

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***DESARROLLO DE UN NANOSISTEMA PARA LA ENTREGA  
SELECTIVA DE *microRNAs* HACIA CÉLULAS DE CÁNCER  
OVÁRICO***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Doctor en ciencias farmacéuticas por:

***EDISON SEBASTIÁN SALAS HUENULEO***

Directores de Tesis: Marcelo J. Kogan y Carmen Romero  
Osses

**Santiago-CHILE**

**Octubre-2021**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**EDISON SEBASTIÁN SALAS HUENULEO**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Bioquímica, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_

**Director de Tesis:**

**Dr. Marcelo J. Kogan** \_\_\_\_\_

**Co-director de Tesis:**

**Dra. Carmen Romero Osses** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Alejandro Covalán** \_\_\_\_\_

**Dr. Hernán Lara** \_\_\_\_\_

**Dr. Gareth Owen** \_\_\_\_\_

**Dr. Nicolás Yutronic** \_\_\_\_\_

**Dra. Inés Yslas** \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Profundamente agradezco a mi familia, mi madre María Huenuleo Castro, mi hermana Natalia Salas Huenuleo y mi hermano Leonardo Salas Huenuleo, por estar siempre conmigo en los mejores y peores momentos.

Agradezco a mis amigos, que no son muchos, pero han sido fundamentales en este proceso y a lo largo de mi vida.

A su vez, me siento agradecido hacia mis tutores, Marcelo Kogan y Carmen Romero, quienes me entregaron la oportunidad y confianza, permitiéndome el desenvolvimiento en la academia con la libertad que necesité para involucrarme en los diversos retos científicos y colaborativos que incursioné.

En particular, y muy especialmente quiero agradecer y dedicar este trabajo a Iva Polakovičová, quien compartió conmigo hasta los últimos instantes de su inagotable vida. En ese tiempo me entregó mucho cariño, apoyo y contención, enseñándome muchas cosas que hoy practico y atesoraré por siempre. Agradezco a ella por los momentos inolvidables junto a su pequeña hija Isabellka Polakovičová, que fueron mi aliento para muchas veces poder continuar. Aquí, materializo la promesa que alguna vez le hice.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
I. FORMULACIÓN GENERAL DE PROYECTO .....	1
1. Cáncer .....	1
2. Cáncer ovárico epitelial (COE).....	4
2.1. Aspectos moleculares del cáncer de ovario.....	10
2.2. Los miRs y su importancia en cáncer de ovario.....	14
2.2.1. miR-145 .....	20
2.3. Tratamientos actuales para el cáncer de ovario .....	23
2.4. Estudios clínicos de nuevos tratamientos .....	28
2.5. miRs como terapia génica.....	31
2.5.1. Vectores de entrega de material genético.....	34
2.6. Nanotecnología como herramienta de terapia en cáncer.....	36
2.6.1. Moléculas diana para direccionamiento en cáncer ovárico.....	39
2.6.2. Nanopartículas poliméricas como vectores.....	42
2.6.3. Nanopartículas de oro para la entrega de miRs.....	46

II. PROPUESTA.....	50
Hipótesis .....	53
Objetivos.....	54
Objetivo General .....	54
Objetivos específicos .....	54
III. METODOLOGÍA .....	56
1. Obtención y caracterización de GNS de 12 nm, conjugación y funcionalización con FA o FSH33 y el miR-145.....	56
1.1. Obtención de GNS.....	56
1.2. Conjugación de GNS con polietilenglicol .....	57
1.3. Funcionalización del sistema GNS-peg-NH <sub>2</sub> con FA o FSH33 .....	58
1.4. Recubrimiento con el miR-145.....	59
1.5. Caracterización fisicoquímica de los sistemas obtenidos .....	60
1.5.1. Espectrofotometría de absorción molecular .....	60
1.5.2. Dispersión dinámica de la luz .....	61
1.5.3. Microelectroforésis de laser Doppler.....	62
1.5.4. Imagenología de fluorescencia .....	62
1.5.5. Estimación del recubrimiento de miR-145.....	63
1.5.6. Microscopía electrónica de transmisión .....	63

1.5.7. Microscopía de fuerza atómica .....	64
2. Evaluación <i>in vitro</i> de la selectividad e incorporación celular de los nanosistemas.....	65
2.1. Viabilidad celular con los nanosistemas sin miR-145 .....	65
2.2. Selectividad celular de los nanosistemas sin miR-145 .....	66
2.3. Incorporación celular de los nanosistemas cargados con miR-145 .....	67
3. Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos celulares y moleculares del nanosistema .....	70
3.1. Viabilidad celular .....	70
3.2. Proliferación celular .....	71
3.3. Migración celular .....	72
3.4. Liberación de VEGF.....	73
3.5. Proliferación de células endoteliales con medios condicionados.....	74
3.6. Ensayo de formación de clones tumorales .....	75
3.7. Evaluación de los efectos en esferoides tumorales .....	75
3.8. Análisis estadísticos.....	76
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
1. Obtención y caracterización de GNS de 12 nm, conjugación y funcionalización con FA o FSH33 y el miR-145.....	79

1.1. Espectrofotometría de absorción molecular .....	80
1.2. Dispersión dinámica de la luz .....	82
1.3. Microelectroforésis de laser Doppler.....	86
1.4. Estimación del recubrimiento de miR-145.....	90
1.4.1. Imagenología de fluorescencia .....	90
1.4.2. Cuantificación de miR-145 por espectroscopía de fluorescencia...	93
1.5. Microscopía electrónica de transmisión .....	95
1.6. Microscopía de Fuerza Atómica.....	96
2. Evaluación <i>in vitro</i> de la selectividad e incorporación celular de los nanosistemas.....	98
2.1. Viabilidad celular con los nanosistemas sin miR-145 .....	98
2.2. Selectividad celular de los nanosistemas sin miR145.....	100
2.3. Internalización de la nanoterapia en células ováricas.....	102
2.4. Cuantificación del miR-145 en células tratadas con nanoterapia.....	106
3. Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos celulares y moleculares de la nanoterapia .....	108
3.1. Viabilidad celular .....	108
3.2. Proliferación celular .....	111
3.3. Evaluación de la formación de clones tumorales .....	114

3.4. Evaluación de la migración celular.....	117
3.5. Liberación de VEGF.....	119
3.6. Proliferación de células endoteliales EA.hy926 por efecto de VEGF en medios de cultivos de células A2780 incubadas con nanoterapia .....	122
3.7. Evaluación de los efectos en esferoides tumorales .....	124
V. CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS.....	137
VI.- REFERENCIAS.....	147

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hallmarks of cancer .....	3
Figura 2. Etapas del cáncer de ovario .....	8
Figura 3. Vías de señalización activadas en COE .....	12
Figura 4. El receptor TrkA activa la transcripción de miRs .....	14
Figura 5. Biogénesis de miRs .....	16
Figura 6. miRs como oncogenes y oncosupresores .....	18
Figura 7. Diagrama de los principales blancos del miR-145 .....	22
Figura 8. Red de interacción entre miRs y sus genes blanco para cáncer de mama.....	33
Figura 9. Estrategias de entrega para terapia génica .....	35
Figura 10. Evolución de formulaciones farmacéuticas para la entrega de paclitaxel.....	37
Figura 10. Targeting pasivo y activo .....	39
Figura 11. Representación de diferentes tipos de nanopartículas poliméricas .	43
Figura 12. Nanopartículas de oro y su superficie modulable .....	48
Figura 13. Esquema de la propuesta del desarrollo del nanosistema y su acción .....	52
Figura 14. Representación esquemática de la síntesis de GNS.....	57

Figura 15. Secuencia miR-145 y miR <i>scramble</i> .....	60
Figura 16. Espectrofotometría UV-Vis .....	82
Figura 17. Cambios en el diámetro hidrodinámico del nanosistema.....	85
Figura 18. Resumen de los diámetros hidrodinámicos obtenidos para cada nanosistema.....	86
Figura 19. Cambios en el potencial Z de cada nanosistema .....	89
Figura 20. Resumen de los potenciales Z obtenidos para cada nanosistema ..	90
Figura 21. Recubrimiento por miR-145.....	92
Figura 22. Cuantificación del recubrimiento de miR145.....	95
Figura 23. Micrografías de TEM para los nanosistemas.....	96
Figura 24. Micrografías de AFM para los nanosistemas.....	97
Figura 25. Ensayo de viabilidad celular realizado en células HeLA, A2780 y SKOV3.....	99
Figura 26. Evaluación de la incorporación celular de los nanosistemas .....	102
Figura 27. Cuantificación de la incorporación celular de la nanoterapia .....	105
Figura 28. Cuantificación de miR145 en células tratadas con la nanoterapia. .	108
Figura 29. Viabilidad celular en las líneas de cáncer ovárico A2780 y SKOV3110	
Figura 30. Efectos en la proliferación celular en la línea de cáncer ovárico epitelial A2780 .....	114

Figura 31. Evaluación de formación de clones tumorales de la línea A2780..	117
Figura 32. Evaluación de la migración celular mediante el ensayo de recuperación de herida .....	119
Figura 33. Liberación de VEGF en células A2780 incubadas con nanoterapia .....	122
Figura 34. Evaluación de la proliferación celular con medio condicionado de células A2780 .....	124
Figura 35. Crecimiento de esferoides de la línea SKOV3 hasta el día 6 .....	125
Figura 36. Curvas de disminución de tamaño de esferoides de la línea SKOV3 tratados hasta el día 5. ....	126
Figura 37. Efectos de la nanoterapia sobre el tamaño y área de esferoides tumorales de la línea SKOV3.....	128
Figura 38. Evaluación de la viabilidad y muerte celular de los esferoides tratados.....	130
Figura 40. Evaluación del mecanismo de muerte celular en esferoides intactos. .....	131

## ABREVIATURAS

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
TrkA	Receptor tirosina quinasa A
DNA	Ácido desoxirribonucleico
VEGF	Factor de crecimiento angiogénico vascular
COE	Cáncer ovárico epitelial
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i> – gen supresor de tumor
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i> – gen supresor de tumor
HER2	<i>Human epidermal receptor 2</i>
p53	gen de proteína supresora de tumores
FIGO	<i>International federation of gynecology and obstetrics</i>
NGF	Factor de crecimiento nervioso
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i>
AKT	Proteína quinasa B
COX-2	Ciclooxigenasa-2
PGE2	Prostalandina E2- $\alpha$
BCL	<i>B-cell lymphoma 2</i> – proteína antiapoptótica
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i> – proteína proapoptótica
FOXL2	<i>Forkhead box protein L2</i>
mTor	<i>Mammalian target of Rapamycin protein</i>
mRNA	RNA mensajero
miR	MicroRNAs
pri-miR	MicroRNA primarios
pre-miR	MicroRNA precursor
TRBP	<i>Transactivation response element RNA-binding protein</i>
PACT	<i>Protein Activator of PKR</i>

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
AGO2	<i>Argonauta 2</i>
RAS	Superfamilia de pequeñas GTPasas monoméricas
MCL1	<i>Myeloid cell leukaemia sequence 1</i>
MYC	Factor de transcripción oncogénico
ADAM17	<i>A Disintegrin and A Metalloproteinase 17</i>
MUC1	<i>Mucin 1 glicoprotein</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
CTR1	<i>Copper transporter 1 protein</i>
ABCB1	<i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1</i>
ABCC10	<i>ATP Binding Cassette Subfamily C Member 10</i>
AUC	Área bajo la curva de la concentración plasmática
VEGFR	Factor de crecimiento vascular endotelial
PDGFR	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
FGFR	Factor de crecimiento fibroblástico
SLE	Sobrevida libre de enfermedad
ANG	Angiopoyetina
TIE2	<i>Tyrosine-protein kinase 2</i>
hATTR	<i>Hereditary transthyretin amyloidosis</i>
siRNA	<i>Silencing RNA</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
PEG-PBD	Polietilenglicol-polibutadieno
PEG-PEE	Polietilenglicol-polietilenetileno
PNIPAm	N-isopropil acrilamida
Np	Nanopartículas
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
FR $\alpha$	Receptor de folato
FSHR	Receptor de la hormona folículo estimulante

