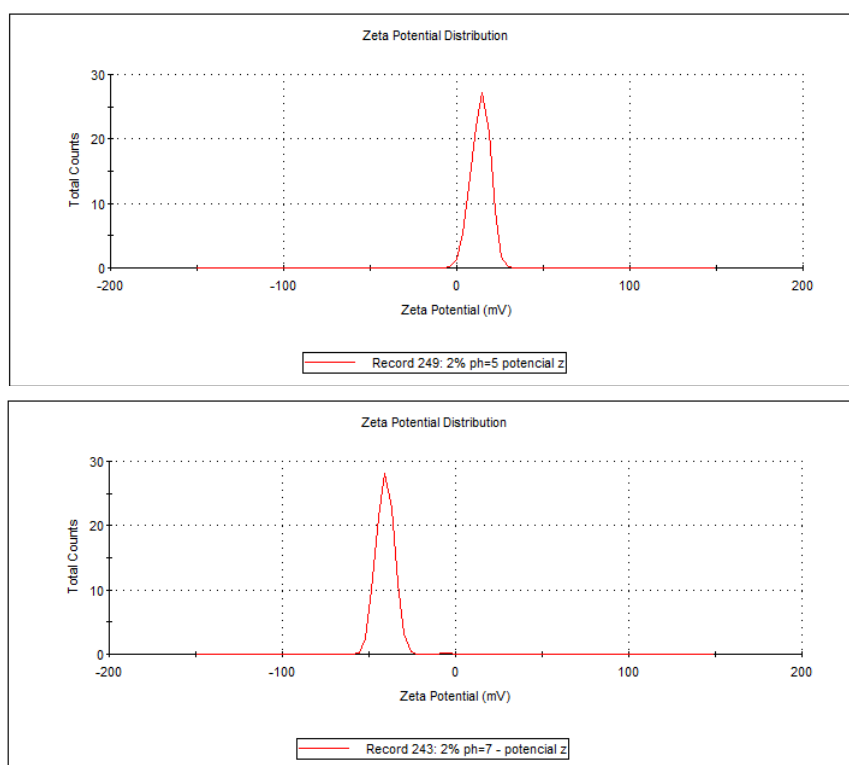


Figura 28: Gráficos individuales obtenidos de las determinaciones de potencial zeta de las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0 (arriba) y pH 7.0 (abajo).

Las formulaciones fueron luego cargadas con siRNA a diferentes relaciones N/P, evaluándose así el tamaño de partícula y potencial zeta adquiridos luego de la carga del oligonucleótido (Tabla 6). Se seleccionaron para este ensayo las formulaciones conteniendo 25mM de fosfatidilcolina (Figura 29), dada la mayor inestabilidad macroscópica que presentaron los sistemas más concentrados luego de períodos cortos de almacenamiento.



Figura 29: Formulaciones de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0 (izquierda) y pH 7.0 (derecha).

	<i>Relación N/P</i>	<i>Tamaño de partícula (d.nm)</i>	<i>PdI</i>	<i>Potencial zeta (mV)</i>
pH 5.0	8000	364.9 ± 35.4	0.452	-35.5 ± 2.7
	4000	384.5 ± 51.5	0.280	-54.4 ± 5.2
	2000	303.2 ± 1.4	0.185	-59.1 ± 3.1
	1000	252.5 ± 19.8	0.263	-59.7 ± 2.2
	100	196.9 ± 14.1	0.398	*
pH 7.0	8000	371.5 ± 36.3	0.463	-41.3 ± 1.9
	4000	375.5 ± 27.1	0.484	-58.4 ± 3.4
	2000	343.4 ± 25.7	0.470	-61.4 ± 2.6
	1000	328.2 ± 61.9	0.448	-63.1 ± 3.0
	100	271.5 ± 28.2	0.463	*

* No se pudieron determinar, por baja relación señal/ruido.

Tabla 6: Tamaño de partícula y potencial zeta de las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM cargadas con siRNA a distintas relaciones N/P, reportadas como Media ± SD (n=4). *Publicado en Pérez et al., 2012.*

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

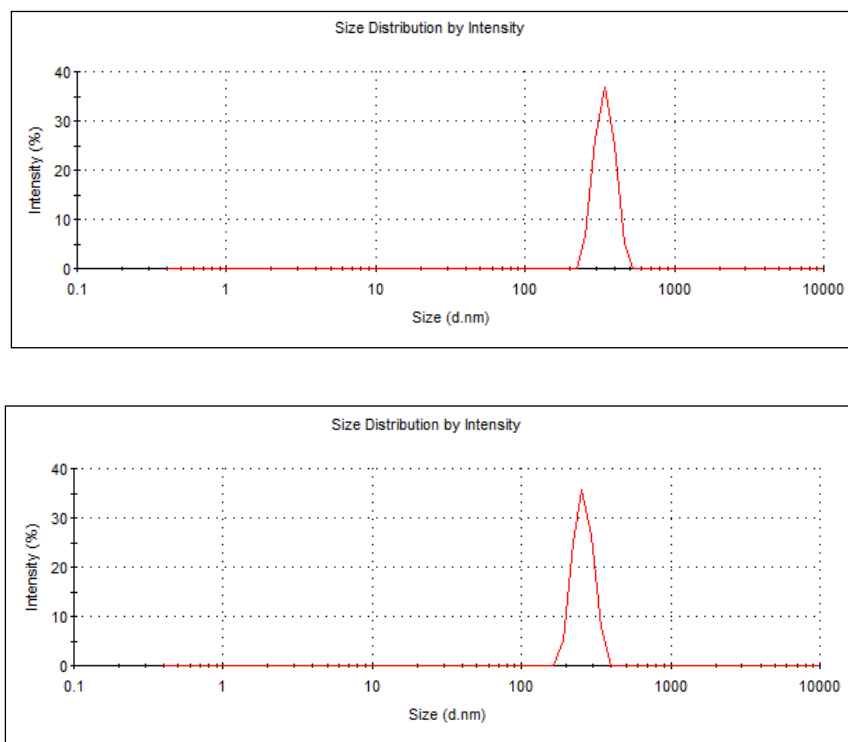


Figura 30: Ejemplo de determinaciones individuales de distribución de tamaño medio de partícula, obtenidas para la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 7.0 cargada con siRNA a N/P 8000 (arriba) y N/P 100 (abajo).

Los resultados indican que a medida que la relación N/P se hace menor (es decir, menor cantidad de fosfatidilcolina en relación al oligonucleótido), los tamaños de partícula tienden a disminuir también; este fenómeno se observa en ambas formulaciones. En cuanto al potencial zeta, podemos inferir al comparar los valores obtenidos de las nanopartículas cargadas respecto de las no cargadas con siRNA, que existe una marcada contribución del oligonucleótido a la carga neta adquirida. Este hecho se observa con mayor magnitud en las nanopartículas formuladas a pH 5.0, las cuales pasan de valores positivos de potencial zeta a valores francamente negativos. Esta contribución del siRNA a la carga neta del sistema es menor para el caso de las nanopartículas formuladas a pH 7.0, las cuales ya presentaban valores de potencial zeta negativos antes de ser cargadas, los que continúan negativizándose aunque muy levemente luego de la carga del oligonucleótido. Es de destacar sin embargo que, en ambos casos, existe una tendencia a valores más negativos a medida que la relación N/P decrece, de lo que podría inferirse que el siRNA se encuentra localizado al menos en parte en la superficie de los lipoplejos.

4.1.3 Morfología determinada por TEM y SEM

La morfología de los lipoplexos obtenidos fue estudiada mediante Microscopía de Transmisión Electrónica (*Transmission Electron Microscopy*, TEM), Fig. 31-34, y Microscopía de Barrido Electrónico (*Scanning Electron Microscopy*, SEM), Fig. 35.

Se evaluaron las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM, sin cargar y cargadas con siRNA a una relación N/P de 8000, límite máximo estudiado previamente en cuanto a capacidad de carga y tamaño de partícula / potencial zeta.

Las fórmulas de pH 5.0 sin siRNA exhibieron partículas de tamaño nanométrico y forma irregular (Fig. 31), observándose una transición hacia partículas de forma esférica y menor diámetro al cargarlas con el oligonucleótido (Fig. 32 y 35). Las fórmulas de pH 7.0, en cambio, exhibieron partículas menos dispersas, elongadas y localmente cilíndricas (Fig. 33-35).

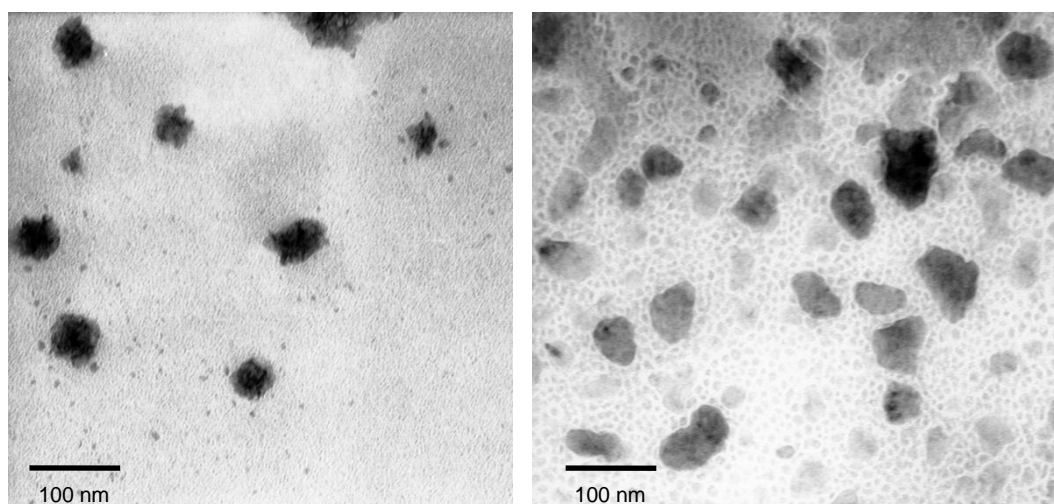


Figura 31: Microscopías Electrónicas de Transmisión (TEM) de las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0 sin cargar con siRNA. Aumento: 140000X

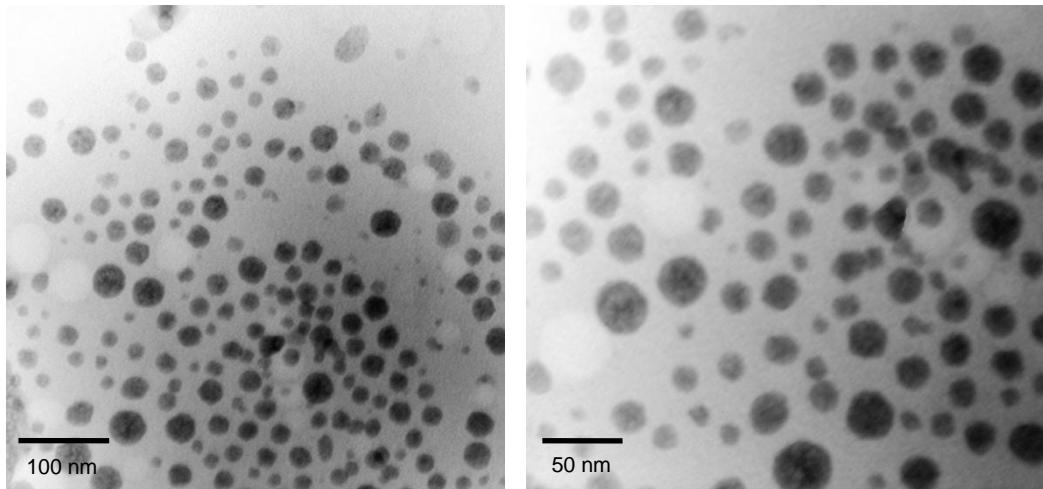


Figura 32: Microscopías Electrónicas de Transmisión (TEM) de las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0 cargadas con siRNA a N/P 8000. Aumentos: 140000X (izq), 250000X (der)

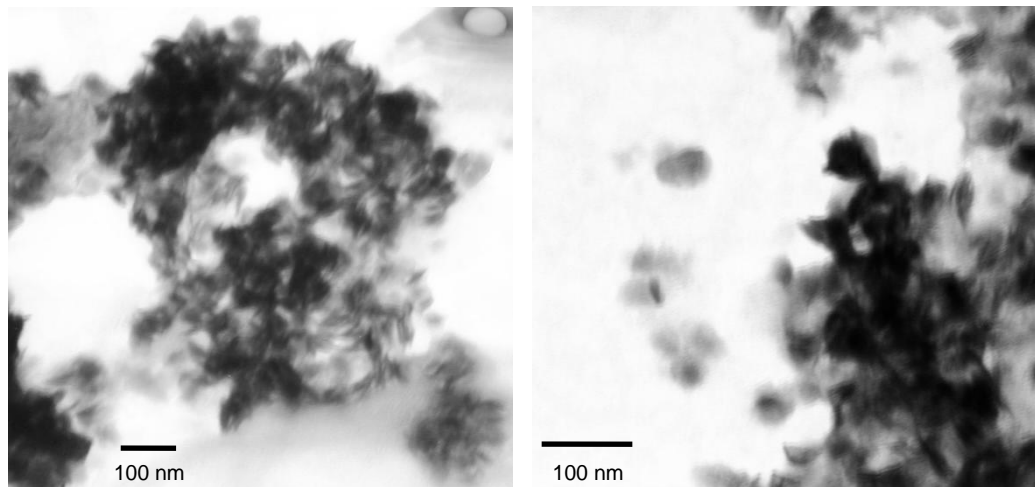


Figura 33: Microscopías Electrónicas de Transmisión (TEM) de las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM pH 7.0 sin cargar con siRNA. Aumentos: 85000X (izq), 140000X (der)

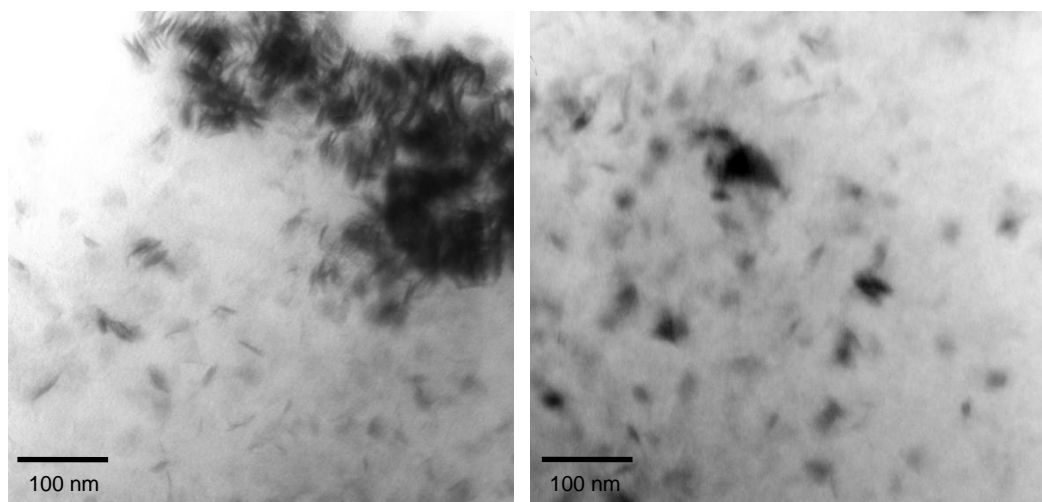


Figura 34: Microscopías Electrónicas de Transmisión (TEM) de las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM pH 7.0 cargadas con siRNA a N/P 8000. Aumento: 140000X

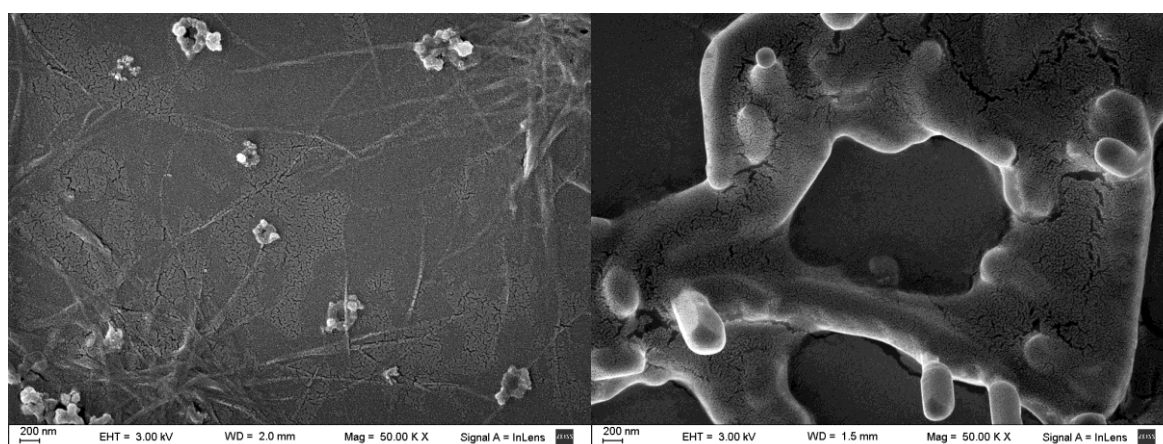


Figura 35: Microscopías Electrónicas de Barrido (SEM) de las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0 (izquierda) y pH 7.0 (derecha) cargadas con siRNA a N/P 8000. Aumento: 50000X. *Publicado en Pérez et al., 2012.*

Observamos que los tamaños surgidos de las micrografías electrónicas tienden a ser menores que los obtenidos por dispersión láser dinámica (DLS); esto puede ocurrir debido a que esta última técnica determina el tamaño de las partículas a partir de su movimiento browniano, correlacionando las fluctuaciones en intensidad de luz dispersada con el tamaño

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

mediante la ecuación de Stokes-Einstein, arrojando el valor de radio hidrodinámico que es mayor que el tamaño real de la partícula (Kapoor et al., 2012; Cui et al., 2006). Asimismo, mientras que las mediciones por DLS se realizan sobre las muestras líquidas, éstas deben ser llevadas a sequedad sobre una placa y luego teñidas ó recubiertas con oro previo al análisis por microscopía, lo que puede afectar a las nanopartículas. Luego, mientras que por microscopía se analizan posiciones seleccionadas de la placa, la técnica DLS arroja los tamaños medios estimados por la intensidad de la luz dispersada en la muestra completa.

4.1.4 Ensayos *in vitro* sobre la línea celular MCF-7

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con las Dras. González y Gándola del Laboratorio de transducción de señales de hormonas peptídicas del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB).

4.1.4.1 Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular

Se realizaron ensayos de citotoxicidad de las formulaciones seleccionadas con el objetivo de observar su comportamiento sobre las líneas celulares en las cuales se realizaron el resto de los ensayos *in vitro*.

El porcentaje de viabilidad celular luego del tratamiento de las células MCF-7 de cáncer de mama con las distintas formulaciones fue estimado mediante medición espectrofotométrica a 490 nm del grado de bio-reducción obtenido de la sal de tetrazolio MTS al producto coloreado formazán por las células viables. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de las células control sin tratar (Figura 36). De acuerdo a los resultados obtenidos, ninguna de las formulaciones arrojó signos de citotoxicidad en la línea celular ensayada en comparación con las células control sin tratar.

Las formulaciones fueron asimismo esterilizadas por autoclave (121°C, 15 minutos, 1 atm sobrepresión) a fin de evaluar cambios en el aspecto macroscópico y citotoxicidad en comparación con las formulaciones sin esterilizar; no se encontraron diferencias significativas con los valores reportados, por lo que se consideró innecesario agregar un paso previo de

esterilización para la realización del resto de los estudios.

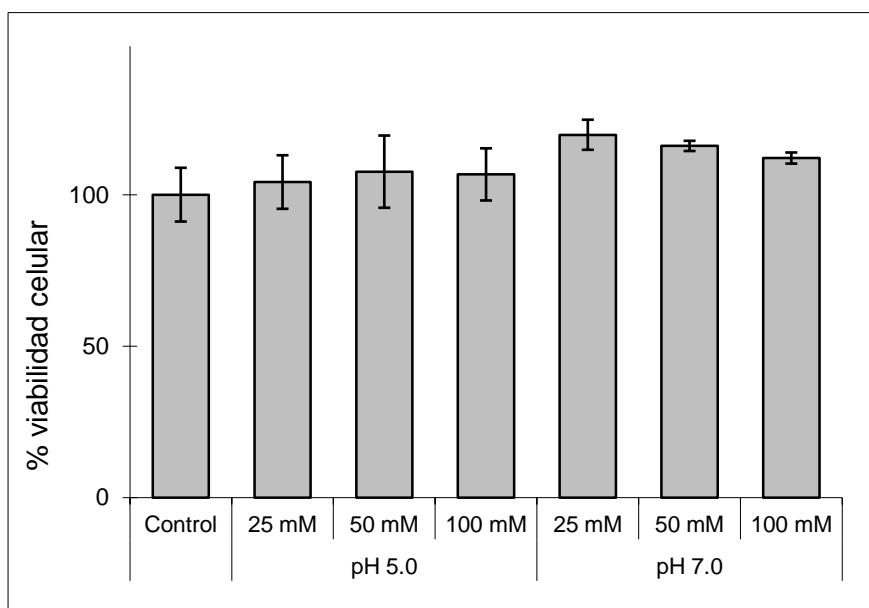


Figura 36: Citotoxicidad de las formulaciones seleccionadas conteniendo 25mM, 50mM y 100mM de fosfatidilcolina en células MCF-7 mediante el ensayo MTS. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto de las células control sin tratar. Media \pm SD (n=3). No se observan diferencias significativas (Test ANOVA seguido del test a posteriori de Dunnett para comparaciones múltiples contra control, $p > 0.05$). Publicado en Pérez *et al.*, 2012.

4.1.4.2 Ensayos de internalización celular del siRNA vehiculizado

La eficiente internalización del siRNA vehiculizado en las células MCF-7 se evaluó a través de la observación por microscopía de epifluorescencia de la transfección de un dsRNA marcado con un fluorocromo (BLOCK-iTTM Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo).

Teniendo en cuenta la mayor inestabilidad macroscópica que presentaron los sistemas más concentrados luego de períodos cortos de almacenamiento y los estudios previos de capacidad de unión de siRNA y tamaño/potencial, se seleccionaron las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0 y 7.0, cargadas con el oligonucleótido a una relación N/P 8000.

El dsRNA marcado con fluorocromo se transfectó en paralelo con el vehículo comercial Lipofectamina® (control positivo, Fig. 37). Mientras que la internalización no mediada por los

vehículos se evaluó incubando las células con el dsRNA marcado desnudo únicamente (control negativo, Fig. 38).

Como se observa en las fotografías obtenidas (Fig. 39 y 40), ambos sistemas diseñados fueron capaces de internalizar el oligonucleótido vehiculizado en las células MCF-7. El dsRNA marcado ingresó al citoplasma y se ubicó en la zona perinuclear (núcleos azules, por tinción con el reactivo fluorescente Hoechst); en contraste, el dsRNA marcado desnudo no fue detectado por la microscopía de fluorescencia, ni dentro de las células ni en el medio extracelular, sugiriendo su degradación o remoción durante el lavado de las células luego del período de incubación.

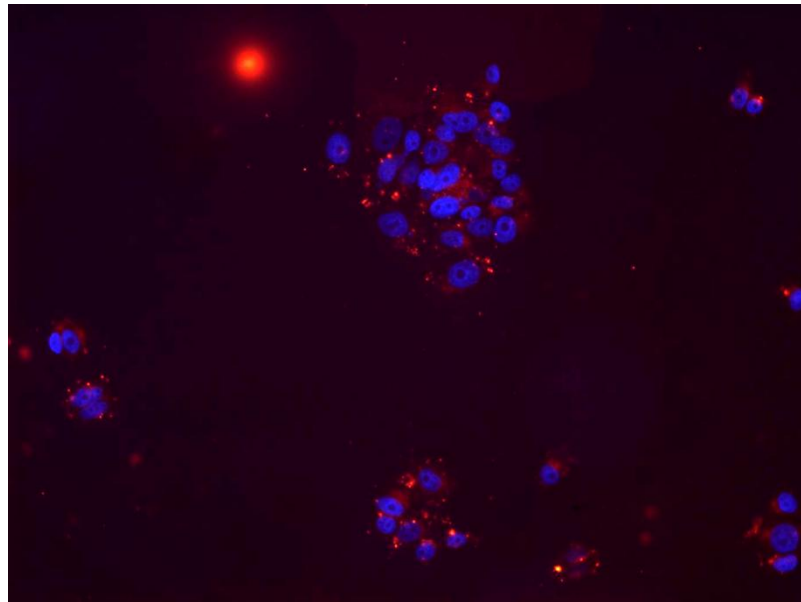


Figura 37: Control positivo para vehiculización de moléculas de dsRNA en células MCF-7, utilizando Lipofectamina®. Las zonas perinucleares rojas corresponden a moléculas de dsRNA en el citoplasma celular. Publicado en Pérez et al., 2012.

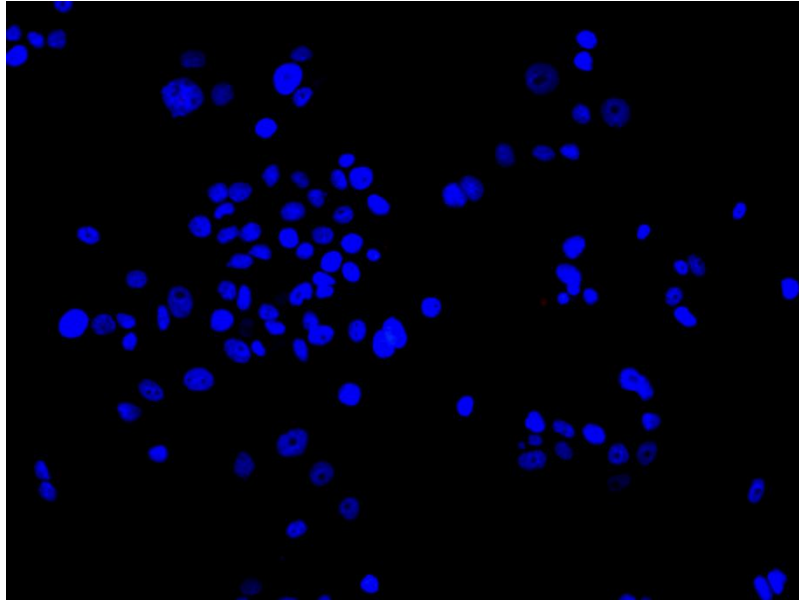


Figura 38: Control negativo para vehiculización de moléculas de dsRNA en células MCF-7, utilizando dsRNA marcado desnudo. *Publicado en Pérez et al., 2012.*

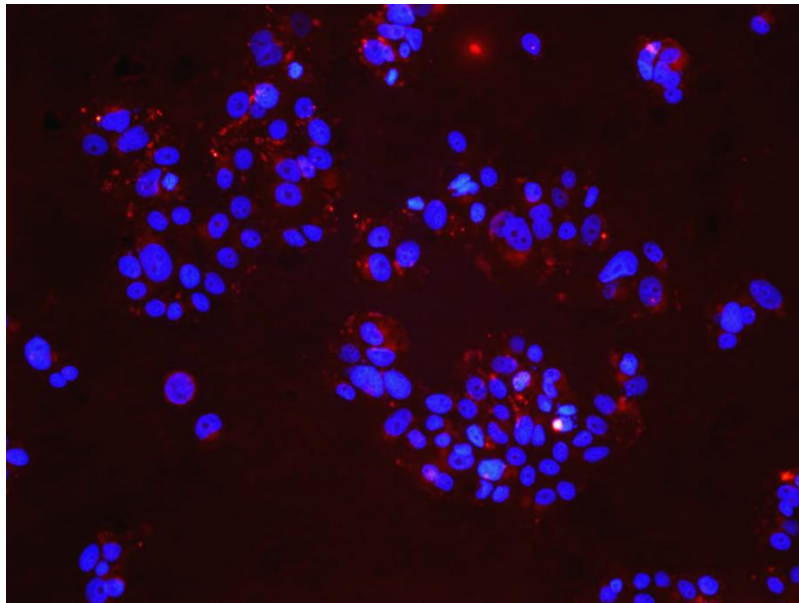


Figura 39: Vehiculización de moléculas de dsRNA en células MCF-7, utilizando la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0. Las zonas perinucleares rojas corresponden a moléculas de dsRNA en el citoplasma celular. *Publicado en Pérez et al., 2012.*

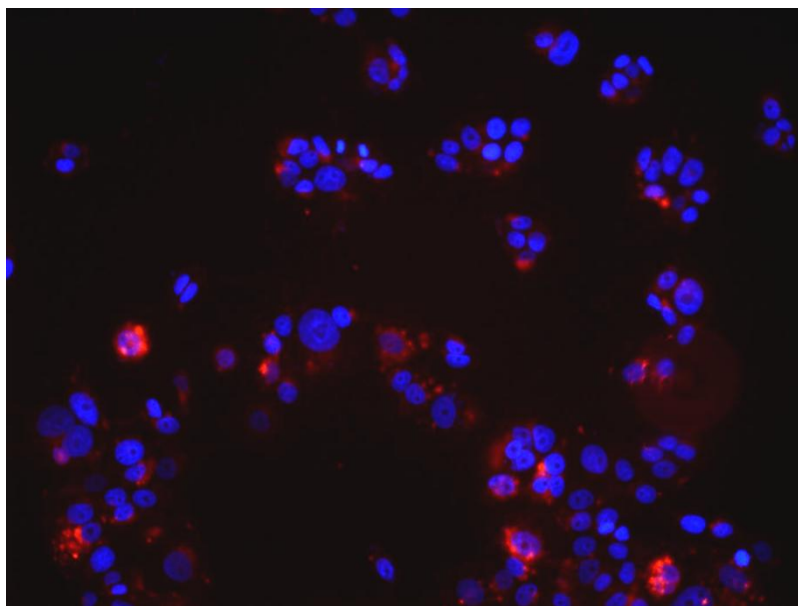


Figura 40: Vehiculización de moléculas de dsRNA en células MCF-7, utilizando la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 7.0. Las zonas perinucleares rojas corresponden a moléculas de dsRNA en el citoplasma celular. *Publicado en Pérez et al., 2012.*

Si bien los ensayos de internalización de siRNA marcado con fluorocromo no permiten cuantificar la eficiencia de vehiculización por los lipoplexos formulados, el análisis de una cantidad considerable de campos al microscopio de fluorescencia da indicios de que las fórmulas diseñadas serían prometedoras como posibles vehículos de siRNA.

Se debe tener en cuenta que el efecto final de silenciamiento génico depende además del escape endolisosomal y de la eficiente incorporación del siRNA vehiculizado a la maquinaria de silenciamiento en el citoplasma celular. Si bien se realizaron pruebas para evaluar dicho efecto sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama a partir de los vehículos diseñados, no fue posible ajustar satisfactoriamente las condiciones de ensayo para el control positivo, es decir, cuando la transfección se realizó utilizando como vehículo el reactivo comercial Lipofectamina®. De esta forma, mientras que podemos argumentar que los lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC) presentan eficiente capacidad de unión de siRNA e incluso de transporte hacia el interior de las células MCF-7, no podemos concluir fehacientemente que dicha vectorización sea eficiente para mediar la disminución en la expresión de un gen blanco en dicha línea celular.

4.1.5 Ensayos *in vitro* sobre la línea celular MDCK

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con los Dres. Lucila Pescio y Nicolás Favale del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de Esfingolípidos del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB).

4.1.5.1 Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular

A los fines de realizar asimismo ensayos *in vitro* de vehiculización intracelular de dsRNA marcado y eficiencia de silenciamiento génico sobre células epiteliales MDCK, se analizó la citotoxicidad de las formulaciones seleccionadas con los volúmenes a usar para los ensayos de transfección sobre dicha línea celular.

De esta forma, se investigó el efecto de las fórmulas desarrolladas sobre la viabilidad de las células MDCK mediante el ensayo de exclusión del colorante azul tripan y conteo celular mediante cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron como porcentaje de células viables (no coloreadas) respecto de las células totales. Se seleccionaron para este ensayo las formulaciones conteniendo 25mM de fosfatidilcolina, dada la mayor inestabilidad macroscópica que presentaron los sistemas más concentrados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, ninguna de las formulaciones arrojó signos de citotoxicidad en la línea celular ensayada, al no observarse diferencias significativas en comparación con las células control sin tratar (Figura 41).

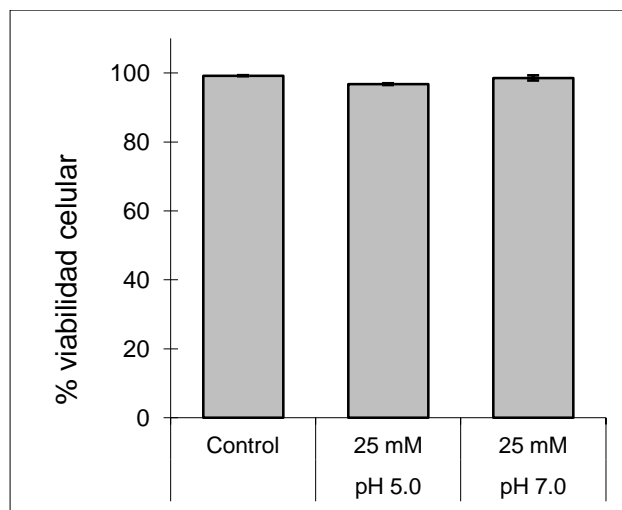


Figura 41: Citotoxicidad de las formulaciones seleccionadas conteniendo 25mM de fosfatidilcolina en células MDCK mediante el ensayo de exclusión de azul tripan. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables (no coloreadas) sobre el total de células contadas. Media \pm SD (n=3). No se observan diferencias significativas (Test ANOVA seguido del test a posteriori de Dunnett para comparaciones múltiples contra control, $p > 0.05$).

Cabe destacar el comportamiento diferencial observado para la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 7.0 en los dos tipos celulares analizados, ya que mientras el tratamiento con la misma en células MDCK no arrojó diferencias respecto de las células sin tratar, se observó un leve efecto proliferativo al trabajar con las células MCF-7 de cáncer de mama (Figura 36). Esto se corresponde con los resultados obtenidos de estudios complementarios que se realizaron sobre los efectos de las formulaciones sobre las vías de transducción de señales involucradas en proliferación y supervivencia celular, para evaluar si los lipoplexos basados en fosfatidilcolina presentaban actividad promitogénica *per sé* sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama (*ver Sección 5. Colaboraciones*).

Considerando que segundos mensajeros derivados de la PC están involucrados en la activación de mediadores de señalización celular que involucran iniciación, progresión y migración celular relacionados con procesos neoplásicos, se analizó la activación de las vías de señalización Akt-mTOR y MEK1/2-ERK1/2 (MAPKs) en dicha línea celular con el objetivo de determinar la utilidad de las diferentes formulaciones como eventuales nanovectores de moléculas de siRNA dirigidas a proteínas sobreexpresadas en dichas patologías. Fueron evaluadas las fórmulas preparadas a pH 5.0 y pH 7.0 en distintas

concentraciones finales en cultivo, observando que las formulaciones de pH 7.0 a determinadas concentraciones indujeron activación de la vía de señalización MEK/ERK 1/2, aumentando la viabilidad celular e induciendo un aumento significativo en la proliferación celular. Estos efectos biológicos se correspondieron además con un aumento en el contenido del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y su localización celular alterada según observaciones mediante inmunofluorescencia. Los efectos descriptos fueron observados específicamente para los lipoplexos formulados a pH 7.0, pero no para los de pH 5.0; se propone que esto podría estar en relación a las diferencias en carga neta y morfología asociadas a las partículas, ya que no se obtuvieron diferencias significativas en tamaño. Considerando entonces que los lipoplexos formulados en pH 5.0 no mostraron efectos biológicos significativos sobre las células de cáncer de mama, se estima que éstos serían los más seguras para administrar agentes antimetabólicos. Estos resultados alertan sobre la importancia y la necesidad de completar el desarrollo farmacéutico con evaluaciones de este tipo para cada una de las formulaciones candidatas que hubieren resultado.