NpO	Nanopartículas de oro
LSPR	<i>Localized surface plasmon resonance</i>
FA	Ácido fólico
FSH33	Péptido de región central de la proteína FSH
GNS	Nanoesféras de oro
A2780	Línea celular de cáncer ovárico epitelial humano
SKOV3	Línea celular de ascitis de cáncer ovárico humano
GNS-FA-miR-145	GNS conjugadas con ácido fólico y miR-145
GNS-FSH33-miR-145	GNS conjugadas con el péptido FSH33 y miR-145
HAuCl <sub>4</sub>	Ácido tetracloroaurico
SH-peg-NH <sub>2</sub>	Polietilenglicol 5 kDa, terminales sulfidrido y amina
GNS-peg-NH <sub>2</sub>	GNS unidas a SH-peg-NH <sub>2</sub>
MES	Ácido 4-morfolinoetanosulfónico
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
GNS-FA	GNS funcionalizadas con FA
GNS-FSH33	GNS funcionalizadas con FSH33
CY5	Fluoróforo <i>Cyanine 5</i>
NHS	N-hidroxisuccinimida
HeLa	Línea celular de cáncer cérvico uterino humano
SDS	Dodecil sulfato de sodio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium culture</i>
SFB	Suero fetal bovino
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
EA.hy926	Línea celular endotelial humana
MTS	Ensayo colorimétrico para evaluar viabilidad y/o proliferación
LDH	Ensayo de lactato deshidrogenasa para muerte celular
LOT	<i>Liquid overlay technique</i>
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>

AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
IGF-1	<i>Insuline-like growth factor 1</i>
IRS1	<i>Insuline receptor substrate 1</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
AV	Anexina V
IP	Ioduro de propidio
Cdk6	Kinasa-6 ciclina dependiente
PARP	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase</i>

## RESUMEN

El cáncer ovárico (CO) es la patología ginecológica más letal en las mujeres. Está ligada a un bajo pronóstico de vida dado el alto porcentaje de diagnósticos tardíos. Se caracteriza por presentar tumores voluminosos, altamente irrigados y con importante diseminación peritoneal. La quimiorresistencia y recidivas post cirugía son frecuentes. Uno de los acercamientos terapéuticos más interesantes es la restauración de microRNAs (miRs) *down*regulados durante la carcinogénesis. Los miRs juegan un importante rol en la multiregulación de procesos celulares como proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis, ciclo celular, angiogénesis y metástasis, entre otros. En este trabajo se diseñaron y sintetizaron nanopartículas de oro transportadoras del miR-145. Para esto, fueron funcionalizadas con ácido fólico o el péptido FSH33 y cargadas con el miR-145 como agente activo. El nanosistema construido ingresó selectivamente hacia las células e inhibió significativamente la viabilidad, migración y el potencial proliferativo y clonogénico. Además, disminuyó la liberación de VEGF y redujo el tamaño de esferoides tumorales mediante daño en la membrana celular, disminución de la viabilidad y activación de la apoptosis celular. Estos resultados entregan importantes avances para el desarrollo de terapias basadas en miRs mediante la utilización de nanotecnologías y sienta las bases para su evaluación en modelos *in vivo*.

## ABSTRACT

Ovarian cancer (OC) is the most lethal gynecological pathology in women and is linked to a low life prognosis due to the high percentage of late diagnosis. It is characterized by large tumors, highly irrigated, with significant dissemination in the peritoneal area. After debulking surgery, a high rate of chemoresistance and relapses are frequent. One of the most interesting therapeutic approaches represents the restoration of microRNAs (miRs) which are downregulated during the carcinogenesis. miRs play an important multi-regulatory role in cellular processes such as proliferation, differentiation, survival, apoptosis, cell cycle, angiogenesis, and metastasis, among others. In this work, gold nanoparticles carrying miR-145 were designed and synthesized. First, the nanoparticles were functionalized with folic acid or the FSH33 peptide, and then loaded with miR-145, a reported agent active against OC cell lines. The constructed nanosystem selectively entered these cells and significantly inhibited cell viability, migration, and proliferative and clonogenic potential. Moreover, it diminished the release of VEGF and reduced the size of OC spheroids through the damage of cell membranes, decrease of cell viability, and activation of apoptosis. These results provide important advances in the development of miR-based therapies using nanotechnologies as selective vectors and gives the approaches for the *in vivo* evaluation.

## **Capítulo 1: Introducción, hipótesis y objetivos**

## **I. FORMULACIÓN GENERAL DE PROYECTO**

### **1. Cáncer**

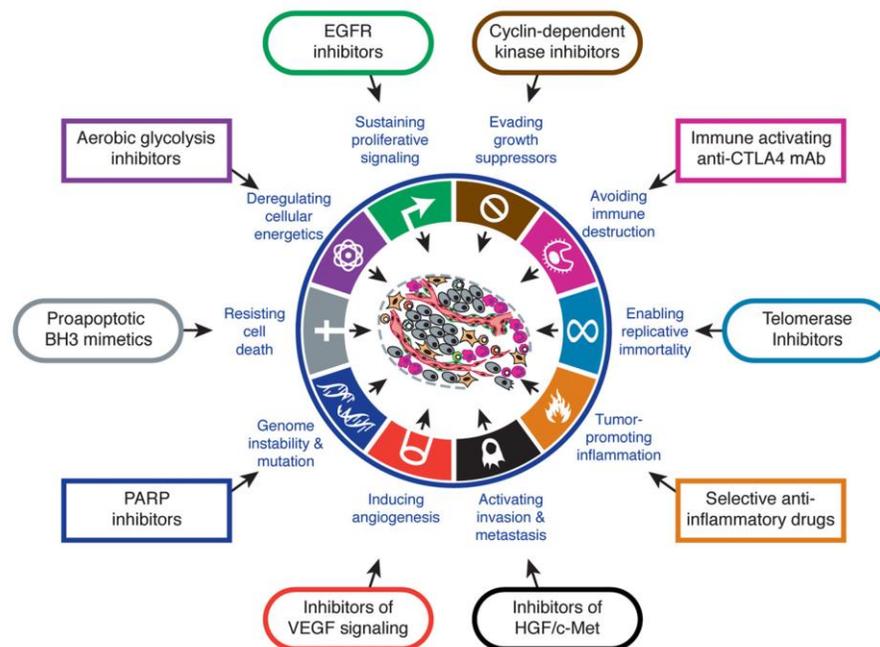
El cáncer es una enfermedad que genera uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Se encuentra posicionada como la segunda causa de muerte, después de las patologías cardiovasculares. En la actualidad, aún está en pleno crecimiento exponencial, por lo que se estima que en el futuro ocupará el primer puesto en mortalidad. Para el 2020 se prevén cerca de 1,8 millones nuevos diagnósticos y 606 mil muertes por cáncer solo en los Estados Unidos [1]. En Chile, en tanto, en el último informe de indicadores básicos de salud de 2016 se indica que el cáncer es la segunda causa de muerte entre los chilenos, con un 26,13% del total de defunciones para ese año, alcanzando una cifra de 27.183 muertes al año. Sin embargo, para algunas regiones de nuestro país, el cáncer se posiciona como la principal causa de muerte, como es el caso de Arica y Parinacota con un 27,82%, Tarapacá con un 26,65% y Antofagasta con un 29,41% del total de muertes anuales [2].

Esta enfermedad sigue siendo un desafío importante para la medicina moderna. A pesar de los esfuerzos puestos a nivel mundial, aun es una enfermedad en pleno desarrollo dentro de la población. En los últimos 50 años no se ha logrado mejorar la sobrevida de los pacientes con cáncer avanzado.

De la misma manera, los métodos de detección no han logrado ser lo suficientemente eficaces para la detección temprana y la administración de tratamientos en el momento adecuado. Además, los tratamientos sistémicos actuales siguen siendo agresivos, generando efectos colaterales importantes, los cuales van desde náuseas hasta la infertilidad debido a la alta toxicidad de los fármacos quimioterapéuticos utilizados y a la inespecificidad en la acción de éstos, los cuales afectan tanto a células tumorales como sanas [3].

Molecularmente, el cáncer es complejo, deriva de una progresión de múltiples cambios celulares los cuales les proporcionan a las células características o capacidades que las condicionan hacia el fenotipo cancerígeno. Para que el cáncer se exprese, existen al menos 10 características que son necesarias de adquirir: i) proliferación sostenida, ii) evasión de la supresión del crecimiento, iii) resistencia a la muerte o apoptosis, iv) replicación sucesiva, v) inducción de la angiogénesis, vi) invasión vii) inflamación, viii) inestabilidad genómica, ix) desregulación de la energía celular y x) evasión respuesta inmune (figura 1) [4]. Dentro de las características más estudiadas, importantes y universales entre los diferentes tipos de cáncer, se encuentra la proliferación sostenida, provocada por un aumento en la señalización molecular que gatilla el crecimiento y división celular, lo cual se debe principalmente a una sobreexpresión de receptores extracelulares de factores de crecimiento, como el receptor del factor de crecimiento epidermal

(EGFR) o receptores tipo tirosina quinasa, como el receptor tirosina quinasa A (TrkA) [5]. Otra característica importante es la desregulación de la supresión del crecimiento mediada por el factor supresor de tumores p53, que juega un rol central en la regulación de la progresión del ciclo celular, senescencia, diferenciación, reparación del DNA y apoptosis [6]. Asimismo, una característica fundamental para el desarrollo de varios tipos de cáncer es la inducción de la angiogénesis sostenida, provocada por una sobreexpresión del factor de crecimiento angiogénico vascular (VEGF) para asegurar la irrigación necesaria para el abastecimiento de nutrientes hacia el tumor [7].



**Figura 1. Hallmarks of cancer.** Capacidades adquiridas en cáncer para la progresión y crecimiento tumoral y dianas terapéuticas que han sido desarrolladas para cada capacidad celular adquirida [4].

## **2. Cáncer ovárico epitelial (COE)**

A nivel mundial, el cáncer de ovario es un problema de salud importante, debido a que es la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres y, a su vez, es la principal causa de muerte por enfermedades ginecológicas [8]. Es considerada como una enfermedad catastrófica, tanto en lo humano, social, como en lo económico. Cerca de 220 mil nuevos casos y 140 mil muertes son reportados anualmente en el mundo [9]. La incidencia esperada de COE en EEUU en el año 2012 se estimó en 22.300 diagnósticos, que provocaron 15.500 muertes. En Europa, en 2008 se estimaron 70 mil diagnosticados con 44 mil muertes. En Chile, 740 casos fueron diagnosticados en 2012, con un total de 415 defunciones, posicionándose como la novena causa de muerte, con un 3 % de las muertes totales por cáncer y la segunda causa de muerte por enfermedades ginecológicas [2]. Es así que, tanto la incidencia como la mortalidad han ido aumentando paulatinamente en la última década. Esta tendencia se debe a ciertos factores como el aumento en la esperanza de vida de las mujeres, la prevalencia de los factores de riesgo y a la variabilidad de los estándares en los tratamientos disponibles en la actualidad [10]. Los factores de riesgo parten principalmente por esperanza de vida; la edad promedio de los casos diagnosticados es de 65 años, en la etapa de la vida de postmenopausia, en donde son diagnosticados el 50% de los casos. Es importante mencionar que, tanto en Chile como en el mundo existe

un proceso de envejecimiento demográfico el cual se denota principalmente en las mujeres, con índices de vejez que se incrementaron de 26 a 36% entre los años 1992 y 2002. A su vez, mujeres que presentan predisposición genética, principalmente mutaciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *HER2* y *p53*, son diagnosticadas 10 años antes de la edad promedio [11]. No obstante, el carácter familiar o hereditario de la enfermedad representa tan solo un 5-10 % de todos los casos de cáncer ovárico epitelial. Por otra parte, se ha correlacionado clínicamente la endometriosis y ovario poliquístico con la aparición de cáncer de ovario, así como también la hiperestimulación ovárica para tratamientos de infertilidad. Mientras que la presencia de virus del papiloma humano, talco perineal y el hábito tabáquico, que anteriormente se consideraban factores de riesgo, están siendo descartados como causas de la enfermedad. Por otra parte, en estudios epidemiológicos se ha encontrado que el riesgo de cáncer de ovario es reducido por estados de anovulación, tales como el embarazo, el uso de anticonceptivos orales o inyectables, amamantamiento, ligación de trompas de Falopio o procedimientos quirúrgicos como la histerectomía.

El cáncer ovárico puede desarrollarse a partir de varios tipos celulares, siendo cerca del 90% de los cánceres de origen epitelial y, predominantemente, con una histología de tipo seroso. Los carcinomas ováricos han sido clasificados de acuerdo a los diferentes epitelios del tracto

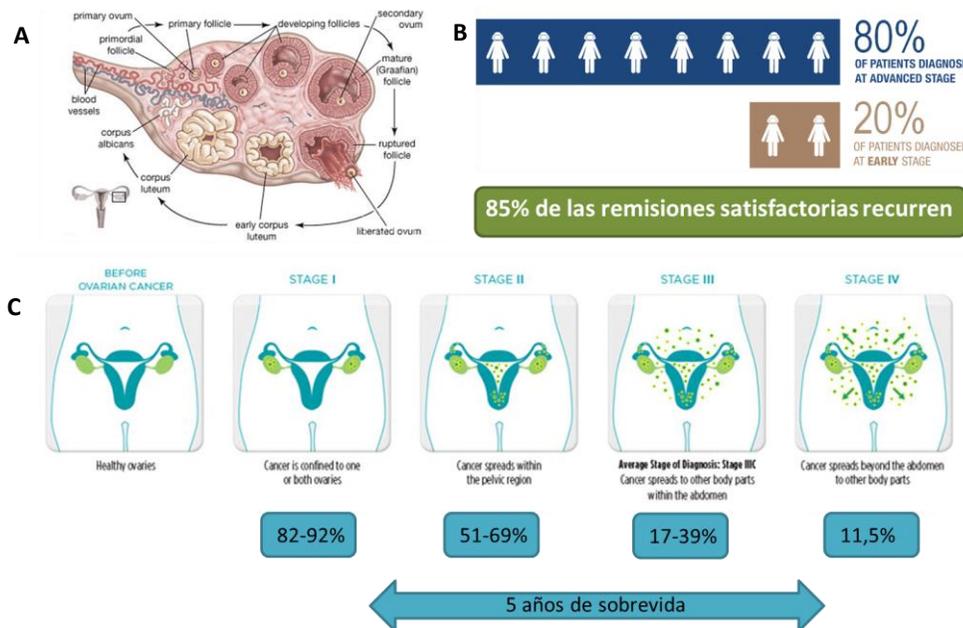
reproductivo femenino teniendo cada uno de ellos diferentes porcentajes de incidencia: carcinoma seroso de alto grado 70%; carcinoma endometriode 10%; carcinoma de células claras 10%; carcinoma mucinoso 3%; y carcinoma seroso de bajo grado menor a un 5% [12]. Sin embargo, se ha llegado a un nuevo consenso en vista de los recientes estudios moleculares, genéticos e histopatológicos que agrupan los tumores en dos categorías, designadas como Tipo I: cuyos tumores emergen a partir de lesiones claramente descritas en el epitelio del ovario, incluyen los tumores de bajo grado serosos, mucinosos, endometrioides, células claras y de transición, los de tipo Tipo II: cuyas lesiones no han sido esclarecidas y los tumores pueden desarrollarse *de novo*, comprenden carcinomas de alto grado serosos, indiferenciados y carcinosarcomas. Recientemente, se ha reportado que ciertos cánceres ováricos epiteliales emergen desde el epitelio de las trompas de Falopio distales. Sin embargo, aún no se ha podido establecer de manera consensuada la serie de eventos que involucran la iniciación, progresión y metástasis del cáncer ovárico epitelial [13]. Cabe destacar que la frecuente ruptura y reparación del epitelio superficial ovárico producto de cada ovulación, provoca que aumente el patrón de proliferación de las células de la superficie epitelial para reparar la herida generada, lo que conlleva a la formación de quistes de inclusión. Estos quistes de inclusión aumentan el riesgo de carcinogénesis capturando células epiteliales en un ambiente de constante estimulación autocrina y paracrina mediada por factores de crecimiento como

VEGF, hormonas, fosfolípidos, lo que finalmente provocan cambios celulares y daño en el DNA [14, 15].

La alta letalidad del COE se debe mayoritariamente a que no existen herramientas de tamizaje, ni síntomas premonitores que permitan su diagnóstico en etapa precoz. Es así que, el 80% de los casos se diagnostican en etapa III o IV de la escala de la *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO), es decir en etapas avanzadas de la enfermedad, donde tan solo el 30% de los casos alcanzará una sobrevida mayor a 5 años [12]. Por otra parte, la transitoriedad de la respuesta terapéutica y el alto porcentaje de recurrencias es un factor importante, que contribuye a la alta mortalidad de esta patología. Es así que, se ha estimado que del 70 al 80 % de los casos responden adecuadamente al tratamiento estándar inicial, experimentando remisión clínica positiva, sin embargo, luego de un tiempo la mayoría presenta recurrencias en una forma de cáncer más agresiva y resistente que el tumor original, lo que indefectiblemente conduce a la muerte [10].

Las fases clínicas de la enfermedad se dividen en etapas y grados (figura 2); etapa I, el crecimiento del tumor está limitado a uno o los dos ovarios, la capsula intacta y no hay afectación de la superficie externa; etapa II, el tumor se extiende a la pelvis, afectando estructuras como el útero y/o trompas de Falopio; etapa III, el tumor se ha extendido fuera de la pelvis, afectando el

peritoneo, ganglios retroperitoneales y la superficie hepática; etapa IV, el cáncer se ha diseminado, existiendo metástasis en hígado, pulmones u otros órganos fuera de la cavidad peritoneal. Los grados son asignados en relación a la diferenciación celular respecto de las células normales e indica la velocidad del desarrollo del cáncer; grado 1, células bien diferenciadas, muy similares a las células epiteliales normales, los tumores se desarrollan lentamente; grado 2, células moderadamente diferenciadas, guardan cierta semejanza con las células de origen y su crecimiento es más acelerado que en grado 1; grado 3, células indiferenciadas, su fenotipo es distinguiblemente diferente de las células normales, crecen y proliferan rápidamente [16].



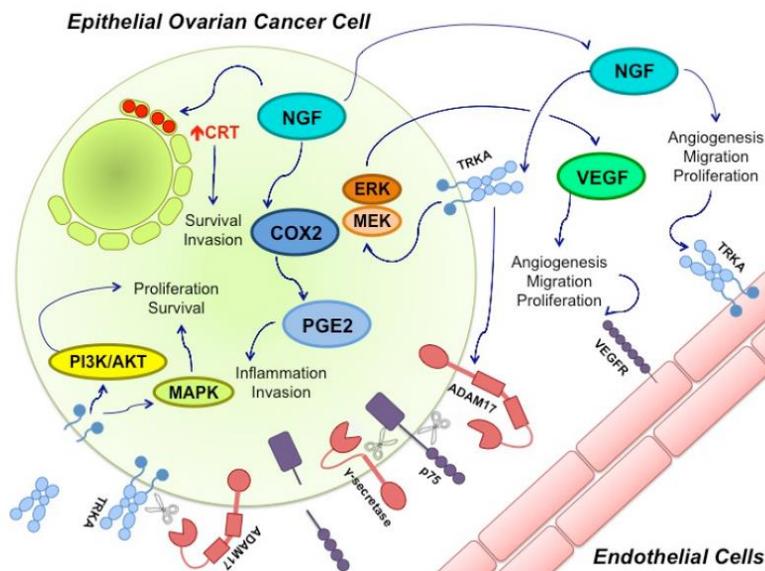
**Figura 2. Etapas del cáncer de ovario.** A) ciclo de ovulación, en donde se muestra el proceso de ruptura y reparación del folículo. B) estadísticas de diagnóstico tardío en pacientes. C) Etapas de la progresión del cáncer ovárico.

Los tumores malignos ováricos tienen como una de sus características principales ser muy angiogénicos, debido a que siguen un patrón altamente controlado como parte de la angiogénesis normal de la función ovárica durante la ovulación [15]. De esta manera, el gran tamaño alcanzado por estos tumores requiere de procesos de angiogénesis sostenida para sustentar su crecimiento. Uno de los principales factores involucrados en este proceso es VEGF, un factor angiogénico y potente mitógeno del endotelio vascular. A su vez, las células tumorales se caracterizan por la pérdida de regulación del crecimiento y proliferación celular, lo que en conjunto con la angiogénesis sostenida, desemboca en tumores de gran tamaño y diseminación [17]. Esto ocurre, en parte, debido a señalizaciones generadas desde una variedad de receptores, tales como los receptores de factores de crecimiento tipo tirosina quinasa [18]. Sin embargo, aunque muchos estudios tratan de explicar la progresión del cáncer ovárico epitelial, aún no se han propuesto mecanismos que suscriban esos cambios, probablemente debido a que la secuencia de eventos que llevan al cáncer de ovario es multifactorial y no completamente entendidos.

## **2.1. Aspectos moleculares del cáncer de ovario**

Los cambios a nivel intracelular y molecular que ocurren en cáncer en general, tienen que ver con el aumento en la señalización de vías fundamentales para la proliferación y crecimiento celular, la sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento, como receptores tirosina quinasa, aumento de factores angiogénicos, etc.; que finalmente generan la sobreexpresión de proteínas oncogénicas, en conjunto con la disminución en la expresión de genes encargados del control de estos procesos, los llamados genes supresores de tumores [4, 19]. Para el cáncer de ovario, se ha reportado que, los receptores de neurotrofinas se encuentran sobreexpresados y su cascada de señalización intracelular está involucrada con la progresión de la transformación celular [18]. En particular, el receptor TRKA, de alta afinidad para el factor de crecimiento nervioso (NGF), se ha asociado con el fenotipo maligno en carcinomas prostático, esofágico, pancreático y tiroideo [19]. Se ha reportado que el receptor TRKA se encuentra sobreexpresado en líneas celulares y en tejido de cáncer ovárico epitelial (COE) y, que a su vez, estos expresan NGF en las células epiteliales del tumor, el cual contribuye a la progresión de la malignidad vía estimulación paracrina, actuando como factor angiogénico directo sobre las células endoteliales e indirecto promoviendo la expresión de VEGF en las células epiteliales del tumor (figura 3) [20]. La evidencia sugiere que TrkA está involucrado en la progresión del cáncer

ovárico epitelial. Es así que se ha propuesto la sobreexpresión y activación de TrkA (p-TrkA) como marcador de mal pronóstico [21]. La sobreexpresión de TrkA y su activación por NGF lleva a cambios intracelulares y activación de vías favorables para la progresión del cáncer, como las vías *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/ERK y *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI3K)/AKT, involucradas en el control de la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis [22, 23]. De la misma manera, se han reportado aumentos en la expresión de VEGF; factor importante en cáncer de ovario debido a la alta angiogénesis que presenta, la proporción de proteínas antiapoptótica/proapoptótica; BCL2/BAX, c-myc, un protooncogen factor de transcripción pluripotente relacionado con la inestabilidad genómica y Ki67, antígeno estrictamente relacionado con proliferación celular, asociado a mal pronóstico en cáncer de ovario, el cual se expresa en las fases G1, S, G2 y M, encontrándose ausente en fase G0 [24]. A su vez, también se ha reportado una disminución en los niveles de FOXL2, un factor de transcripción involucrado en la apoptosis [25].

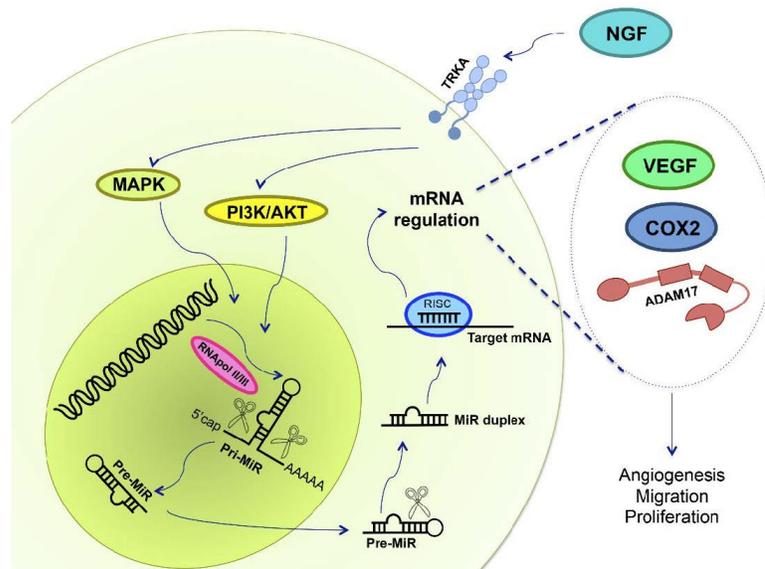


**Figura 3. Vías de señalización activadas en COE.** Se exponen algunas de las vías más importantes activadas en cáncer ovárico epitelial y sus efectos de la expresión de proteínas como VEGF en células endoteliales [26].