4.1.5.2 Ensayos de internalización celular del siRNA vehiculizado

Así como se realizó con la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, se evaluó la eficiente internalización del siRNA vehiculizado por los lipoplexos en la línea celular MDCK, a través de la observación por microscopía de epifluorescencia de la transfección de siRNA marcado con un fluorocromo verde (AllStarsTM Negative Control siRNA AF® 488).

Se seleccionaron las formulaciones de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0 y 7.0 cargadas con el oligonucleótido a una relación N/P de 1000, dado que a mayores relaciones se observaban efectos citotóxicos y cambios morfológicos importantes sobre las células transfectadas.

Como se observa en las fotografías obtenidas (Fig. 43 y 44), ambos sistemas fueron también capaces de internalizar el oligonucleótido vehiculizado en las células MDCK, el cual ingresó al citoplasma y se ubicó en la zona perinuclear (núcleos azules, por tinción del DNA con el reactivo fluorescente Hoechst). El siRNA marcado con fluorocromo se transfectó en paralelo con el vehículo comercial HiPerFect® (control positivo, Fig. 42).

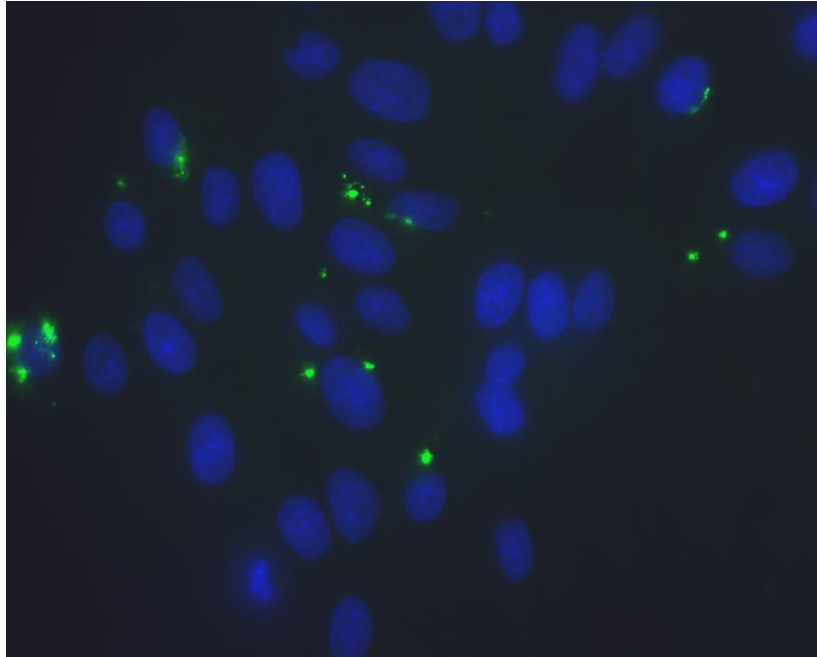


Figura 42: Control positivo para vehiculización de moléculas de siRNA fluorescente en células MDCK, utilizando el reactivo de transfección HiPerFect®. Las zonas perinucleares verdes corresponden a moléculas de siRNA en el citoplasma celular.

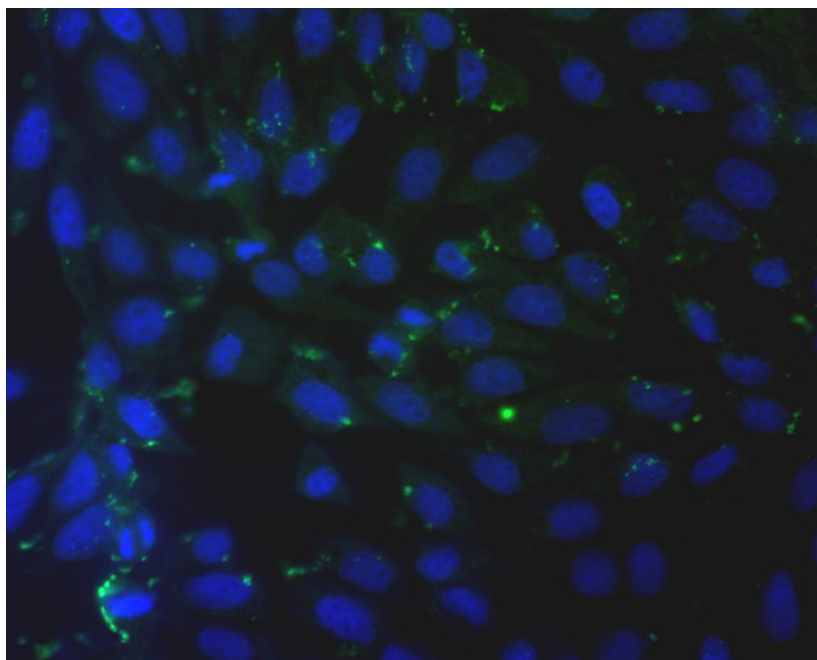


Figura 43: Vehiculización de moléculas de siRNA fluorescente en células MDCK, utilizando la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0. Las zonas perinucleares verdes corresponden a moléculas de siRNA en el citoplasma celular.

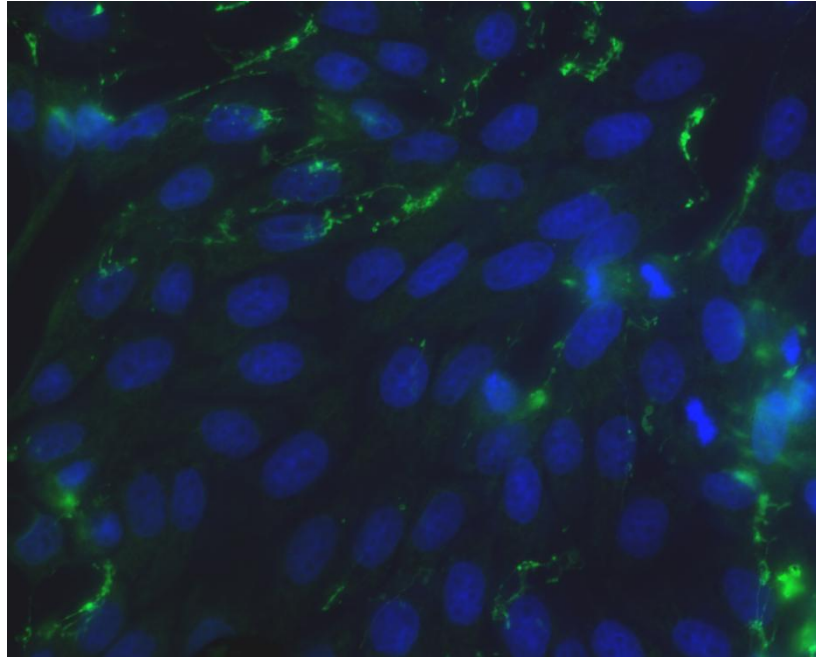


Figura 44: Vehiculización de moléculas de siRNA fluorescente en células MDCK, utilizando la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 7.0. Las zonas perinucleares verdes corresponden a moléculas de siRNA en el citoplasma celular.

4.1.5.3 Evaluación de eficiencia de silenciamiento génico

La eficiencia de silenciamiento génico (“gene knock down”) a partir del siRNA transfectado se investigó a través del silenciamiento de la expresión de la lámina nuclear, red entremezclada de filamentos intermedios de 15 a 80 nm de grosor compuestos por las proteínas láminas A, B y C, situadas en la periferia del nucleoplasma en contacto con la membrana nuclear interna. Se utilizó para ello un siRNA específico para Lámina A/C (Invitrogen, CA, USA). Las proteínas láminas A y C se sintetizan a partir del mismo gen, llamado LMNA, por procesamiento alternativo (Martin et al, 2009). La eficiente actividad del siRNA a través de su efecto de silenciamiento sobre la expresión de Lámina A/C en las células transfectadas fue evaluada mediante observación por epifluorescencia de un anticuerpo secundario conjugado con TRITC (tetrametilrodamina B isotiocianato, marca fluorescente roja) que se une a un anticuerpo primario anti Lámina A/C.

Como se observa en las imágenes obtenidas, tanto el siRNA vehiculizado con el reactivo comercial de transfección HiPerFect® (control positivo, Fig. 45) como el vehiculizado con las formulaciones propuestas (Fig. 46 y 47), tuvieron efecto de

silenciamiento de la expresión de la lámina nuclear. Las imágenes obtenidas fueron capturadas en los tres canales (verde, rojo y azul), permitiendo de esta forma observar tanto los núcleos celulares (azules, marcación por Hoechst) como la eficiencia de transfección de las células tratadas (marca verde, correspondiente al siRNA AF® 488) y la eficiencia de silenciamiento de la expresión de lámina nuclear a través de la atenuación de la marca fluorescente roja sobre varios de los núcleos en los campos evaluados.

Si bien se muestran imágenes representativas de la totalidad evaluada, el análisis de una cantidad considerable de campos al microscopio de fluorescencia da indicios de que los lipoplexos diseñados serían prometedores como vehículos de siRNA en esta línea celular.

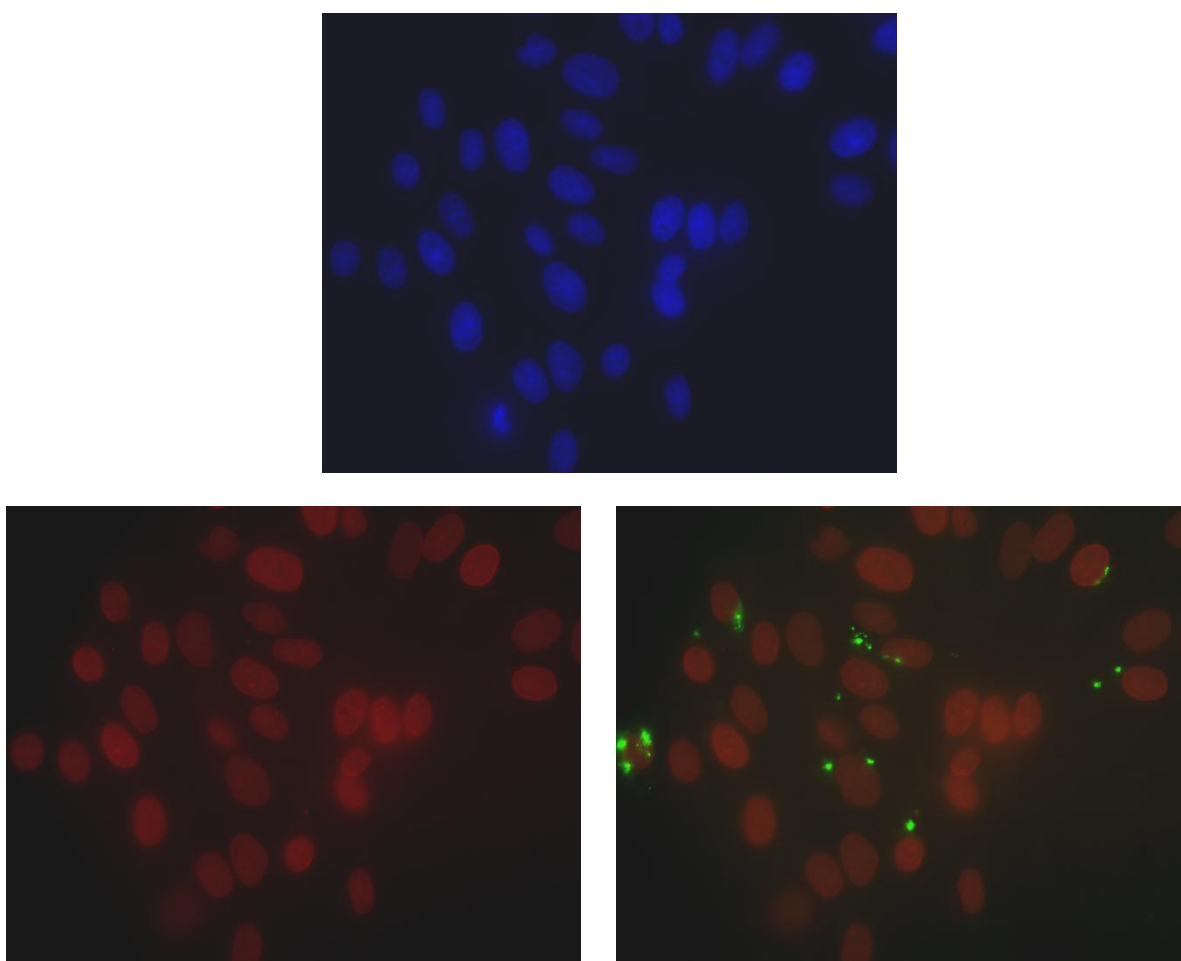


Figura 45: Microscopía de epifluorescencia de las células MDCK transfectadas utilizando el reactivo comercial HiPerFect® (control positivo). Las imágenes fueron capturadas en los tres canales (verde, rojo y azul) para el mismo campo, observando los núcleos celulares en el cuadro superior (marca azul, Hoechst), la marcación de la lámina nuclear en el cuadro inferior izquierdo (marca roja, anticuerpo anti lámina A/C) y la marca correspondiente a la co-transfección con el siRNA AF® 488 en el cuadro inferior derecho (marca verde).

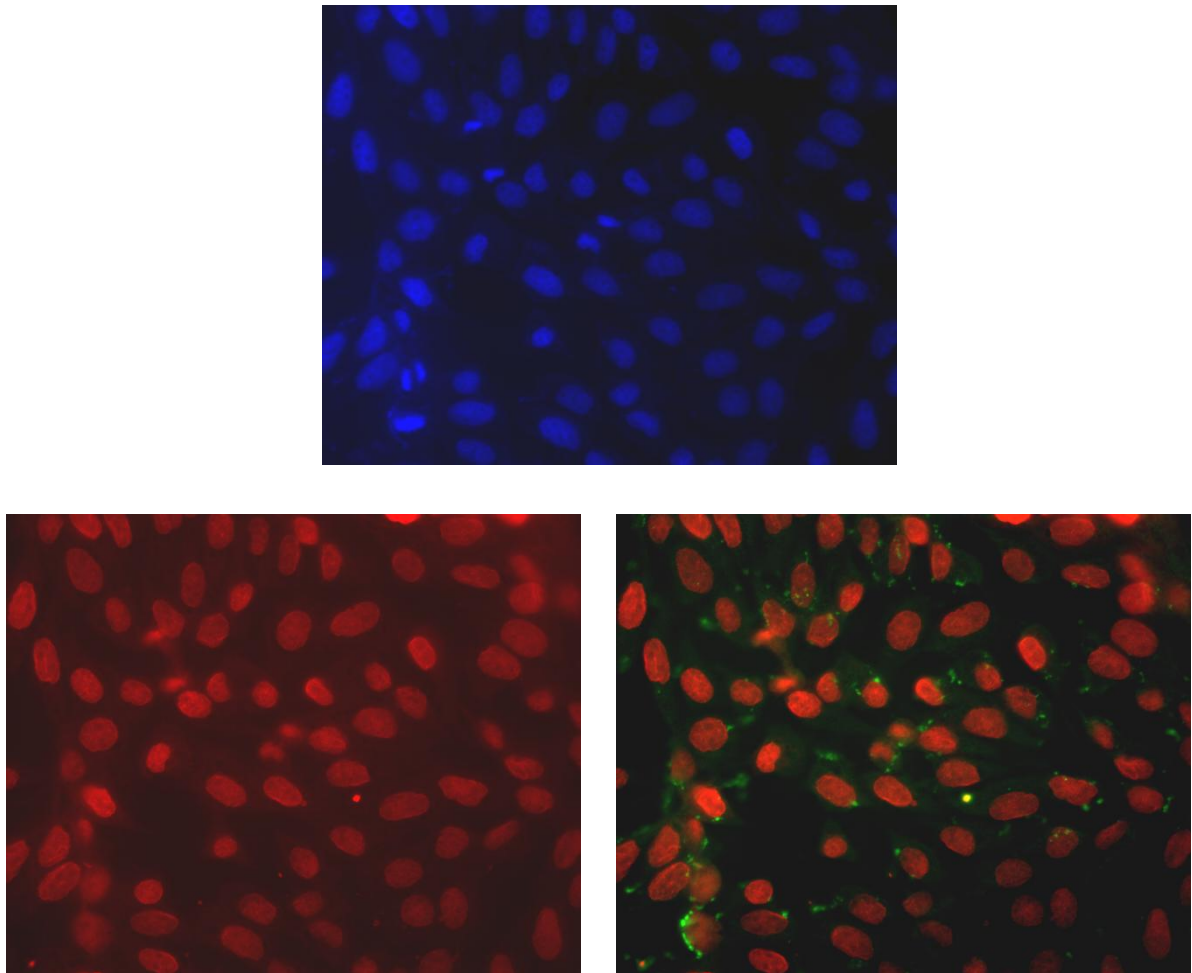


Figura 46: Microscopía de epifluorescencia de las células MDCK transfectadas utilizando la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 5.0. Las imágenes fueron capturadas en los tres canales (verde, rojo y azul) para el mismo campo, observando los núcleos celulares en el cuadro superior (marca azul, Hoechst), la marcación de la lámina nuclear en el cuadro inferior izquierdo (marca roja, anticuerpo anti lámina A/C) y la marca correspondiente a la co-transfección con el siRNA AF® 488 en el cuadro inferior derecho (marca verde).

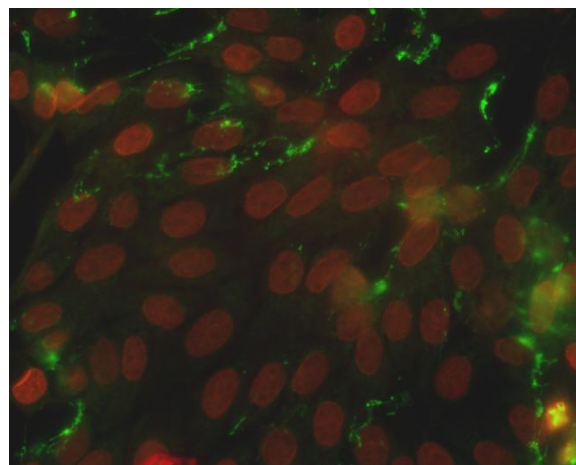
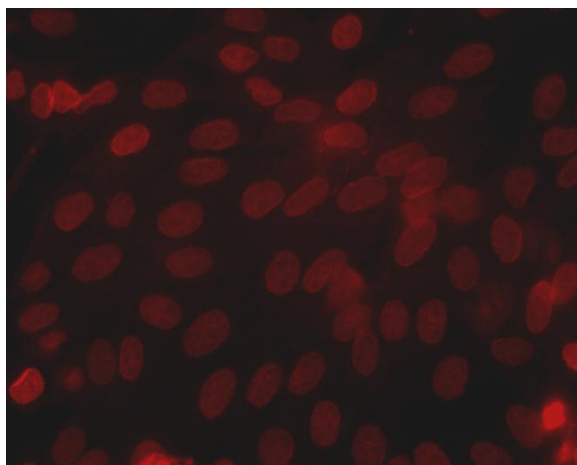
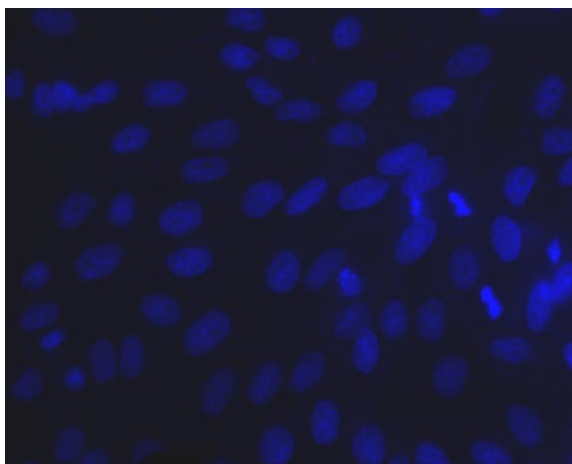


Figura 47: Microscopía de epifluorescencia de las células MDCK transfectadas utilizando la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 7.0. Las imágenes fueron capturadas en los tres canales (verde, rojo y azul) para el mismo campo, observando los núcleos celulares en el cuadro superior (marca azul, Hoechst), la marcación de la lámina nuclear en el cuadro inferior izquierdo (marca roja, anticuerpo anti lámina A/C) y la marca correspondiente a la co-transfección con el siRNA AF® 488 en el cuadro inferior derecho (marca verde).

4.1.6 Estabilidad de las formulaciones

Las formulaciones fueron conservadas en viales de vidrio color ambar, sellados y almacenados al abrigo de la luz por 30 días. Luego del período de almacenamiento, el tamaño de partícula fue determinado por dispersión láser dinámica (Fig. 48).

Las formulaciones resultaron ser inestables luego del período de almacenamiento evaluado, observando agregación y presencia de poblaciones de elevado tamaño medio (Fig. 49). De hecho, se observó importante sedimentación ya a partir del quinto día de almacenamiento, aunque con rápida redispersión y reconstitución macroscópica mediante breve agitación suave.

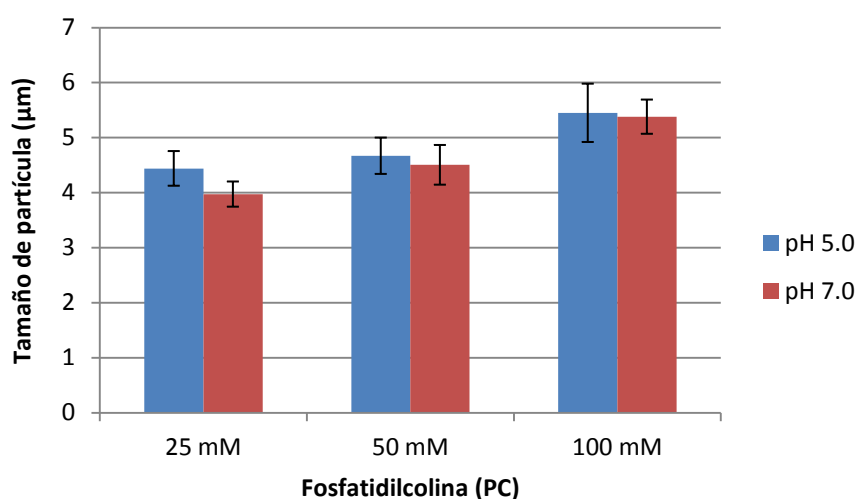


Figura 48: Tamaño de partícula luego de almacenamiento por 30 días. Media \pm S.D. (n=3).

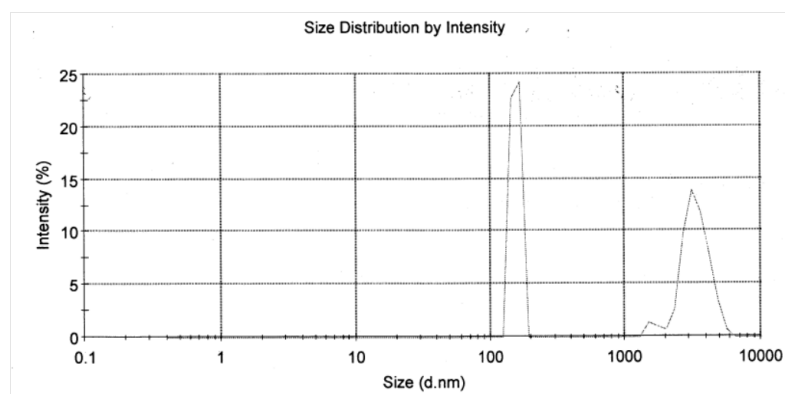


Figura 49: Ejemplo de determinación individual de distribución de tamaño medio de partícula, obtenido para la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 7.0.

Estos resultados confirmarían las observaciones que se realizaron durante el manejo de las formulaciones a lo largo del trabajo experimental; como consecuencia de esta visible inestabilización física, no se reevaluaron los demás parámetros fisicoquímicos de la formulación. Es por ello que estos sistemas no reunirían las condiciones de estabilidad mínimas necesarias como para poder ser propuestos a una escala de desarrollo/evaluación posterior, planteando así la necesidad de una optimización de las fórmulas que indefectiblemente comprendería un cambio cualitativo de su composición; para modificar de esta manera la modalidad de autoensamble característica de la molécula de fosfatidilcolina.

4.2 Lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares (LP-PC/SB)

4.2.1 Elaboración y selección inicial de las formulaciones

Se prepararon mezclas de fosfatidilcolina de soja (PC) y colato de sodio (SC) ó desoxicolato de sodio (SDC) en las siguientes relaciones molares de fosfatidilcolina : sal biliar: 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 (Tabla 7). La concentración total en todos los casos fue de 2% p/v.

Este abanico de composiciones se propone en base a los inconvenientes mencionados anteriormente con los LP-PC. Las mezclas binarias de sales biliares y fosfatidilcolina han sido muy estudiadas en las últimas décadas, como se mencionó en la Introducción. De allí queda evidenciado que la presencia de la sal biliar modifica la modalidad característica de la fosfatidilcolina en el autoensamble; pero al ser las sales biliares compuestos endógenos también, su inclusión en las composiciones podría mejorar las propiedades tanto físicas como biológicas de los LP-PC sobre todo si se presentan composiciones alternativas conocidas y se realiza una detallada caracterización biofísica basándose en la abundante bibliografía al respecto. Así, las relaciones molares fueron seleccionadas en base a la capacidad máxima de solubilización de la fosfatidilcolina por la sal biliar según reportes previos (Hammad & Müller, 1998; Dürr et al, 1994; Smidt et al, 1994) y conservando la concentración final de 2% p/v usada para los LP-PC seleccionados.

Se utilizaron como diferentes medios de dispersión: agua desionizada, solución reguladora isotónica de fosfato monoácido/diácido de sodio 67mM pH 7.4 y solución reguladora isotónica de acetato de sodio/acido acético 50mM pH 5.0. Las soluciones reguladoras fueron isotonizadas mediante el agregado de cantidades suficientes de cloruro de sodio de acuerdo a los métodos de Sörensen y White-Vincent. Las dispersiones obtenidas fueron procesadas mediante homogeneización mecánica de altas revoluciones y sonda homogeneizadora ultrasónica, a fin de obtener las formulaciones nanoparticuladas finales.

#	Fosfatidilcolina (PC)	Colato de sodio (SC)	Desoxicolato de sodio (SDC)	Medio
1	17 mM	17 mM	---	Agua
2				Buffer pH 5.0
3				Buffer pH 7.4
4	12.5 mM	25 mM	---	Agua
5				Buffer pH 5.0
6				Buffer pH 7.4
7	8 mM	32 mM	---	Agua
8				Buffer pH 5.0
9				Buffer pH 7.4
10	5 mM	40 mM	---	Agua
11				Buffer pH 5.0
12				Buffer pH 7.4
13	17 mM	---	17 mM	Agua
14				Buffer pH 5.0
15				Buffer pH 7.4
16	12.5 mM	---	25 mM	Agua
17				Buffer pH 5.0
18				Buffer pH 7.4
19	8 mM	---	32 mM	Agua
20				Buffer pH 5.0
21				Buffer pH 7.4
22	5 mM	---	40 mM	Agua
23				Buffer pH 5.0
24				Buffer pH 7.4

Tabla 7: Composición de las distintas formulaciones de LP-PC/SB.

Es de esperar que en estos sistemas la sal biliar escogida sea el excipiente que aporte mayor toxicidad a la fórmula, dado que la fosfatidilcolina se reconoce como segura y no tóxica (listada como GRAS - excipiente reconocido generalmente como seguro, del inglés “Generally recognized as safe” – por la FDA) y además su citotoxicidad fue evaluada en primera instancia en los LP-PC formulados a concentraciones aún mayores que las presentes en estos sistemas; no obstante, las concentraciones de ambos componentes y el tipo de sal biliar utilizada resultan críticas para la morfología y propiedades fisicoquímicas finales adoptadas por los sistemas diseñados, por lo que se consideró necesario evaluar la citotoxicidad de cada fórmula y no de los excipientes por separado.

Es así que se realizó una selección preliminar de las fórmulas desarrolladas mediante ensayos de citotoxicidad sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, con la cual se realizarían los primeros ensayos *in vitro* para determinar la eficacia de las formulaciones en cuanto a su capacidad de vehiculización del siRNA al citoplasma celular y eficiencia de silenciamiento génico.

El porcentaje de viabilidad celular luego del tratamiento de las células con las distintas formulaciones fue estimado mediante medición espectrofotométrica a 490 nm del grado de bio-reducción obtenido de la sal de tetrazolio MTS al producto coloreado formazán por las células viables. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de las células control sin tratar.

En la Figura 50 se observa que todas las fórmulas conteniendo fosfatidilcolina y desoxicolato de sodio (PC:SDC) resultaron marcadamente citotóxicas, sin importar concentraciones relativas de los excipientes ni el medio de formulación. En cuanto a las fórmulas conteniendo fosfatidilcolina y colato de sodio (PC:SC), sólo presentaron cierto grado de citotoxicidad aquellas conteniendo mayor proporción de SC – relaciones 1:4 y 1:8 – formuladas a pH 5.0.

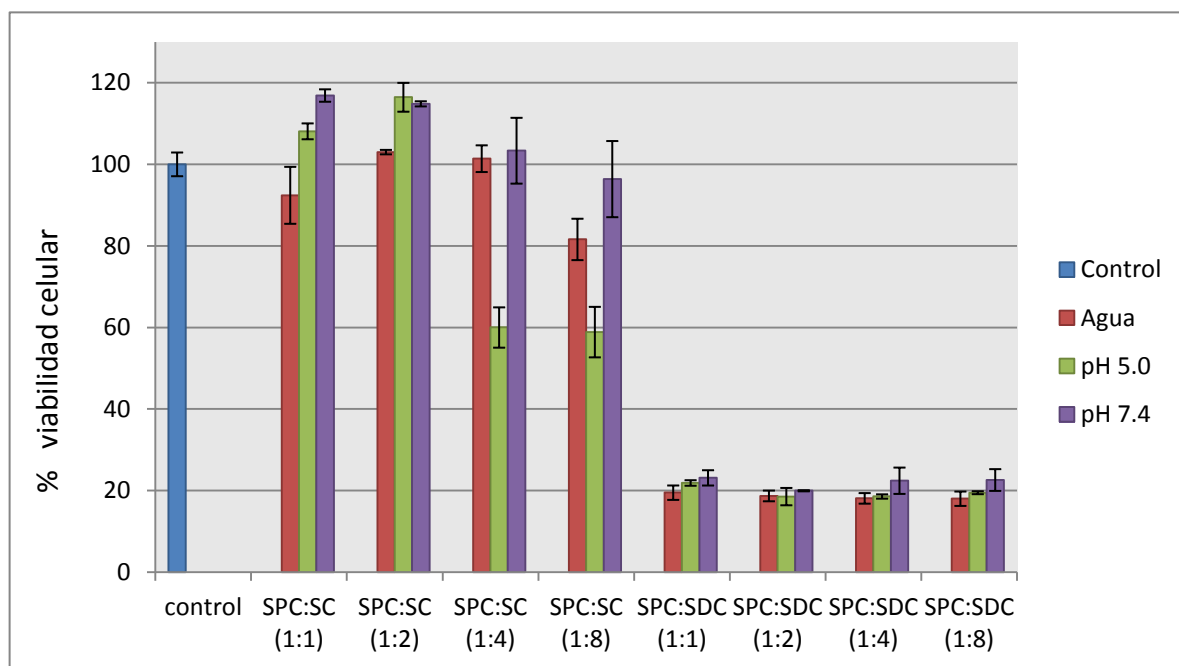


Figura 50: Citotoxicidad en células MCF-7 de los sistemas formulados en distintos medios conteniendo diferentes relaciones molares de fosfatidilcolina (PC) y colato de sodio (SC) o desoxicolato de sodio (SDC). Los resultados se expresan como porcentaje de células viables respecto de las células control sin tratar. Media \pm SD (n=3).

De acuerdo a estos resultados, que se corresponden con la mayor actividad membranólítica del SDC en comparación con el SC, tanto en células neoplásicas como normales, se decidió descartar las formulaciones de PC:SDC como posibles sistemas de vehiculización de siRNA y continuar el estudio del resto de las fórmulas desarrolladas. De estas fórmulas se realizó luego una caracterización fisicoquímica para el estudio de su microestructura, además de la evaluación de su capacidad de unión/carga de siRNA, capacidad de captación/internalización celular y ulterior eficiencia de silenciamiento génico.

4.2.2 Determinación de tamaño de partícula y carga superficial

Se realizaron determinaciones de tamaño de las partículas resultantes en las formulaciones seleccionadas mediante ensayos de dispersión láser dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS), a 25°C y un ángulo de dispersión de 173°, utilizando un equipo provisto de láser de 4mW He-Ne (633nm) disponible en el Dpto. de Tecnología Farmacéutica. Las determinaciones se realizaron sobre las formulaciones sin cargar con siRNA y las cargadas con el oligonucleótido a una relación de N/P 2000, a fin de asegurar saturación de carga por parte del sistema según resultados obtenidos en los ensayos de desplazamiento de SYBR Green que se reportan en la sección 4.2.4.

Como se observa en las Tablas 8-9, se obtuvieron partículas en el rango de los 80 – 150 nm para los sistemas PC:SC 1:1 y 1:2 agua, 1:1 y 1:2 pH 5.0, y 1:1 pH 7.4; en los otros casos se obtuvieron partículas en el rango de los 7 – 70 nm. Estos resultados se corresponden a su vez con las diferencias macroscópicas observadas en las formulaciones preparadas, en cuanto a su turbidez y opalescencia comparada, lo que podría inferir a primera instancia la presencia de distintos tipos de sistemas dispersos. Es de destacar que ninguno de los sistemas presentó floculación o sedimentación.

En cuanto al potencial zeta desarrollado, se obtuvieron valores negativos para todas las formulaciones, ya sea sin cargar o cargadas con siRNA. Dichos valores disminuyeron luego de la incubación con el oligonucleótido, para la mayoría de las composiciones estudiadas, de lo que podría inferirse que el siRNA se encuentra localizado al menos en parte hacia la superficie de las nanopartículas obtenidas.

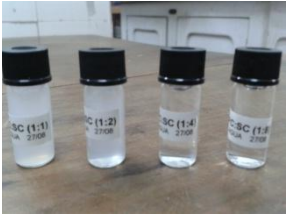

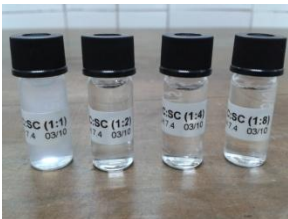
		<i>Partículas sin cargar</i>			
		<i>PC:SC</i>	<i>Tam. Part.</i>	<i>PdI</i>	<i>Pot. Zeta</i>
			<i>(d.nm)</i>		<i>(mV)</i>
	Agua	1:1	135.5 ± 2.0	0.272	-26.1 ± 1.6
		1:2	126.8 ± 1.1	0.380	-30.9 ± 1.5
		1:4	7.9 ± 0.1	0.432	-15.7 ± 4.2
		1:8	6.6 ± 0.2	0.761	-8.1 ± 3.4
	pH 5.0	1:1	128.7 ± 1.9	0.284	-14.9 ± 0.7
		1:2	103.9 ± 3.1	0.691	-15.8 ± 2.0
		1:4	23.7 ± 0.7	0.204	-8.8 ± 8.1
		1:8	56.3 ± 1.5	0.264	-8.7 ± 7.3
	pH 7.4	1:1	122.3 ± 3.4	0.244	-18.3 ± 2.3
		1:2	69.9 ± 3.7	0.424	-22.6 ± 3.6
		1:4	21.9 ± 0.4	0.099	-8.9 ± 3.9
		1:8	44.5 ± 4.5	0.321	-7.0 ± 2.2

Tabla 8: Tamaño de partícula y potencial zeta de las formulaciones de fosfatidilcolina y colato de sodio (PC:SC) a distintas relaciones de componentes sin cargar con siRNA, reportados como Media ± SD (n=4). En la columna izquierda se muestran fotografías de los preparados: PC:SC 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8, de izquierda a derecha.