Existe una serie de hipótesis que tratan de explicar la génesis del cáncer de ovario. Una de ellas está relacionada con el proceso inflamatorio y algunas moléculas tales como la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) y su producto de biosíntesis; prostaglandina E<sub>2</sub>-α (PGE<sub>2</sub>). La mayoría de los tejidos no expresan constantemente COX-2, de hecho, su rol es producir prostaglandinas de manera inducible durante procesos inflamatorios y patológicos. Se ha asociado la expresión de la vía COX-2/PGE<sub>2</sub> con procesos tumorigénicos, encontrándose correlaciones en el aumento de sus niveles y el desarrollo de cánceres de próstata, mama, gástrico y colon [25]. De la misma

manera, se ha evidenciado que PGE2 en niveles elevados es capaz de promover la proliferación, supervivencia, evasión de la apoptosis, angiogénesis (mediante el aumento en la expresión de VEGF), migración e invasión mediante la activación de manera autocrina y paracrina de las vías de señalización intracelular MAPK/ERK y PI3K/AKT/mTor [27, 28]. Su rol en la evasión de la apoptosis también ha sido ligada a la disminución de su sustrato el ácido araquidónico, el cual estimula la apoptosis mediante la producción de ceramidas [29]. Además, se ha demostrado que al inhibir COX-2 con el inhibidor selectivo celecoxib en pacientes con poliposis adenomatosa familiar se ha observado regresión en los adenomas [30].

En cáncer de ovario en tanto, se ha reportado una elevada expresión de COX-2, lo que sugiere que esta enzima juega un importante rol en la progresión del carcinoma ovárico [31]. Interesantemente, en células de la teca en ovario se ha encontrado que la estimulación con NGF incrementa los niveles de COX-2 y PGE2- $\alpha$  [32]. Algunos estudios sugieren que la activación del receptor TrkA mediante su ligando NGF induce a cambios en la expresión de microRNAs (miRs) involucrados en la regulación de la expresión de proteínas como VEGF y COX-2, entre otras (Figura 4) [26].

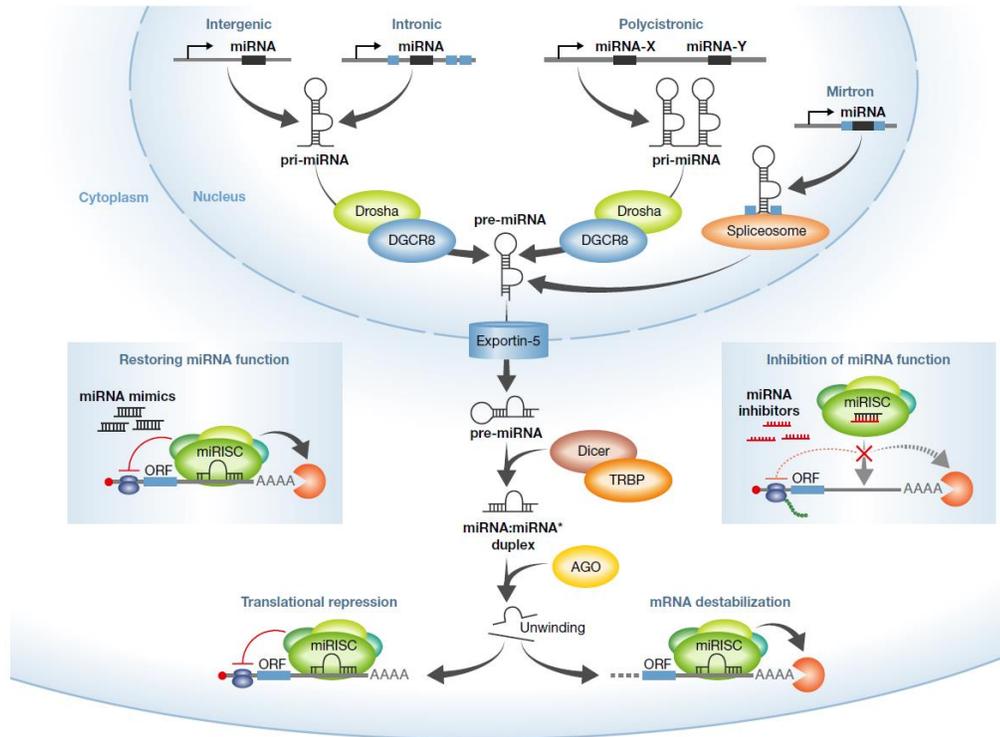


**Figura 4. El receptor TrkA activa la transcripción de miRs.** Las vías de señalización activadas por TrkA pueden promover la transcripción de miRs que regulan proteínas claves para la progresión del cáncer de ovario epitelial [26].

## 2.2. Los miRs y su importancia en cáncer de ovario

Recientemente se han descrito ciertas vías que actúan de manera diferente a las señalizaciones proteicas convencionales, sin embargo, se encuentran íntimamente relacionadas en una compleja red de regulaciones a nivel post-transcripcional. Una nueva clase de pequeños RNAs no codificantes de hebra simple, llamados miRs de alrededor de 19-25 nucleótidos, juegan un importante rol, virtualmente en todas las vías biológicas en mamíferos y otros organismos multicelulares. Estos son capaces de regular la expresión génica

principalmente mediante la unión por hibridación nucleotídica en el extremo 3' UTR (*untranslated*) de los RNAs mensajeros (mRNA) provocando bloqueo de la traducción y/o degradación del mRNA [33]. La ruta canónica de biogénesis comienza con la transcripción por la RNA polimerasa II a partir de unidades transcripcionales independientes en el genoma, dando origen a un largo transcrito primario llamado pri-miR en forma de horquilla, este es procesado en el núcleo por la enzima Drosha, una RNAsa III parte del complejo microprocesador, generando a partir de un pri-miR, uno o varios miR precursores o pre-miR de entre 70 – 100 nucleótidos que conservan forma de horquilla. Los pre-miRs son transportados al citoplasma mediante la enzima exportina-5 vía poros nucleares, en donde son escindidos por la enzima Dicer una RNAsa III y las proteínas asociadas la complejo TRBP y PACT para generar una hebra dúplex de miR de alrededor de 22 nucleótidos, en donde una de las hebras es degradada y la hebra activa (miR maduro) es incorporada en el *RNA-induced silencing complex/Argonata 2* (RISC/AGO2) ejerciendo su acción inhibitoria de la traducción como RNA antisentido del mRNA blanco mediante tres procesos diferentes: i) corte sitio específico del mRNA; ii) promoviendo la degradación del mRNA; y iii) inhibiendo la traducción por impedimento estérico (figura 5) [34, 35].



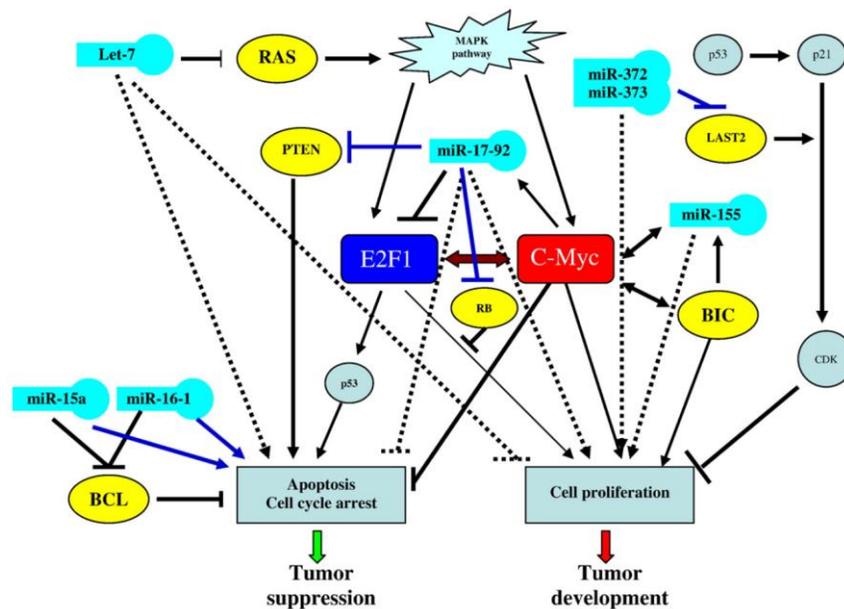
**Figura 5. Biogénesis de miRs.** Esquema del proceso de transcripción génica, modificaciones postranscripcionales, exportación citoplasmática, procesamientos y efectos en la traducción de proteínas [36].

Debido al tipo de estructura de un miR, en cuanto a su corta secuencia nucleotídica de hibridación, éste tiene la capacidad de interactuar con hasta cientos de blancos moleculares de mRNAs, pudiendo inhibir la traducción de diferentes proteínas involucradas en procesos similares e inclusive varias proteínas de la misma vía de señalización celular. Esto conlleva a que la actividad inhibitoria se vea amplificada y maximizada [37]. Por lo tanto, la expresión aberrante de tan solo un miR puede moderar erróneamente la expresión de un gran número de transcritos y afectar profundamente vías de

señalización completas relacionadas con vías patológicas. A la vez, un solo mRNA puede ser regulado por múltiples miRs, por lo que el circuito de regulación mediado por miRs es extremadamente complejo e intrincado. Los genes de miRs pueden ser expresados como genes únicos (monocistrónicos) o como *clusters* de miR agrupados en un locus (policistrónicos). También pueden estar ubicados en regiones intergénicas dentro de exones o intrones de otros genes. Pueden ser transcritos por su propio promotor, por promotores de genes cercanos o promotores del gen “hospedero” dependiendo de dónde se encuentren ubicados en el genoma (figura 5) [36].

Se ha reportado la influencia de los miRs en numerosos procesos celulares fundamentales, tales como desarrollo, proliferación, control del ciclo celular, apoptosis, diferenciación, migración y metabolismo, entre otros. Por lo que la expresión aberrante de tan solo un miR puede moderar erróneamente la expresión de un gran número de transcritos y afectar profundamente vías de señalización completas. Hasta la fecha, han sido ampliamente reportadas diversas alteraciones en la expresión normal de los miRs en estados celulares patológicos, tal como en el caso del cáncer, sugiriendo que los miRs juegan un rol como una nueva clase de oncogenes u oncosupresores, dependiendo de su blanco molecular. En donde los miRs oncogénicos regulan la expresión de genes supresores de tumores o de factores de transcripción asociados a la transcripción de proteínas oncosupresoras, mientras que los miRs

oncosupresores regulan la expresión de oncogenes o factores de transcripción para oncogenes (figura 6) [37]. En ese sentido, se ha demostrado que la expresión de ciertos miRs que actúan como oncosupresores tienen como blanco oncoproteínas con roles cruciales en vías importantes para el desarrollo del cáncer, como por ejemplo BCL2, RAS, MCL1 (*myeloid cell leukaemia sequence 1*) y MYC, por mencionar solo algunas [38]. De esta manera, los perfiles de expresión de miRs oncosupresores en cáncer, se encuentran disminuidos y los miRs oncogénicos se encuentran aumentados [39].



**Figura 6. miRs como oncogenes y oncosupresores.** Modelo esquemático que demuestra el mecanismo de miRs involucrados en la patogénesis del cáncer. Los miRs pueden regular directamente el crecimiento celular o indirectamente controlando la apoptosis. En la figura Let-7, miR-15a y miR 16-1 actúan como oncosupresores, mientras miR-17-92, miR-155, miR 372 y miR373 tienen acción oncogénica [40].