	PC:SC	Partículas cargadas con siRNA		
		Tam. Part.	PdI	Pot. Zeta
		(d.nm)		(mV)
Agua	1:1	143.2 ± 4.1	0.279	-37.8 ± 1.6
	1:2	142.3 ± 3.7	0.237	-44.4 ± 2.1
	1:4	17.4 ± 5.8	0.481	-23.6 ± 4.5
	1:8	7.2 ± 0.2	0.705	-18.3 ± 0.8
pH 5.0	1:1	104.9 ± 3.1	0.268	-21.3 ± 0.9
	1:2	125.8 ± 1.5	0.135	-22.4 ± 2.7
	1:4	22.7 ± 0.6	0.179	-16.0 ± 0.7
	1:8	20.5 ± 0.5	0.066	-6.4 ± 1.1
pH 7.4	1:1	85.2 ± 3.4	0.231	-27.1 ± 1.8
	1:2	23.1 ± 0.5	0.289	-11.5 ± 1.1
	1:4	21.2 ± 0.9	0.312	-16.3 ± 1.5
	1:8	39.2 ± 1.4	0.242	-18.7 ± 3.7

Tabla 9: Tamaño de partícula y potencial zeta de las formulaciones de fosfatidilcolina y colato de sodio (PC:SC) a distintas relaciones de componentes cargadas con siRNA, reportados como Media ± SD (n=4).

4.2.3 Morfología determinada por TEM y SEM

La morfología de las nanopartículas obtenidas fue estudiada mediante Microscopía de Transmisión Electrónica (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) y Microscopía de Barrido Electrónico (*Scanning Electron Microscopy*, SEM).

Las imágenes presentadas en las Figuras 51-54 se corresponden con los resultados obtenidos previamente por dispersión láser dinámica (DLS), observándose partículas esféricas definidas, cuyo tamaño se reduce al incrementar la proporción molar de colato de sodio en la formulación.

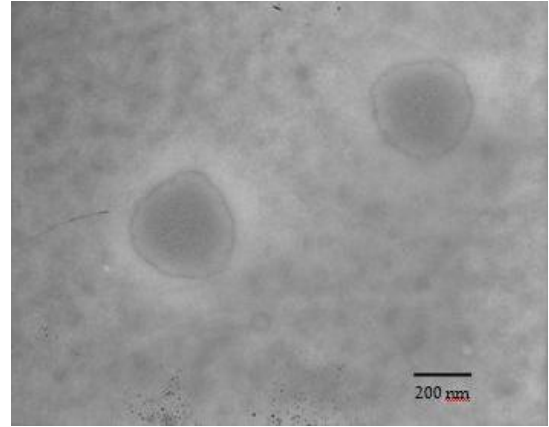
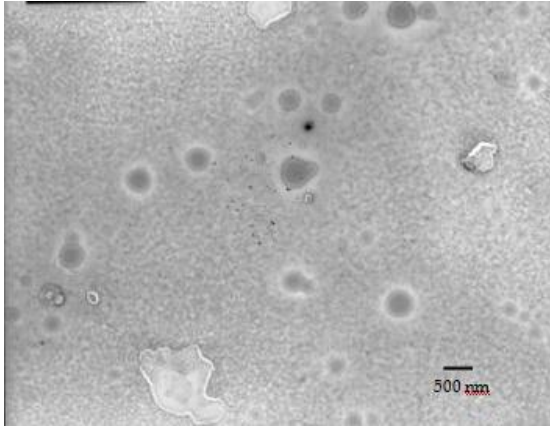


Figura 51: Micrografías de transmisión electrónica (TEM) de las formulaciones pH 5.0 de PC:SC 1:1 cargadas con siRNA.

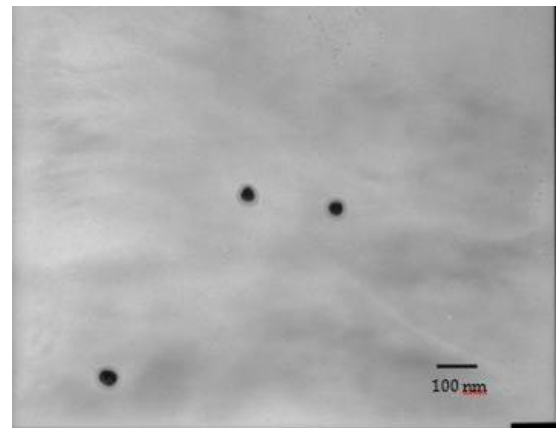
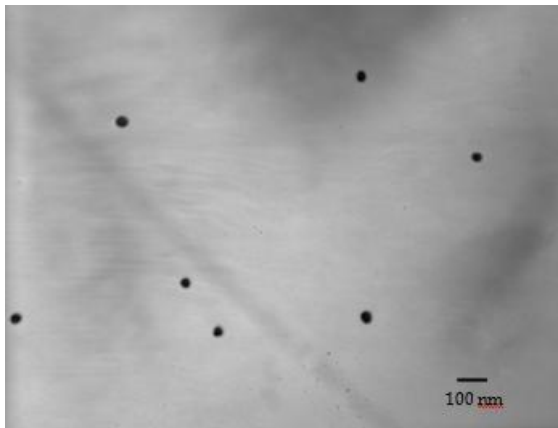


Figura 52: Micrografías de transmisión electrónica (TEM) de las formulaciones pH 5.0 de PC:SC 1:8 cargadas con siRNA.

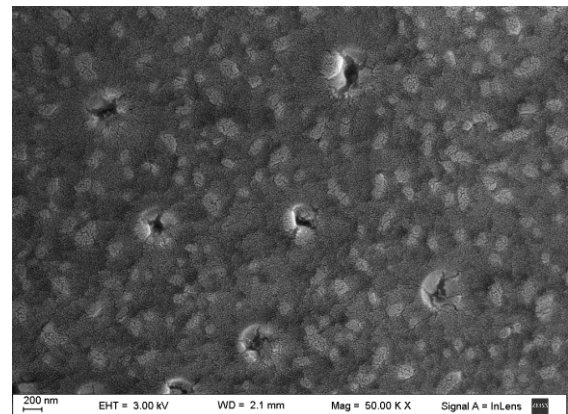
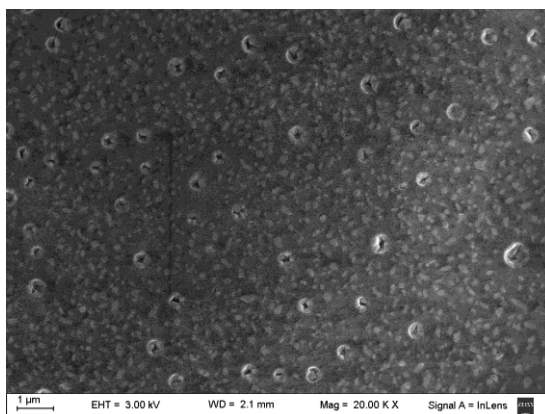


Figura 53: Micrografías de barrido electrónico (SEM) de las formulaciones pH 5.0 de PC:SC 1:1 cargadas con siRNA.

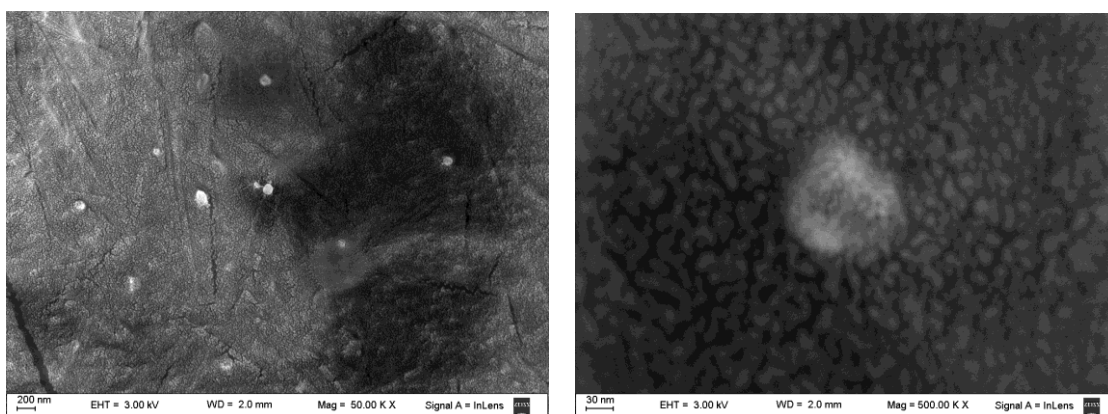


Figura 54: Micrografías de barrido electrónico (SEM) de las formulaciones pH 5.0 de PC:SC 1:8 cargadas con siRNA.

Las micrografías corresponden a los lipoplexos obtenidos a pH 5.0 con relaciones PC:SC 1:1 y 1:8, cargados con siRNA en los N/P utilizados para ensayos *in vitro* sobre las células MCF-7, primeras en evaluación; estas composiciones fueron las seleccionadas, de entre todas las formulaciones, para mostrar sus micrografías porque muestran la menor y la mayor relación entre componentes evaluadas; se consideraron también en esta elección los resultados de eficiencia de transfección sobre dicha línea celular que se comentan más adelante, los que revelan que las formulaciones a pH 5.0 fueron las más versátiles.

Estos ensayos evidenciaron partículas con forma esférica cuyo tamaño disminuye a medida que aumenta la proporción de colato de sodio. La morfología esférica de las partículas fue semejante en todos los casos; sin embargo, como se ejemplifica en las figuras, se pudo apreciar una diferencia en cuanto a la microestructura de las mismas. En el caso de las formulaciones con proporciones iguales de PC:SC, se observó una circunferencia exterior diferenciada del centro, atribuible a una vesícula; mientras que para las formulaciones con relación PC:SC 1:8, se apreció una estructura homogénea, concordante con una forma micelar (Silvander et al., 1996).

4.2.4 Evaluación de eficiencia y capacidad de carga de siRNA

Con el objetivo de estudiar la interacción de las moléculas de siRNA con los lipoplexos elaborados se realizaron una serie de experimentos en los cuales se buscó determinar su eficiencia y capacidad de unión. Para este propósito, las cantidades evaluadas de cada fórmula fueron expresadas durante los ensayos como relaciones N/P (relación entre el número de cargas positivas, amonios cuaternarios de la fosfatidilcolina, y la cantidad de grupos fosfato aniónicos del siRNA).

Como técnica cuantitativa para determinar la capacidad de unión de siRNA por las fórmulas, se realizaron ensayos de desplazamiento por fluorescencia con el reactivo comercial SYBR Green I®, de alta sensibilidad y específico para dsDNA y dsRNA.

El ensayo se basa en el desplazamiento de la unión del SYBR Green al siRNA al ir agregando cantidades crecientes del vehículo diseñado. La reducción en la fluorescencia emitida al disociarse el SYBR Green del ácido nucleico es cuantificada en un espectrofluorómetro, observándose valores luego de los cuales el agregado de mayores cantidades de vehículo (es decir, alcanzando superiores relaciones N/P) no implican una mayor pérdida de señal fluorescente; este punto marca el máximo desplazamiento alcanzado del SYBR Green y la asociación máxima del siRNA al vehículo en el sistema propuesto.

10 pmoles de siRNA (0.5 µL) se mezclaron con 150 µL de solución de SYBR Green en una placa transparente de 96 pocillos, y cantidades crecientes de formulación fueron agregadas en alícuotas sucesivas de 5 µL alcanzando los distintos valores de N/P hasta un total de 50 µL (Tabla 10). Luego de cada agregado, las muestras fueron incubadas antes de la lectura de fluorescencia y a cada medición se le descontó el valor de fluorescencia intrínseca del SYBR Green (blanco). Luego, para cada valor de fluorescencia remanente tras el agregado de las fórmulas a los distintos N/P se calculó el porcentaje de fluorescencia respecto del control (100%), dado por la interacción entre el siRNA y el SYBR Green en ausencia de las fórmulas.

<i>Relaciones N/P obtenidas</i>				
<i>μL agregados</i>	<i>PC:SC 1:1</i>	<i>PC:SC 1:2</i>	<i>PC:SC 1:4</i>	<i>PC:SC 1:8</i>
5	182	133	87	55
10	364	267	174	110
15	545	400	261	164
20	727	533	348	219
25	909	667	435	274
30	1091	800	522	329
35	1273	933	609	384
40	1455	1067	696	438
45	1636	1200	783	493
50	1818	1333	870	548

Tabla 10: Cálculo de la relación N/P obtenida con cada alícuota de formulación agregada a la mezcla siRNA - SYBR Green.

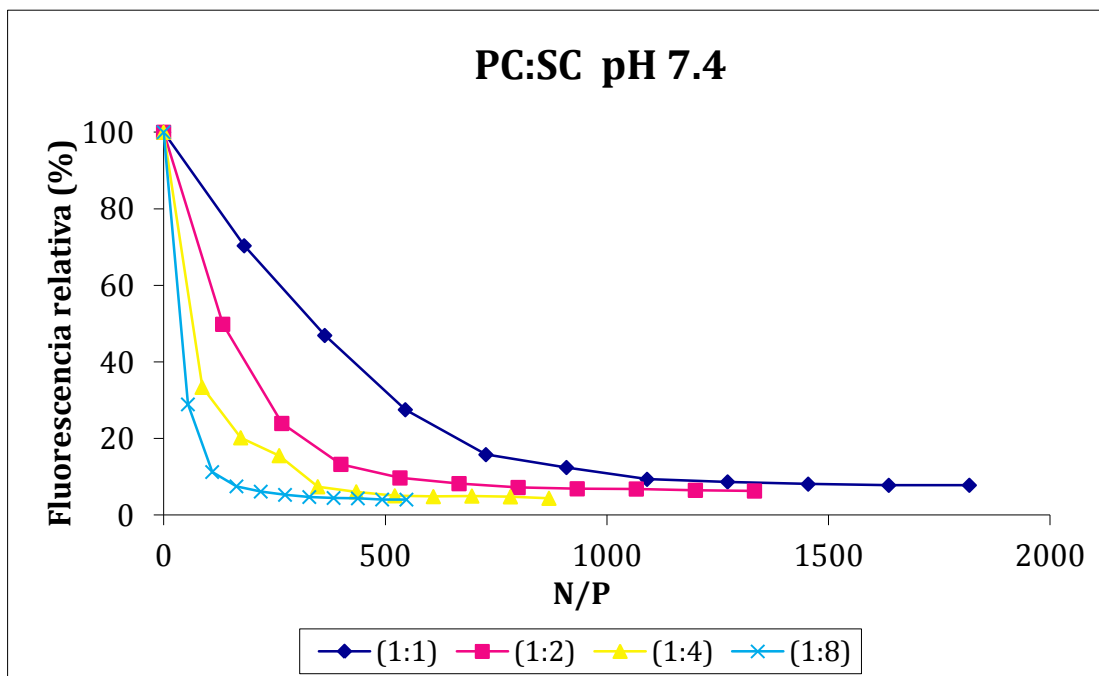


Figura 55: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de siRNA por los lipoplexos formulados a pH 7.4.

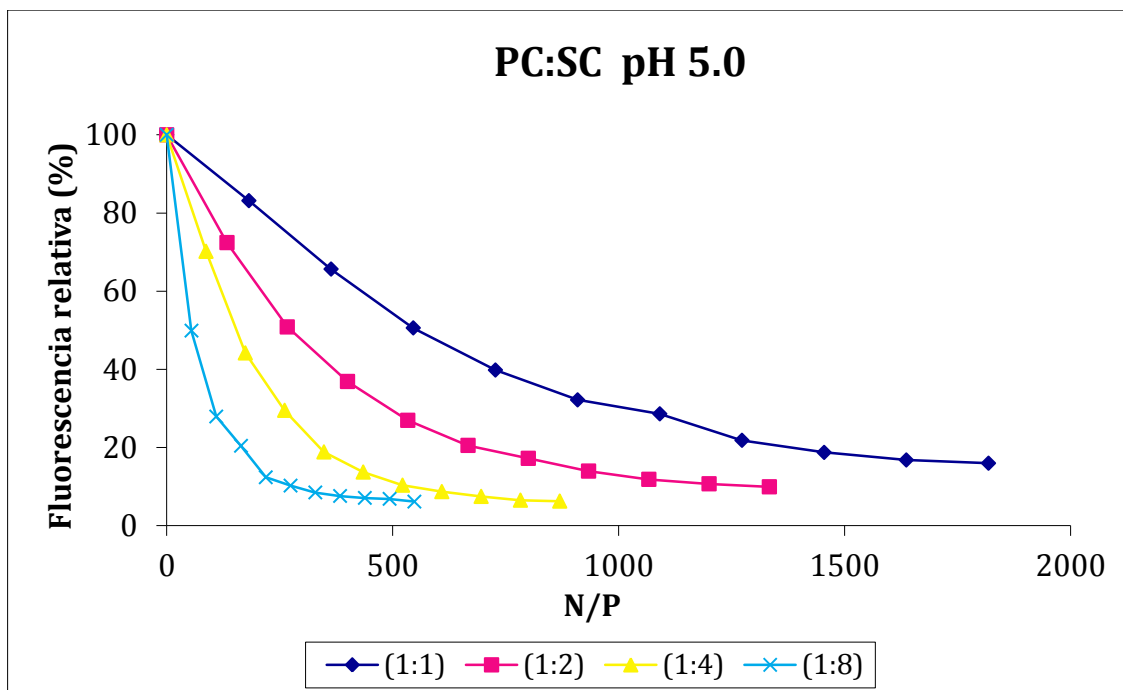


Figura 56: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de siRNA por los lipoplexos formulados a pH 5.0.

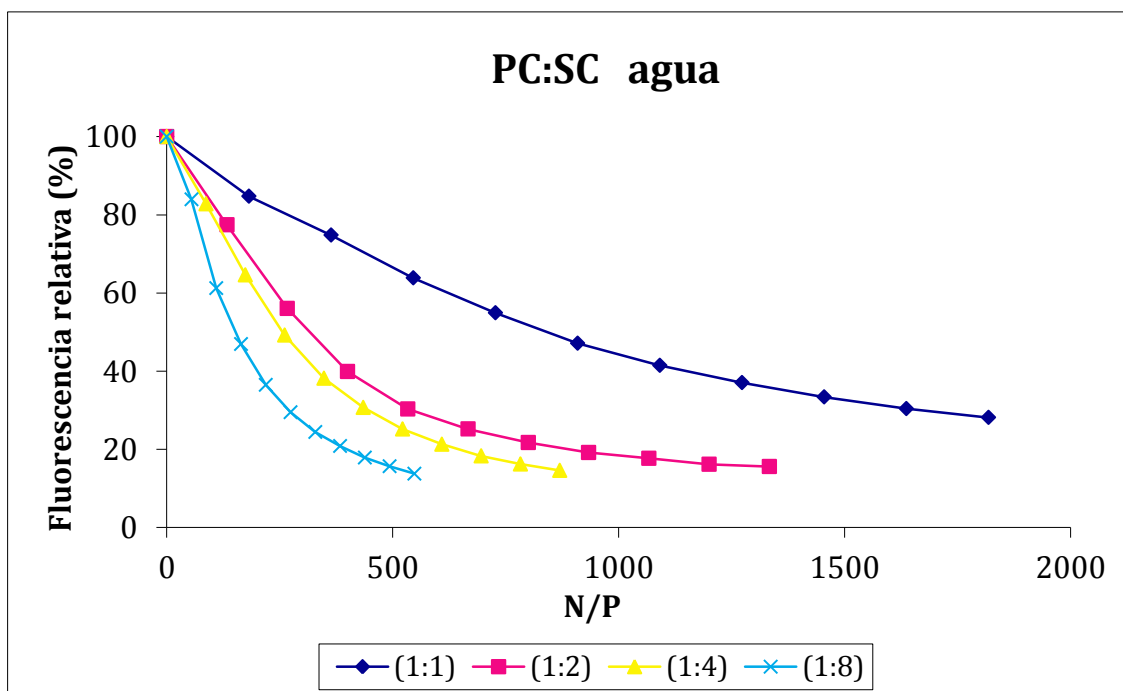


Figura 57: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de siRNA por los lipoplexos formulados en agua.

Los resultados indican una importante unión o carga de siRNA por parte de los vehículos diseñados. Dicha afinidad se incrementa a medida que aumenta el contenido relativo de colato de sodio (SC) en cada formulación, lo que se evidencia por una disminución cada vez más pronunciada de la fluorescencia emitida al ser desplazado el SYBR Green de su unión al oligonucleótido. Es decir, se observa que para una misma relación N/P alcanzada, la asociación del siRNA al vehículo es mayor para los sistemas con mayor contenido relativo de SC (Fig. 55-57).

A continuación se presentan los resultados agrupados de acuerdo a las distintas relaciones PC:SC formuladas, donde se pone en evidencia a su vez que para una misma relación PC:SC la afinidad de unión al siRNA es mayor para los sistemas pH 7.4 que para los formulados a pH 5.0, y ambas son mayores que la afinidad obtenida por los sistemas formulados en agua desionizada (Fig. 58-61).

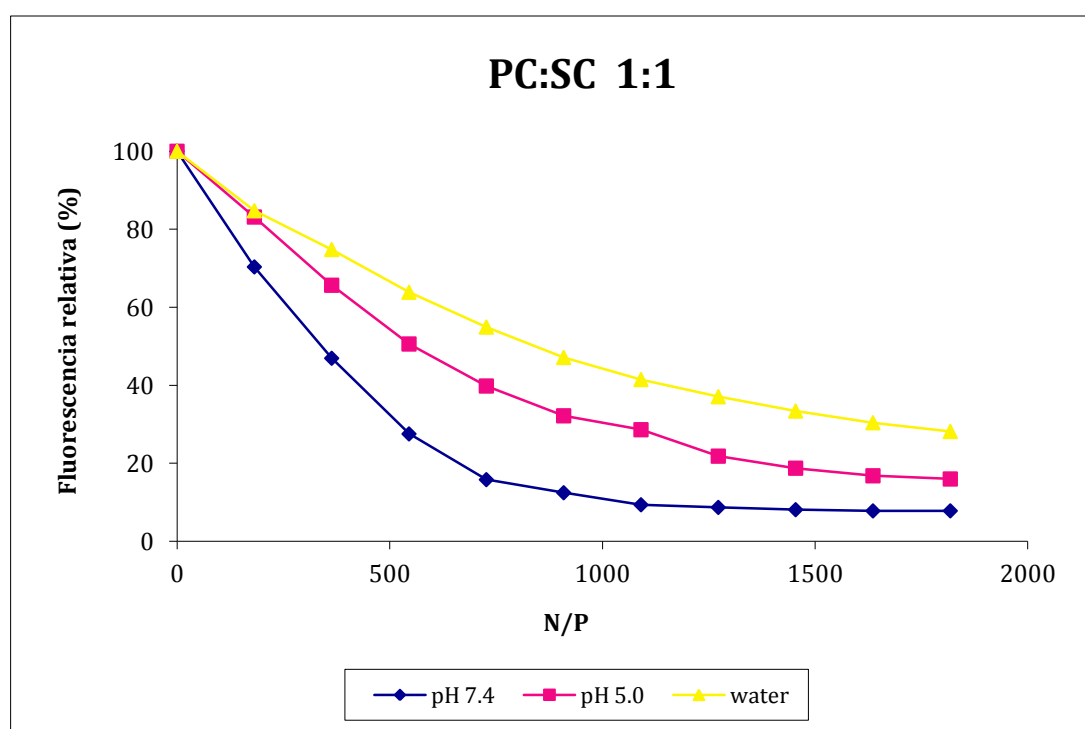


Figura 58: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de siRNA por los distintos lipoplexos formulados en relación PC:SC 1:1.

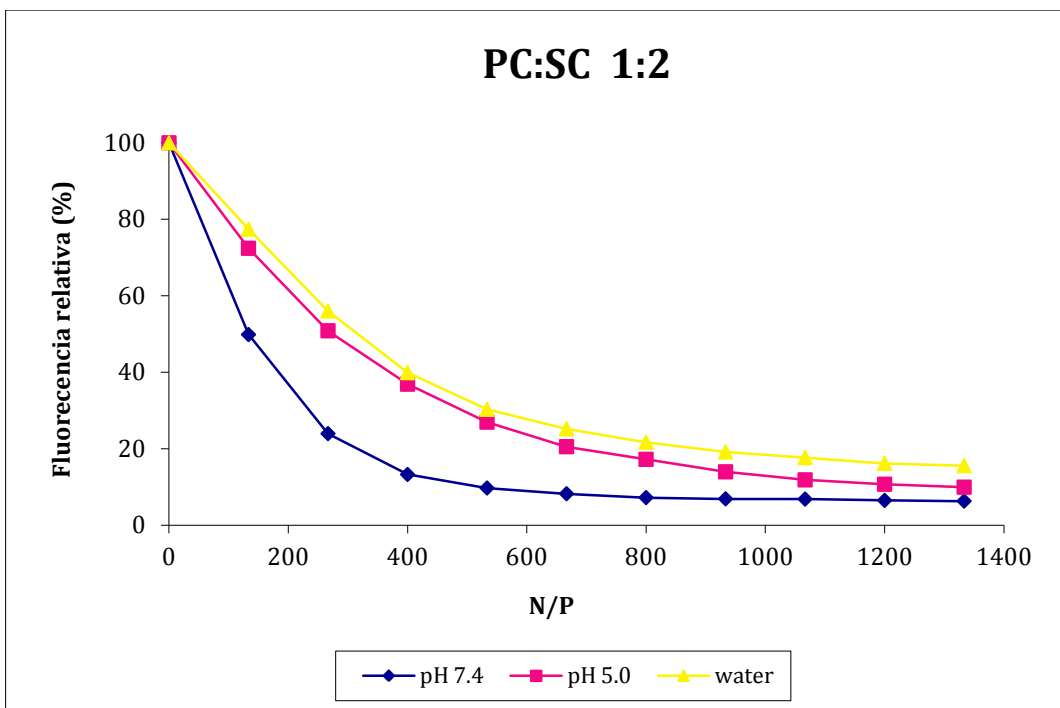


Figura 59: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de siRNA por los distintos lipplexos formulados en relación PC:SC 1:2.

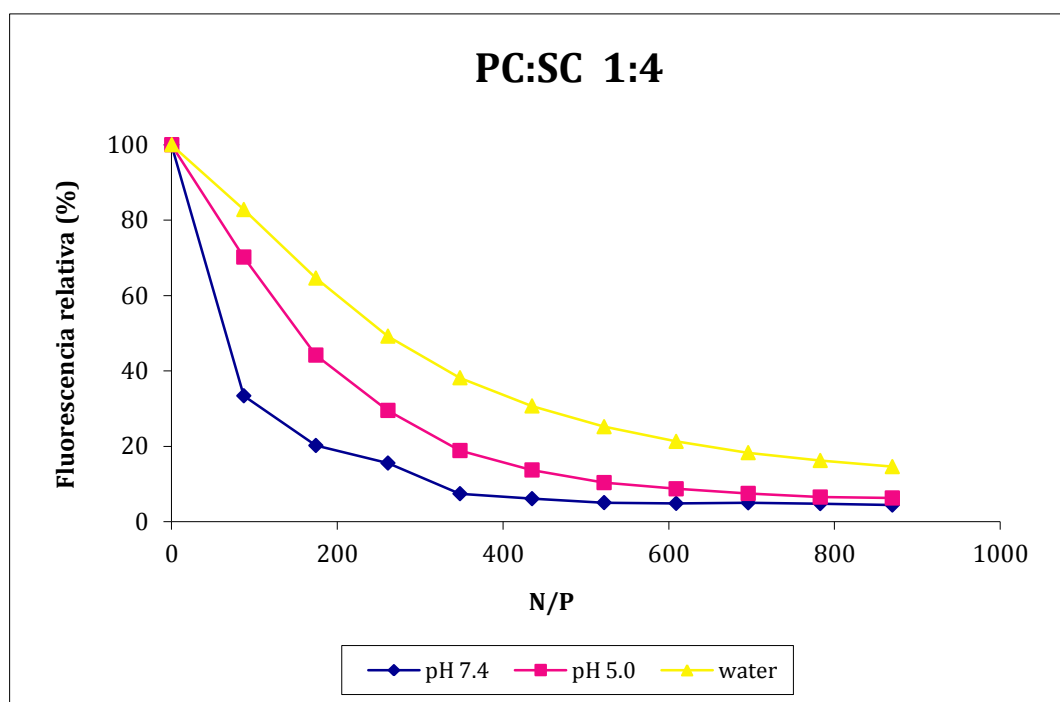


Figura 60: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de siRNA por los distintos lipplexos formulados en relación PC:SC 1:4.

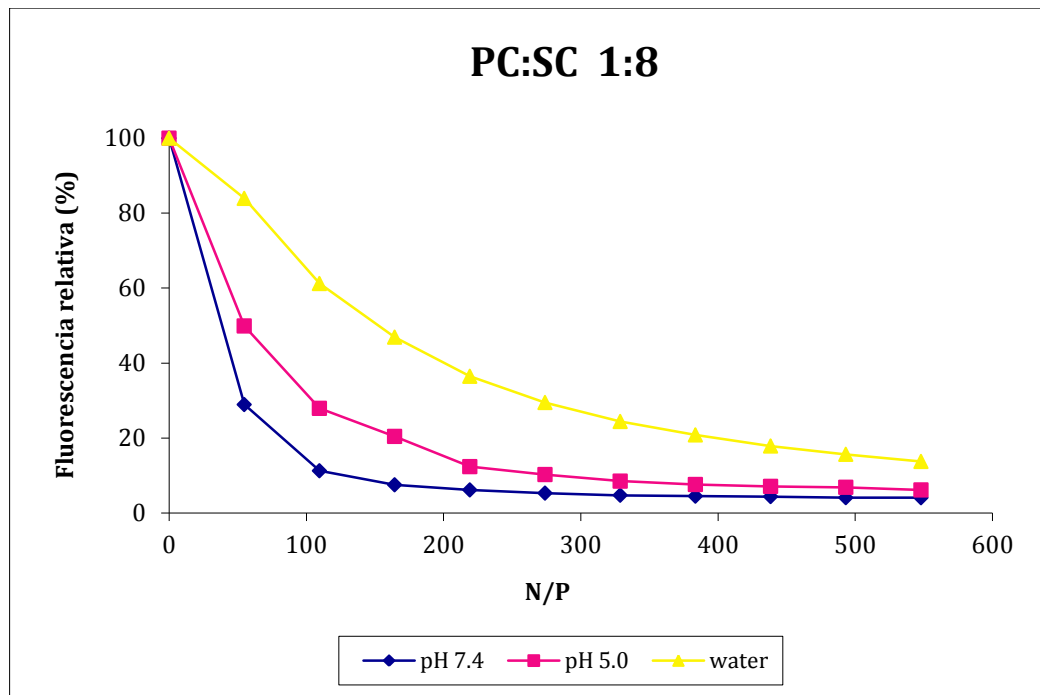


Figura 61: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de siRNA por los distintos lipoplexos formulados en relación PC:SC 1:8.

4.2.5 Ensayos *in vitro* sobre la línea celular MCF-7

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con las Dras. González y Gándola del Laboratorio de transducción de señales de hormonas peptídicas del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB).

4.2.5.1 Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular

A los fines de seleccionar las condiciones más apropiadas para los ensayos *in vitro* de vehiculización intracelular de dsRNA marcado y eficiencia de silenciamiento génico, se debe considerar la correlación entre citotoxicidad y capacidad de carga de siRNA de cada una de las formulaciones. Es por ello que se analizó la citotoxicidad de las formulaciones seleccionadas en el rango de concentraciones a usar para los ensayos de transfección sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

Considerando la menor capacidad de carga de siRNA presentada por los sistemas PC:SC 1:1, los mismos fueron descartados para los siguientes ensayos *in vitro*; en tanto que los sistemas PC:SC 1:2, 1:4 y 1:8 fueron analizados en cuanto a su toxicidad en diferentes concentraciones:

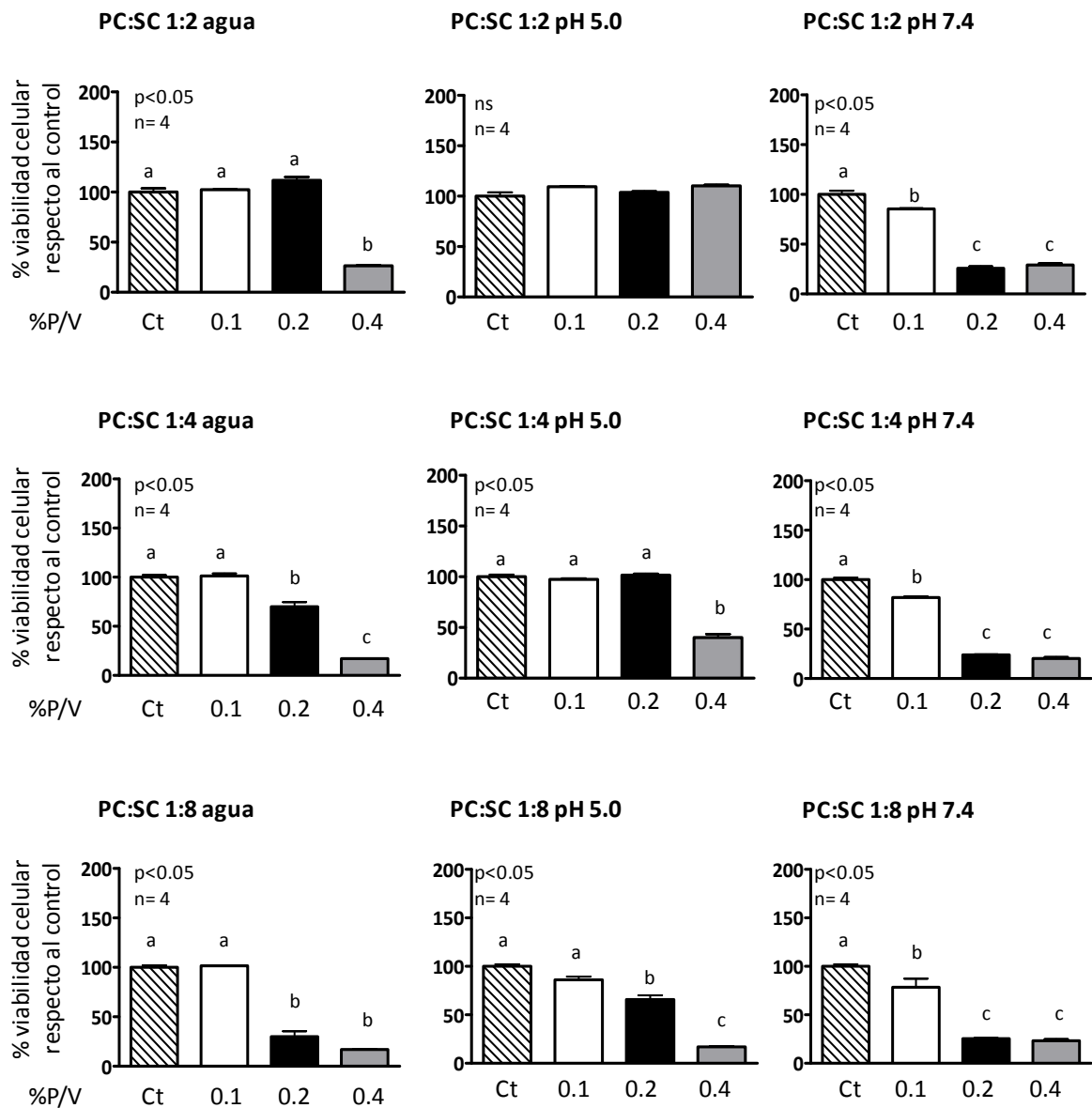


Figura 62: Citotoxicidad mediante ensayo MTS en células MCF-7 de los vehículos PC:SC 1:2, 1:4 y 1:8 formulados en distintos medios, a diferentes concentraciones finales a utilizar para transfección. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables respecto de las células control sin tratar (Ct). Media \pm SD (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas, $p < 0.05$ (Newman-Keuls). Publicado en Pérez, Gándola et al., 2015.

Como se observa en la Figura 62, la citotoxicidad de los sistemas aumenta a medida que la proporción de colato en la formulación es mayor; como consecuencia, las fórmulas PC:SC 1:8 resultaron ser las más tóxicas. Estos resultados concuerdan con reportes previos que demostraron que la fosfatidilcolina atenúa los efectos citotóxicos de los ácidos cólicos (Tan et al, 2013). En cuanto al medio, los sistemas formulados a pH 5.0 resultaron los menos citotóxicos.

Dado que para un N/P 500 la concentración de lipoplexos 1:2 a utilizar es 0.07%, los ensayos demostraron que los lipoplexos 1:2 no son citotóxicos para ninguno de los medios ensayados. Considerando la baja citotoxicidad y alta capacidad de unión de las mismas en los tres medios, se usaron las tres formulaciones en un N/P 500 para los ensayos de transfección.

Por otro lado, dado que para N/P 500 la concentración de lipoplexos 1:4 a utilizar es 0.11%, los ensayos demostraron que los mismos no presentan citotoxicidad apreciable en las formulaciones en agua y pH 5.0 pero sí resultan levemente citotóxicos en las formulaciones a pH 7.4. Considerando la baja citotoxicidad y considerable capacidad de unión de siRNA de los lipoplexos 1:4 en agua y pH 5.0, se los utilizó para ensayos de transfección de dsRNA fluorescente. En cuanto a las formulaciones 1:4 a pH 7.4, si bien muestran algo de citotoxicidad también demostraron una alta capacidad de unión, por lo que se las utilizó en ensayos de transfección a N/P 200.

Dada la importante citotoxicidad observada, se decidió descartar las formulaciones con relación PC:SC 1:8, ya que por otro lado si bien presentaron buena capacidad de unión de siRNA, ésta fue similar a la obtenida con las formulacones de relación 1:4.

Considerando los resultados obtenidos de citotoxicidad y su correlación con la eficiencia de carga de siRNA, se seleccionaron los sistemas PC:SC 1:2 y 1:4 para continuar con los ensayos *in vitro* de vehiculización intracelular de dsRNA fluorescente y eficiencia de silenciamiento génico mediado por siRNA sobre la línea celular MCF-7.

4.2.5.2 Ensayos de internalización celular del siRNA vehiculizado

La eficiente internalización del siRNA vehiculizado en las células MCF-7 se evaluó a través de la observación por microscopía de epifluorescencia de la transfección de dos tipos de dsRNA marcados con fluorocromo (BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo y Fluorescein-labeled dsRNA BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo). El dsRNA marcado con fluorocromo se transfectó en paralelo con el vehículo comercial Lipofectamina® (control positivo). Mientras que la internalización no mediada por los vehículos se evaluó incubando las células con el dsRNA marcado desnudo únicamente (control negativo). (Fig. 63 y 64)

Para las células incubadas con el dsRNA marcado rojo (Alexa), una vez finalizada la transfección, se realizó la tinción de los núcleos con el reactivo de Hoescht (azul), ya que esto facilita analizar la distribución intracelular del oligonucleótido; mientras que en los ensayos en los que se empleó el dsRNA marcado verde (fluoresceína), no se realizó la incubación con Hoescht para evitar la interferencia de ambos fluoróforos dada por su similar localización intracelular.

Como se observa en las fotografías obtenidas, ambos dsRNA marcados fueron internalizados por una proporción significativa de células, ya sea al ser transfectados con Lipofetamina® (control positivo) o con los vehículos propuestos; en contraste, el dsRNA marcado desnudo (control negativo) no fue detectado dentro de las células ni en el medio extracelular, sugiriendo su degradación o remoción durante el lavado de las células luego del período de incubación.

Tanto el dsRNA fluorescente marcado con Alexa (rojo), Fig. 63, y el dsRNA fluorescente marcado con fluoresceína (verde), Fig. 64, ingresaron al citoplasma celular y se ubicaron en la zona perinuclear, al igual que se había observado previamente para las formulaciones de lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC) seleccionados.

Si bien los ensayos de internalización celular de oligonucleótidos marcados con fluorocromo no constituyen una técnica cuantitativa precisa para comparar eficiencia entre distintas formulaciones, dichas pruebas permitieron confirmar la habilidad de los vehículos diseñados para vehiculizar los oligonucleótidos al interior de las células.

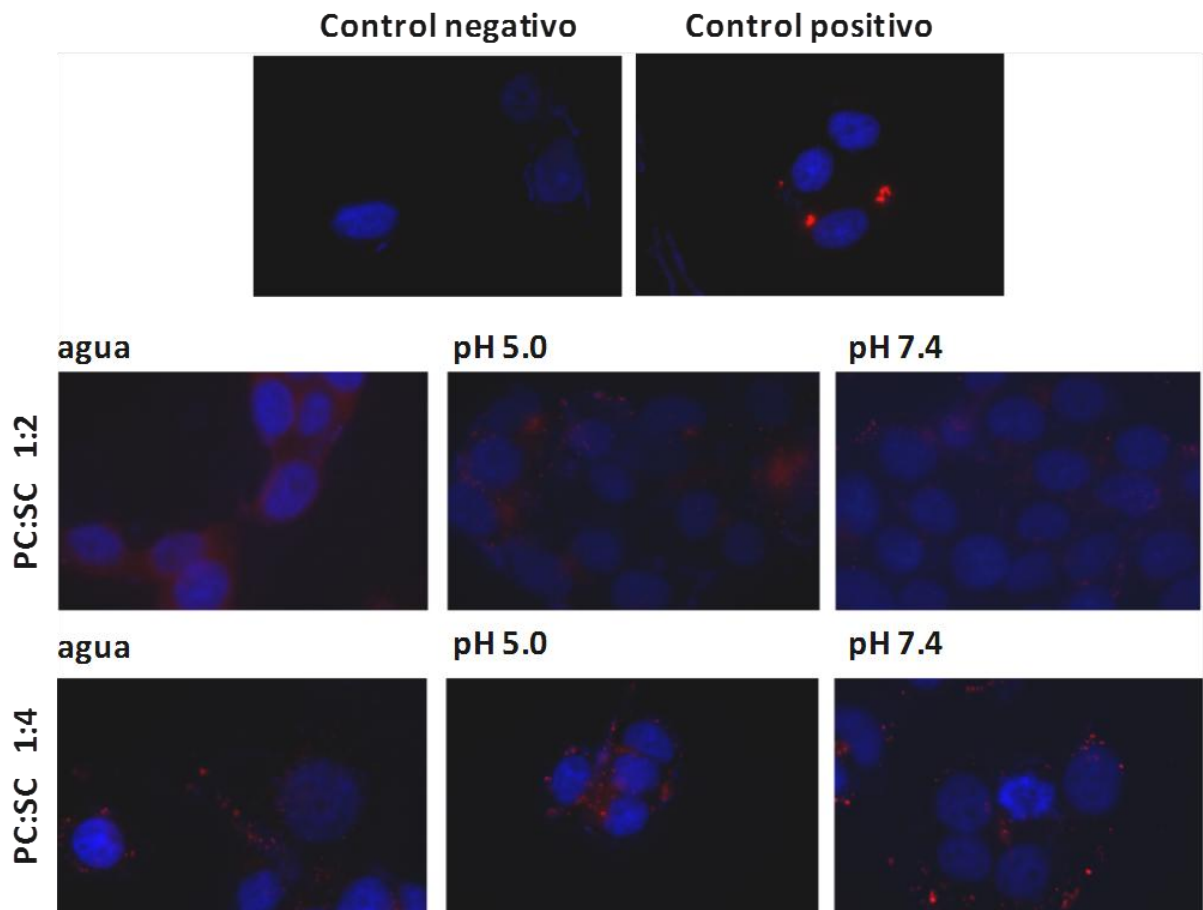


Figura 63: Microscopía de epifluorescencia del dsRNA BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo transfectado con los distintos vehículos en células MCF-7. Los controles incluyen dsRNA desnudo (-) y asociado a Lipofectamina® (+). *Publicado en Pérez, Gándola et al., 2015.*

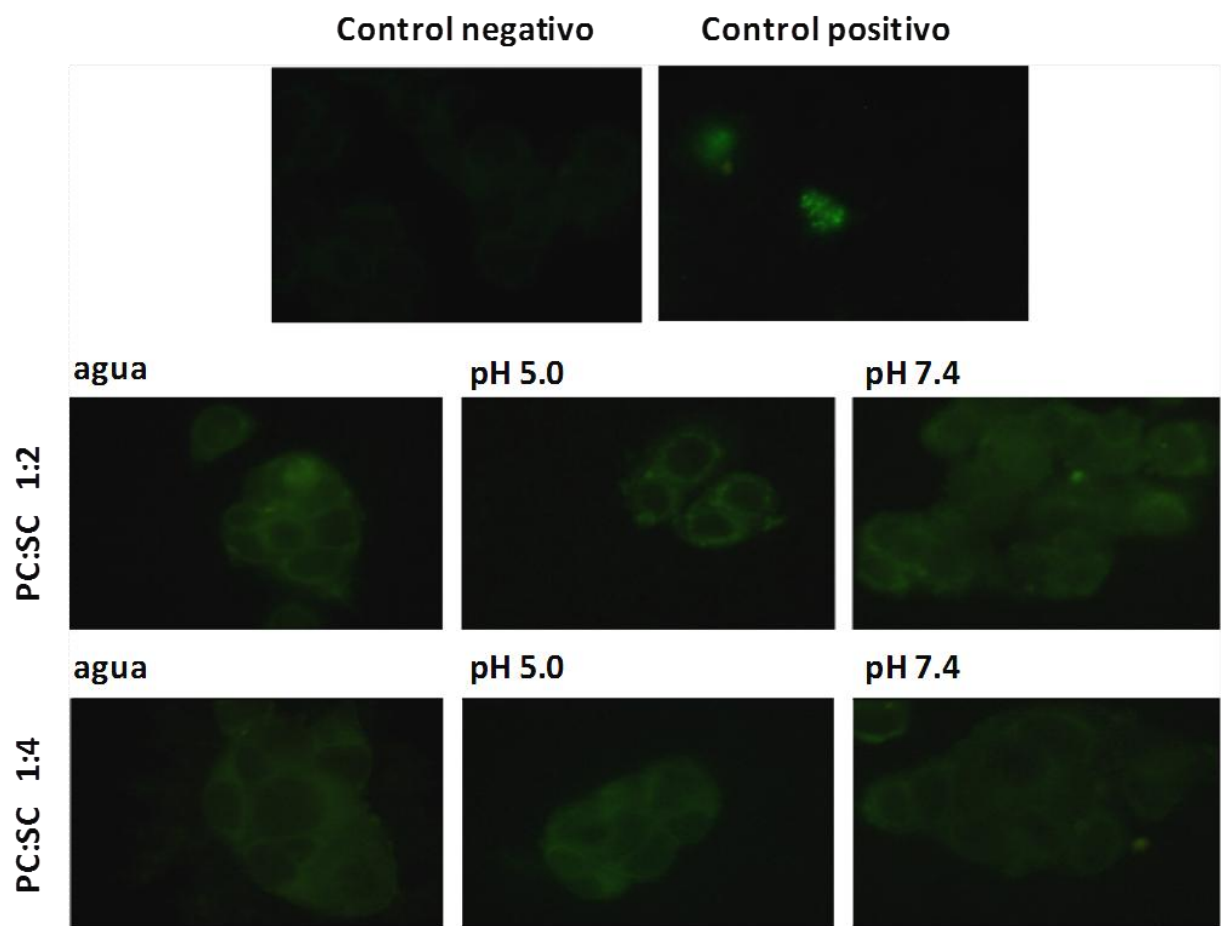


Figura 64: Microscopía de epifluorescencia del Fluorescein-labeled dsRNA BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo transfectado con los distintos vehículos en células MCF-7. Los controles incluyen dsRNA desnudo (-) y asociado a Lipofectamina® (+). *Publicado en Pérez, Gándola et al., 2015.*

4.2.5.3 Evaluación de eficiencia de silenciamiento génico

Dado que la principal vía de internalización de siRNA complejo con lípidos o polímeros es la endocitosis (Wang et al., 2010), y nuestros sistemas son nanoestructuras autoensambladas de fosfatidilcolina, es muy probable que dicha vía de ingreso celular sea la principal; como a partir del ingreso a través de esta vía las moléculas de siRNA podrían ser degradadas si no presentan un adecuado escape endosomal, se realizaron estudios para comprobar si los lipoplexos utilizados como vehículos de siRNA efectivamente son capaces de permitir el silenciamiento de la expresión de un gen blanco en las células MCF-7.

La eficiencia de silenciamiento génico (“gene knock down”) a partir del siRNA transfectado por los los sistemas PC:SC 1:2 y 1:4 se investigó a través del silenciamiento de la expresión de actina. Se utilizó para ello un siRNA control anti-actina (Stealth™ RNAi Actin Positive Control, Invitrogen, CA, USA). La concentración óptima de siRNA para lograr silenciamiento de la expresión de actina fue evaluada previamente mediante ensayos de transfección con el vehículo comercial Lipofectamina® (control positivo). La eficiente actividad del siRNA a través de su efecto de silenciamiento sobre la expresión de actina fue observada mediante tinción con faloidina de las células MCF-7 transfectadas (Fig. 65).

Como se observa en las imágenes obtenidas, el siRNA desnudo transfectado (control negativo) no mostró efecto de silenciamiento génico, probablemente debido a su degradación enzimática en el medio con suero así como a su internalización celular restringida debida a la repulsión electrostática con la membrana celular negativamente cargada. En contraste, el siRNA vehiculizado con Lipofectamina® (control positivo) tuvo un evidente efecto de silenciamiento génico.

El efecto de sistemas diseñados resultó dependiente tanto de la relación PC:SC como del medio utilizado en cada formulación. Los lipoplexos preparados en relación PC:SC 1:2 mostraron un claro efecto silenciador de la expresión de actina en los sistemas de pH 5.0 y pH 7.4, pero no en los sistemas formulados en agua. En tanto, los lipoplexos preparados en relación PC:SC 1:4 tuvieron un significativo efecto silenciador en los sistemas de pH 5.0 y agua.

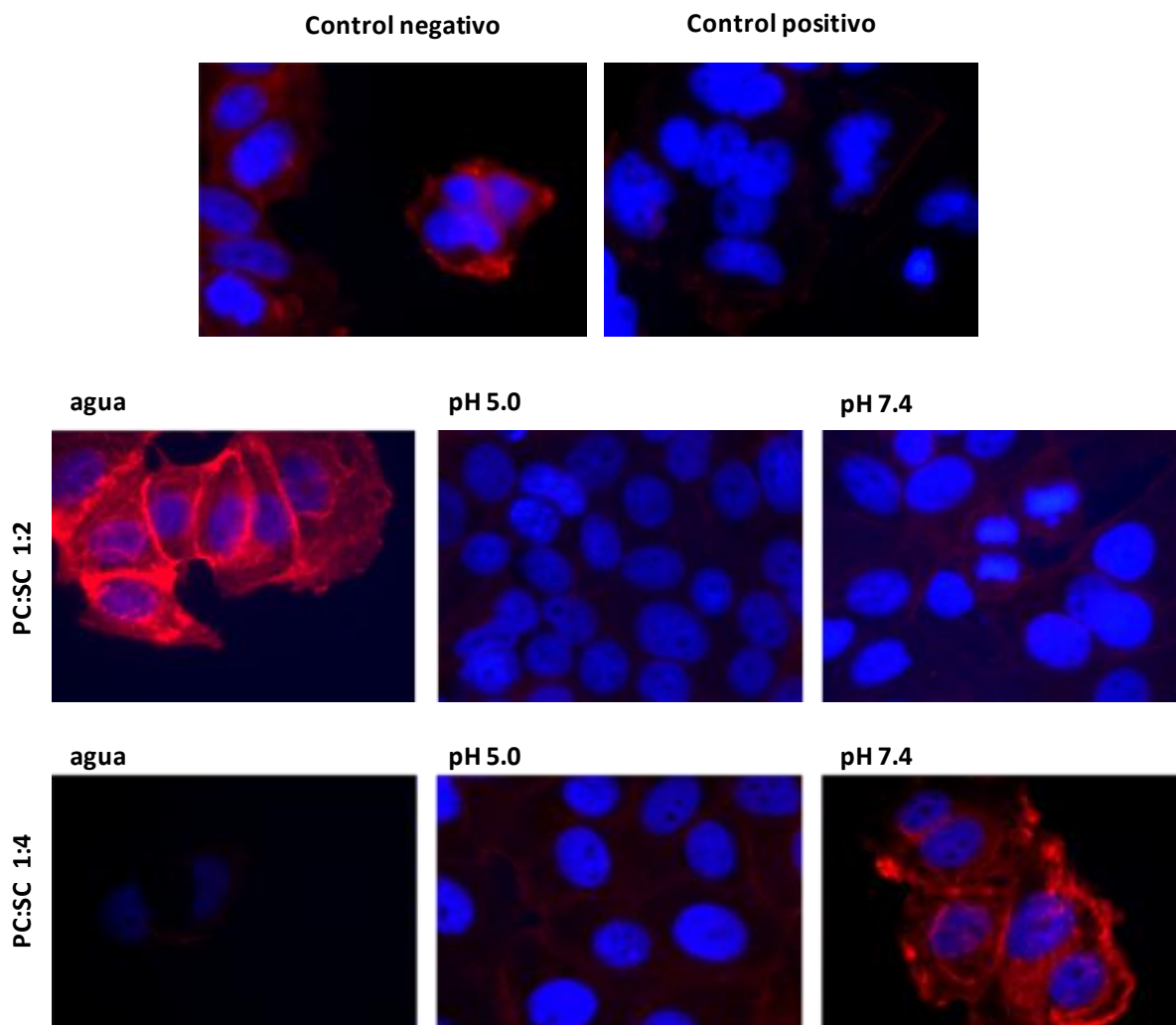


Figura 65: Microscopía de epifluorescencia de la tinción de actina con Faloidina (rojo) luego de la transfección de siRNA anti-actina con los distintos vehículos en células MCF-7. Los controles incluyen siRNA desnudo (-) y asociado a Lipofectamina® (+). Publicado en Pérez, Gándola et al., 2015.

En resumen, los sistemas PC:SC 1:2 y 1:4 formulados en los distintos medios demostraron una efectiva unión de siRNA, siendo viables para su uso en ensayos de transfección en células MCF-7 de cáncer de mama dada su baja citotoxicidad, capacidad de vehiculización e internalización celular del oligonucleótido y eficiencia del efecto final de silenciamiento génico; siendo *a priori* los sistemas formulados en pH 5.0 los más versátiles.

4.2.6 Ensayos *in vitro* sobre la línea celular MDCK

Estos ensayos fueron realizados en colaboración con los Dres. Lucila Pescio y Nicolás Favale del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de Esfingolípidos del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB).

4.2.6.1 Ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular

A los fines de realizar asimismo ensayos *in vitro* de vehiculización intracelular de dsRNA marcado y eficiencia de silenciamiento génico sobre células epiteliales MDCK, se analizó la citotoxicidad de las fórmulas seleccionadas con los volúmenes a usar para los ensayos de transfección sobre dicha línea celular.

Considerando la menor capacidad de carga de siRNA presentada por los sistemas PC:SC 1:1 y los formulados en agua, y la importante citotoxicidad ya observada para los sistemas PC:SC 1:8 sobre las células MCF-7 en los estudios previos, los mismos fueron descartados para los ensayos posteriores sobre la línea celular MDCK.

De acuerdo a los resultados obtenidos, ninguna de las formulaciones seleccionadas arrojó signos de citotoxicidad en la línea celular ensayada, al no observarse diferencias significativas en comparación con las células control sin tratar (Figura 66).

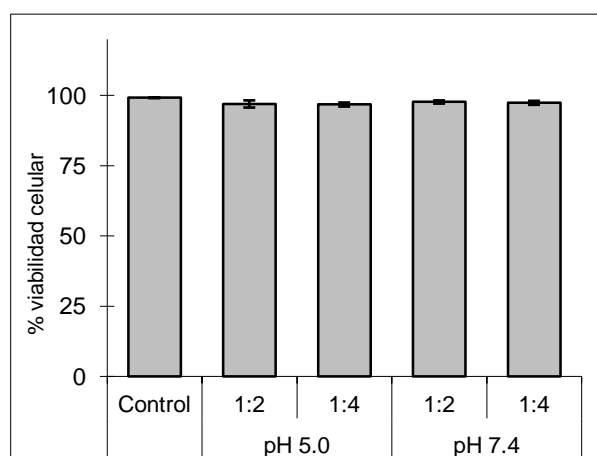


Figura 66: Citotoxicidad de los vehículos PC:SC 1:2 y 1:4 formulados en distintos medios en células MDCK mediante el ensayo de exclusión de azul tripan. Los resultados se expresan como porcentaje de células viables (no coloreadas) sobre el total de células contadas. Media \pm SD (n=3). No se observan diferencias significativas (Test ANOVA seguido del test a posteriori de Dunnett para comparaciones múltiples contra control, $p > 0.05$).

4.2.6.2 Ensayos de internalización celular del siRNA vehiculizado

Se evaluó la eficiente internalización del siRNA vehiculizado por los lipoplexos LP-PC/SB en la línea celular MDCK, a través de la observación por microscopía de epifluorescencia de la transfección de siRNA marcado con un fluorocromo verde (AllStars™ Negative Control siRNA AF® 488). Como control positivo se utilizó como vehículo el reactivo de transfección HiPerFect® (Fig. 67) y como control negativo las incubaciones se realizaron en presencia de las formulaciones sin el agregado de siRNA (Fig. 68).

Se seleccionaron los sistemas PC:SC 1:2 y 1:4 formulados en pH 7.4, dada su mayor capacidad de carga de siRNA, siendo cargados con el oligonucleótido a una relación N/P 100, ya que a mayores relaciones se observaron efectos citotóxicos y cambios morfológicos importantes sobre las células transfectadas. Como se observa en las imágenes obtenidas (Fig. 69 y 70), ambos sistemas fueron capaces de internalizar el oligonucleótido vehiculizado en las células MDCK, el cual ingresó al citoplasma y se ubicó en la zona perinuclear (núcleos azules, por tinción del DNA con el reactivo fluorescente Hoechst) al igual que lo observado sobre la línea celular MCF-7.

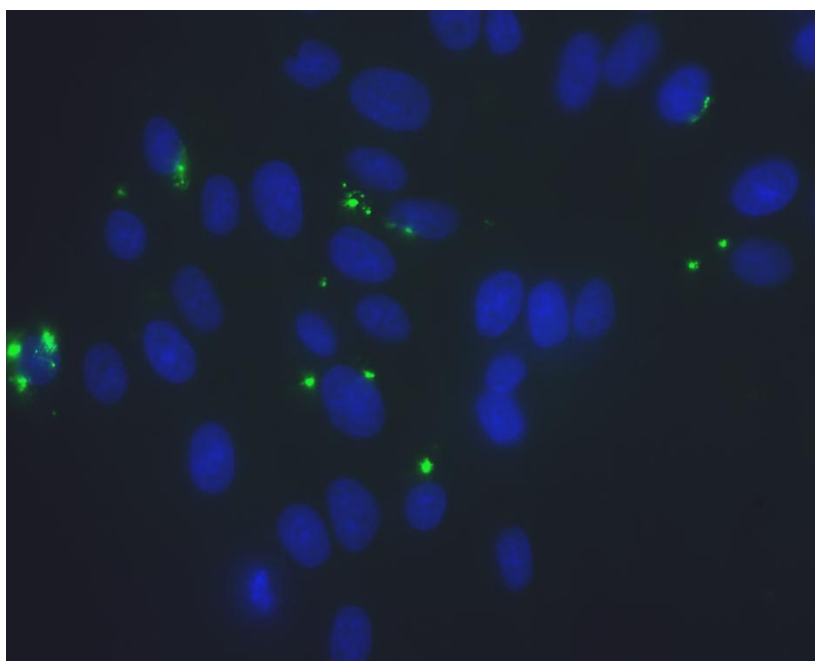


Figura 67: Control positivo para vehiculización de moléculas de siRNA fluorescente en células MDCK, utilizando el reactivo de transfección HiPerFect®. Las zonas perinucleares verdes corresponden a moléculas de siRNA en el citoplasma celular.

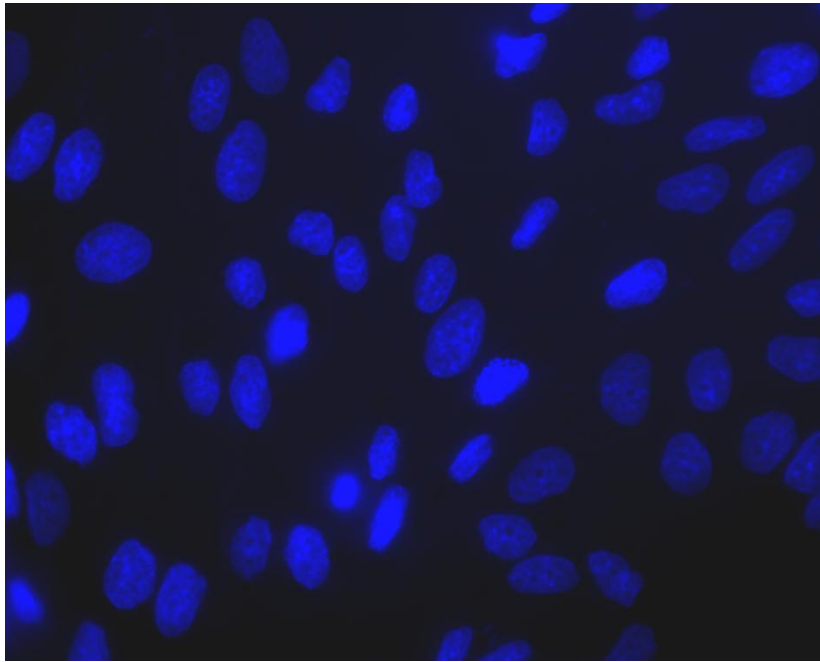


Figura 68: Control negativo para vehiculización de moléculas de siRNA fluorescente en células MDCK.

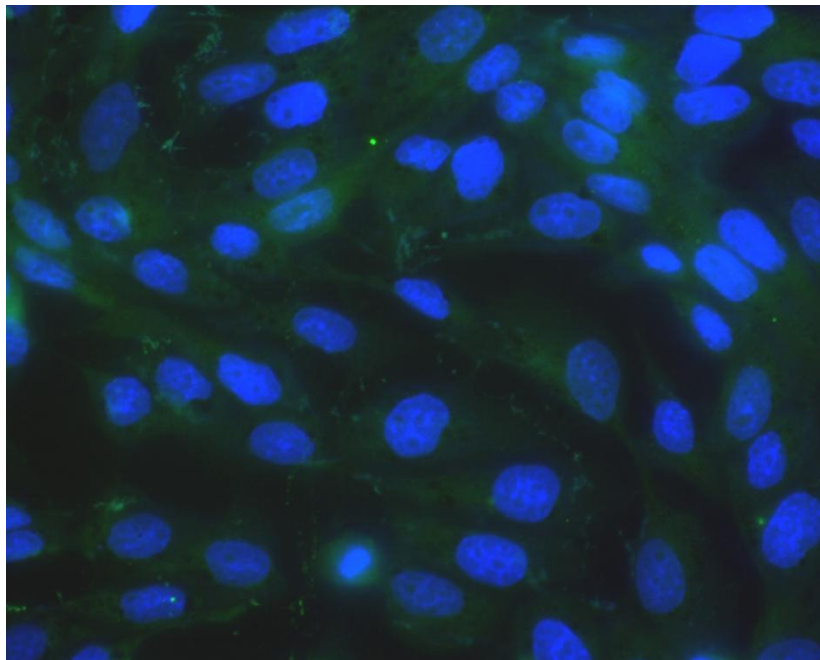


Figura 69: Vehiculización de moléculas de siRNA fluorescente en células MDCK, utilizando la formulación PC:SC 1:2 pH 7.4. Las zonas perinucleares verdes corresponden a moléculas de siRNA en el citoplasma celular.

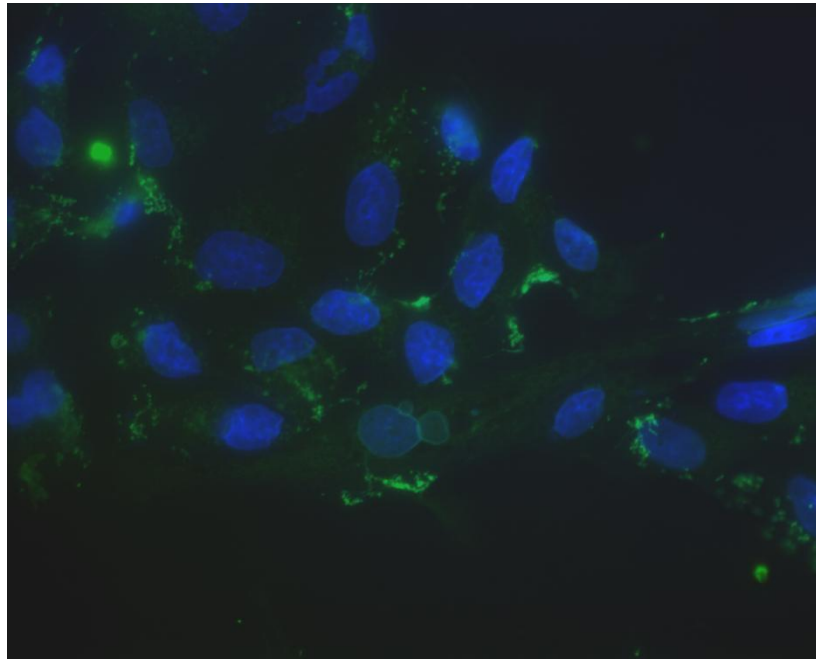


Figura 70: Vehiculización de moléculas de siRNA fluorescente en células MDCK, utilizando la formulación PC:SC 1:4 pH 7.4. Las zonas perinucleares verdes corresponden a moléculas de siRNA en el citoplasma celular.

4.2.6.3 Evaluación de eficiencia de silenciamiento génico

La eficiencia de silenciamiento génico (“gene knock down”) a partir del siRNA transfectado en las células MDCK se investigó a través del silenciamiento de la expresión de la lámina nuclear, al igual que se había realizado para los lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC). Se utilizó para ello un siRNA específico para Lámina A/C (Invitrogen, CA, USA). La eficiente actividad del siRNA a través de su efecto de silenciamiento sobre la expresión de Lámina A/C en las células transfectadas fue evaluada mediante observación por epifluorescencia de un anticuerpo secundario conjugado con TRITC (tetrametilrodamina B isotiocianato, marca fluorescente roja) que se une a un anticuerpo primario anti Lámina A/C. Como control negativo las incubaciones se realizaron en presencia de las formulaciones sin el agregado de siRNA (Fig. 72).

Como se observa en las imágenes obtenidas, tanto el siRNA vehiculizado con el reactivo comercial de transfección HiPerFect® (control positivo, Fig. 71) como el

vehiculizado con las formulaciones de PC:SC 1:2 y 1:4 pH 7.4 (Fig. 73 y 74, respectivamente), tuvieron efecto de silenciamiento de la expresión de la lámina nuclear. Las imágenes obtenidas fueron capturadas en los tres canales (verde, rojo y azul), permitiendo de esta forma observar tanto los núcleos celulares (azules, marcación por Hoechst) como la eficiencia de transfección de las células tratadas (marca verde, correspondiente al siRNA AF® 488) y la eficiencia de silenciamiento de la expresión de lámina nuclear a través de la atenuación de la marca fluorescente roja sobre varios de los núcleos en los campos evaluados.

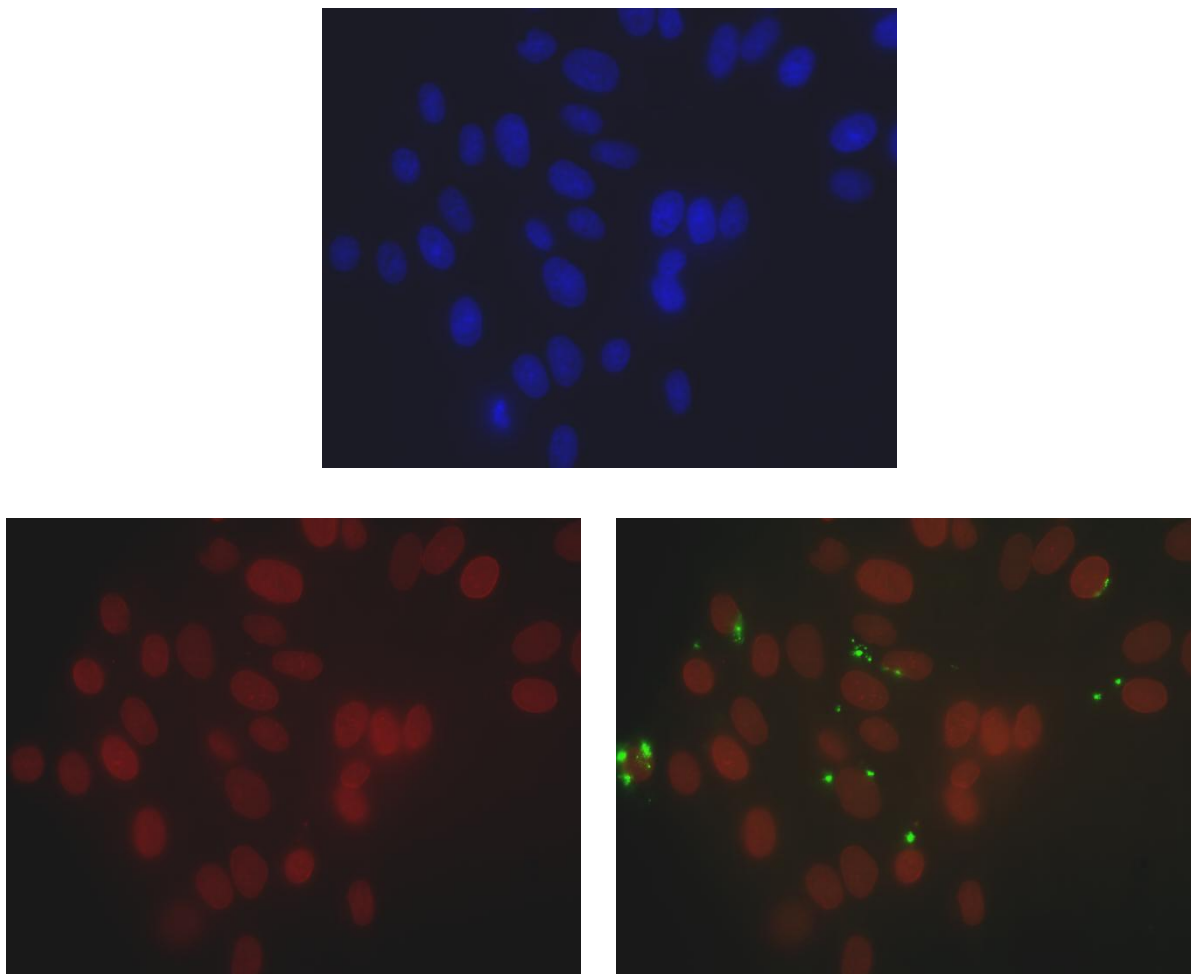


Figura 71: Microscopía de epifluorescencia de las células MDCK transfectadas utilizando el reactivo comercial HiPerFect® (control positivo). Las imágenes fueron capturadas en los tres canales (verde, rojo y azul) para el mismo campo, observando los núcleos celulares en el cuadro superior (marca azul, Hoechst), la marcación de la lámina nuclear en el cuadro inferior izquierdo (marca roja, anticuerpo anti lámina A/C) y la marca correspondiente a la co-transfección con el siRNA AF® 488 en el cuadro inferior derecho (marca verde).

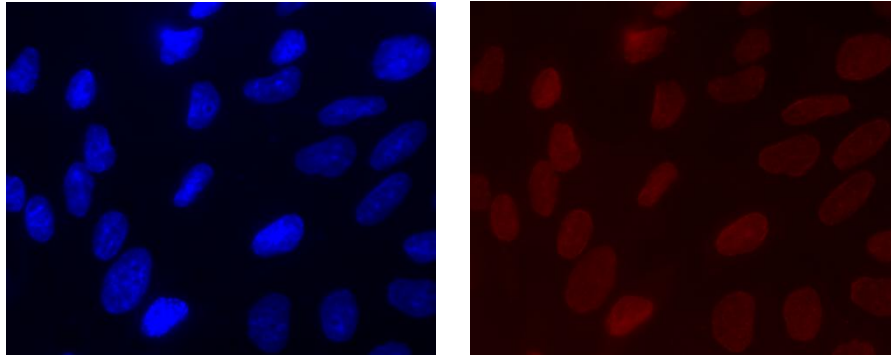


Figura 72: Microscopía de epifluorescencia de las células MDCK incubadas sin el agregado de siRNA (control negativo). Las imágenes fueron capturadas en los distintos canales para el mismo campo, observando los núcleos celulares en el cuadro izquierdo (marca azul, Hoechst), y la marcación de la lámina nuclear en el cuadro derecho (marca roja, anticuerpo anti lámina A/C).