Los mecanismos por los cuales las células tumorales pueden presentar niveles desregulados de miRs han sido recientemente establecidos, pudiendo ser de índole multifactorial, incluyéndose mecanismos tales como deleciones, mutaciones en la secuencia de DNA de los miR, mutaciones en la secuencia de los mRNA blanco, silenciamiento epigenético, defectos en las enzimas de su ruta de biogénesis, debido a represión transcripcional e inclusive por la influencia de oncogenes [39]. Por otra parte, se ha reportado que ciertos miRs pueden ser detectados en tejidos y en sangre. Al respecto, existen estudios acerca de los perfiles de miRs circulantes en sangre, para los cuales se ha propuesto que pueden reflejar cambios de su expresión en los tejidos [41]. De esta manera, ciertos miRs pueden ser útiles como potenciales biomarcadores en patologías como el cáncer. La desregulación en la expresión de miRs juega un rol fundamental en todo el proceso de cancerogénesis, tanto en etapas iniciales, progresión y en la diseminación del cáncer. A su vez, el reemplazo de miRs que se encuentran *downregulados* en células tumorales y que ejercen roles oncosupresores, por miRs miméticos, ha dado resultados positivos en ensayos *in vitro* y terapéuticos [42].

En carcinoma ovárico, se han descrito ciertos miRs con su expresión alterada [43-45]. Hasta la fecha existen algunos reportes en los cuales se correlaciona la influencia de miRs en la progresión del cáncer de ovario, dentro de los cuales se ha encontrado que los miRs Let-7, la familia de los miR-200,

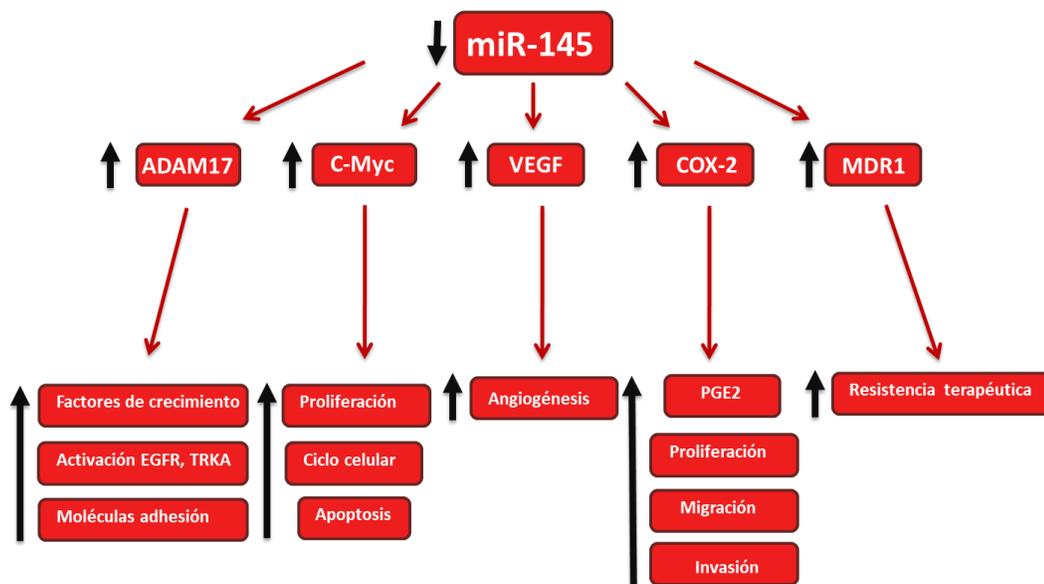
miR-12-92, miR-21, miR-145 y miR-23b se presentan desregulados en el estado patológico [26]. A su vez, se algunos de estos miRs se han correlacionado con la sobreexpresión del receptor TrkA en células de COE (figura 4). Interesantemente, algunos de esos miRs presentan potenciales aplicaciones en detección, diagnóstico y/o terapia. Dentro de los miRs más atractivos de estudio, se encuentra el miR-145, un oncosupresor [46, 47] el cual se ha sido evaluado como inhibidor de la proliferación, invasión y metástasis [48].

### **2.2.1. miR-145**

El miRNA-145 es un conocido regulador de una serie de proteínas oncogénicas importantes en la cancerogénesis (figura 7). Se ha encontrado significativamente *downregulado* en líneas de cáncer de ovario y se ha observado que su reincorporación inhibe la proliferación celular y promueve la apoptosis. En líneas celulares de gliomas también se ha reportado disminución en sus niveles, en donde se ha apuntado su función como un regulador negativo de la tumorigénesis [49]. Se ha demostrado que su restauración mediante la incorporación exógena, reduce significativamente la proliferación, migración e invasión en estudios *in vitro* y que uno de sus blancos directos y responsable en parte de estos efectos es la proteína ADAM17 (*A Disintegrin*

*and A Metalloproteinase 17*) generalmente sobreexpresada en cáncer de próstata, mama, ovario y carcinoma ductal pancreático [50]. ADAM17 puede activar factores de crecimiento, inactivar o activar ciertos receptores y moléculas de adhesión o superficie celular. ADAM17 está involucrada principalmente en la activación de la vía de EGFR (HER1) que regula proliferación celular, migración, adhesión, diferenciación y apoptosis [51]. Asimismo, se ha reportado que los niveles de ADAM17 durante la progresión del COE se encuentran aumentados, por lo que existe una correlación en la *dowregulación* del miR-145 y una *upregulación* de ADAM17. A su vez, los niveles de miR-145 se encuentran fuertemente involucrados con el proceso angiogénico en cáncer colorectal y cáncer de ovario. Reportándose, que el miR-145 regula la activación transcripcional de VEGF [52]. De la misma manera, participa en la expresión de la enzima COX-2 en cáncer de próstata a nivel transcripcional y post-transcripcional, teniendo un importante rol en la expresión de COX-2 en cáncer de ovario y los procesos inflamatorios y tumorigénicos [53]. Recientemente, para el cáncer ovárico, se ha descrito que el miR-145 actúa como represor del crecimiento celular mediante la unión directa al mensajero de c-Myc y su entrega exógena disminuye los niveles de c-Myc inhibiendo la proliferación celular y promoviendo la apoptosis [49]. El miR-145 además, suprime la invasión celular y metástasis por unión directa sobre el transcrito de MUC1 (*mucin 1*), una glicoproteína de membrana tipo I, que juega un rol importante en la protección de las células normales frente a

agentes patógenos, sin embargo, en células tumorales ejerce un rol evasor de la respuesta inmune. Clínicamente, la expresión de MUC1 ocurre frecuentemente en muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, ovario, pulmón, colon y carcinomas pancreáticos [48]. Además, recientemente se ha propuesto una función en la resistencia a la quimioterapia, ya que el miR-145 puede regular directamente los niveles de la bomba de eflujo MDR1, sobreexpresada en muchos tipos de cáncer resistentes a terapia [54].



**Figura 7. Diagrama de los principales blancos del miR-145.** El miR-145 inhibe directamente los RNA mensajeros de las proteínas ADAM17, C-myc, VEGF, COX-2 y MRD1, entre los más importantes en cáncer. En el estado patológico, los niveles de expresión del miR-145 disminuyen, aumentando la traducción de estas proteínas como consecuencia de la falta regulación de sus transcritos por el miR-145, lo que provoca el aumento del crecimiento, proliferación, angiogénesis y comportamientos asociados a la carcinogénesis.

Se ha demostrado que el miR-145 inhibe la invasión y metástasis en cáncer nasofaríngeo [55], el crecimiento tumoral y metástasis en cáncer colorrectal [56], inhibe el crecimiento e invasión en cáncer de mama [57]. Se ha observado que inhibe la proliferación, migración, invasión y la progresión del ciclo celular en cáncer gástrico [58]. Otros estudios han evidenciado que el miR-145 inhibe la proliferación celular y promueve la apoptosis, reduciendo significativamente la migración e invasión en cáncer hepatocelular [50], entre otros [59]. Además, se ha propuesto que pudiera ser un candidato como marcador de progresión en cáncer de próstata [60]. Por lo tanto, la administración del miR-145 de manera sistémica, para llegar a células tumorales primarias, células metastáticas o de recidivas, se proyecta como una investigación interesante de abordar, relevante por el alto potencial terapéutico.

### **2.3. Tratamientos actuales para el cáncer de ovario**

Las alternativas de tratamiento de primera opción, tanto en Chile como en el mundo, son el uso de cirugía citorreductora seguida de quimioterapia. Para aquellos casos en que la condición clínica no lo permite, existe la opción de tratamiento con quimioterapia neoadyuvante para reducir el tamaño del tumor y posteriormente, cirugía [61]. No obstante, tales

intervenciones solo logran citorreducir efectivamente no más que un 20 a un 30% de los casos [62]. Por consiguiente, las principales terapias que son utilizadas para el tratamiento del cáncer de ovario son cirugía de citorreducción, y quimioterapias con agentes citotóxicos como cisplatino, carboplatino y paclitaxel, los cuales no son fármacos selectivos para el cáncer de ovario.

La citorreducción en cáncer de ovario epitelial tiene dos objetivos, determinar la etapa del cáncer y extraer el máximo de tejido tumoral. En el procedimiento se trata de extraer quirúrgicamente la mayor masa tumoral posible, intentando no dejar ningún tejido tumoral remanente con un tamaño mayor a 1 cm. Algunos de los efectos secundarios de la citorreducción son, la resección incompleta del tumor, lo cual depende de su tamaño, grado de avance, metástasis, etc., dejar una colostomía temporal, un catéter temporal en la vejiga, además la citorreducción puede requerir de la extirpación del bazo, vesícula biliar, parte del estómago, hígado y/o páncreas. También podría requerirse la extirpación de ambos ovarios y el útero, por lo que la persona no podrá quedar embarazada y entrará en menopausia si no se le ha presentado aún [63].

El cisplatino es una coordinación metálica de platino que ha sido utilizada en diversos tipos de cáncer, tales como testicular, ovárico, de cabeza

y cuello, entre otros. Su principal efecto anticancerígeno se produce por la unión al centro reactivo de los residuos de purinas (N7) en la hebra de DNA, produciendo que la maquinaria de reparación no pueda unirse al DNA, por lo tanto, causando daño irreversible en las células cancerígenas, interrumpiendo la mitosis y llevando hacia la muerte celular mediada por apoptosis. Además, puede generar entrecruzamientos dentro de la hebra de DNA, entre bases purinas lo cual aumenta la toxicidad del cisplatino, al impedir la expresión de proteínas o la replicación celular [64]. Uno de los problemas de la administración de cisplatino es la resistencia, esto se produce debido a que provoca la rápida degradación del transportador de membrana de cobre – CTR1, transportador que es utilizado para ingresar a la célula, lo que conlleva a una disminución del ingreso de cisplatino hacia la célula, resultando en la aparición de resistencia [65]. La administración de este compuesto genera una gran cantidad de efectos secundarios, tal como hepatotoxicidad [66], nefrotoxicidad [67], alergias, entre otros efectos [64].

El carboplatino es un análogo del cisplatino que actúa bajo el mismo mecanismo de acción. La principal diferencia reside en que los efectos secundarios nefrotóxicos son menores, por lo que se utiliza como alternativa más segura al cisplatino [68]. Sin embargo, se ha evidenciado que puede producir toxicidad hematológica cuando es usado en dosis similares [69]. El paclitaxel ha sido utilizado en el tratamiento de distintos tipos de cáncer como

cáncer de ovario, cabeza y cuello, mama, entre otros. Su mecanismo de acción es a través de la unión a los microtúbulos, impidiendo su despolimerización, por lo que genera un arresto del ciclo celular en la fase G2/M [70]. La resistencia hacia este fármaco esta mediada por 3 mecanismos: la sobreexpresión de transportadores de membrana de salida (ABCB1 y ABCC10) [71, 72], mutaciones en la tubulina  $\alpha$  o  $\beta$ , alteraciones en la estabilidad de la red microtubular y, una reducida función de proteínas proapoptóticas como Bcl-2 y p53. El principal efecto secundario que tiene el paclitaxel es la neuropatía periférica [70].