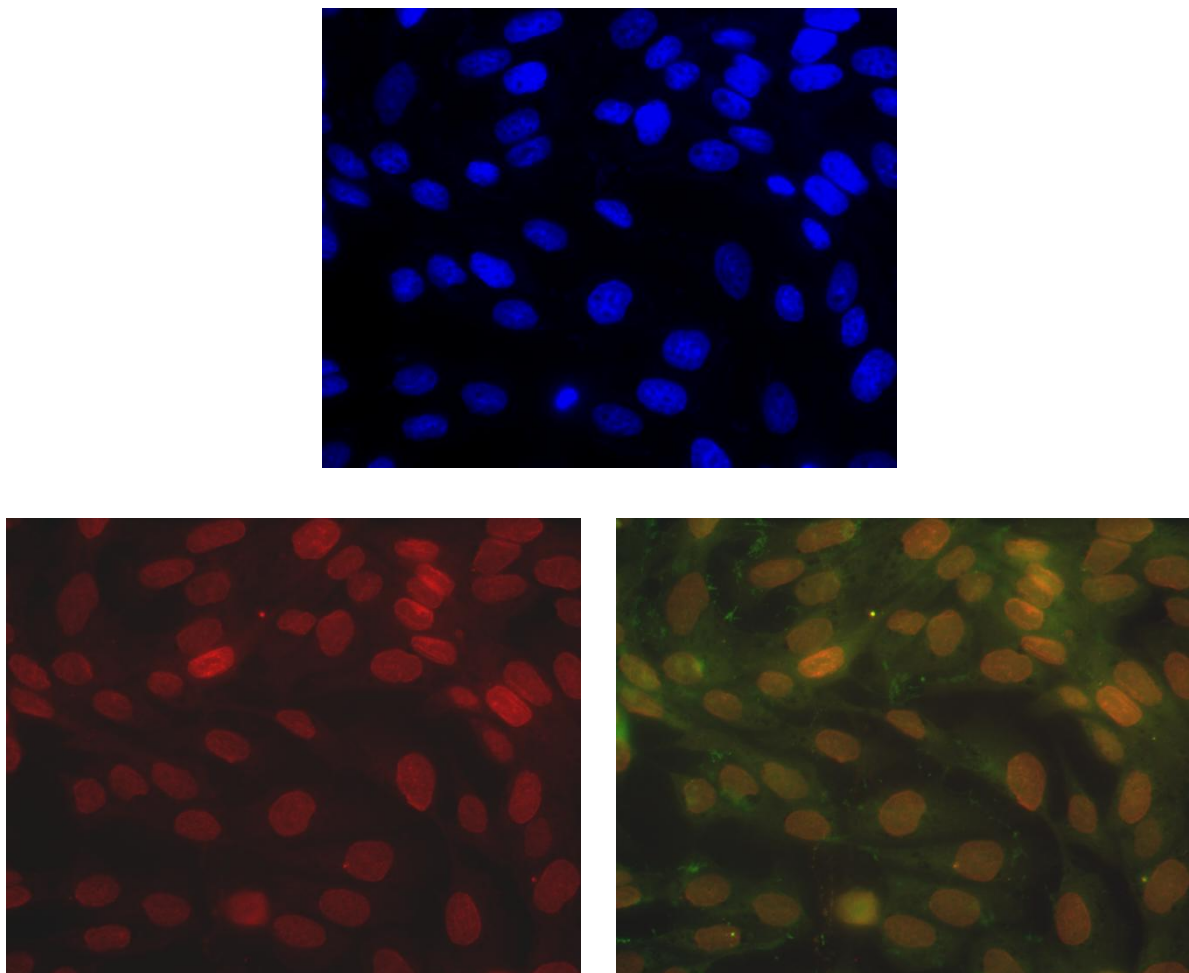


Figura 73: Microscopía de epifluorescencia de las células MDCK transfectadas utilizando la formulación de PC:SC 1:2 pH 7.4. Las imágenes fueron capturadas en los tres canales (verde, rojo y azul) para el mismo campo, observando los núcleos celulares en el cuadro superior (marca azul, Hoechst), la marcación de la lámina nuclear en el cuadro inferior izquierdo (marca roja, anticuerpo anti lámina A/C) y la marca correspondiente a la co-transfección con el siRNA AF@ 488 en el cuadro inferior derecho (marca verde).

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

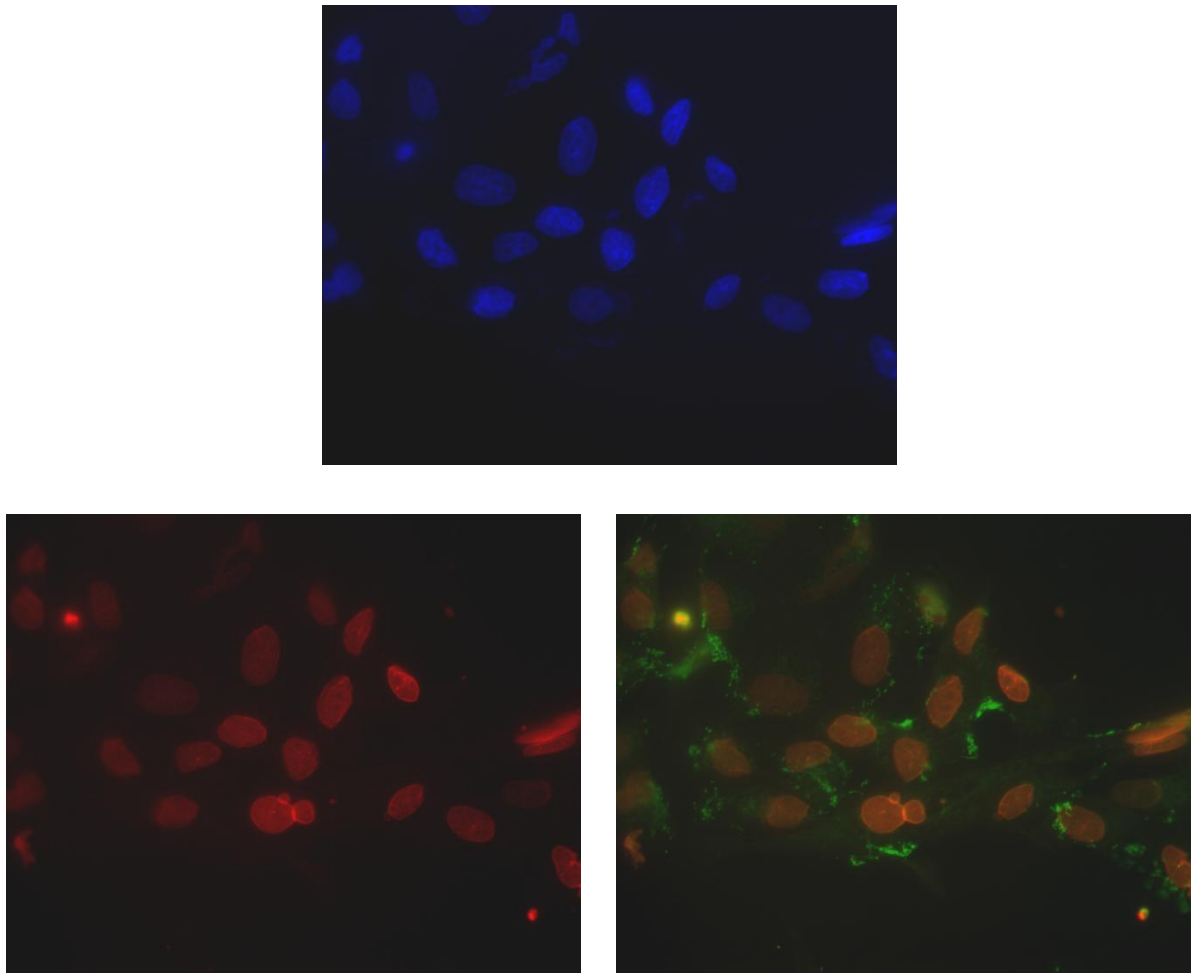


Figura 74: Microscopía de epifluorescencia de las células MDCK transfectadas utilizando la formulación de PC:SC 1:4 pH 7.4. Las imágenes fueron capturadas en los tres canales (verde, rojo y azul) para el mismo campo, observando los núcleos celulares en el cuadro superior (marca azul, Hoechst), la marcación de la lámina nuclear en el cuadro inferior izquierdo (marca roja, anticuerpo anti lámina A/C) y la marca correspondiente a la co-transfección con el siRNA AF@ 488 en el cuadro inferior derecho (marca verde).

4.2.7 Estabilidad de las formulaciones

Las formulaciones fueron conservadas en heladera a 5°C por 45 días, luego de lo cual el tamaño de partícula fue determinado por dispersión láser dinámica (DLS) y comparado con las mediciones a tiempo cero.

Como se observa en la Tabla 11, los tamaños medios de partícula obtenidos luego del período de almacenamiento no fueron marcadamente superiores a los de tiempo cero, por lo que podríamos sugerir la estabilidad de los sistemas en las condiciones evaluadas. Cabe destacar también que el aspecto macroscópico de las formulaciones se conservó inalterado, sin presentar floculación o sedimentación como sí ocurría en el caso de los lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC).

	PC:SC	T = 0d			T = 45d		
		Tam. Part. (d.nm)	PdI	Pot. Zeta (mV)	Tam. Part. (d.nm)	PdI	Pot. Zeta (mV)
Agua	1:1	135.5 ± 2.0	0.272	-26.1 ± 1.6	121.3 ± 7.5	0.235	-45.0 ± 2.2
	1:2	126.8 ± 1.1	0.380	-30.9 ± 1.5	165.3 ± 4.9	0.282	-50.8 ± 2.2
	1:4	7.9 ± 0.1	0.432	-15.7 ± 4.2	24.5 ± 0.8	0.235	-20.4 ± 3.7
	1:8	6.6 ± 0.2	0.761	-8.1 ± 3.4	19.6 ± 0.7	0.448	-12.6 ± 1.2
pH 5.0	1:1	128.7 ± 1.9	0.284	-14.9 ± 0.7	143.5 ± 1.6	0.109	-31.1 ± 0.4
	1:2	103.9 ± 3.1	0.691	-15.8 ± 2.0	150.5 ± 2.9	0.150	-30.3 ± 0.7
	1:4	23.7 ± 0.7	0.204	-8.8 ± 8.1	18.6 ± 0.5	0.116	-34.2 ± 2.8
	1:8	56.3 ± 1.5	0.264	-8.7 ± 7.3	19.0 ± 0.1	0.261	-34.4 ± 1.3
pH 7.4	1:1	122.3 ± 3.4	0.244	-18.3 ± 2.3	99.1 ± 0.7	0.202	-30.5 ± 1.1
	1:2	69.9 ± 3.7	0.424	-22.6 ± 3.6	71.1 ± 0.8	0.455	-32.5 ± 1.4
	1:4	21.9 ± 0.4	0.099	-8.9 ± 3.9	32.5 ± 0.5	0.364	-27.9 ± 1.9
	1:8	44.5 ± 4.5	0.321	-7.0 ± 2.2	24.3 ± 0.8	0.387	-20.0 ± 2.2

Tabla 11: Tamaño de partícula y potencial zeta de las formulaciones sin siRNA recién preparadas y luego de 45 días de estabilidad a 5°C, reportados como Media ± SD (n=4).

Se observó asimismo que para los sistemas de relación PC:SC 1:8 formulados en pH 5.0 y 7.4 se produjo una apreciable disminución del tamaño de partícula, lo que podría corresponder con la progresión de la transición vesícula a micela luego de su preparación y medición inicial, ya que estos sistemas son los que poseen mayor contenido relativo de colato (SC) y fuerza iónica durante su formulación.

En cuanto a los valores obtenidos de potencial zeta, se apreció una disminución generalizada de los mismos en todos los casos (valores más negativos), lo que podría atribuirse a cambios transicionales en la microestructura de los sistemas luego de su formulación inicial, hecho que estaría a su vez favoreciendo también a la estabilización física de los mismos al aumentar los efectos repulsivos entre las partículas.

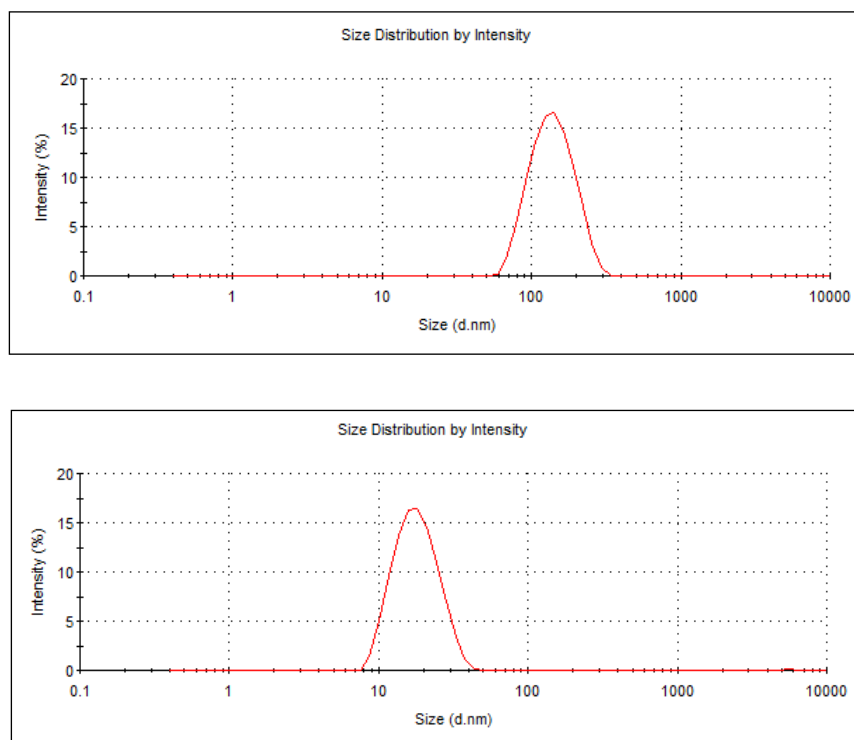


Figura 75: Ejemplo de determinaciones individuales de distribución de tamaño medio de partícula, obtenidos luego del período de estabilidad evaluado para las formulaciones pH 5.0 PC:SC 1:1 (arriba) y 1:8 (abajo).

Considerando los resultados obtenidos, podemos sugerir que estos sistemas reúnen condiciones mínimas como para poder ser propuestos a una escala de desarrollo/evaluación posterior. Es importante destacar asimismo que estos vehículos fueron diseñados a partir de un desarrollo racional planteado a partir de la necesidad de optimización de los lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC) formulados previamente, y que no habían presentado buenas características de estabilidad fisicoquímica.

4.2.8 LP-PC/SB como posibles vehículos de DNA plasmídico

Como se mencionó en la Introducción, las moléculas de siRNA pueden ser introducidas a la célula por transfección transitoria de siRNAs sintéticos (Elbashir, 2001; Oliveira & Goodell, 2003) o por transfección transitoria o estable de construcciones que expresan short hairpin RNAs (shRNAs) (Brummelkamp, 2002). Por lo tanto, con el fin de evaluar la posibilidad de utilizar los lipoplexos formulados para lograr el silenciamiento de un gen blanco mediante la expresión de un shRNA, o para vehiculizar DNA plasmídico (pDNA) con otros fines, se realizaron ensayos de desplazamiento por fluorescencia con el reactivo SYBR Green I®, a fin de determinar la capacidad de unión de pDNA por las fórmulas.

Se utilizaron dos tipos de plásmidos en estos ensayos:

- pYFP (vector de expresión que codifica para la proteína fluorescente amarilla, YFP), de 4700 pb y una concentración de 4.5 µg/µL
- pGFP (vector de expresión que codifica para la proteína fluorescente verde, GFP), de 6500 pb y una concentración de 1.0 µg/µL

En forma similar a como se realizó el ensayo de desplazamiento para evaluar la interacción de siRNA con las formulaciones, adaptando las concentraciones finales a fin de obtener una adecuada señal fluorescente, 0.1 µL de pGFP ó pYFP se mezclaron con 150 µL de solución de SYBR Green (dilución 1/10000 del reactivo comercial en buffer Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) en una placa transparente de 96 pocillos, y cantidades crecientes de formulación fueron agregadas en alícuotas sucesivas de 10 µL alcanzando los distintos

valores de N/P hasta un total de 100 μ L (Tablas 12 y 13). Luego de cada agregado, las muestras fueron incubadas antes de la lectura de fluorescencia y a cada medición se le descontó el valor de fluorescencia intrínseca del SYBR Green (blanco). Luego, para cada valor de fluorescencia remanente tras el agregado de las fórmulas a los distintos N/P se calculó el porcentaje de fluorescencia respecto del control (100%), dado por la interacción entre el pDNA y el SYBR Green en ausencia de las fórmulas.

a) Ensayos de desplazamiento del complejo SYBR Green – pYFP

<i>μL agregados</i>	<i>Relaciones N/P obtenidas</i>			
	<i>PC:SC 1:1</i>	<i>PC:SC 1:2</i>	<i>PC:SC 1:4</i>	<i>PC:SC 1:8</i>
10	108	79	52	32
20	215	159	103	65
30	323	238	155	97
40	430	317	206	130
50	538	397	258	162
60	645	476	309	195
70	753	556	361	227
80	860	635	412	260
90	968	714	464	292
100	1075	794	515	325

Tabla 12: Cálculo de la relación N/P obtenida con cada alícuota de formulación agregada a la mezcla pYFP - SYBR Green.

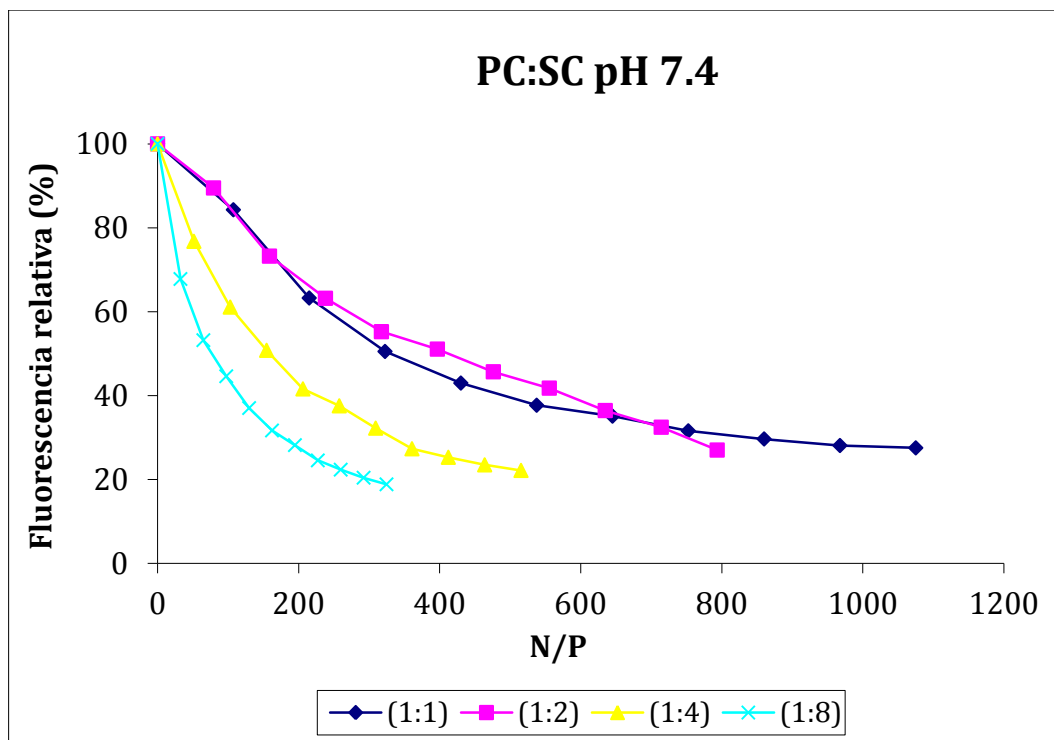


Figura 76: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de pYFP por los lipoplexos formulados a pH 7.4.

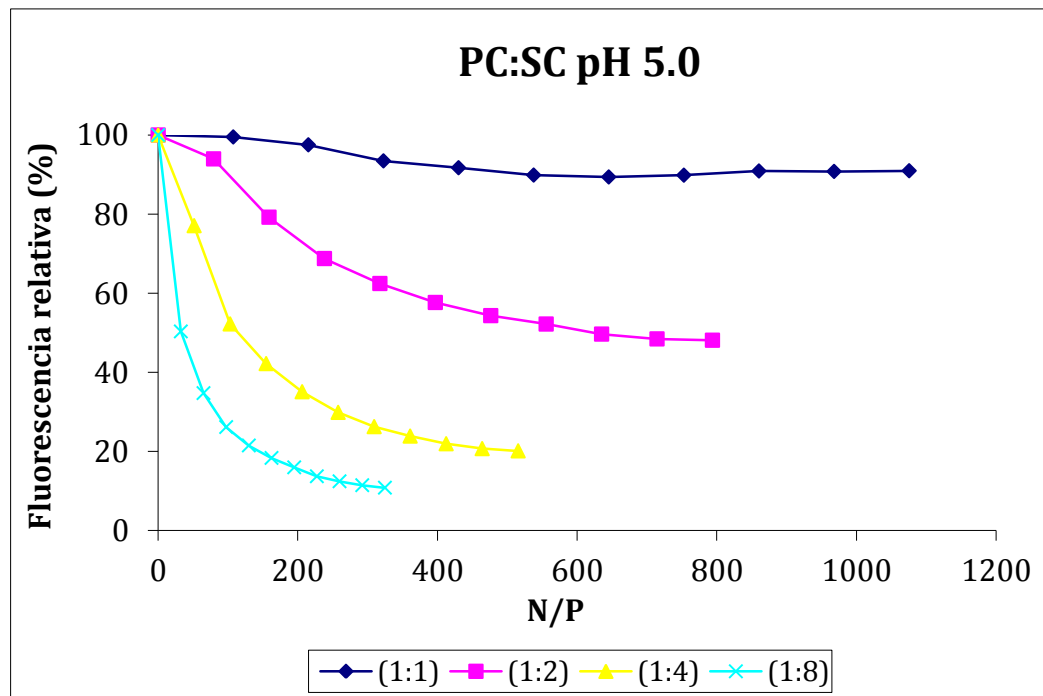


Figura 77: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de pYFP por los lipoplexos formulados a pH 5.0.

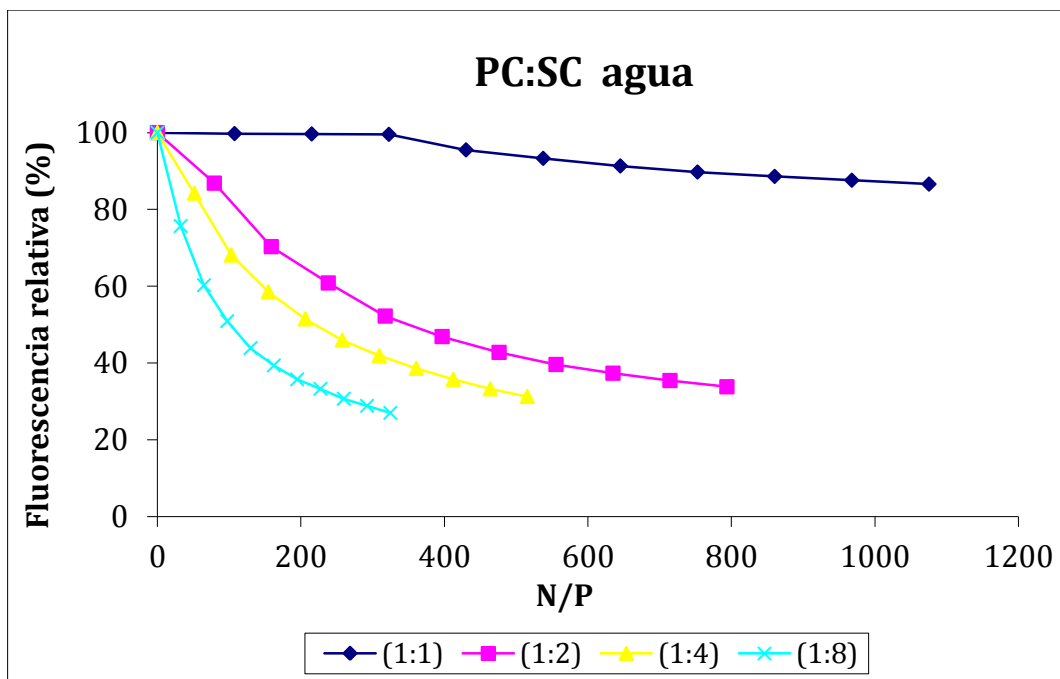


Figura 78: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de pYFP por los lipoplexos formulados en agua.

b) Ensayos de desplazamiento del complejo SYBR Green – pGFP

<i>μL agregados</i>	<i>Relaciones N/P obtenidas</i>			
	<i>PC:SC 1:1</i>	<i>PC:SC 1:2</i>	<i>PC:SC 1:4</i>	<i>PC:SC 1:8</i>
10	476	357	233	147
20	952	714	465	294
30	1429	1071	698	441
40	1905	1429	930	588
50	2381	1786	1163	735
60	2857	2143	1395	882
70	3333	2500	1628	1029
80	3810	2857	1860	1176
90	4286	3214	2093	1324
100	4762	3571	2326	1471

Tabla 13: Cálculo de la relación N/P obtenida con cada alícuota de formulación agregada a la mezcla pGFP - SYBR Green.

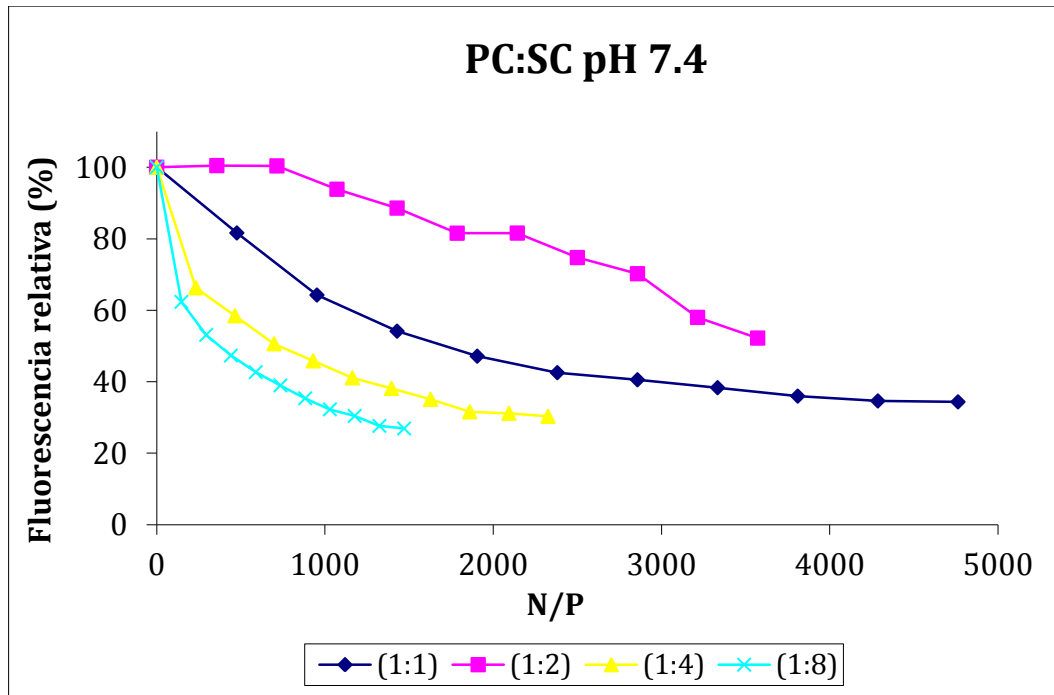


Figura 79: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de pGFP por los lipoplexos formulados a pH 7.4.

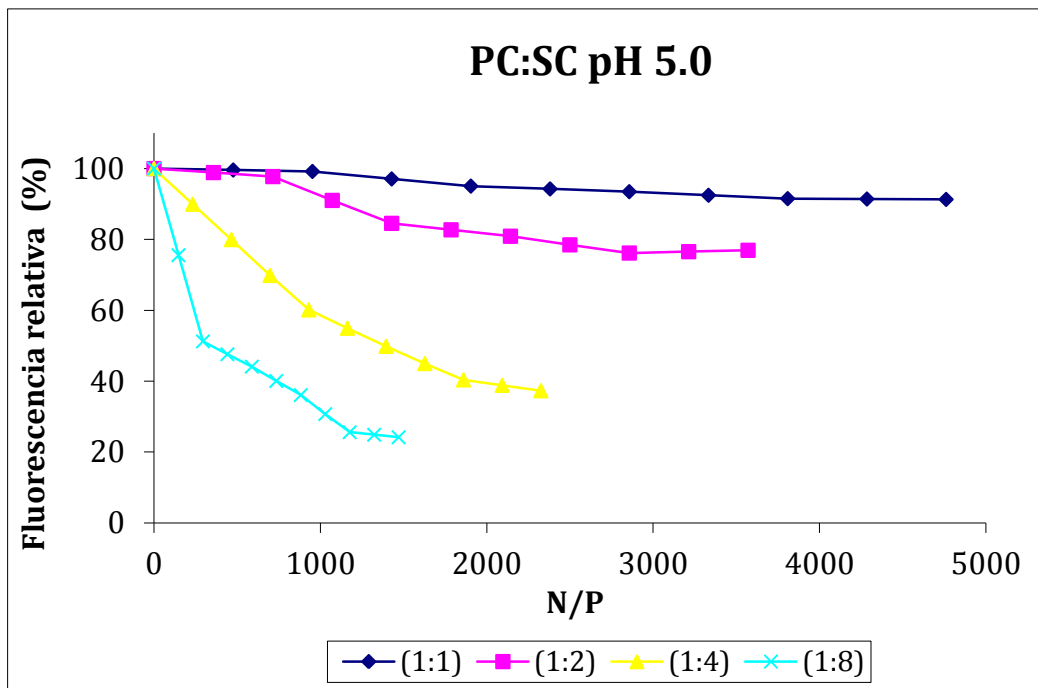


Figura 80: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de pGFP por los lipoplexos formulados a pH 5.0.

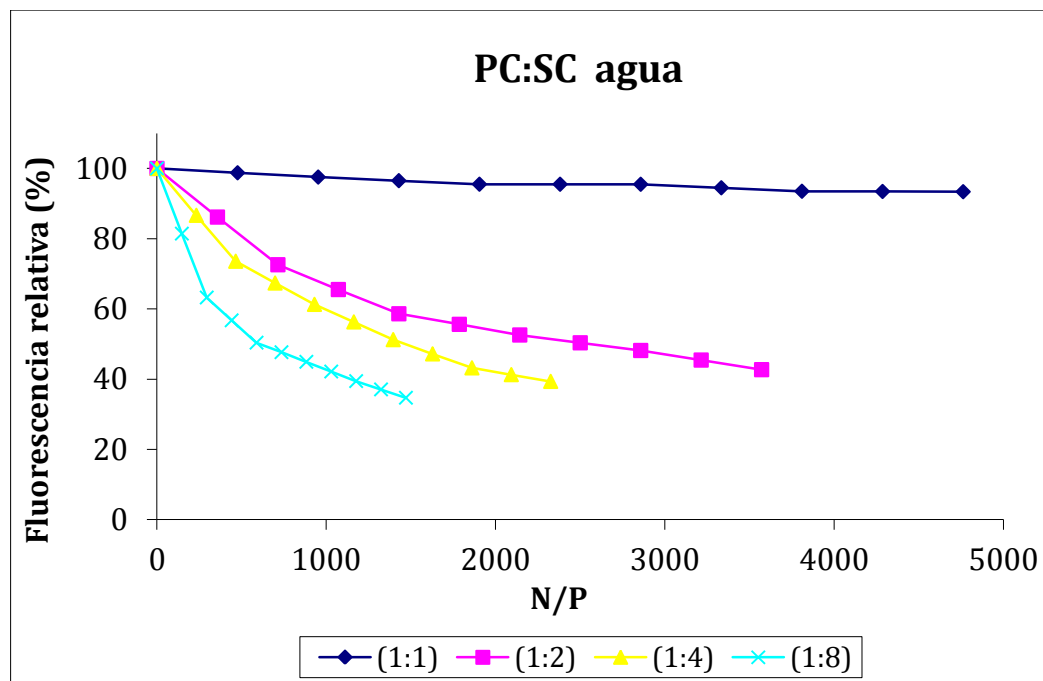


Figura 81: Ensayos de desplazamiento de SYBR Green comparando la capacidad de unión de pGFP por los lipoplexos formulados en agua.

En forma similar a los resultados obtenidos previamente con las formulaciones cargadas con siRNA, se evidencia una importante afinidad de unión para ambos plásmidos, la cual se incrementa a medida que aumenta el contenido relativo de colato de sodio (SC) en cada formulación; esto se evidencia por una disminución cada vez más pronunciada de la fluorescencia emitida luego del desplazamiento del SYBR Green de su unión al plásmido (Fig. 76-81).

Se observa que para una misma relación N/P alcanzada, la asociación del pDNA al vehículo es mayor para los sistemas con mayor contenido relativo de SC. Cabe destacar, sin embargo, que para las formulaciones PC:SC 1:1 y 1:2 pH 7.4 cargadas con pYFP, el perfil obtenido fue muy similar, no evidenciando diferencias en afinidad por el plásmido. Otra observación particular a destacar en este sentido es la inversión de los perfiles observados para los sistemas PC:SC 1:1 y 1:2 pH 7.4 cargadas con pGFP, en los cuales la afinidad fue mayor para aquellos con menor contenido de SC. Estas discordancias con el comportamiento general observado no se producen al evaluar los vehículos formulados en agua y pH 5.0.

Para los sistemas formulados en agua y pH 5.0 en relaciones equimolares PC:SC no se obtuvo apreciable unión con el plásmido, tanto al utilizar pYFP como pGFP, aún a los mayores valores de N/P evaluados. Esto se diferencia claramente de lo observado al evaluar la afinidad del siRNA por los mismos vehículos, donde, aunque en menor cuantía que con los sistemas con mayor contenido relativo de SC, se evidenció unión del oligonucleótido.

Se deja aclarado que en el IQUIFIB, la capacidad de carga de los distintos nanovehículos para los plásmidos evaluados se realiza en forma paralela utilizando la técnica de electroforesis por geles de agarosa; y que, dado que los resultados obtenidos a través de esta técnica no concuerdan en su totalidad con los provenientes de los ensayos de desplazamiento de SYBR Green, no pudo seleccionarse la formulación óptima para evaluar la adecuada transfección y expresión del plásmido vehiculizado por técnicas de fluorescencia.

Mediciones preliminares por DLS evidenciaron valores de tamaño de partícula mayores a los obtenidos al cargar los mismos vehículos con siRNA, lo que se podría corresponder con el mayor tamaño del material génico a transportar (Tabla 14).

<i>N/P</i>	<i>Tam. Part. (d.nm)</i>	<i>PdI</i>	<i>Pot. Zeta (mV)</i>
500	445.1 ± 33.1	0.331	-15.6 ± 0.5
1000	549.2 ± 21.6	0.343	-13.4 ± 0.8

Tabla 14: Tamaño de partícula y potencial zeta de las formulaciones PC:SC 1:1 cargadas con pYFP a relaciones N/P 500 y 1000, reportadas como Media ± SD (n=4).

Si bien aún es necesario evaluar la capacidad de transfección *in vitro* y expresión de los pDNA vehiculizados por los sistemas que mostraron mejor capacidad de carga de acuerdo a los ensayos de desplazamiento, los resultados preliminares obtenidos sugieren que los lipoplexos tipo LP-PC/SB diseñados para uso como vehículos de siRNA constituirían asimismo formulaciones adecuadas para ser optimizadas para su uso como vehículos de vectores plasmídicos.

5 COLABORACIONES

5.1 Colaboraciones con IQUIFIB

1. “Innovative strategies for breast cancer therapy: concepts and applications”

Lorena González, Ezequiel Monteagudo, Sebastián E. Pérez, Yamila Gándola and Adriana M. Carlucci. *The Research and Biology of Cancer* (2013). iConcept Press Ltd. ISBN 978-14775549-9-9.

Alcances del libro

La idea original del libro fue desplegar la información a través de la presentación de experimentos claves que le den al lector un sentido del descubrimiento y le proporcionen información detallada sobre el fundamento conceptual que subyace a la biología moderna del cáncer, particularmente de aquellos cánceres más frecuentes.

El libro sintetiza los hallazgos de las últimas tres décadas en investigación en cáncer y propone un marco conceptual a partir del cual enseñar acerca de estos descubrimientos. Provee la estructura, organización y contenidos necesarios para un curso de biología del cáncer para estudiantes avanzados y doctorandos. La publicación incluye gran parte de la literatura reciente relacionada con cáncer y está destinada a capacitar al estudiante para pasar directamente a la literatura de investigación primaria.

El texto proporciona información actualizada sobre temas tales como las células madre tumorales y quimioterápicos recientemente introducidos; también se presenta un estado de situación de las técnicas empleadas desde los distintos abordajes que presenta esta patología.

La investigación biomédica moderna se explora para ayudar a los lectores a mejorar sus habilidades analíticas y a asimilar y pensar con claridad acerca de los complejos procesos

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

biológicos involucrados. Además de su valor como libro de texto, se intentó que sea una referencia útil para las personas que trabajan en laboratorios biomédicos, y para los profesionales clínicos.

Contenidos del capítulo

En este capítulo del libro se presentan dos estrategias innovadoras relacionadas con el diseño de nanotransportadores que resulten apropiados para vehiculizar agentes terapéuticos de reconocido interés para el tratamiento del cáncer de mama.

Por un lado el uso de microemulsiones, un producto nanofarmacéutico extensamente estudiado y aplicado durante los últimos años como sistema de liberación de tamoxifeno, un fármaco de primera elección en la hormonoterapia de la enfermedad con el objetivo de proponer un protocolo terapéutico alternativo a los vigentes. Y por otro lado el diseño de vectores no virales para la vehiculización de siRNA, una variante de la terapia antisentido que genera grandes expectativas para silenciar la expresión de proteínas involucradas en la inducción y progresión de las patologías oncológicas.

En el trabajo se intenta presentar una comprensión de los mecanismos subyacentes a los efectos biológicos causados por cada una de las formulaciones ensayadas. Habida cuenta de que es bien reconocido que para abordar los desafíos de combatir tumores malignos con herramientas nanotecnológicas, es necesario combinar el desarrollo racional del producto nanofarmacéutico con la comprensión de los mecanismos biológicos más básicos de la patología neoplásica.

En este capítulo se presentan estadísticas y el estado de situación general del diagnóstico, alternativas de abordaje de la enfermedad y factores de pronóstico. Se hace especial hincapié en la administración de agentes hormonoterápicos en pacientes con distintas situaciones y estadios de la enfermedad. También se destacan algunos conceptos y ventajas generales que la aplicación de la nanotecnología conlleva en cáncer de mama y los nanovehículos actualmente en evaluación.

A continuación se presentan las características de las microemulsiones que las transforman en sistemas de liberación de fármacos en creciente uso farmacéutico. Se propone un diseño racional diferente con el objetivo de optimizar formulaciones de esta forma farmacéutica para vehicular/liberar tamoxifeno. Se dedica especial atención a los aspectos tecnológicos involucrados en el desarrollo como la caracterización fisicoquímica del nanovehículo y su alto potencial de transferencia tecnológica. Finalmente se presentan los resultados de inhibición de proliferación celular *in vitro* para las diferentes formulaciones.

Hay muchas áreas en las cuales todavía existe incertidumbre acerca de la elección de la terapia más apropiada para los diferentes estadios y casos del cáncer de mama. Esta situación aparece a pesar de los recientes avances en el campo de la biología. La diversidad de presentaciones clínicas de la enfermedad, junto con la ausencia de una apropiada comprensión de los factores determinantes que puedan mejorar ciertamente los resultados clínicos llevan a la comunidad oncológica a reclamar por nuevos protocolos terapéuticos.

La literatura también destaca el alto potencial de los sistemas de liberación de drogas nanotecnológicos para mejorar la actual situación en esta área del conocimiento.

Debido a lo anteriormente descrito, en este capítulo se presenta un procedimiento experimental de selección, racional e interdisciplinario para desarrollar y optimizar microemulsiones y su correspondiente evaluación de performance *in vitro*.

El diseño experimental comienza con la selección de excipientes farmacéuticamente aceptables para todas las vías de administración, pero se circunscribió solamente a la utilización de Polisorbato 80 como surfactante. Luego, fueron evaluados por su capacidad de solubilización y comportamiento citotóxico *in vitro*; aquellos que mostraron parámetros aceptables fueron luego seleccionados por su capacidad de formar microemulsiones. En nuestra opinión esta disposición de diseño permite una optimización más rápida de la composición más apropiada.

Los resultados obtenidos luego de la inhibición de proliferación *in vitro* inducida por estradiol en células MCF-7 de cáncer de mama, demostraron un significativo efecto sobre el crecimiento celular. Una disminución de al menos el 90% en las células viables fue mostrado luego de la incubación de las microemulsiones seleccionadas conteniendo 20 mM de

tamoxifeno. También es dable destacar que los experimentos en cultivos celulares fueron llevados a cabo sin adición de otros reactivos. En resumen, la mayoría de las consideraciones que actualmente son solicitadas para el desarrollo de una formulación nanotecnológica junto a la comprensión detallada de sus componentes críticos, sus interacciones y sus consecuentes efectos biológicos en células de cáncer de mama fueron considerados.

Esta forma de abordar la investigación de nuevos nanotransportadores representa una alternativa interesante para buscar protocolos más efectivos de agentes terapéuticos bien conocidos y también un mejor cumplimiento del protocolo terapéutico, un tema no menor en la práctica clínica. Los datos preliminares obtenidos no sólo avalan la subsecuente investigación para el desarrollo de un protocolo alternativo de administración oral de tamoxifeno, sino también una formulación de administración intramuscular o endovenosa. Estos nanotransportadores podrían ser particularmente útiles en ensayos clínicos combinados no sólo para pacientes con cáncer de mama diagnosticado tempranamente sino también en aquellos que presentan metástasis.

Por otro lado, se resumen las aplicaciones terapéuticas que se han descrito últimamente para el RNA pequeño de interferencia (siRNA) como una promisorio herramienta para una terapia oncológica innovadora. Se mencionan los sistemas de liberación de siRNA más estudiados, que están basados en lípidos y polímeros; se detallan otros dispositivos que se han propuesto y las nuevas tendencias en esta área del conocimiento. Finalmente, se propone un desarrollo racional farmacotécnico para diseñar y evaluar nanopartículas basadas en lecitina como vehículo no viral del oligonucleótido.

Los resultados preliminares obtenidos con estos sistemas alientan la posibilidad de mejorar algunas de las desventajas atribuidas normalmente a los vectores no virales como pobre ingreso celular o alta citotoxicidad. En el diseño farmacotécnico propuesto no fue necesario agregar ningún lípido o surfactante catiónico, que a priori se relacionan con alta toxicidad, para mejorar la capacidad de carga del siRNA. En este caso, la eficiencia de carga se consiguió por medio de la optimización de parámetros críticos en el proceso de fabricación, tales como pH y fuerza iónica.

Se deja destacado también que estas nanopartículas basadas en lecitina están en concordancia con el consenso internacional que sostiene que los nanoliposomas tendrán un interesante desarrollo en los próximos años si se resuelven algunos problemas de inestabilización que se le reconocen.

En conclusión se propone una modalidad novedosa de trabajo interdisciplinario con el objetivo de optimizar sistemas nanofarmacéuticos que resultaron alternativas promisorias para posteriores investigaciones que podrían incluir estudios in vivo o ex vivo.

Hoy día queda bien claro que para un traslado efectivo a ensayos clínicos, los nanovehículos deben presentar algunas características que en esta modalidad de trabajo se abordan desde el inicio mismo del pre-desarrollo farmacéutico. Se trabaja con excipientes biocompatibles, bien caracterizados, aprobados por entidades regulatorias para la vía pretendida y de reconocida función. Las formas farmacéuticas propuestas son coloides que están disponibles en el mercado como vehículos de fármacos convencionales. Dentro de las ventajas comparativas que presentan como sistemas de vehiculización/liberación también se cuenta la eficiencia asegurada para el ingreso celular debido a sus nanodimensiones; esto permite, para el caso de las células neoplásicas, proveer un mecanismo de vectorización pasivo de los agentes terapéuticos.

En conclusión, la propuesta involucra un trabajo focalizado en principios de la tecnología farmacéutica bien establecidos junto con una mejor comprensión de los resultados biológicos para poder acelerar la incorporación de los nanotransportadores en el progreso terapéutico del cáncer de mama; mejorando de esta manera la transferencia de los conceptos en aplicaciones clínicas.

2. “Mitogenic Effects of Phosphatidylcholine Nanoparticles on MCF-7 Breast Cancer Cells”

Yamila B. Gándola, Sebastián E. Pérez, Pablo E. Irene, Ana I. Sotelo, Johanna G. Miquet, Gerardo R. Corradi, Adriana M. Carlucci and Lorena González. *BioMed Research International* (2014), Article ID 687037, 13 pages. doi:10.1155/2014/687037.

Los fosfolípidos de membrana, así como el perfil de ácidos grasos, se encuentran alterados en las células tumorales. Dichas células se encuentran caracterizadas por una marcada elevación de los niveles de fosfocolina y compuestos conteniendo colina. De hecho, el contenido celular total de fosfatidilcolina (PC) puede ser utilizado como marcador de proliferación en tejidos glandulares mamarios neoplásicos, o como un biomarcador predictivo para monitorear la respuesta tumoral.

Por lo tanto, las fosfatidilcolinas no constituyen vehículos inertes sino compuestos con actividad biológica comprobada; los fosfolípidos y sus segundos mensajeros derivados están involucrados en los mecanismos de proliferación y tráfico celular, y se ha descrito el incremento de fosfatidilcolina y compuestos conteniendo colina en células neoplásicas. Se ha reforzado por otra parte la idea de que ciertos excipientes poseen un rol como componentes farmacéuticos activos en ciertas formulaciones, ya que tienen la capacidad de modificar la actividad farmacológica de un principio activo o producir efectos biológicos concurrentes.

Considerando que la fosfatidilcolina es el principal componente de la lecitina y tomando en cuenta las cada vez mayores aplicaciones de formulaciones basadas en lecitina en nanomedicina y para la administración de agentes antineoplásicos, el objetivo del presente trabajo fue determinar los efectos biológicos de nanopartículas de fosfatidilcolina sobre las vías de señalización y proliferación en células de MCF-7 de cáncer de mama.

Resultados previos obtenidos demostraron que nanopartículas de fosfatidilcolina formuladas en pH 5.0 y 7.0 y transfectadas en concentraciones finales de 0.1 y 0.01 % p/v fueron capaces de unir eficientemente oligonucleótidos y transportarlos al interior de células MCF-7 (Pérez et al., 2012). El estudio sugirió que los sistemas de vehiculización basados en

lecitina podrían representar formulaciones versátiles y novedosas para las terapias génicas antitumorales. Sin embargo, para evaluar si las nanopartículas de fosfatidilcolina presentaban actividad promitogénica *per sé*, sus efectos sobre las vías de transducción de señales involucradas en proliferación y supervivencia celular requerían ser estudiados. Es así que, considerando que segundos mensajeros derivados de la PC están involucrados en la activación de mediadores de señalización celular como las proteínas mTOR y MAPKs, se analizó la activación de las vías de señalización Akt-mTOR y MEK1/2-ERK1/2 en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

Las nanopartículas de fosfatidilcolina formuladas en pH 7.0 y transfectadas en concentración final de 0.1% indujeron la activación de la vía de señalización MEK-ERK1/2, incrementaron la viabilidad celular y promovieron un aumento de 20% en la proliferación. Estos efectos biológicos se correspondieron con un aumento en el contenido del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y su localización celular alterada según observaciones mediante inmunofluorescencia.

Los resultados del presente estudio sugieren que altas concentraciones de fosfatidilcolina, formando estructuras nanoparticuladas cargadas negativamente, podrían inducir cambios fisicoquímicos en la membrana plasmática que alteren la localización celular de EGFR y/o su actividad, facilitando la acumulación del receptor en el citoplasma, lo que estaría asociado a una activación incrementada de la vía MEK-ERK1/2 e inducción de la progresión del ciclo celular.

Los efectos descriptos fueron observados específicamente para las nanopartículas formuladas en pH 7.0, pero no para las formuladas en pH 5.0; se propone que esto podría estar en relación a las diferencias en carga neta y morfología asociadas a las partículas, ya que no se obtuvieron diferencias significativas en tamaño. Considerando entonces que las nanopartículas de fosfatidilcolina formuladas en pH 5.0 no mostraron efectos biológicos significativos sobre las células de cáncer de mama, se estima que éstas serían las más seguras para administrar agentes antimitóticos.

La interpretación de la interacción entre los nanotransportadores con los receptores de membrana es un tema que debe ser evaluado exhaustivamente para lograr así una mejor

comprensión de los efectos biológicos promovidos. El presente estudio remarca la importancia de la investigación de los efectos de los vehículos ampliamente utilizados en el área farmacéutica y demuestra que se deben considerar los posibles efectos biológicos de las formulaciones basadas en fosfatidilcolina. Asimismo, estudios acerca de los posibles efectos biológicos de las nanopartículas de fosfatidilcolina en células normales serían de gran utilidad para expandir el conocimiento acerca de sus potenciales usos farmacéuticos. Los efectos de los excipientes sobre la fisiología normal y la biología celular representan importantes factores a tener en cuenta durante el desarrollo racional farmacéutico.

5.2 Colaboración en Dpto. de Tecnología Farmacéutica

“Solubility of amphotericin B in water-lecithin-dispersions and lecithin-based submicron emulsions”

Claudia Salerno, Sebastián Pérez, Ezequiel Monteagudo, Adriana Carlucci and Carlos Bregni. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences (2013) 26, 189-193.

Las dispersiones acuosas de lecitina fueron estudiadas en la literatura y hasta están presentes hoy día en el mercado. La lecitina es un excipiente ampliamente usado debido a su excelente biocompatibilidad y sus dispersiones en agua son fáciles de preparar usando una agitación intensa entre los 40 y 60°C de modo de permitir una buena hidratación. Se destaca que además de la sencillez del procedimiento tecnológico, no es necesario el agregado ni de lípidos ni de surfactantes.

Por otro lado, las emulsiones submicrónicas se definen como emulsiones con diámetros de tamaño medio comprendidos entre 50 y 1000 nm y que están preparadas usando surfactantes GRAS ("Generally recognized as safe" by US Food and Drug Administration), que pueden además ser elaboradas a nivel industrial. Han recibido gran atención últimamente como sistemas de liberación de fármacos pobremente solubles que pueden ser vehiculizados en cantidades importantes en su fase oleosa sin la necesidad de agregar excipientes potencialmente tóxicos, o intermediarios de elaboración como los solventes. Tienen buen potencial de escalado industrial por su relación costo-eficiencia, su simpleza de elaboración y su gran estabilidad física.

La Leishmaniasis es una enfermedad endémica en más de 70 países que es causada por parásitos del género *Leishmania* spp. La presentación cutánea es la forma clínica prevalente de esta enfermedad. Existe una necesidad de desarrollo de formas farmacéuticas tópicas para el tratamiento de esta patología, en especial para ser asociada a las terapias orales en uso.

La anfotericina B, es un fármaco antifúngico poliénico que también presenta actividad antileishmaniásica y es una de las pocas drogas disponibles para el tratamiento de esta

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

enfermedad pero su liberación parenteral está asociada con hemólisis y nefrotoxicidad. Está actualmente comercializada bajo la forma de micelas mixtas, liposomas y complejos lipídicos, aunque las últimas dos formas han mostrado éxito en reducir los efectos adversos, su costo restringe su utilidad clínica. Por el contrario, la presentación como micela mixta es costo-efectiva pero no pudo mejorar la tolerancia al fármaco. Así, sería útil contar con una formulación tópica de anfotericina de bajo costo que evite los efectos tóxicos causados por su administración parenteral.

En este trabajo se prepararon tanto dispersiones acuosas de lecitina como emulsiones submicrónicas basadas en lecitina para vehiculizar anfotericina B. El objetivo principal fue evaluar la factibilidad de uso de las dispersiones como vehículo útil para el fármaco y también comparar ambas formas farmacéuticas en cuanto a capacidad de carga del fármaco para evaluar la influencia del contenido de lecitina de estos sistemas sobre la solubilización de anfotericina B. Para poder comparar, se prepararon dispersiones acuosas y emulsiones submicrónicas conteniendo 1,2 y 2,4% de lecitina sin ajustar el pH del medio de preparación.

Las dispersiones con mayor contenido de lecitina mostraron un aumento de solubilización de fármaco 10 veces mejor que las de menor contenido, aunque no mejoraron significativamente la solubilidad acuosa de la anfotericina.

Las emulsiones submicrónicas conteniendo 1,2% de lecitina mostraron un aumento de 40 veces con respecto a las dispersiones de menor contenido en cuanto a capacidad de solubilización, mientras que las de mayor contenido del fosfolípido mejoraron 400 veces la solubilización de las dispersiones equivalentes.

Sin embargo, la capacidad de solubilización de las emulsiones submicrónicas con 2,4% de lecitina no fue significativamente mayor que las de 1,2%. Esto significa que no hay diferencias en el potencial de solubilización que se deba a la concentración de lecitina.

Del estudio de estabilidad llevado a cabo se destaca que las emulsiones submicrónicas cargadas con fármaco son más estables a 4°C que a temperatura ambiente; el seguimiento de la estabilidad también incluyó la medición de los índices de refracción, el tamaño medio de las nanopartículas y espectroscopía UV para observar agregados. Este último parámetro no mostró agregación del fármaco en las emulsiones submicrónicas en ningún caso; de todas

maneras la estabilidad es una de las propiedades de las formulaciones que deben ser mejorados para estudios posteriores.

Se concluyó que las dispersiones acuosas de lecitina mostraron poca capacidad de solubilización para la anfotericina B. Los resultados señalan a las emulsiones submicrónicas como apropiados sistemas de liberación. Se puede asumir que el mejoramiento de la capacidad de la solubilización es debida a la microestructura de esta formulación y no a la solubilidad de sus componentes por separado ya que es superior a la solubilidad aditiva dada por los componentes.

Más estudios son requeridos para evaluar estas emulsiones submicrónicas como potenciales formulaciones tópicas del fármaco.

6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los vehículos de siRNA basados en lípidos han resultado ser más exitosos en los estudios *in vivo*. Esto se debe a que dichas formulaciones han demostrado estar apropiadamente diseñadas para cargar moléculas de siRNA, asegurar su estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*, facilitar el ingreso celular, mejorar la vectorización celular y facilitar el transporte hacia el compartimiento intracelular deseado. A medida que más productos terapéuticos basados en siRNA ingresan a fases clínicas habiendo cumplimentado el escrutinio regulatorio asociado, existe una clara necesidad de desarrollar sistemas bien caracterizados que aseguren una calidad consistente y de esta manera un desempeño confiable.

Los ensayos clínicos preliminares pueden ser llevados a cabo usando formulaciones con estabilidad limitada y elaboradas en pequeña escala. Sin embargo, se hace necesaria una comprensión integral de los factores que influyen la estructura y la estabilidad de estas formulaciones nanoparticuladas, a fin de prevenir cualquier inconveniente relacionado con la optimización de la elaboración a escala industrial y con la estabilidad de largo plazo; dos aspectos primordiales que son requeridos para avalar ensayos clínicos de envergadura y un eventual uso comercial.

El desarrollo concomitante de la caracterización biofísica que pueda mejorar la comprensión del ensamblado y estabilidad de estos complejos es crítica. Esta caracterización es también requerida para diseñar, seleccionar, desarrollar y optimizar formulaciones de forma confiable. La caracterización fisicoquímica constituye así la base del desarrollo de una estrategia de control analítico efectivo de los sistemas de liberación de siRNA (Kapoor et al., 2012).

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue diseñar, formular y evaluar dos sistemas nanoparticulados basados en fosfatidilcolina para la vehiculización de oligonucleótidos, en particular de siRNA, a la línea celular de epitelio mamario tumoral MCF-7 y a una línea celular de epitelio no tumoral, como la MDCK.

Específicamente, se buscó relacionar el comportamiento *in vitro* de los sistemas nanoparticulados con los valores obtenidos para los parámetros de caracterización biofísica empleados. Este se plantea como un objetivo muy ambicioso, considerando que la bibliografía reconoce ausencia de comparación sistémica entre diferentes protocolos, líneas celulares, tipos de ensayos y aún modelos *in vivo* usados, observándose a menudo resultados inconsistentes y controversiales (Bruno, 2011). Así, se evaluó morfología, distribución, tamaño medio y carga superficial de partícula habida cuenta de lo descrito en la bibliografía en cuanto a la influencia de estas variables en la interacción con las membranas y maquinarias enzimáticas celulares. Además, estos parámetros pueden ser utilizados para obtener información acerca de la estabilidad física de los sistemas.

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

6.1 Lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC)

6.1.1 Elaboración y evaluación inicial de las formulaciones

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

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

En cuanto a la esterilización, el proceso inicial utilizando calor húmedo mediante autoclavado, demostró la factibilidad de este tipo de procedimiento en todas las formulaciones.

La selección preliminar de las fórmulas mediante electroforesis en geles de agarosa permitió evaluar la capacidad de unión de siRNA de cada uno de los sistemas, seleccionando así el medio diluyente más apropiado. Sólo se logró evidenciar unión del siRNA en los lipoplexos preparados a pH 5.0 y pH 7.0, pero no se evidenció la formación de complejos entre el siRNA y las formulaciones preparadas en agua y glicerol. Esto es consecuente con el hecho de que el medio condiciona la morfología y las características fisicoquímicas de los sistemas y por ende las interacciones fisicoquímicas que pueden establecer, tanto entre sí como con el oligonucleótido (Walter et al., 2000).

Estos resultados se podrían relacionar en primera instancia con la presencia de cloruro de sodio y sales de fosfato o acetato en los medios dispersantes de pH regulado utilizados, lo

cual colabora al incremento de la fuerza iónica. Es conocido que a medida que aumenta la fuerza iónica del medio, disminuye la concentración micelar crítica (CMC) así como el tamaño de las estructuras formadas. Walter y col. estudiaron este efecto en soluciones reguladoras conteniendo cloruro de sodio en distintas concentraciones, sacarosa y urea, concluyendo que la CMC decrece en soluciones con alto contenido de sales. Asimismo, Huang reportó que en soluciones acuosas de lecitina, las sales de cloruro primero aumentan levemente la CMC y luego la decrecen, a medida que aumenta la fuerza iónica (Huang, 1997). Se deduce que esto puede entonces contribuir a la formación rápida y facilitada en medios de esta naturaleza de partículas definidas tipo lipoplexo al asociarse la fosfatidilcolina con el oligonucleótido.

Si bien resultados obtenidos en estudios posteriores (Pérez et al., 2012) indicaron asociación de las formulaciones seleccionadas con el siRNA en un amplio rango de relaciones N/P, para los valores más bajos sólo las formulaciones de pH 5.0 mostraron muy leve unión, mientras que directamente no se observó unión para las formulaciones de pH 7.0 por debajo de N/P 100. Dados los valores de potencial zeta obtenidos en los ensayos subsiguientes, esto podría estar relacionado con una mayor disponibilidad de la colina en la cabeza polar de la fosfocolina que se da en los sistemas a pH 5.0.

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

Recientemente, Bouarab et al. publicaron un trabajo que bien podría considerarse una continuación de la técnica descrita para la obtención de nuestros vehículos. Prepararon nanoliposomas en base a lecitina de salmón extraída por un proceso enzimático y a dos lecitinas comerciales, Phospholipon 85G (conteniendo 89.5% de fosfatidilcolina, Lipoid Phospholipid, GmbH Alemania) y PL-DHA (fosfolípidos del ácido docosahexanóico, DHA, Polaris, Francia). Comenzaron con la preparación de vesículas grandes unilamelares (LUVs) a partir de 2 g de cada una de las lecitinas a las que se le agregó 98 g de solución acuosa de pH 7 para obtener una dispersión de lecitina 2% p/p, es decir una proporción idéntica a nuestro caso. Estos sistemas fueron usados como vehículos de una molécula hidrofóbica, el

ácido cinámico; luego del agregado del fármaco, la suspensión fue mezclada durante 4 horas bajo agitación y en atmósfera inerte de N₂. Luego la mezcla fue sonicada a 25°C, 40 kHz y a 30% de potencia total durante 30 segundos hasta obtener una dispersión homogénea. Finalmente, la suspensión fue extruída 11 veces a través de filtros de policarbonato (100 nm de tamaño de poro) a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase de las vesículas. En el trabajo, se compararon los efectos de estas tres composiciones diferentes sobre las propiedades de encapsulación del fármaco, tamaño, movilidad electroforética, temperatura de transición de fases y fluidez. También evaluaron la morfología por TEM e hicieron un estudio reológico de las formulaciones, realizando finalmente un estudio de estabilidad primaria de las mismas (Bouarab et al., 2014). Se menciona este trabajo porque además de utilizar prácticamente las mismas condiciones de dispersión de fosfatidilcolina, varían la técnica de preparación usando una combinación de los procesos de sonicación y extrusión, que resultan en la formación de nanoliposomas con distribución de tamaño homogéneo; lo cual es la técnica de elección a escala industrial, porque permite el control del rango de tamaño, así como del índice de polidispersión.

6.1.2 Caracterización fisicoquímica y morfológica

Los análisis por microscopía electrónica mostraron el tamaño nanométrico de las partículas obtenidas; un dato relevante para el cual está confirmada su relación con la distribución *in vivo*, la estabilidad, la toxicidad y la llegada al sitio blanco (Mohanraj & Chen, 2006; Singh & Lillard, 2009).

Por otro lado y en forma más específica, la caracterización morfológica de los vectores liposomales de siRNA ha sido descripta como una herramienta útil para entender la estructura relativa, la orientación de las moléculas de siRNA y el ensamblado de los complejos; esto afecta además a la estabilidad del complejo tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las nanopartículas obtenidas a pH 5.0 mostraron una morfología esférica, aunque irregular, con importante aglomeración inter-particular. El tamaño medio observado estuvo entre 200 y 250nm, con un alto índice de poli-dispersión, indicativo de la baja estabilidad física de las mismas. El potencial zeta de estas nanopartículas fue de entre +14 mV y +24 mV.

Las partículas fueron luego cargadas con siRNA a diferentes relaciones N/P, reevaluándose el tamaño de partícula y potencial zeta adquiridos luego de la carga del oligonucleótido. Para este ensayo se usaron las formulaciones conteniendo 25 mM de fosfatidilcolina, dada la mayor inestabilidad macroscópica que presentaron los sistemas más concentrados luego de períodos cortos de almacenamiento.

Al cargar las partículas con siRNA se observó una forma más esférica, y una leve variación en los valores de tamaño medio, con una tendencia a disminuir con el agregado del oligonucleótido. Asimismo, los valores de potencial zeta se volvieron negativos al formarse los complejos tipo lipoplexo PC-siRNA.

Silvander y col. (1996) prepararon vesículas unilamelares pequeñas (SUV) a través de irradiación ultrasónica de muestras conteniendo lecitina 0.5% p/v en medio buffer pH 7.4 (10 mM Tris-HCl con 150 mM NaCl). Prepararon dispersiones madre que fueron sonicadas durante una hora y diluidas con buffer a la concentración final. En nuestro trabajo, usamos agitación adicional mediante homogeneización de altas revoluciones previa a la sonicación y un buffer de similar pH así como también de pH 5.0; las concentraciones de NaCl en nuestro caso fueron 109 mM para las formulaciones de pH 5.0 y 78 mM para las de pH 7.0. Es decir, que ellos trabajaron a una concentración de lecitina cuatro veces inferior y a una mayor fuerza iónica del medio. En esas condiciones, demostraron la formación de vesículas de lecitina mediante técnicas de dispersión de luz y crio-TEM. Por lo tanto, se puede proponer que los sistemas obtenidos a pH 5.0 forman estructuras tipo vesícula bicapa, conteniendo medio dispersante en su interior, y que el alto grado de aglomeración se debe a que las vesículas no serían capaces de lograr una repulsión inter-partícula efectiva; esta situación podría estar en relación con la proporción relativa del fosfolípido y la fuerza iónica resultante del medio.

Silvander también reportó que el agregado de un compuesto aniónico promueve la transición de las vesículas de fosfatidilcolina a una estructura micelar. Si se considera que el grupo colina y el fosfato de la cabeza zwitteriónica de la PC pueden actuar en forma independiente (Walter et al., 2000), es posible que el oligonucleótido pueda establecer interacciones electrostáticas con la cabeza polar de la fosfolina, lo que cambiaría el radio de curvatura de la nanopartícula imitando los cambios morfológicos que se observan en la transición vesícula-micela. Entonces, el agregado de siRNA cambiaría tanto la fuerza iónica

del medio como las interacciones en y con las partículas lo cual resultaría en el cambio morfológico de los lipoplexos preparados en buffer pH 5.0 hacia estructuras más esféricas y la disminución del tamaño observada a medida que disminuye la relación fosfatidilcolina:siRNA (menores relaciones N/P). El cambio de signo observado para el potencial zeta y la tendencia a valores más negativos a medida que la relación N/P decrece estaría indicando la nueva organización de los componentes, y que al menos algunas moléculas de siRNA se estarían ubicando en la superficie del lipoplexo.

Por otro lado, las nanopartículas obtenidas a pH 7.0 mostraron un tamaño medio de entre 180 y 200 nm, exhibiendo también un alto índice de poli-dispersión. En este caso, se describieron estructuras más alargadas, con formas localmente cilíndricas tanto en las nanopartículas aisladas como en las aglomeradas. El potencial zeta observado para estas partículas fue negativo. Al ser incorporado el siRNA se observó una conservación de la morfología tipo cilíndrica, aunque disminuyó significativamente el número y tamaño de los aglomerados. Los valores de potencial zeta se mantuvieron negativos, pero de mayor valor absoluto comparado con el de las partículas vacías.

Almgren y colaboradores estudiaron el fenómeno de auto-ensamble de la fosfatidilcolina en diferentes condiciones experimentales; demostraron la presencia de estructuras hexagonales cilíndricas y en algunos casos la coexistencia de éstas con vesículas y micelas. Otros autores como Chen et al. (2008) y Walter et al. (2000), también describieron este tipo de morfología en los sistemas que estudiaron. Esto podría explicar lo observado en la preparación de las nanopartículas a pH 7.0, en las que se presentó una morfología cilíndrica predominante; este tipo de morfología también explicaría la baja estabilidad física observada. Con el agregado de siRNA los valores de potencial zeta se vuelven más negativos, lo que estaría indicando que al menos algunas moléculas de siRNA se estarían ubicando en la superficie del lipoplexo. Esta interacción estaría favorecida por la nueva organización adoptada que permitiría la unión del oligonucleótido con el nitrógeno cuaternario de la cabeza polar de la fosfocolina.

Comparando los resultados obtenidos en nuestro trabajo para las formulaciones a pH 7.0 con los presentados por Bouarab et al. (2014), quienes usaron prácticamente la misma composición cuali-cuantitativa pero la técnica de sonicación-extrusión, ellos demostraron la

naturaleza bicapa de las vesículas a través de micrografías, confirmando que se obtienen nanoliposomas, entendiendo a estos sistemas como estructuras bicapa continuas cerradas.

En conclusión y en concordancia con los estudios de Walter et al., se observó la influencia que el pH y la fuerza iónica del medio ejercen sobre la estructura adoptada por las partículas. El modelo que propusieron estos autores consiste en tres estados; uno representado por el estado vesicular o bicapa, el segundo por una región de coexistencia con estructuras bicapas mixtas y micelas, y finalmente una región micelar mixta.

Los equilibrios de interacciones fisicoquímicas que se dan en las preparaciones a pH 5.0 y 7.0 serían muy diferentes entre sí. Esta diferencia, a su vez, podría explicar las diferentes características físicoquímicas observadas y, teóricamente, distintos efectos biológicos.

No sólo la cuestión de si las vesículas representan verdaderas estructuras de equilibrio está planteada de forma ambigua, sino que también sigue sin respuesta la cuestión de la exacta secuencia de su evolución estructural y la existencia de estructuras intermedias como redes conectadas o bicapas perforadas (Egelhaaf & Schurtenberger, 1997).

Si bien mediante microscopía electrónica se evidencia en forma directa la morfología de las partículas, aunque en campos seleccionados, la técnica de DLS informa el valor de radio hidrodinámico que es mayor que el tamaño real de la partícula, pero a partir de la intensidad de la luz dispersada por la muestra completa. Esta característica tiene su correlato con el proceso de Investigación y Desarrollo a nivel industrial, el cual utiliza las técnicas microscópicas en la etapa de desarrollo de las formulaciones como una manera de estimar la morfología a través de su visualización directa; mientras que las técnicas de DLS son las más apropiadas para los estudios de estabilidad y establecimiento de las especificaciones para el control de calidad posterior.

Tendencia en Asuntos Regulatorios

Resulta interesante concluir esta parte de la discusión de los LP-PC haciendo referencia a las exigencias actuales que las Entidades regulatorias promueven para las solicitudes que involucran administración endovenosa de Sistemas tipo liposomales, habida cuenta que

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

constituyen la línea de investigación más avanzada como Sistemas de liberación de siRNA; y a que los sistemas desarrollados en el presente trabajo obedecen a esa clasificación. Según las Normas ICH vigentes para la aprobación de un producto liposomal de administración endovenosa desarrollado con referencia a un producto liposomal innovador, la experiencia con este tipo de formulaciones es limitada. Como resultado, sólo se ofrecen recomendaciones generales en una publicación del 2013, en la que se solicita y se anima además a las compañías farmacéuticas a que investiguen las bases científicas que se consideren necesarias y apropiadas para ser relacionadas con los datos requeribles a la hora de demostrar la comparabilidad entre ambas formulaciones liposomales (*EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02. Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. 21 February 2013*).

El documento aclara como premisa general que la calidad farmacéutica impacta sobre la farmacocinética y la farmacodinamia, que la velocidad de liberación del fármaco puede afectar la seguridad y/o eficiencia del producto, y que si el fármaco está atrapado en el interior puede no estar biológicamente disponible y puede estar protegido del metabolismo y/o degradación.

También establece que la formulación afecta al ingreso celular y a la biodistribución del fármaco en los tejidos; es decir que se deberá tener sumo cuidado en la determinación de las propiedades fisicoquímicas del liposoma, el estado fisicoquímico del fármaco encapsulado y las interacciones entre componentes del liposoma y el entorno biológico.

La comparabilidad farmacéutica se hace antes de los ensayos no clínicos para definir la necesidad de extensión de los mismos. Así, la caracterización de calidad de los liposomas incluye la presentación obligatoria de los ítems que se detallan a continuación:

- Componentes lipídicos (descripción, fuente, caracterización, elaboración, perfil de impurezas, isómeros y características de estabilidad).
- Otros excipientes: calidad, pureza, y estabilidad.
- Productos intermedios: identificación y control de intermediarios clave durante la fabricación.

- Relación activo/grupos lipídicos: en etapas clave de elaboración para corroborar que están dentro del rango aceptable que asegura las características de la formulación.

- Propiedades del liposoma: morfología, tamaño medio, distribución de tamaño, formación de agregados.

- Principio activo: fracción encapsulada (cantidad libre/entrampada).