El esquema primario de quimioterapia para cáncer ovárico es en base a carboplatino (AUC 6 mg/mL/min) más paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) cada 3 semanas o solo paclitaxel (80 mg/m<sup>2</sup>) cada semana, existiendo variaciones en la forma y vías de administración dependiendo de la condición de la enfermedad y de la paciente. En aquellas pacientes en las que se logra una citorreducción óptima, la opción de primera línea es el uso de quimioterapia postoperatoria endovenosa e intraperitoneal. La quimioterapia intraperitoneal está basada en cisplatino y ha demostrado resultados positivos en la sobrevivencia de pacientes en etapa III y citorreducción óptima. Sin embargo, puede provocar toxicidad, disfunción renal y neuropatías e incluso, en casos extremos, pérdida de la audición [73].

Para pacientes con enfermedad no citorrreductiva y de mal pronóstico, es posible utilizar además el tratamiento antiangiogénico con bevacizumab; un anticuerpo humanizado monoclonal anti-VEGF que impide la proliferación de células endoteliales [74]. A su vez, se ha comenzado a utilizar quimioterapia neoadjuvante (carboplatino AUC 5-6 más paclitaxel 135-175 mg/m<sup>2</sup>) antes de la cirugía citorrreductiva con el objetivo de reducir el tamaño del tumor, incrementando las probabilidades de una cirugía menos riesgosa, especialmente en mujeres de avanzada edad y con co-morbilidades [75]. Las recurrencias son tratadas dependiendo del intervalo libre de enfermedad y teniendo en cuenta posibles resistencias al platino, utilizando esquemas basados en carboxiplatino-paclitaxel (si el intervalo es mayor a 6 meses) o terapias con monofármaco asociadas a bevacizumab [76]. Se ha estimado que del 70 al 80% de los casos responde adecuadamente al tratamiento estándar inicial, experimentando remisión clínica satisfactoria, sin embargo, dependiendo de la etapa inicial de diagnóstico, la mayoría recurre en una forma de cáncer más agresiva y resistente que, indefectiblemente conduce a la muerte (figura 2) [10].

## 2.4. Estudios clínicos de nuevos tratamientos

En relación con los últimos avances en el desarrollo de fármacos para combatir el cáncer de ovario, existe una serie de estudios clínicos actualmente concluidos y en progreso que intentan acercarse a una solución, sin embargo, la mayoría de estos desarrollos logran prolongar el tiempo de vida del paciente en bajos porcentajes.

Pazopanib es un inhibidor de receptores tirosina quinasa, cuyos blancos moleculares son el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) -1, -2, -3, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)  $\alpha/\beta$ , el receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) -1 y -3 y la proteína tirosina quinasa Kit (c-KIT). Estudios clínicos en fase III demostraron que la incorporación de pazopanib al tratamiento estándar extendió la sobrevida libre de enfermedad (SLE) en pacientes, por 5,6 meses. Sin embargo, debido a su inespecificidad, se presentaron serios efectos adversos como hipertensión, diarrea, náuseas, dolor de cabeza y fatiga [77].

Nintedanib es otro inhibidor de tirosina quinasa de administración oral, sus blancos son VEGFR, PDGFR y FGFR. En el estudio clínico en fase III se observó que los pacientes que recibieron este inhibidor tuvieron un

aumento en la SLE de 0,7 meses. Sus principales efectos tóxicos fueron diarrea y transaminasas elevadas [78].

También se ha abordado el desarrollo de fármacos antiangiogénicos, tal como Cediranib, un inhibidor de tirosina quinasas que inhibe VEGFR-1, -2 y -3, inhibiendo la señalización de VEGF, con ello los efectos en la generación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor. Los estudios realizados en fase III determinaron que la administración favoreció con 3,1 meses en la extensión de SLE. Sin embargo, los efectos tóxicos encontrados incluyeron hipertensión, diarrea, hipotiroidismo, ronquera, hemorragias, proteinuria y fatiga [79].

AMG386 es un agente molecular nuevo, un péptido de fusión, diseñado para inhibir la angiogénesis, que actúa secuestrando la angiopoyetina (ANG) -1 y -2, fuertemente involucradas en la formación de nueva vasculatura, maduración de vasos sanguíneos, adhesión y migración, previniendo de esta manera su interacción con el receptor tirosina quinasa TIE2 endotelial. Su actividad fue evaluada en un estudio clínico en fase III observando que la SLE se prolongó en un 52%. Es por esto, que en la actualidad se está llevando a cabo un segundo estudio en fase III para AMG386 para ensayar sus potenciales beneficios [80].

En otro ámbito, los estudios de terapias basadas en nanotecnología se encuentran en aumento, en donde ya se han investigado avances importantes en el desarrollo de terapias dirigidas y con efectos secundarios limitados. Dentro de estos desarrollos, encontramos como ejemplo, el uso de nanopartículas de oro para la sensibilización de células tumorales de cáncer de ovario para evitar la quimiorresistencia por cisplatino [81] aumentando la efectividad del fármaco.

Por otro lado, existe un creciente interés en la investigación de nuevas áreas de la biología para desarrollar terapias innovadoras, efectivas y con menores riesgos y efectos secundarios. Como ejemplo, han aumentado los estudios respecto del potencial de RNAs no codificantes como agentes terapéuticos. Lo que ha llevado a que recientemente, en el año 2018 la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobara el primer fármaco basado en RNAs, el Patisiran; un siRNA desarrollado para una polineuropatía rara provocada por amiloidosis hereditaria mediada por la proteína transtiretina (hATTR), cuyo mensajero es degradado por la acción del siRNA [82, 83]. No obstante, este importante avance, es un hecho que los ensayos clínicos que normalmente atacan exclusivamente un blanco molecular en una vía biológica a menudo fallan en revertir el fenotipo patogénico debido a la etiología multifactorial de la enfermedad y la capacidad de adaptabilidad de las células cancerígenas [84]. Es por esto que, moléculas de RNAs como los miRNAs, son objetivo de estudio

como agentes terapéuticos pleiotrópicos, debido a su capacidad de interactuar con múltiples blancos moleculares, teniendo así la posibilidad de regular vías biológicas completas que se encuentran desreguladas.

## **2.5. miRs como terapia génica**

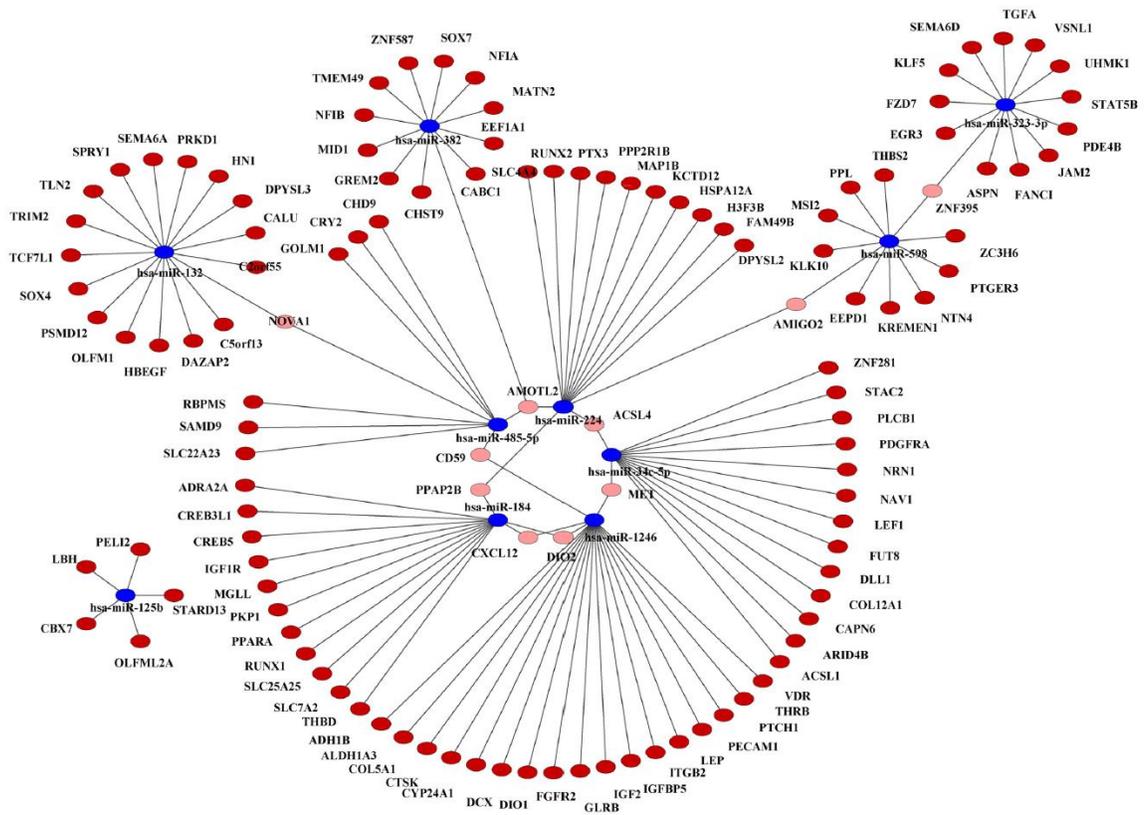
Los niveles normales de miRs oncosupresores que se encuentran *downregulados* en cáncer pueden ser potencialmente restaurados a sus niveles normales [85]. Los miRs pueden ser administrados dentro de las células mediante diversos métodos; por transfección de plásmidos con secuencias que codifiquen para los miRs de interés, infección utilizando retrovirus o lentivirus que expresen los miRs para que la maquinaria interna celular transcriba estos productos y sean procesados debidamente por la célula hospedera, o introduciendo exógenamente miRs sintéticos o miméticos en alguno de los estados de procesamiento regular (pri-miR, pre-miR, doble hebra, hebra simple, etc). Asimismo, para disminuir los niveles de miRs oncogénicos que se encuentran aumentados en cáncer, es posible introducir secuencias antisentido llamadas antagomirs, mediante las mismas estrategias mencionadas anteriormente. Estas secuencias hibridan con los miRs, previniendo de esta manera que los miRs oncogénicos actúen sobre sus blancos moleculares. Reprimiendo características importantes para el

desarrollo del cáncer, como proliferación, migración, invasión, desdiferenciación, inhibición de la apoptosis, angiogénesis, etc. [86, 87].

Una de las características principales, que hace a los miRs y antagomirs alternativas relevantes como estrategia terapéutica, es que, al interactuar con múltiples blancos moleculares, la respuesta terapéutica inhibitoria se amplifica y maximiza, inhibiendo no solo la traducción de una proteína en particular, como sucede en el caso de la administración exógena de siRNAs, sino de rutas completas y familias de proteínas involucradas en la generación del fenotipo cancerígeno (figura 8) [88].

La terapia génica, entre los nuevos desarrollos terapéuticos, es uno de los más interesantes y promisorios. Esta, tiene el potencial de tratar enfermedades a nivel de ácidos nucleicos, mediante la manipulación, reemplazo, silenciamiento, restauración o reprogramación del material genético [89]. Actualmente, las terapias basadas en la incorporación de genes o la modificación de su expresión se han posicionado en la investigación científica como viables, comenzando a estudiarse más profundamente, lo que se refleja en el creciente número de ensayos clínicos llevados a cabo a nivel mundial [90]. Sin embargo, uno de los puntos críticos y retos claves, en el cual muchos de los investigadores principales en la materia están de acuerdo, es que, es necesario el desarrollo de tecnologías para entregar el material

genético en las células blanco deseadas, con alta eficiencia de transfección y selectividad por células y tejido tumoral, para que de esta manera la terapia sea eficiente, dirigida y los efectos secundarios sean evitados [91].