- Estabilidad del activo, los lípidos y los excipientes funcionales en el producto final: cuantificación de productos de degradación críticos (ej. liso-fosfatidilcolina, grupos hidrolíticos/oxidados).

Se deberán presentar además métodos de liberación *in vitro* confiables, discriminativos y validados que deberán ser desarrollados para monitorear la liberación simulada del activo de los liposomas en un medio fisiológico y clínicamente relevante; se deberá monitorear la estabilidad en el almacenamiento y bajo las condiciones de uso propuestas; y se deberá demostrar robustez del proceso para la etapa de reconstitución de la preparación en la farmacia.

También, dentro de las exigencias requeridas para la caracterización de la calidad y dependiendo de la función específica de los liposomas, los siguientes parámetros adicionales podrán ser adicionalmente considerados durante la solicitud:

- Mantenimiento de la integridad de la formulación en plasma.

- Caracterización del comportamiento de transición de la fase bicapa lipídica (ej. temperatura y entalpía de transiciones).

- Determinación de la carga “superficial” del liposoma.

- pH del compartimiento interno (liposomas sensibles a gradientes de pH).

- Caracterización del estado físico del activo dentro del liposoma.

- Distribución del activo dentro del liposoma (superficie, bicapa, interior).

Finalmente, para ensayos clínicos y no clínicos se deberán considerar y presentar los datos de depuración del vehículo liposomal, porque tanto el volumen de distribución como la depuración del fármaco vehiculizado dependen directamente del mismo.

6.1.3 Citotoxicidad de los vehículos

Si bien muchos autores sostienen que parte de los requisitos necesarios para la implementación de los sistemas nanoparticulados en la clínica parecen estarse logrando, la toxicidad de los mismos sigue siendo una cuestión fundamental a tener en cuenta. Es por ello que la citotoxicidad de los sistemas propuestos es un parámetro a determinar en las fases tempranas de su desarrollo.

Considerando los resultados obtenidos respecto a la capacidad de los vehículos basados en PC de unir siRNA, se analizó la citotoxicidad de aquellos preparados en pH 5.0 y pH 7.0 tanto sobre la línea celular de epitelio mamario tumoral MCF-7 como sobre la línea celular de epitelio renal canino normal MDCK. Los resultados evidenciaron que las formulaciones propuestas no resultan tóxicas en el rango de concentraciones evaluado, que se corresponde con los volúmenes utilizados para los posteriores ensayos *in vitro* sobre dichas líneas celulares. Tampoco se observaron cambios en comparación con las formulaciones esterilizadas, por lo que se consideró innecesario agregar un paso previo de esterilización para la realización del resto de los ensayos.

Es importante mencionar el comportamiento diferencial observado para la formulación de fosfatidilcolina 25mM pH 7.0 en los dos tipos celulares analizados, ya que mientras el tratamiento con la misma en células MDCK no arrojó diferencias respecto de las células sin tratar, se observó un leve efecto proliferativo al trabajar con las células MCF-7 de cáncer de mama. Esto se corresponde con los resultados obtenidos en estudios complementarios que se realizaron sobre los efectos de las formulaciones sobre las vías de transducción de señales involucradas en proliferación y supervivencia celular, para evaluar si las formulaciones basadas en fosfatidilcolina presentaban actividad promitogénica *per sé* sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama (*ver Sección 5. Colaboraciones*). A raíz de estos estudios se concluyó que, de los lipoplexos diseñados, aquellos formulados en pH 5.0 serían en primera

instancia los más seguros para administrar agentes antimetabólicos dirigidos a células neoplásicas. Se remarca así la importancia de la investigación exhaustiva de aquellos vehículos ampliamente utilizados en el área farmacéutica, debiendo considerarse los posibles efectos biológicos de las formulaciones basadas en fosfatidilcolina.

6.1.4 Internalización celular y eficiencia de silenciamiento

Tanto los lipoplexos basados en fosfatidilcolina formulados a pH 5.0 como a pH 7.0 fueron capaces de internalizar el oligonucleótido vehiculizado en ambas líneas celulares transfectadas. Las micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia permitieron observar que el dsRNA marcado ingresó al citoplasma y se ubicó en la región perinuclear.

Generalmente, los vectores no virales ingresan a la célula mediante endocitosis (Kuhn, 2014). La endocitosis de nanopartículas implica la formación de endosomas tempranos que luego maduran a endosomas tardíos, los cuales finalmente se fusionan con los lisosomas para la degradación de las moléculas endocitadas. Para que el siRNA que ingresa al citoplasma celular pueda incorporarse a la maquinaria de silenciamiento génico debe escapar esta vía de degradación endo-lisosomal.

Si bien está ampliamente descrito que los vehículos no virales basados en lípidos ingresan vía endocitosis, no se puede asegurar cuáles serían las interacciones que disparan este mecanismo en nuestro caso, porque todas las nanopartículas cargadas con siRNA (LP-PC) tuvieron potencial zeta negativo; si bien se ha propuesto que la internalización de partículas cargadas negativamente ocurriría a través de una unión no específica y reclutamiento de las mismas en sitios catiónicos de la membrana plasmática, con su subsecuente endocitosis. También se ha estudiado el ingreso celular de nanopartículas de óxido de cerio en función del potencial zeta, variando el pH de la solución; y los resultados indicaron un ingreso celular más eficiente de las nanopartículas cargadas negativamente en células de adenocarcinoma de pulmón en comparación a las cargadas positivamente. Sin embargo, generalmente se reconoce un bajo nivel de interacción e internalización celular para las partículas neutras y negativas en comparación con las cargadas positivamente, que se sabe se unen a grupos de carga negativa presentes en la superficie celular como el ácido siálico y

translocan a través de la membrana plasmática. Por este motivo, éstas últimas siguen siendo de primera elección en terapia génica (Verma & Stellacci, 2010).

La caracterización morfológica es una herramienta útil para la optimización de la formulación, ya que se ha demostrado la correlación entre la morfología del lipoplexo y su eficiencia de transfección; los lipoplexos de siRNA caracterizados como estructuras más chicas son habitualmente más eficaces, al menos *in vitro*, en comparación a estructuras de capas concéntricas mayores. Esto implicaría un ingreso endocítico más eficiente de estos complejos más chicos pero también apropiado escape endosomal (Desigaux et al., 2007).

Debido a que la morfología es influenciada por la relación de carga y la estructura del componente lipídico, estos factores afectarán la eficiencia de transfección, pero el tiempo de incubación también es otra variable a optimizar durante el desarrollo (Kapoor et al., 2012).

Un ingreso celular eficiente se corresponde usualmente con silenciamiento efectivo a menos que el escape endosomal sea el paso limitante de la velocidad (Mendonca et al., 2010). Para nuestros sistemas desarrollados, si bien hemos observado que los lipoplexos basados en fosfatidilcolina presentan eficiente capacidad de unión de siRNA e incluso de transporte hacia el interior de ambos tipos celulares, no pudimos comprobar fehacientemente que dicha vectorización sea eficiente para mediar la disminución en la expresión de un gen blanco en las células MCF-7 por ajuste de condiciones del ensayo. Sin embargo, sí se logró evidenciar una disminución de la expresión en las células MDCK transfectadas, en las cuales tanto el siRNA anti lámina A/C vehiculizado con el reactivo comercial de transfección HiPerFect® como el vehiculizado con los sistemas diseñados tuvieron efecto de silenciamiento de la expresión de la lámina nuclear. Dicho efecto sería algo más marcado para las células transfectadas con los lipoplexos pH 5.0, al observarse mayor atenuación de la señal fluorescente dentro de los campos analizados.

No obstante, dado que se podría suponer que la fosfatidilcolina por sí sola posee una eficiencia limitada para desestabilizar la membrana de las vesículas endosomales y que de esta manera todo el siRNA vehiculizado llegue a liberarse e incorporarse a la maquinaria de silenciamiento génico en el citoplasma celular, se planteó que la optimización de los sistemas

por el agregado de agentes desestabilizantes de membrana como las sales biliares podría colaborar en este sentido.

6.1.5 Estabilidad de las formulaciones

Las formulaciones resultaron ser inestables luego del período de almacenamiento evaluado, obteniendo mediante mediciones por DLS tamaños medios de partícula muy superiores a los de tiempo cero. Esto evidenció la agregación de las partículas, en correspondencia con importante sedimentación ya a partir de los primeros días de almacenadas.

Bouarab et al. (2014) analizaron la estabilidad luego de 30 días de almacenamiento de nanoliposomas preparados con una composición cuali-cuantitativa muy similar a la nuestra pero mediante procesos de preparación más sofisticados, obteniendo suspensiones liposomales con muy bajo índice de polidispersión (menor a 0.2) y una distribución de tamaños estrecha, con una consecuente alta estabilidad. Además, no observaron precipitación en las muestras. En este caso, ellos atribuyeron que realizaron el paso final de extrusión durante el procesamiento a fin de obtener vesículas unilamelares nanométricas con una distribución de tamaño homogénea.

Estos resultados demuestran la importancia de la técnica de preparación en un sistema de este tipo, ya que nuestras formulaciones podrían presentar una estabilidad inicial de muy corto plazo debida a la composición del medio utilizado y la fuerza iónica presente, pero encontrarse exentas de un paso final de extrusión por poros de tamaño estrecho, no presentaron estabilidad a largo plazo. Esto planteó la necesidad de optimización de los sistemas, tanto a partir de modificaciones en la técnica como de cambios cualitativos de su composición, prosiguiendo con el desarrollo de sistemas mixtos de fosfatidilcolina y sales biliares.

6.2 Lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares (LP-PC/SB)

6.2.1 Elaboración y evaluación inicial de las formulaciones

En el campo de las ciencias farmacéuticas, las micelas de sales biliares y los sistemas mixtos derivados son objeto de investigación intensiva dado su potencial como sistemas de transporte (“carrier”) de drogas. Una de las ventajas de utilizar dichos sistemas es el incremento de la solubilidad del fármaco en presencia de micelas de sales biliares o micelas mixtas, formadas generalmente con lípidos (Wiedmann & Kamel, 2002). Es así que las mezclas binarias de sales biliares y fosfatidilcolina han sido muy estudiadas en las últimas décadas, ya que la presencia de la sal biliar modifica la modalidad característica de la fosfatidilcolina en el autoensamble.

Las composiciones de fosfatidilcolina : sal biliar utilizadas en el presente trabajo fueron seleccionadas en base a la capacidad máxima de solubilización de la fosfatidilcolina por la sal biliar según reportes previos (Hammad & Müller, 1998; Dürr et al, 1994; Smidt et al, 1994) y conservando la concentración final de 2% p/v usada para los LP-PC.

Dado que se conoce que en los sistemas formulados la sal biliar es el excipiente que aporta mayor toxicidad, y teniendo en cuenta los resultados previos de ausencia de toxicidad de los LP-PC formulados a concentraciones de fosfatidilcolina aún mayores que las presentes en estos sistemas, la selección preliminar de las formulaciones mediante ensayos de viabilidad celular sobre la línea celular MCF-7 permitió descartar *a priori* las composiciones que resultaron ser marcadamente citotóxicas.

Todas las fórmulas conteniendo desoxicolato de sodio (SDC) presentaron muy elevada citotoxicidad (al menos 80%), por lo que fueron descartadas en esta etapa y se prosiguió con la evaluación detallada de los sistemas conteniendo colato de sodio (SC). Estos resultados se pueden corresponder con la mayor actividad membranolítica del SDC en comparación con el SC, la cual si bien es disminuída al encontrarse asociado en sistemas mixtos con fosfatidilcolina, las concentraciones de ambos componentes y el tipo de sal biliar utilizada

resultan críticos para las propiedades fisicoquímicas finales adoptadas y su interacción con las membranas celulares.

Se sabe que la concentración de fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina, en la bilis es alta, y que en presencia de sales biliares se forman sistemas mixtos: vesículas mixtas o micelas mixtas, dependiendo de la proporción lípido/surfactante. Dicha asociación disminuye la actividad monomérica de las sales biliares previniendo la solubilización y efecto membranólítico en la membrana apical de las células epiteliales (Ross et al., 2004).

Garidel y col. publicaron un estudio detallado en el que concluyeron que menor cantidad de SDC es necesaria para la solubilización de membranas comparada con SC, presentando el primero mayor actividad membranólítica. De acuerdo a su naturaleza química, la hidrofobicidad del SDC es mayor porque presenta dos grupos hidroxilo comparado con el SC que posee tres grupos; como consecuencia, las propiedades de solubilización y agregación son bastante diferentes. Esta importante dependencia de la hidrofobicidad de las sales biliares se refleja en los coeficientes de partición, siendo el de SC mucho menor al de SDC, lo que indica una incorporación más facilitada del SDC en la membrana. Esta diferencia en los coeficientes de partición refleja también la actividad membranólítica del surfactante (Garidel et al., 2007).

6.2.2 Caracterización fisicoquímica y morfológica

Se obtuvieron partículas en el rango de los 80 – 150 nm para los sistemas PC:SC 1:1 y 1:2 en agua, 1:1 y 1:2 pH 5.0, y 1:1 pH 7.4; en los otros casos se obtuvieron partículas en el rango de los 7 – 70 nm. Las distribuciones de tamaño medio fueron obtenidas con bajo índice de polidispersión en general, hecho que avala la presencia de poblaciones homogéneas de nanopartículas, excepto para algunas de las formulaciones preparadas en agua y en relación 1:2. Se puede apreciar que a mayores proporciones de colato de sodio se obtienen partículas de menor tamaño. Estos resultados concuerdan con evidencias previas que demostraron que el tamaño, estructura y composición de los agregados resultantes de la mezcla de fosfolípidos con sales biliares depende de la relación entre ambos componentes (Müller, 1981).

Walter y col. midieron turbidez mediante DLS como indicador indirecto de los cambios microestructurales de vesículas de fosfatidilcolina al ir agregando cantidades sucesivas de colato de sodio (Walter et al., 1991). Llegaron a la conclusión que la PC al ser dispersada en soluciones acuosas forma estructuras de tipo bicapa compatibles con vesículas, y que el agregado de la sal biliar provoca la transición a estructuras más pequeñas lo que se evidencia por la disminución de la turbidez de la solución; las estructuras resultantes aparecen como puntos pequeños uniformes, indicativo de micelas esféricas. Estos resultados fueron también corroborados por el grupo de Chen y col. Ellos describieron que mezclas de fosfolípidos y surfactantes como las sales biliares forman estructuras anfifílicas mixtas, cuya naturaleza depende de las cantidades relativas de fosfolípido y surfactante. En este trabajo se demostró claramente la formación de pequeñas micelas a altas relaciones surfactante/lípido, mientras que a relaciones muy bajas los fosfolípidos predominantes forman vesículas de membrana bicapa con surfactante incorporado (Chen et al., 2008). Más aún, se demostró que la bicapa fosfolipídica de las vesículas es desintegrada debido a la adición de altas concentraciones de sales biliares, a relaciones sal biliar : fosfatidilcolina ≥ 4 , formándose micelas mixtas (Venneman et al., 2002). Podría proponerse en nuestro trabajo, entonces, que a bajas proporciones de colato de sodio se obtuvieron pequeñas vesículas unilamelares, mientras el aumento del porcentaje de SC condujo a la formación de micelas mixtas. Estos resultados se corresponden a su vez con las diferencias macroscópicas observadas en las formulaciones preparadas, con baja turbidez cuando las estructuras predominantes son vesículas, y transparencia cuando lo son las micelas mixtas. Cabe destacar que los sistemas presentando estructuras vesiculares no mostraron signos de floculación, en concordancia con el hecho de que sus valores absolutos de potencial zeta fueron superiores a 15 mV, por lo cual se espera una aceptable estabilidad coloidal de los mismos debido a las fuerzas repulsivas dominantes.

Las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de las formulaciones con mayor y menor contenido de SC permitieron ver una morfología esférica de las partículas semejante en todos los casos; sin embargo, se pudo apreciar una diferencia en cuanto a la microestructura interna de las mismas. En el caso de las formulaciones con proporciones iguales de PC:SC, se observó una circunferencia exterior diferenciada del centro, atribuible a una vesícula;

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

mientras que para las formulaciones con relación PC:SC 1:8, se apreció una estructura homogénea, concordante con una forma micelar (Silvander et al., 1996).

Garidel y col. describieron el proceso de transición de liposomas hacia micelas mixtas mediante el agregado de soluciones concentradas de surfactante a dispersiones lipídicas, el llamado proceso de “solubilización”. Así vieron que en presencia de muy bajas cantidades de surfactante, algunas moléculas son incorporadas en la capa externa de la membrana lipídica, incrementándose a medida que aumenta la concentración del surfactante. En esta etapa, existe una distribución de monómeros de surfactante entre la fase lipídica de la membrana y la fase acuosa, con la formación de vesículas mixtas. También ocurre un proceso *flip-flop*, transportando el surfactante a la capa interna de la membrana y viceversa hasta que se alcanza el equilibrio. Luego, se alcanza una concentración crítica de surfactante donde las bicapas lipídicas se encuentran saturadas con surfactante y las vesículas comienzan a desorganizarse, cambiar su morfología y fragmentar en micelas mixtas. Ambas estructuras coexisten hasta que luego de posteriores agregados de surfactante todas las vesículas desaparecen y la “solubilización” es completa. Se diferencia a su vez entre micelas mixtas ricas en lípido y micelas mixtas ricas en surfactante, con menores tamaños de partícula y presentes a mayores relaciones surfactante/lípido (Garidel et al., 2007).

Aunque no se encontró una correlación clara entre la carga de los nanovehículos con el siRNA y el tamaño de partícula obtenido, se pudo observar en la mayoría de los casos que las nanopartículas ya cargadas negativamente previo a la carga del oligonucleótido disminuyeron levemente su potencial zeta luego de dicha adición, lo que indicaría que el oligonucleótido se encontraría, al menos en parte, en la superficie de las partículas (Omedes Pujol et al., 2013). Se ha descrito que la encapsulación de siRNA en liposomas se puede conseguir durante o luego de su preparación. En el caso del entrapamiento del siRNA posterior a la preparación liposomal, éste ocurre como resultado de interacciones electrostáticas lípido-siRNA, seguido de una reestructuración de las capas lipídicas (Kapoor et al., 2012); por lo que el entrapamiento del oligonucleótido en los lipoplexos podría asimismo ocurrir como resultado de las interacciones lípido-siRNA y reorganización de la estructura de la nanopartícula.

6.2.3 Evaluación de la capacidad de carga de siRNA

Como técnica cuantitativa para determinar la capacidad de unión de siRNA por las fórmulas, se realizaron ensayos de desplazamiento por fluorescencia, de acuerdo a reportes previos en bibliografía (Dorasamy et al., 2009; Pérez et al., 2009; Geall & Blagbrough, 2000).

Los resultados indicaron una importante unión de siRNA por parte de los vehículos diseñados, siendo ésta superior al aumentar el contenido relativo de colato de sodio (SC) en cada formulación. El incremento en la afinidad por el oligonucleótido para los sistemas conteniendo mayor proporción de SC podría corresponderse a la menor carga negativa asociada a la superficie de dichas nanopartículas, de acuerdo a los resultados de potencial zeta obtenidos. A su vez, debemos considerar las diferencias en tamaño como otro importante factor, ya que las partículas más pequeñas podrían estar presentando una mayor superficie relativa expuesta y una relación tamaño/carga más conveniente para incorporar siRNA, lo que podría también colaborar a la mayor afinidad observada para las estructuras micelares obtenidas a mayores proporciones de SC.

Al presentar los resultados agrupados de acuerdo a las distintas relaciones PC:SC formuladas, se evidenció que para una misma relación PC:SC la afinidad de unión al siRNA fue mayor para los sistemas de pH 7.4 que para los formulados a pH 5.0, y ambas fueron a su vez mayores que la afinidad obtenida por los sistemas formulados en agua desionizada. A partir de estos resultados podríamos sugerir que la presencia de sales en los medios regulados e isotonizados colabora al incremento de la fuerza iónica del medio y así a la disminución de la concentración micelar crítica (CMC), lo que facilitaría la obtención de estructuras micelares con eficiente relación tamaño/carga para unir siRNA.

Por otro lado, dentro de una misma relación PC:SC, podría ocurrir que a pH 5.0 la carga positiva del nitrógeno cuaternario de la fosfatidilcolina estuviese menos disponible como consecuencia de la morfología predominante adoptada, lo que implicaría una menor interacción con el oligonucleótido, teniendo en cuenta además que el colato estaría con menor carga y polaridad, afectando la conformación adoptada por la nanopartícula. Si bien es conocido que el colato tiene un pKa de 4.63 (25°C, 150 mM de fuerza iónica), esta constante se torna mayor en presencia de otros lípidos o surfactantes, con los que el colato tiende a formar hetero-agregados; esto se debería a la menor polaridad y al menor potencial de

repulsión electrostática en la superficie de tales agregados. Así, varios autores sugirieron que en condiciones fisiológicas el pKa es de 4.80 (37°C, 150 mM de fuerza iónica) para una solución acuosa de colato por debajo de la CMC, y que cambia a un valor de 6.91 cuando el colato es unido a bicapas de PC originalmente electroneutras, en las mismas condiciones de medición. Es muy probable, entonces, que este aumento en el pKa del SC sea un fenómeno que ocurre también en la preparación de nuestros vehículos; este aumento dependerá de la proporción de PC presente y de la naturaleza y fuerza iónica del medio dispersante en cada formulación, y afectaría consecuentemente a la capacidad de unión de siRNA (Elsayed & Cevc, 2011).

Cabe destacar que si bien los valores obtenidos de potencial zeta fueron negativos para todos los sistemas evaluados, todos presentaron afinidad por el siRNA en mayor o menor medida. Este fenómeno ya ha sido descrito para el caso de los nanoliposomas basados en lípidos aniónicos o zwitteriónicos usados como vectores de liberación de siRNA potencialmente más seguros que los basados en lípidos catiónicos. El atrapamiento de siRNA y la eficiencia de liberación con estos lípidos por sí mismos, es sin embargo, debatible debido a la ausencia de interacciones electrostáticas que mejoren el acomplejamiento con el siRNA. Los intentos de preparar liposomas aniónicos conteniendo siRNA sin utilizar un agente adicional mostraron en general pobre eficiencia de encapsulación (7-9%), pero hubo casos como el de Halder et al. (2006) quienes prepararon nanoliposomas neutros con DOPC que dieron eficiente silenciamiento para el gen de la quinasa de adhesión focal en un modelo de tumor de ovario en ratones.

6.2.4 Citotoxicidad de los vehículos

La citotoxicidad que presentan muchos de los sistemas propuestos en la literatura para la vehiculización de drogas es lo que en general limita su aplicación terapéutica. Es por ello que se analizó la citotoxicidad de las formulaciones seleccionadas en el rango de concentraciones a usar para los ensayos de transfección.

La toxicidad sobre las células tumorales MCF-7 observada para los sistemas fue mayor a medida que la proporción de colato en cada formulación aumenta, resultando las fórmulas

PC:SC 1:8 las más citotóxicas. Estos resultados concuerdan con reportes previos que demostraron que la fosfatidilcolina atenúa los efectos citotóxicos de los ácidos cólicos (Tan et al., 2013), por lo que las diferencias observadas podrían deberse tanto al efecto tóxico del colato de sodio mismo, como a la disminución del contenido de fosfatidilcolina en la formulación.

Las propiedades anfipáticas de las sales biliares que permiten la solubilización de lípidos, son también las responsables de su toxicidad. En condiciones fisiológicas las sales biliares son esencialmente biosurfactantes aniónicos capaces de promover actividad membranolítica (Garidel et al., 2007). En ese sentido, se ha reportado que el aumento de la fuerza iónica induce cambios en la carga negativa de las sales biliares, disminuyendo la CMC de las mismas; esto podría estar ocurriendo en nuestro caso con la formación de micelas en el medio regulado e isotonado con NaCl y a composiciones con alta proporción de colato, lo que estaría justificando la disminución del tamaño de las nanopartículas obtenidas y de los efectos electrostáticos con la consecuente solubilización facilitada de las micelas en las membranas. Esto estaría en concordancia con la mayor citotoxicidad demostrada por la relación PC:SC 1:8.

En cuanto al medio de formulación, los sistemas preparados en solución reguladora pH 5.0 resultaron los menos citotóxicos. Esto podría estar relacionado con dos aspectos diferentes: a) las diferencias observadas en la ionización del colato de sodio y la subsecuente superficie relativa expuesta y b) los cambios biológicos de señalización intracelulares inducidos por las nanopartículas. Cabral et al. ya habían demostrado el amplio rango de pKa aparente de los ácidos biliares en distintos ambientes moleculares; para los ácidos cólicos, estos valores van desde 4.6 (debajo de la CMC) hasta 7.3 (para vesículas ácido biliar:PC en relación 3:97 p/p). Debido a estas diferencias y como ya se discutió previamente, podría ocurrir que a pH 5.0 la carga positiva del nitrógeno cuaternario de la fosfatidilcolina estuviese menos expuesta como consecuencia de la morfología predominante adoptada. Por otro lado, se evidenció que para los lipoplexos basados en PC existen efectos biológicos concomitantes sobre la señalización y proliferación en células MCF-7, dados tanto por la composición como por el medio de formulación (Pérez et al., 2012). Es decir, la morfología y la carga asociada a las nanopartículas, resultan también parámetros interesantes de conocer para, de ser posible,

correlacionarlos con los mecanismo de interacción entre las distintas composiciones de los nanovehículos y los elementos constitutivos de la membrana celular, de los que resultarán la naturaleza y magnitud de los efectos biológicos que se disparen.

Por otro lado, cabe destacar que se verificó que ninguna de las formulaciones seleccionadas para los ensayos de transfección *in vitro* sobre las células MDCK (PC:SC 1:2 y 1:4, pH 5.0 y 7.4) arrojara signos de citotoxicidad en dicha línea celular, al no observarse diferencias significativas en comparación con las células control sin tratar; esto al realizar los análisis con los mismos volúmenes de formulación que serían luego utilizados para los ensayos de transfección a una relación N/P 100, ya que que a mayores relaciones ya se observaban efectos citotóxicos y cambios morfológicos importantes al microscopio sobre las células transfectadas.

6.2.5 Internalización celular y eficiencia de silenciamiento

Considerando los resultados obtenidos de citotoxicidad y su correlación con la eficiencia de carga de siRNA, se seleccionaron los sistemas PC:SC 1:2 y 1:4 para realizar los ensayos *in vitro* de vehiculización intracelular de dsRNA fluorescente y eficiencia de silenciamiento génico mediado por siRNA.

La internalización del oligonucleótido vehiculizado se evaluó a través de la observación por microscopía de fluorescencia de la transfección de dsRNA marcados con distintos fluorocromos, siendo los mismos internalizados por una proporción significativa de células; en contraste, el dsRNA desnudo no fue detectado luego del período de incubación. Si bien estos ensayos no constituyen una técnica cuantitativa precisa para comparar eficiencia de internalización entre los distintos vehículos, los resultados obtenidos permitieron confirmar la habilidad cierta de los vehículos diseñados para vehiculizar los oligonucleótidos al interior de ambas líneas celulares.

Generalmente se reconoce un bajo nivel de interacción e internalización celular para las partículas neutras y negativas en comparación con las cargadas positivamente, que se sabe se unen a grupos de carga negativa presentes en la superficie celular como el ácido siálico y

translocan a través de la membrana plasmática (Verma & Stellacci, 2010). Sin embargo, los lipoplexos cargados negativamente también han sido asociados a buenas eficiencias de transfección. La eficacia *in vivo* de estos sistemas se especula que se debe a la adsorción de factores de promotores fagocíticos tales como α 2-macroglobulina, IgG y proteínas C reactivas sobre la superficie. Alternativamente, la carga aniónica podría alterar la conformación de las proteínas integrales de membrana, lo que mejoraría el reconocimiento celular (Kapoor et al., 2012).

Debemos tener en cuenta, sin embargo, que es común la degradación del siRNA en la vía de internalización endo-lisosomal, por lo que un ingreso celular eficiente se corresponde usualmente con silenciamiento génico efectivo a menos que el escape endosomal sea el paso limitante de la velocidad (Mendonca et al., 2010). Es por ello que se investigó la eficiencia del silenciamiento de la expresión de actina a partir del siRNA transfectado por nuestros vehículos a las células MCF-7, obteniendo resultados dependientes tanto de la relación PC:SC como del medio utilizado en cada formulación. Los lipoplexos formulados a pH 5.0 resultaron los sistemas más versátiles sobre esta línea celular, ya que silenciaron eficientemente la expresión de actina tanto en sus composiciones PC:SC 1:2 como 1:4. No obstante, al evaluar la eficiencia de silenciamiento de la expresión de lámina nuclear a partir del siRNA transfectado a las células MDCK, se observó efecto de silenciamiento a partir de las transfecciones realizadas con los sistemas PC:SC 1:2 y 1:4 a pH 7.4. Esto indica que si bien algunos vehículos generarían un silenciamiento génico eficaz a partir del siRNA transfectado en ambos tipos celulares, otros limitarían su efectividad a una línea celular determinada, al menos en las condiciones de ensayo evaluadas.

6.2.6 Estabilidad de las formulaciones

Las formulaciones resultaron ser estables luego del período de almacenamiento evaluado, obteniendo mediante mediciones por difracción láser dinámica (DLS) tamaños medios de partícula muy similares a los de tiempo cero, con poblaciones de tamaño homogéneas correspondientes a bajos valores de polidispersión en general.

Los resultados llamativos de los sistemas de relación PC:SC 1:8 formulados en pH 5.0 y 7.4, donde se produjo una apreciable disminución del tamaño de partícula luego del período de conservación, se podrían relacionar con una transición aún parcial de vesículas a micelas en el momento de su medición a tiempo cero, dado que se ha descripto que para composiciones lípido/surfactante con alta concentración de éste último y en condiciones de elevada fuerza iónica, esta progresión hacia el estado micelar se completa luego de etapas previas que implican coexistencia entre las distintas estructuras. Es así que Garidel y col., en su estudio del proceso de transición de liposomas hacia micelas mixtas mediante el agregado de soluciones concentradas de surfactante a dispersiones lipídicas, postularon que se alcanza una concentración crítica de surfactante donde las bicapas lipídicas se encuentran saturadas con dichas moléculas y las vesículas comienzan a desorganizarse, cambiar su morfología y fragmentar en micelas mixtas, coexistiendo ambas estructuras hasta conseguir la “solubilización” completa (Garidel et al., 2007).

Suponemos que este mismo fenómeno podría estar explicando en parte el aumento en valor absoluto obtenido para el potencial zeta en las distintas composiciones de PC:SC luego de su formulación inicial, lo que se correspondería a su vez con la estabilidad física de los mismos al presentar valores absolutos superiores a 15 mV y aumentar así los efectos repulsivos entre las partículas.

Es de destacar que la estabilidad física obtenida para los vehículos desarrollados es comparable con la reportada para algunos sistemas de lipoplexos catiónicos, los cuales a pesar de su mayor toxicidad poseen un alto nivel de interacción e internalización celular y por ello siguen siendo de primera elección en terapia génica (Verma & Stellacci, 2010). Es así que Geusens et al. (2009) estudiaron la estabilidad de lipoplexos catiónicos compuestos de DOTAP / colato de sodio con siRNA durante 28 días a 4°C, observando que el tamaño de partícula fue consistente luego del período de almacenamiento evaluado.

6.2.7 LP-PC/SB como posibles vehículos de DNA plasmídico

Los resultados obtenidos de la eficiencia de carga de los lipoplexos con dos plásmidos diferentes, de extensión (cantidad de pares de bases) marcadamente distinta, mediante ensayos

de desplazamiento con SYBR Green sugieren que algunas de las formulaciones diseñadas para uso como vehículos de siRNA constituirían también sistemas adecuados para su uso como vehículos de vectores plasmídicos.

Hay que tener en consideración, sin embargo, que la mayor afinidad del vehículo por el plásmido no siempre se corresponde con una mayor expresión del mismo una vez transfectado, ya que la liberación del pDNA una vez internalizado implica la ruptura de mayor cantidad de interacciones con el vehículo y/o los lípidos catiónicos del endosoma en comparación con el siRNA o pequeños oligonucleótidos. Es por ello que, bajo similares condiciones, se podría observar efecto silenciador del siRNA liberado a partir de un nanocarrier lipídico pero no expresión de un DNA plasmídico vehiculizado (Li et al., 2007).

En forma similar a lo observado al cargar los vehículos con siRNA, la asociación del pDNA al lipoplexo fue mayor para los sistemas con mayor contenido relativo de SC, salvo en dos casos aislados. Por otro lado, algunas mediciones preliminares de tamaño de partícula mediante DLS arrojaron valores superiores al comparar un mismo vehículo cargado con plásmido en lugar de siRNA, lo que se correspondería con el mayor tamaño del plásmido y con la distinta capacidad y grado de empaquetamiento e interacción con la nanopartícula.

Aunque el siRNA o los oligonucleótidos antisentido tienen propiedades fisicoquímicas similares a los plásmidos de DNA, carecen de la capacidad para condensarse en nanopartículas con la consecuente neutralización con lípidos catiónicos o, en nuestro caso, el nitrógeno cuaternario de la cabeza polar fosfocolina. Una molécula de pDNA puede colapsar para formar una nanopartícula mientras que se necesitan múltiples siRNAs para formar una estructura similar (Bruno, 2011).

Si bien resta continuar con la evaluación de los LP-PC/SB como posibles y eficientes vehículos de vectores plasmídicos, podríamos suponer entonces que estas diferencias de comportamiento estarían relacionadas a su vez con las distintas formas de interacción entre el pDNA o el siRNA y los vehículos desarrollados, así como con la afinidad diferencial observada para ciertas composiciones.

Conclusiones

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

7 CONCLUSIONES

Se desarrollaron y estudiaron sistemas nanoparticulados basados en fosfatidilcolina para su uso como vehículos para la administración *in vitro* de siRNA en líneas celulares normales y de cáncer de mama. El desarrollo racional farmacéutico incluyó una caracterización fisicoquímica detallada en paralelo a una evaluación biológica funcional correlacionada con los resultados obtenidos.

El diseño racional de estas formulaciones basadas en excipientes conocidos y aceptables aún para administración endovenosa, permitió su optimización a partir de la evaluación conjunta de composición, microestructura y comportamiento biológico, estableciendo en forma preliminar su potencial uso como propuesta segura, promisoría y no explorada aún para la Terapia Génica Antisentido.

Los lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC) diseñados constituyen un sistema basado en excipientes de reconocida biocompatibilidad y fueron capaces de mejorar algunas de las desventajas atribuidas normalmente a los vectores no virales, como pobre ingreso celular o alta citotoxicidad. En el diseño experimental propuesto no fue necesario agregar ningún lípido o surfactante catiónico, de reconocida toxicidad, para mejorar la capacidad de carga del oligonucleótido. La técnica de elaboración fue sencilla, siendo la eficiencia de carga conseguida por medio de la optimización de parámetros críticos en el proceso de fabricación, tales como pH y fuerza iónica.

Los lipoplexos formulados a pH 5.0 y 7.0 mostraron mejor capacidad de carga del oligonucleótido a amplios rangos de relaciones N/P y fueron caracterizados en cuanto a tamaño, morfología e interacción con el siRNA, relacionando dichas variables con los efectos biológicos asociados en cuanto a citotoxicidad, ingreso celular y eficiencia de silenciamiento génico. Si bien los sistemas seleccionados no exhibieron citotoxicidad y presentaron significativa capacidad de unión de siRNA e incluso de transporte hacia el interior de las células con localización perinuclear, sólo se pudo demostrar la eficiente vectorización para mediar la disminución en la expresión de un gen blanco en la línea celular no tumoral MDCK.

Los lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares (LP-PC/SB) fueron diseñados entonces a partir de un desarrollo racional surgido de la necesidad de optimización de los lipoplexos formulados previamente. Estos vehículos si bien comparten las ventajas de biocompatibilidad con los sistemas propuestos en primera instancia, permiten una mayor versatilidad de composiciones y modificación de sus parámetros biofísicos, con la correspondiente factibilidad de escalado industrial y posibilidad de traslación a la clínica luego de evaluaciones ulteriores.