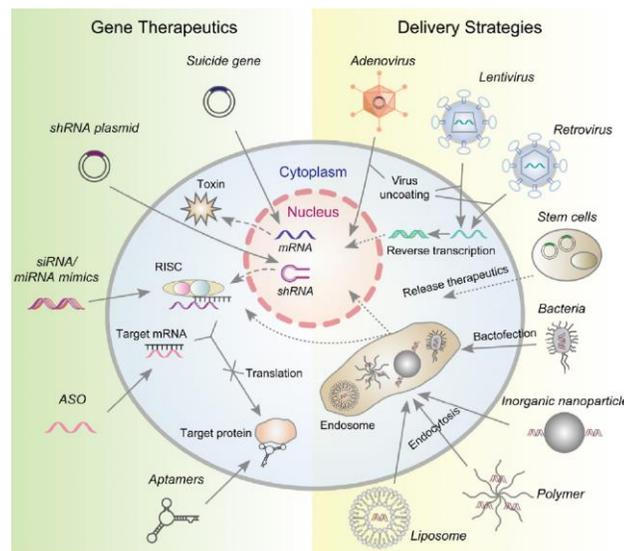


**Figura 8. Red de interacción entre miRs y sus genes blanco para cáncer de mama. En Azul se representan los miRs, en rojo los blancos regulados por solo un miR, en rosado, los blancos regulados por más de un miR [88].**

### 2.5.1. Vectores de entrega de material genético

En el contexto de los transportadores de material genético hacia la célula, han sido elaboradas diversas alternativas biológicas y químicas (figura 9), una de las más estudiadas es la utilización de vectores virales. Estos, han sido ampliamente estudiados y utilizados para mediar la entrega de genes, tanto de genes codificantes para proteínas, como no codificantes, dentro de los cuales se incluyen los RNAs antisentido como shRNAs, siRNAs o miRs miméticos. Las ventajas de este tipo de vectores son que poseen una alta eficiencia de transfección, debido a la alta especificidad de los virus utilizados, otorgando, además, la posibilidad de expresión a largo plazo cuando el material genético se inserta en el DNA del hospedero y se utiliza su maquinaria de transcripción para su producción [92]. No obstante, están acompañados de una serie de problemas en relación a la seguridad biológica. Se ha reportado que su administración tanto *in vitro* como *in vivo*, puede llevar a mutagénesis por inserción con consecuente carcinogénesis, respuesta inmune aguda e inmunogenicidad, lo cual además de provocar daños en la salud, puede resultar en una disminución en la eficiencia de transfección y expresión del gen, en consecuencia, de la efectividad terapéutica [93]. Además, los vectores virales tienen también otras limitaciones. Debido al espacio de carga de ácidos nucleicos en el interior de la partícula viral, es que existe un límite en el tamaño en pares de bases del material genético a insertar dentro del genoma viral. En

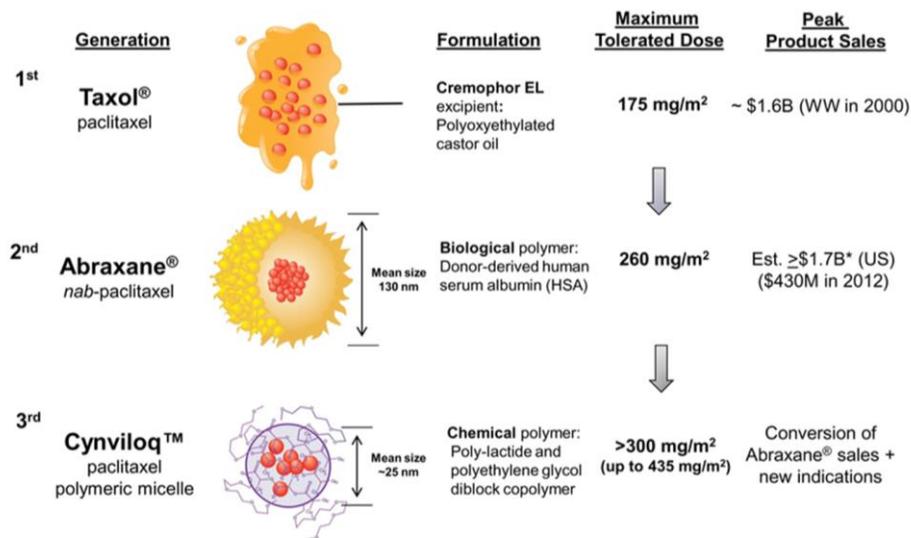
cuanto a la producción de partículas virales, se encuentran importantes complicaciones en la producción a baja y gran escala. Si bien, los virus o cepas virales poseen una alta especificidad frente a ciertos tejidos, las posibilidades de modificaciones para modular la especificidad hacia otros tejidos son bajas y complejas [94]. Debido a esto, para la entrega de moléculas antisentido como DNA, siRNA, shRNA y miRs, o plásmidos con dichas secuencias para su expresión, la utilización de la nanotecnología para el desarrollo de vectores químicos en forma de nanopartículas, ha sido establecida como una excelente alternativa debido a sus favorables propiedades fisicoquímicas y en términos de capacidad de carga de ácidos nucleicos, potencial selectividad hacia células y tejidos, baja inmunogenicidad y efectos citotóxicos [93].



**Figura 9. Estrategias de entrega para terapia génica.** Diferentes sistemas para la entrega de material genético, en donde destacan los sistemas nanoparticulados como liposomas, polímeros y nanopartículas metálicas [95].

## **2.6. Nanotecnología como herramienta de terapia en cáncer**

La nanomedicina como subárea de la nanotecnología, ha alcanzado una gran importancia en el desarrollo de nuevas estrategias para la entrega de fármacos para terapia y la generación de dispositivos para la detección de marcadores celulares para diagnóstico temprano de enfermedades como el cáncer. En las últimas dos décadas se han generado numerosas investigaciones en torno a la utilización de nanopartículas de diversos materiales para el tratamiento de enfermedades, así como dispositivos nanoestructurados de uso externo o de administración sistémica para la detección de moléculas biomarcadoras [95]. Las aproximaciones en la liberación controlada de fármacos se focalizan en el desarrollo de nanopartículas para mejorar la biodisponibilidad, seguridad y acción de una molécula activa. Como ejemplo de nanomedicinas que sortearon todas las pruebas clínicas y se encuentran actualmente disponibles en el mercado para su uso, es destacable la evolución que han tenido las formulaciones farmacéuticas del paclitaxel, desde el Taxol, hasta formulaciones de nanomedicinas como el Abraxane de 130 nm y el desarrollo de 3ra generación Cynviloq de 25 nm (figura 11).

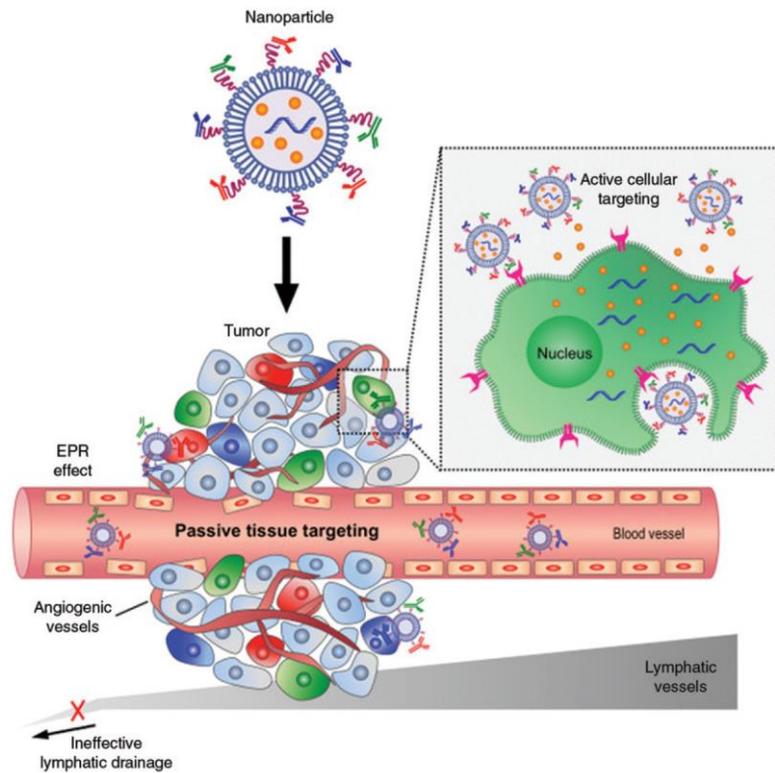


**Figura 10. Evolución de formulaciones farmacéuticas para la entrega de paclitaxel.**

Para la generación de nanomedicinas, se han explorado diversos tipos de materiales. Una amplia gama de agentes poliméricos e inorgánicos estructurados nanométricamente, con propiedades idóneas para ser administrados *in vivo*, han sido desarrollados debido a su baja toxicidad, eficiencia de entrega, degradabilidad y biodisponibilidad [96].

Dentro los nuevos avances tecnológicos para enfrentar retos terapéuticos tales como terapias contra el cáncer, la nanotecnología se encuentra en una posición relevante y de vanguardia ya que, debido a las propiedades que adquieren los materiales en la escala nano, presentan atractivas características para usos como agentes terapéuticos o vectores de entrega selectiva de fármacos. Las nanopartículas (Np) son estructuras con

tamaños menores de 100 nm de diámetro en, al menos una de sus dimensiones [89]. Han sido estudiadas extensamente para su utilización en la liberación controlada de fármacos quimioterapéuticos, mejorando su eficacia de acción y seguridad [97]. Dependiendo de su diseño y configuración, las Np pueden alcanzar los tumores mediante dos vías principales: la acumulación pasiva y/o activa. La vía pasiva, toma ventaja del fenómeno de *enhanced permeability and retention* (EPR) el cual se encuentra presente en el área cercana a los tumores debido a sus vasos sanguíneos defectuosos en cuanto a las uniones estrechas de las células endoteliales y a la ausencia de vasculatura linfática en las proximidades del tumor. Esto facilita a las Np el encuentro con el tumor y su acumulación en el espacio intersticial. La vía activa, si bien se encuentra bajo del efecto EPR, a su vez, está relacionada con la especificidad hacia el tejido diana, lo cual se puede alcanzar mediante la modificación de la superficie de las Np con moléculas como anticuerpos o ligandos que interactúen con receptores tejido-específicos sobreexpresados en las células tumorales, tales como el receptor de transferrina, ácido fólico, de la hormona folículo estimulante (FSH), glicoproteínas, receptores de factores de crecimiento (EGFR) o integrinas, por mencionar solo algunos. Incrementando, de esta manera, la retención de las Np en el tejido tumoral, promoviendo su internalización dentro de las células y mejorando la eficiencia de la entrega [89, 94, 98].



**Figura 10. Targeting pasivo y activo.** Efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) en los vasos sanguíneos que conectan con el tumor, lo que hace posibles estrategias de entrega de fármacos mediante direccionamiento pasivo o activo mediante la funcionalización de nanomateriales [99].

### 2.6.1. Moléculas diana para direccionamiento en cáncer ovárico

En cáncer de ovario existen algunas moléculas presentes en la superficie celular que pueden ser utilizadas para mediar el reconocimiento e ingreso selectivo de los nanosistemas hacia el interior de la célula.

El receptor TrkA, de alta afinidad para el *nerve growth factor* (NGF) es expresado en las células de la granulosa y de la teca en el ovario, y se ha reportado su sobreexpresión en tumores ováricos. Interesantemente, este receptor aumenta su expresión conforme avanza el estado de malignidad de la enfermedad, lo cual puede ser una ventaja al momento del reconocimiento por el nanosistema, el cual podría tener un mayor ingreso en estados avanzados de la enfermedad [100]. Su ligando NGF, es un polipéptido de gran tamaño (13,25 kDa) y como tal, existe una dificultad inherente del tamaño que imposibilita su incorporación en la superficie de nanopartículas. Son requeridos, además, estudios acerca de la fracción del ligando que interactúa fisicoquímicamente con el receptor TrkA, para evaluar su potencialidad de síntesis y funcionalización de Np, o moléculas antagonistas o agonistas que también tengan afinidad por este receptor. No obstante, TrkA no es un receptor específico del ovario y se encuentra expresado en otros tejidos [101] y, de manera importante en el sistema nervioso, por lo que es probable la generación de efectos adversos.