La composición de los sistemas así como las condiciones de transfección fueron optimizadas a fin de obtener sistemas nanoparticulados capaces de cargar siRNA eficientemente y promover su vehiculización hacia el interior de las células, obteniendo mayor unión del oligonucleótido para las composiciones con mayor contenido relativo de colato de sodio (SC). Se minimizó la citotoxicidad de los sistemas y se comprobó la eficiencia de las composiciones PC:SC 1:2 y 1:4 para silenciar la expresión de un gen blanco en células tumorales MCF-7, resultando los vehículos formulados a pH 5.0 los más versátiles; mientras que las mismas composiciones a pH 7.4 resultaron eficaces para silenciamiento génico en las células normales MDCK. Las evaluaciones fueron realizadas en paralelo con algunos de los reactivos de transfección comerciales *in vitro* más utilizados y reconocidos. Se realizó asimismo la caracterización fisicoquímica de los vehículos, consistente con estructuras vesiculares o micelares mixtas de acuerdo a la proporción relativa de colato en las composiciones ensayadas, y comprobó la estabilidad física de las formulaciones propuestas.

Como estudio adicional, se evaluó la posibilidad de utilizar los LP-PC/SB diseñados para vehiculizar DNA plasmídico (pDNA), ya sea para lograr el silenciamiento de un gen blanco mediante la expresión de un shRNA o con otros fines. Los resultados preliminares obtenidos sugieren que algunas de las formulaciones propuestas para uso como vehículos de siRNA constituirían también sistemas adecuados para su uso como vehículos de vectores plasmídicos.

Es de destacar que la producción de vectores no virales efectivos para uso en Terapia Génica constituye el mayor desafío, aún no resuelto, para el paso a la etapa de ensayos clínicos, ya que con varios agentes terapéuticos propuestos, los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* muchas veces no tienen un correlato con los observados luego *in vivo*. En este

aspecto se debe considerar las propiedades particulares de los sistemas nanométricos así como la relevancia que ha adquirido en el último tiempo el estudio detallado de los efectos celulares no deseados y asociados con los excipientes (Choa et al., 2015), aún los reconocidos como biocompatibles. Es por ello que complementariamente, en colaboración con el IQUIFIB, se estudiaron los efectos biológicos de los vehículos nanoparticulados desarrollados sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, con especial énfasis en la alteración de las vías de señalización que son activadas por reconocidos segundos mensajeros de la PC y que involucran iniciación, progresión y migración celular relacionados con procesos neoplásicos, para así poder determinar la utilidad de las diferentes formulaciones como eventuales nanovectores de moléculas de siRNA dirigidas a proteínas sobreexpresadas en dichas patologías. Mientras algunos de los sistemas resultaron inocuos, otros de similar composición cuali-cuantitativa indujeron efectos proliferativos a partir de alteraciones en la expresión del receptor EGFR, proteína susceptible de silenciamiento génico para terapia antitumoral.

Estos resultados sugieren que en el diseño experimental se deben evaluar los efectos biológicos de las formulaciones desarrolladas, más allá de que se conozcan los mismos para sus constituyentes aislados. Se propone, entonces, una modalidad novedosa de trabajo interdisciplinario con el objetivo de optimizar sistemas nanofarmacéuticos que resulten alternativas promisorias para posteriores investigaciones que podrían incluir estudios *in vivo* o *ex vivo*.

Finalmente, debemos destacar que se trabajó con excipientes biocompatibles, bien caracterizados, aprobados por entidades regulatorias y de reconocida función. Las formas farmacéuticas propuestas son coloides que están disponibles en el mercado como vehículos de fármacos convencionales, lo que favorece su factibilidad de optimización para un traslado efectivo a ensayos clínicos con una transferencia concreta a la Terapia Génica. Dentro de las ventajas comparativas que presentan como sistemas de vehiculización también se cuenta la eficiencia mejorada para el ingreso celular debido a sus nanodimensiones; esto permite, para el caso de las células neoplásicas, proveer un mecanismo de vectorización pasivo de los oligonucleótidos terapéuticos.

Resumen

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

8 RESUMEN

El silenciamiento de genes por interferencia con ARN (iRNA) es un proceso biológico natural que implica la acción de pequeños ARN de interferencia (siRNA). La demostración de este fenómeno advirtió acerca de su potencial para ser utilizado con fines de inhibir la sobreexpresión de proteínas involucradas en diferentes patologías, incluyendo iniciación y progresión del cáncer. Sin embargo, la producción de vectores no virales efectivos para uso en Terapia Génica constituye el mayor desafío, aún no resuelto, para el paso a la etapa de ensayos clínicos.

El objetivo general del presente trabajo de Tesis fue el estudio, interpretación y optimización de formas farmacéuticas nanométricas utilizadas por la Tecnología Farmacéutica como sistemas de liberación de fármacos convencionales, para la administración *in vitro* de siRNA en células MCF-7 de cáncer de mama y células normales tipo MDCK. El desarrollo racional de estas formulaciones permitió la correlación entre composición, microestructura y comportamiento biológico, para aportar de esa manera a la comprensión de su potencial uso como propuesta segura, promisorio y no explorado aún para la Terapia Génica Antisentido.

El diseño experimental incluyó el desarrollo racional farmacéutico en paralelo a la evaluación biológica, para poder alcanzar la optimización de: i) Lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC) y, ii) Lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares (LP-PC/SB).

El desarrollo de los lipoplexos basados en fosfatidilcolina, que tomó como ventaja inicial la reconocida biocompatibilidad del excipiente, implicó su preparación en diferentes concentraciones y medios dispersantes, evaluando luego la eficiencia de unión con el oligonucleótido a distintas relaciones N/P (es decir, número de cargas positivas aportadas por las formulaciones sobre el número de cargas negativas aportadas por los grupos fosfatos de las moléculas de siRNA). Los sistemas seleccionados fueron luego evaluados en cuanto a citotoxicidad *in vitro* en las líneas celulares utilizadas y caracterizados en términos de distribución de tamaño medio de partícula, potencial zeta y morfología mediante microscopía

electrónica. Los vehículos formulados en condiciones de mayor fuerza iónica tanto a pH 5.0 como a pH 7.0 mostraron eficiente capacidad de unión con siRNA en un amplio rango de relaciones N/P, sin presentar signos de citotoxicidad en ningún caso. No fue necesario agregar ningún lípido o surfactante catiónico, de reconocida toxicidad, para mejorar la capacidad de carga del oligonucleótido. La técnica de elaboración fue sencilla, siendo la eficiencia de carga conseguida por medio de la optimización de parámetros críticos en el proceso de fabricación, tales como pH y fuerza iónica. Mediante la caracterización fisicoquímica de los sistemas se observaron partículas de tamaño nanométrico y morfología dependiente de las características del medio de formulación empleado. Al ser los vehículos diseñados transfectados en paralelo con los reactivos comerciales Lipofectamina® y HiPerFect®, se observó que los sistemas propuestos presentaron eficiente transporte del oligonucleótido hacia el interior de la célula y con preferente localización perinuclear. Si bien no se pudo demostrar concretamente que dicha vectorización fuese eficiente para mediar la disminución en la expresión de un gen blanco en la línea celular tumoral MCF-7, sí se evidenció eficiencia de silenciamiento génico sobre la línea celular MDCK.

Los lipoplexos basados en fosfatidilcolina y sales biliares (LP-PC/SB) fueron luego diseñados a partir de un desarrollo racional surgido de la necesidad de optimización de los lipoplexos basados en fosfatidilcolina (LP-PC). Se obtuvieron vehículos con baja citotoxicidad, alta capacidad de carga de siRNA y buena transfección. Las composiciones de los sistemas consistieron en distintas relaciones molares de fosfatidilcolina y colato de sodio (PC:SC) con una concentración total de 2% p/v, utilizando como medios dispersantes agua desionizada o soluciones acuosas reguladoras.

Se obtuvieron nanopartículas con tamaños por debajo de los 150 nm y forma esférica, con menores tamaños a medida que la proporción relativa de SC se incrementó, lo que dio cuenta de la presencia de pequeñas vesículas en las formulaciones con baja proporción de SC y suspensiones micelares mixtas a porcentajes mayores de SC. Las características macroscópicas, junto con los valores obtenidos para los parámetros fisicoquímicos, se correspondieron con este tipo de estructuras. Se observó una importante unión de los vehículos con el oligonucleótido, la cual fue mayor para los sistemas con mayor contenido de

SC. Dentro de la misma relación molar PC:SC, el orden de eficiencia de unión de acuerdo al medio de formulación fue el siguiente: pH 7,4 > pH 5.0 > agua desionizada.

Considerando la citotoxicidad y la capacidad de carga de siRNA observada para los distintos vehículos, se seleccionaron los sistemas PC:SC 1:2 y 1:4 para los ensayos de transfección *in vitro*. Los resultados mostraron que los lipoplexos seleccionados fueron capaces de inducir internalización celular del oligonucleótido y mediar el eficiente silenciamiento de un gen blanco, con comportamiento diferencial de acuerdo al tipo celular ensayado. Resultados preliminares obtenidos sugieren además que algunas de dichas formulaciones propuestas para uso como vehículos de siRNA constituirían también sistemas adecuados para su uso como vehículos de DNA plasmídico (pDNA).

9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. *Garland Science*, New York.

Alexis F., Rhee J-W., Richie J.P. (2008). New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urologic oncology: seminars and original investigations*, 26, 1, 74-85.

Allen T.M., Cullis P.R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303, 1818-1822.

Almgren M. (2000). Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1508, 23, 146–163.

Almofti M.R., Harashima H., Shinohara Y., Almofti A., Baba Y., Kiwada H. (2003). Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 410, 246–253.

Barenholz Y. (2012). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160, 117-134.

Barichello J.M., Ishida T., Kiwada H. (2010). Complexation of siRNA and pDNA with cationic liposomes: the important aspects in lipoplex preparation. *Methods in Molecular Biology*, 605, 461-72.

Basile L, Pignatello R, Passirani C. (2012). Active targeting strategies for anticancer drug nanocarriers. *Current Drug Delivery*, 9, 255-268.

Berns K., Horlings H.M., Hennessy B.T., et al (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12, 395-402.

Bertrand N., Wub J., Xu X. et al (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2–25.

Bosselmann S., Williams R.O. (2012). Has nanotechnology led to improved therapeutic outcomes? *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 38, 158–170.

Bouarab L., Maherani B., Kheiolomoom A. (2014). Influence of lecithin-lipid composition on physic-chemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115: 197-204.

Bowtle W.J. (2007). Oral lipid-based formulations: enhancing the bioavailability of poorly wáter-soluble drugs. Chapter 4: “Materials, process and manufacturing consideration for lipid-based hard-capsule formats”. *CRC Press*, Boca Raton, USA.

Brajtburg J., Elberg S., Kobayashi G.S., Bolard J. (1994). Amphotericin B incorporated into egg lecithin-bile salt mixed micelles: molecular and cellular aspect relevant to therapeutic efficacy in experimental mycoses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 2, 300-306.

Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 631-51.

Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296, 550-553.

Bruno K. (2011). Using drug-excipient interactions for siRNA delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 1210–1226.

Burger H.J., Schuetz J.D., Schuetz E.G., Guzelian P.S. (1992). Paradoxical transcriptional activation of rat liver cytochrome P-450 3A1 by dexamethasone and the antigluocorticoid pregnenolone 16 alpha-carbonitrile: analysis by transient transfection into primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 89, 2145–2149.

Burnett J.C., Rossi J.J. (2012). RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry and Biology*, 19, 60–71.

Cabral D.J., Hamilton J.A., Small D.M. (1986). The ionization behavior of bile acids in different aqueous environments. *Journal of Lipid Research*, 27, 334–344.

Carey M.C., Small D.M. (1972). Micelle formation by bile salts. Physical-chemical and thermodynamic considerations. *Archives of Internal Medicine*, 130, 4, 506-527.

Cecchetti S., Spadaro F., Lugini L., Podo F., Ramoni C. (2007). Functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in regulating CD16 membrane expression in natural killer cells. *European Journal of Immunology*, 37, 10, 2912–2922.

Chawla J.S., Amiji M.M. (2003). Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. *AAPS PharmSci*, 5, Article 3. Available from <http://www.aapsj.org/articles/ps0501/ps050103/ps050103.pdf>.

Chen H., Guo Z., Yu F., Ki J. et al (2008). Influence of La³⁺ ions on the egg-yolk phosphatidylcholine and sodium taurocholate self-assemblies in aqueous suspension. *Journal of Colloid and Interface Science*, 328, 158–165.

Choa E.J., Suna B., Doha K-O., Wilsona E.M., Torregrosa-Allenc S., Elzeyc B.D., Yeoa Y. (2015). Intraperitoneal delivery of platinum with in-situ crosslinkable hyaluronic acid gel for local therapy of ovarian cancer. *Biomaterials*, 37, 312–319.

Coskun U., Grzybek M., Drechsel D., Simons K. (2011). Regulation of human EGF receptor by lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 22, 9044–9048.

Creixell M., Peppas N.A. (2012). Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance. *Nano Today*, 7, 367-379.

Cui Z., Qiu F., Sloat B.R. (2006). Lecithin-based cationic nanoparticles as a potential DNA delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 313, 206-213.

Cukierman E., Khan D.R. (2010). The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochemical pharmacology*, 80, 762-770.

Dangi J.S., Vyas S.P., Dixit V.K. (1998). The role of mixed micelles in drug delivery. I. Solubilization. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24, 7, 681-684.

Davis M.E. (2009). The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Molecular Pharmacology*, 6, 659-668.

Davis M.E., Brewster M.E. (2004). Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3, 1023-1035.

Desigaux L., Sainlos M., Lambert O., Chevre R., Letrou-Bonneval E., Vigneron J.P., Lehn P., Lehn J.M., Pitard B. (2007). Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 104, 16534-16539.

Dial E.J., Rooijackers S.H., Darling R.L., Romero J.J., Lichtenberger L.M. (2008). Role of phosphatidylcholine saturation in preventing bile salt toxicity to gastrointestinal epithelia and membranes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23, 3, 430-436.

Dorasamy S., Singh M., Ariatti M. (2009). Rapid and sensitive fluorometric analysis of novel galactosylated cationic liposome interaction with siRNA. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3, 12, 632-635.

Drummond D.C., Meyer O., Hong K. et al (1999). Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological reviews*, 51, 4, 691-744.

Duane W.C., Wiegand D.M. (1980). Mechanism by which bile salt disrupts the gastric mucosal barrier in the dog. *The Journal of Clinical Investigation*, 66, 1044 -1049.

Dürr M., Hager J., Lohr J.P. (1994). Investigation on mixed micelle and liposome preparations for parenteral use based on soya phosphatidylcholine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 40, 147-156.

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

Eastman S.J., Siegel C., Tousignant J., Smith A.E., Cheng S.H., Scheule R.K. (1997). Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1325, 41–62.

Elbashir S.M. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-498.

Eldar-Boock A., Polyak D., Scomparin A., Satchi-Fainaro R. (2013). Nano-sized polymers and liposomes designed to deliver combination therapy for cancer. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 682–689.

Elsayed M., Cevc G. (2011). The vesicle-to-micelle transformation of phospholipid-cholate mixed aggregates: A state of the art analysis including membrane curvature effects. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808, 1, 140-153.

EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02. *Committee for Human Medicinal Products (CHMP)*. Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. 21 February 2013.

Ernsting M.K., Murakami M., Undzys E., Aman A., Press B., Li S-D (2012). A docetaxel-carboxymethylcellulose nanoparticle outperforms the approved taxane nanoformulation, Abraxane, in mouse tumor models with significant control of metastases. *Journal of Controlled Release*, 162, 575–581.

FDA Guidance for Industry, Liposome Drug Products (2002).

Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M. (1987). Lipofection — a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 84, 7413–7417.

Ferber S., Baabur-Cohen H., Blau R. et al (2014). Polymeric nanotheranostics for real-time non-invasive optical imaging of breast cancer progression and drug release. *Cancer Letters*, 352, 81–89.

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., et al. (2013). GLOBOCAN 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France. *International Agency for Research on Cancer*. Available from: <http://globocan.iarc.fr>

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.

Florence A.T., Attwood D. (2006). Physicochemical principles of pharmacy. *Pharmaceutical Press, Royal Pharmaceutical Society*, London, UK.

Förster Y., Schwenzer B. (2008). Sensitization of cancer cells for chemo/Immuno/Radiotherapy. Chapter 20: Antisense oligonucleotides and siRNA as specific inhibitors of gene expression: mechanism of action and therapeutic potential, pp. 337-362. *Springer. Humana Press*, Totowa, NJ. Disponible en <https://books.google.com.ar/books?isbn=1597454745>.

Gándola Y., Pérez S.E., Irene P., Sotelo A., Miquet J., Corradi G., Carlucci A., González L. (2014). Mitogenic Effects of Phosphatidylcholine Nanoparticles on MCF-7 Breast Cancer Cells. *BioMed Research International*, Article ID 687037, 13 pages, doi: 10.1155/2014/687037.

Gao Z., Zhang L., Yongjun Sun Y. (2012). Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. *Journal of Controlled Release*, 162, 45–55.

Garidel P., Hildebrand A., Knauf K., Blume A. (2007). Membranolytic activity of bile salts: influence of biological membrane properties and composition. *Molecules*, 12, 2292-2326.

Geusens B., Lambert J., De Smedt S.C., Buyens K., Sanders N.N., Van Gele M. (2009). Ultradeformable cationic liposomes for delivery of small interfering RNA (siRNA) into human primary melanocytes. *Journal of Controlled Release*, 133, 214-220.

Gomez da Silva L.C., Fonseca N.A., Moura V., Pedrosa de Lima M.C., Simões S., Moreira J.N. (2012). Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges. *Accounts of Chemical Research*, 45, 7, 1163–1171.

Gooding M., Browne L.P., Quinteiro F.M., Selwood D.L. (2012). siRNA delivery: From lipids to cell-penetrating peptides and their mimics. *Chemical Biology & Drug Design*, 80, 787–809.

Goonasinghe A., Mundy E.S., Smith M., Khosravi-Far R., Martinou J.C., Esposti M.D. (2005). Pro-apoptotic Bid induces membrane perturbation by inserting selected lysolipids into the bilayer. *Biochemical Journal*, 387, 109–118.

Gorden K.B., Gorski K.S., Gibson S.J. et al (2005). Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *Journal of Immunology*, 174, 1259-68.

Gregoriadis, G. (1988). Liposomes as drug carriers. *Wiley*, New York, 1–863.

Grobmyera S.R., Zhoua G., Gutweina L.G., Iwakumab N., Sharmac P., Hochwald S.N. (2012). Nanoparticle delivery for metastatic breast cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8, S21–S30.

Gullotti E., Yeo Y. (2009) Extracellularly activated nanocarriers: A new paradigm of tumor targeted drug delivery. *Molecular Pharmacology*, 6, 1041–1051.

Halder J., Kamat A.A., Landen Jr. C.N., Han L.Y. Lutgendorf S.K., Lin Y.G., Merritt W.M., Jennings N.B., Chavez-Reyes A., Coleman R.L., Gershenson D.M., Schmandt R., Cole S.W., Lopez-Berestein G., Sood A.K. (2006). Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. *Clinical Cancer Research*, 12, 4916–4924.

Hammad M.A., Müller B.W. (1998). Increasing drug solubility by means of bile salt–phosphatidylcholine-based mixed micelles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46, 3, 361-367.

Hatakeyama H., Ito E., Akita H., Oishi M., Nagasaki Y., Futaki S., Harashima H. (2009). A pH-sensitive fusogenic peptide facilitates endosomal escape and greatly enhances the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 139, 127-132.

Hippalgaonkar K., Majumdar S., Kansara V. (2010). Injectable Lipid Emulsions - Advancements, Opportunities and Challenges. *AAPS PharmSciTech*, 11, 4, doi: 10.1208/s12249-010-9526-5.

Hofmann A.F., Mysels K.J. (1987). Bile salts as biological surfactants. *Colloids and Surfaces*, 30, 1, 145-173.

Howard K.A., Rahbek U.L., Liu X.D., Damgaard C.K., Glud S.Z., Andersen M.O., Hovgaard M.B., Schmitz A., Nyengaard J.R., Besenbacher F., Kjems J. (2006). RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system. *Molecular Therapy*, 14, 476-484.

Huang P.I., Chang J.F., Kirn D.H., Liu T.C. (2009). Targeted genetic and viral therapy for advanced head and neck cancers. *Drug Discovery Today*, 14, 570-578.

Huang Y.X. (1997). Laser light scattering studies on thermodynamics of C8-lecithin and monovalent salt solutions. *Journal of Chemical Physics*, 107, 21, 9141-9145.

Huang Y.X., Tan R.C., Li Y.L., et al (2001). Effects of salts on the formation of C8-lecithin micelles in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 236, 1, 28-34.

Ikebe M., Kitaura Y., Nakamura M., Tanaka H., Yamasaki A., Nagai S., Wada J., Yanai K., Koga K., Sato N., Kubo M., Tanaka M., Onishi H., Katano M. (2009). Lipopolysaccharide (LPS) increases the invasive ability of pancreatic cancer cells through the TLR4/MyD88 signaling pathway. *Journal of Surgical Oncology*, 100, 725-731.

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

Kabanov A.V. (1999). Taking polycation gene delivery systems from in vitro to in vivo. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 2, 365–372.

Kapoor M., Burgess D.J., Patil S.D. (2012). Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. *International Journal of Pharmaceutics*, 427, 35–57.

Kedmi R., Ben-Arie N., Peer D. (2010). The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*, 31, 6867–6875.

Kenny G.D., Kamaly N., Kalber T.L., et al (2011). Novel multifunctional nanoparticle mediates siRNA tumour delivery, visualization and therapeutic tumor reduction in vivo. *Journal of Controlled Release*, 149, 2, 111-116.

Kim H.R., Kim I.K., Bae K.H., Lee S.H., Park T.G. (2008). Cationic solid lipid nanoparticles reconstituted from low density lipoprotein components for delivery of siRNA. *Molecular Pharmaceutics*, 5, 4, 622–631.

Kim S.H., Jeong J.H., Lee S.H., Kim S.W., Park T.G. (2008). Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *Journal of Controlled Release*, 129, 107–116.

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

Kuhn D.A., Vanhecke D., Michen B., Blank F., Gehr P., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. (2014). Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5, 1625-1636.

Kulkarni S.A., Feng S.S. (2013). Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 30, 10, 2512-22. doi: 10.1007/s11095-012-0958-3.

Kundu A.K., Chandra P.K., Hazari S., Pramar Y.V., Dash S., Mandal T.K. (2012). Development and optimization of nanosomal formulations for siRNA delivery to the liver. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80, 257–267.

Lammers T., Kiessling F., Hennink W.E., Storm G. (2012). Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release*, 161, 175–187.

Lasic D.D. (1997). Liposomes in Gene Delivery. Chapter: Liposomes in the delivery of antisense oligonucleotides. *CRC Press LLC*. Boca Ratón, Florida, U.S.A.

Le Garrec D., Gori S., Luo L. et al (2004). Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 99, 83–101.

Lee J.H., Yeo Y. (2015). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*, 125, 75–84.

Lee R.J., Huang L. (1996). Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 8481-8487.

Leng J., Egelhaaf S.U., Cates M.E. (2002). Kinetic pathway of spontaneous vesicle formation. *Europhysics Letters*, 59, 2, 311–317.

Li J., Chen Y.C., Tseng Y.C. et al (2010). Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 142, 416-421.

Li W., Szoka Jr. F.C. (2007). Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharmaceutical Research*, 24, 3, 438-449

Liu F., Qi H., Huang L., Liu D. (1997). Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. *Gene Therapy*, 4, 517–523.

Liu J., Gong T., Wang C., Zhong Z., Zhang Z. (2007). Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 340, 153-162.

Liu J., Van S., Ma N., Yu L. (2012). Efficient systemic delivery of siRNA to the mouse liver by pegylated lipopolymer. *International Journal of Pharmaceutics*, 427, 58– 63.

Martin C., Chen S., Maya-Mendoza A., Lovric J., Sims P., Jackson D. (2009). Lamin B1 maintains the functional plasticity of nucleoli. *Journal of Cell Science*, 122, 1551–1562.

Martin G.P., El-Hariri L.M., Marriott C. (1992). Bile salt- and lysophosphatidyl choline-induced membrane damage in human erythrocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44, 646–660.

Miao J., Du Y., Yuan H., Zhang X., Li Q., Rao Y., Zhao M., Hu F. (2015). Improved cytotoxicity of paclitaxel loaded in nanosized lipid carriers by intracellular delivery. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 10. doi: 10.1007/s11051-014-2852-x

Midoux P., Pichon C., Yaouanc J.J., Jaffrès P.A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: A current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *British Journal of Pharmacology*, 157, 166-178

Miller A.D. (2013). Lipid-based nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. *Journal of Drug Delivery*, Article ID 165981, 9 pages, doi: 10.1155/2013/165981.

Mohanraj V.J., Chen Y. (2006). Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 561-573.

Morrissey D.V., Lockridge J.A., Shaw L., Blanchard K. (2005) Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nature Biotechnology*, 23, 8, 1002-1007.

Müller K. (1981). Structural dimorphism of bile salt/lecithin mixed micelles. A possible regulatory mechanism for cholesterol solubility in bile? X-ray structure analysis. *Biochemistry*, 20, 404–414.

Nakamura Y., Kogure K., Futaki S., Harashima H. (2007). Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nano device for siRNA. *Journal of Controlled Release*, 119, 360-367.

Navarro G., Sawant R.R., Biswas S. et al (2012). P-glycoprotein silencing with siRNA delivered by DOPE-modified PEI overcomes doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Nanomedicine*, 7, 65-78.

Needham D., Anyarambhatla G., Kong G., Dewhirst M.W. (2000). A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Research*, 60, 5, 1197-1201.

Nel A.E., Modler L., Velegol D. et al (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-biointerface. *Nature Materials*, 8, 543-557.

Nishikawa M., Huang L. (2001). Non viral vectors in the new millenium: delivery barriers in gene therapy. *Human Gene Therapy*, 12, 861-870.

Oerlemans C., Bos M., Storm G., Nijssen F W., Hennink W.E. (2010). Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release. *Pharmaceutical Research*, 27, 12, 2569–2589.

Oh N., Park J.H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 51-63.

Oh Y.K., Park T.G. (2009). siRNA delivery systems for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 850-62.

Oivanen M., Kuusela S., Lönnberg H. (1998). Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by Brønsted acids and bases. *Chemical Reviews*, 98, 961-990.

Oliveira D.M., Goodell, M.A. (2003). Transient RNA interference in hematopoietic progenitors with functional consequences. *Genesis*, 36, 4, 203-208.

Omedes Pujol M., Coleman D.J.L., Allen C.D., Heidenreich O., Fulton D.A. (2013). Determination of key structure-activity relationships in siRNA delivery with a mixed micelle system. *Journal of Controlled Release*, 172, 3, 939–945.

Ozpolat B., Sood A.K., Lopez-Berestein G. (2010). Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *Journal of Internal Medicine*, 267, 44-53.

Paris L., Cecchetti S., Spadaro F. et al. (2010). Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C downregulates HER2 overexpression on plasma membrane of breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 12, 3, article R27.

Park H.S., Jung H.Y., Park E.Y., Kim J., Lee W.J., Bae Y.S. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *Journal of Immunology*, 173, 3589–3593.

Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J. (2005a). Biophysical characterization of anionic lipoplexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1711, 1–11.

Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J. (2005b). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *The AAPS Journal*, 7, Article 9.

Pector V., Backmann J., Maes D., Vandenbranden M., Ruyschaert J.M. (2000). Biophysical and structural properties of DNA.diC(14)-amidine complexes. Influence of the DNA/lipid ratio. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 29533–29538.

Peer D., Karp J.M., Hong S. et al (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2, 751-760.

Peer D., Lieberman J. (2011). Special delivery: targeted therapy with small RNAs. *Gene Therapy*, 18, 1127–1133.

Pekovic V., Harborth J., Broers J.L.V., Ramaekers F.C.S., van Engelen B., Lammens M., von Zglinicki T., Foisner R., Hutchison C. and Markiewicz E. (2007). Nucleoplasmic

LAP2{alpha}-lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts. *Journal of Cell Biology*, 176, 163-172.

Peng Z. (2005). Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Human Gene Therapy*, 16, 1016–1027.

Pérez A.P., Romero E.L., Morilla M.J. (2009). Ethylenediamine core PAMAM dendrimers/siRNA complexes as in vitro silencing agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 380, 189-200.

Pérez S.E., Gándola Y., Carlucci A.M., González L. (2015). Development, characterization and in vitro evaluation of phosphatidylcholine-sodium cholate-based nanoparticles for siRNA delivery to MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 3, 1-15.

Pérez S.E., Gándola Y., Carlucci A.M., González L., Turyn D., Bregni C. (2012). Formulation strategies, characterization and in vitro evaluation of lecithin-based nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Drug delivery*, Article ID 986265, 9 pages. doi:10.1155/2012/986265

Pike L.J. (2008). The challenge of lipid rafts. *The Journal of Lipid Research*, 50, 323-328.

Pon R.T.P., Borys N. (2009) Lyso-thermosensitive liposomal Doxorubicin: a novel approach to enhance efficacy of thermal ablation of liver cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 10, 2, 333-343.

Reischl D., Zimmer A. (2009) Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems (review). *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 5, 8–20.

Ross, B.P., Braddy, A.C., McGeary, R.P., Blanchfield, J.T., Proklai, L., Toth, I. (2004). Micellar aggregation and membrane partitioning of bile salts, fatty acids, sodium dodecyl sulfate, and sugar-conjugated fatty acids: correlation with hemolytic potency and implications for drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 1, 3, 233-245.

Tesista: FARM. SEBASTIAN E. PEREZ
Directora: Prof. Dra. Adriana Carlucci

Schroeder A., Levins C.G., Cortez C., Langer R., Anderson D.G. (2010). Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *Journal of Internal Medicine*, 267, 1, 9-21.

Semple S.C., Akinc A., Chen J., Sandhu A.P., Mui B.L., Cho C.K., Sah D.W., Stebbing D., Crosley E.J. et al (2010). Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature Biotechnology*, 28, 172-176.

Shah P., Bhalodia D., Shelat P. (2010). Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1, 1, 24-32.

Shchipunhov Y.A. (1997). Self-organising structures of lecithin. *Russian Chemical Reviews*, 66, 4, 301-322.

Shen T.H., Mittal V., Ferrari M., Chang J. (2013). Delivery of gene silencing agents for breast cancer therapy. *Breast Cancer Research*, 15, 205.

Shim M.S., Kwon Y.J. (2010). Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS Journal* 277, 23, 4814–4827.

Shukla S., Sumaria C.S., Pradeepkumar P.I. (2010). Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook. *ChemMedChem*, 5, 328–349.

Silvander M., Karlsson G., Edwards K. (1996). Vesicle solubilization by alkyl sulfate surfactants: a cryo-TEM study of the vesicle to micelle transition. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179, 1, 104–113.

Simons K., Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-72.

Simons K., Sampaio J.L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi:10.1101/cshperspect.a004697

Singh R., Lillard J.W. Jr. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86, 215-223.

Smidt J.H., Grit M., Crommelin D.J.A. (1994). Dissolution kinetics of griseofulvin in mixed micellar solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 9, 1209–1212.

Smith P.K. et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 1, 76-85.

Smoluchowski, M. (1916). Drei Vorträge über Diffusion, Brownsche Molekularbewegung und Koagulation von. *Kolloidteilchen, Physik. Zeitschr (in German)*, 17, 557–571, 585–599.

Suh M.S., Shim G., Lee H.Y., Han S.E., Yu Y.H., Choi Y., Kim K., Kwon I.C., Weon K.Y., Kim Y.B., Oh Y.K. (2009). Anionic amino acid-derived cationic lipid for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 140, 268–276.

Sznitowska M., Klunder M., Placzek M. (2008). Paclitaxel solubility in aqueous dispersions and mixed micellar solutions of lecithin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56, 1, 70–74.

Tan Y., Qi J., Lu Y., Hu F., Yin Z., Wu W. (2013). Lecithin in mixed micelles attenuates the cytotoxicity of bile salts in Caco-2 cells. *Toxicology In Vitro*, 27, 714–720.

Torchilin V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 145-160.

Unfried K., Sydlik U., Bierhals K. et al (2008). Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294, 2, 358-367.

van Hoogevest P., Wendel A. (2014). The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 9, 1088-1107.

Venneman N.G., Huisman S.J., Moschetta A., van Berge-Henegouwen G.P., van Erpecum K.J. (2002). Effects of hydrophobic and hydrophilic bile salt mixtures on cholesterol crystallization in model biles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1583, 2, 221–228.

Verma A., Stellacci F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, 6, 1, 12-21.

Walter A, Vinson P, Kaplun A, Talmon Y (1991). Intermediate structures in the cholate-phosphatidylcholine vesicle-micelle transition. *Biophysical Journal*, 60, 1315–1325.

Walter A., Kuehl G., Barnes K., VanderWaerdt G. (2000). The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508, 20-33.

Wang J., Feng S., Wang S., Chen Z. (2010). Evaluation of cationic nanoparticles of biodegradable copolymers as siRNA delivery system for hepatitis B treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 400, 194–200.

Wang J., Lu Z., Wientjes M.G., Au J.L. (2010). Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS Journal*, 12, 4, 492-503. doi: 10.1208/s12248-010-9210-4.

Weber U., Eroglu C., Mlodzik M. (2003). Phospholipidmembrane composition affects EGF receptor and Notch signaling through effects on endocytosis during *Drosophila* development. *Developmental Cell*, 5, 4, 559–570.

Weisman S., Hirsch-Lerner D., Barenholz Y., Talmon Y. (2004). Nanostructure of cationic lipid-oligonucleotide complexes. *Biophysical Journal*, 87, 609–614.

Wiedmann T.S., Kamel L. (2002). Examination of the solubilisation of drugs by bile salt micelles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91, 1743:1764.

Wood B.J., Pon R.T., Locklin J.K., et al (2012). Phase I study of heat-deployed liposomal doxorubicin during radiofrequency ablation for hepatic malignancies. *Journal of vascular and interventional radiology*, 23, 2, 248-255.

Wood L.D., Parsons D.W., Jones S., et al (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 318, 1108-1113.

Woodle M.C. (1993). Surface-modified liposomes: assessment and characterization for increased stability and prolonged blood circulation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64, 249–262.

Xia G., Huang L. (2012). Recent advances in nonviral vectors for gene delivery. *Accounts of Chemical Research*, 45, 7, 971–979.

Xia Z.J., Chang J.H., Zhang L. et al. (2004). Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. *Chinese Journal of Cancer*, 23, 1666–1670.

Xu R., Huang Y., Mai J., Zhang G., Guo X., Xia X., Koay E.J., Qin G., Erm D.R., Li Q., Liu X., Ferrari M., Shen H. (2013). Multistage vectored siRNA targeting ataxia-telangiectasia mutated for breast cancer therapy. *Small*, 9, 1799-1808.

Yadava P., Gibbs M., Castro C., Hughes J.A. (2008). Effect of lyophilization and freezethawing on the stability of siRNA-liposome complexes. *AAPS PharmSciTech*, 9, 335–341.

Yang Y., Nunes F.A., Berencsi K., Furth E.E. et al (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, 91, 4407-4411.

Yarmolenko P.S., Zhao Y., Landon C., Spasojevic I., Yuan F., Needham D., Viglianti B., Dewhirst M.W. (2010). Comparative effects of thermosensitive doxorubicin-containing liposomes and hyperthermia in human and murine tumours. *International Journal of Hyperthermia*, 26, 5, 485–498.

Zamora M.R., Budev M., Rolfe M., Gottlieb J, Humar A. et al. (2011). RNA Interference Therapy in Lung Transplant Patients Infected with Respiratory Syncytial Virus. *American Journal of respiratory and critical care medicine*, 183, 531-538.

Zhang Y., Li H., Sun J., Gao J., Liu W., Li B., Guo Y., Chen J. (2010). DC-Chol/DOPE cationic liposomes: a comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 390, 198–207.

Zhao Q-Q, Chen J.L., Lv T.F., He C.X., Tang G.P., Liang W.Q., Tabata Y., Gao J.Q. (2009). N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a

polyethylenimine/chitosan/DNA complex. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 4, 706-710.

Zolnik B.S., Sadrieh N. (2009). Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. *Advanced Delivery Reviews*, 61, 6, 422-427.