Otro de los receptores atractivos como blanco para direccionar la llegada de Np a tumores en general, sobreexpresado en cáncer de ovario es el receptor de folato (FR $\alpha$ ). El folato es un metabolito crítico para la síntesis de DNA y reacciones de metilación, el cual es incorporado vía endocitosis de manera muy activa por las células tumorales [102]. Ha sido reportado que el

FR $\alpha$  es expresado en el 80% de los COE y su expresión se correlaciona fuertemente con el estado y grado de malignidad [103]. El FR $\alpha$  se expresa normalmente en muy pocos tejidos, principalmente en los túbulos proximales en riñón, pero también en menor grado en glándulas bronquiales en pulmón, plexo coroideo en cerebro, trompas de Falopio, útero, y células epiteliales de mama, estando restringido exclusivamente a la superficie apical de las células epiteliales polarizadas, siendo inaccesible desde la circulación sanguínea [104]. Además, la sobreexpresión en tumores ováricos se ha observado que oscila entre 10 y 100 veces más que en riñón, donde normalmente se expresa en mayor nivel [105]. Por lo tanto, la sobreexpresión específica de este receptor y la capacidad de internalización lo posicionan como una adecuada estrategia para la entrega selectiva de fármacos y Np [104]. La incorporación de moléculas de ácido folato en sistemas nanoparticulados, ha sido explorada con resultados promisorios en cuanto a la selectividad *in vitro* e *in vivo* hacia células y tejidos tumorales, aumentando el ingreso intracelular mediante endocitosis mediada por el FR $\alpha$  [106, 107].

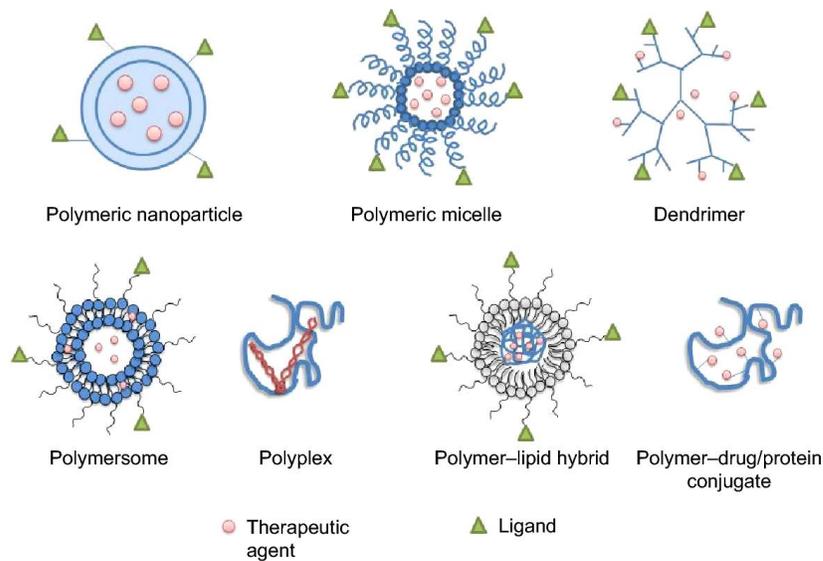
Por otra parte, y particularmente para el cáncer de ovario epitelial, existe un receptor que se encuentra normalmente expresado de manera específica y en altos niveles en células ováricas epiteliales en mujeres y en células de origen prostático en hombres, sin encontrarse expresión en otras células de tejidos sanos [108]; el receptor de la hormona folículo estimulante

(FSHR) observándose que, en el estado patológico de cáncer, este se encuentra sobreexpresado en al menos 2 órdenes de magnitud [109]. La hormona FSH es una molécula heterodimérica, secretada por la glándula pituitaria, compuesta por la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ , la cual se une con alta afinidad a su receptor. De esta manera el receptor FSHR se convierte en un blanco molecular racional para el desarrollo de una terapia selectiva contra el cáncer ovárico. En la literatura se ha reportado la utilización de péptidos de FSH asociados sobre la superficie de nanopartículas poliméricas para entregar selectivamente fármacos como paclitaxel hacia células que expresan el receptor FSHR, sin embargo, se han evidenciado efectos tóxicos agudos luego de la exposición al nanosistema debido a la formación de agregados de los polímeros utilizados en la obtención de las nanopartículas [110].

### **2.6.2. Nanopartículas poliméricas como vectores**

Las nanopartículas poliméricas comenzaron a ser una alternativa a la terapia génica mediada por vectores virales debido a los eventos críticos en la seguridad de estos últimos, siendo inclusive llamada como *non-viral gene therapy*. De esta manera los vectores químicos comenzaron a ser el resultado del avance en la ciencia de los materiales y la química, alcanzando la capacidad de modular la obtención de partículas de tamaño nanométrico, de

carácter homogéneo, de fina configuración y funcionalidad en donde pudieran albergarse moléculas de ácidos nucleicos protegidas de la degradación y evitando los riesgos en la seguridad. Las nanopartículas poliméricas se conforman por agrupaciones de polímeros solubles en agua, lipídicas, con carácter anfifílico o mezclas de estos para generar las características fisicoquímicas deseadas. Dentro de los sistemas más destacados se encuentran las micelas, dendrímeros, polimerosomas, poliplexes, etc. (figura 11) [111].



**Figura 11. Representación de diferentes tipos de nanopartículas poliméricas. [112]**

En cuanto a la entrega de material genético en el tejido celular deseado por cualquier sistema nanoparticulado en general, hay tres grandes desafíos a considerar al desarrollar un sistema para terapia génica: 1)

distribución preferencial hacia el tejido blanco, 2) internalización celular en las células diana y 3) la liberación del contenido en el espacio citoplasmático para ejercer el efecto activo en el blanco molecular. En ese sentido las nanopartículas poliméricas tienen la posibilidad de ser modificadas químicamente para añadir moléculas de direccionamiento; ha sido evaluado el escape endosomal mediante el efecto esponja de protones e hinchazón del endosoma tardío para lograr la liberación de su contenido en el citoplasma [111]. Existe una amplia gama de configuraciones y agentes poliméricos para la obtención de nanopartículas.

Las micelas son un bloque de copolímeros con carácter anfifílico, autoensamblables en medio acuoso, que forman una arquitectura tipo *core-shell* resultando en un centro hidrofóbico capaz de encapsular sustancias apolares y una superficie hidrofílica que se puede modificar con moléculas de interés terapéutico o de direccionamiento [113].

Los polimerosomas o *polymer-based liposome*, son entidades poliméricas que adoptan la forma de vesículas las cuales se forman mediante procesos de hidratación de bloques de copolímeros anfifílicos (no lipídicos). Pueden estar formados por polímeros como polietilenglicol-polibutadieno (PEG-PBD), polietilenglicol-polietileno (PEG-PEE), poli N-isopropil acrilamida (PNIPAm), etc. La formación de estos polimerosomas permite la

encapsulación de moléculas de mayor tamaño que las micelas. Pudiendo cargar moléculas terapéuticas hidrofílicas en su interior, tal como ácidos nucleicos. Dependiendo de la configuración de la arquitectura polimérica, estas nanoestructuras también son susceptibles de modificaciones químicas en su superficie para otorgarle diferentes propiedades biológicas [114, 115].

Otros tipos de polímeros hidrofílicos como los nanogeles o microgeles han sido desarrollados, con alta afinidad acuosa y su arquitectura entrecruzada. Poseen un alto contenido de agua en su interior lo que les permite incorporar grandes cantidades de moléculas hidrofílicas. Esta tecnología comenzó su investigación con estructuras de tamaño micrométrico, sin embargo, en la actualidad se han alcanzado tamaños nanométricos para aplicaciones como la terapia génica [116].

A pesar de la gran cantidad de desarrollos surgidos en el área de las nanopartículas poliméricas, se continúa investigando acerca de la necesidad de entender ampliamente la importancia de cada diseño molecular y la complejidad de posibilidades que estos generan. Los nanopolímeros tienen la ventaja de poder ser biodegradables, bajamente tóxicos, modulables en tamaño, etc., sin embargo, la funcionalización con moléculas para el direccionamiento o entregarle propiedades fisicoquímicas diferentes no es trivial. Además, la capacidad de carga de fármacos en general o de ácidos

nucleicos como miRs es baja y depende de la configuración polimérica [111].

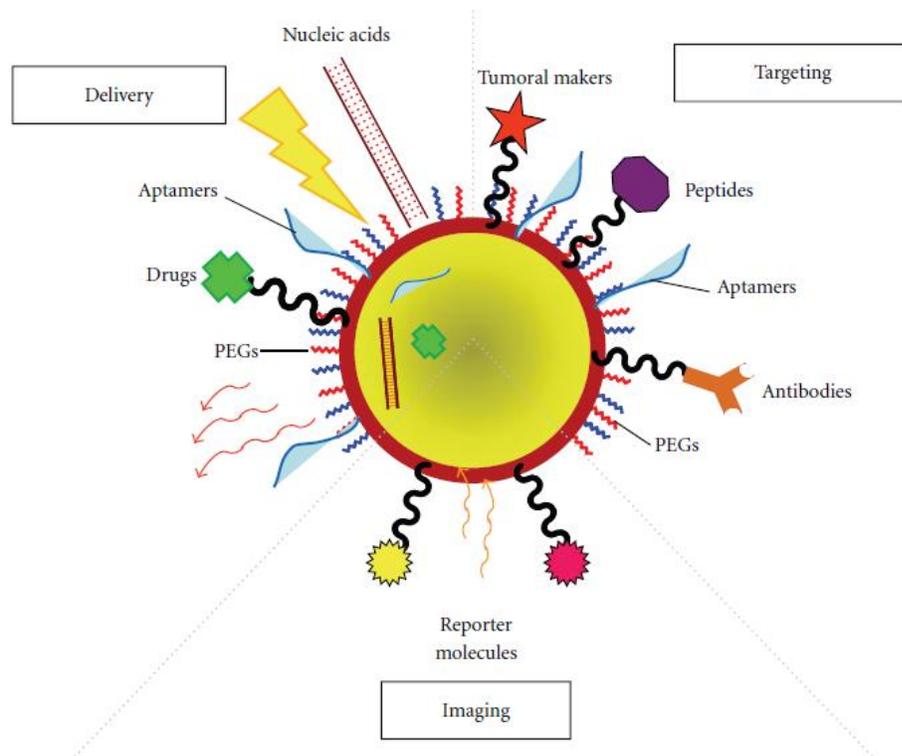
### **2.6.3. Nanopartículas de oro para la entrega de miRs**

Las nanopartículas de oro (NpO) representan un sistema muy interesante debido a una multiplicidad de características positivas. Diversas investigaciones utilizando NpO han concluido que éstas presentan bajos o nulos niveles de toxicidad para las células *in vitro*, aun a altas concentraciones, lo cual depende principalmente de la configuración del recubrimiento orgánico en la superficie de la nanopartícula [117]. Asimismo, se ha demostrado *in vivo* que luego de administraciones repetidas en ratones, no hubo evidencia de toxicidad en términos de supervivencia, comportamiento, peso animal, morfología de los órganos, bioquímica sanguínea e histología de tejidos [118]. Además, las NpO poseen peculiares propiedades ópticas, particularmente interesantes para una terapia contra el cáncer. En presencia de irradiación electromagnética, los electrones de la superficie del metal pueden interactuar con ciertas longitudes de onda (dependiendo del tamaño de la partícula) y oscilar de manera coherente. Este fenómeno de resonancia, genera calor nanométricamente localizado, capaz de eliminar células cancerígenas sin afectar a las células sanas que la rodean, un efecto llamado *localized surface plasmon resonance* (LSPR) [119]. Es decir, las NpO pueden ser administradas

y luego de un tiempo adecuado, ser irradiadas localmente en el tumor con una longitud de onda específica y entonces, el calor generado podrá eliminar las células malignas, reduciendo el tamaño del tumor. Este fenómeno de hipertermia es aditivo para un efecto terapéutico relacionado con la entrega de moléculas bioactivas transportadas en su superficie. Se ha observado que las células cancerígenas que permanecen vivas luego de un tratamiento de hipertermia son más sensibles a la posterior terapia farmacológica tradicional [120]. Adicionalmente, las NpO poseen la ventaja de la simpleza de su síntesis, obteniendo dispersiones monodispersas con rendimiento adecuado y perfectamente escalables [121]. La superficie de las NpO puede ser modificada con moléculas tales como anticuerpos, agonistas, antagonistas o ligandos naturales de algún receptor de membrana alta y diferencialmente expresado (figura 12). De esta misma manera, las NpO pueden ser también multifuncionalizadas con diferentes moléculas activas que, pueden conferirle, por una parte, selectividad hacia el tejido blanco y por otra parte, la acción terapéutica deseada, tal como oligonucleótidos antisentidos como los siRNAs o miRs. Asimismo, pueden ser modificados con moléculas fluorescentes que les otorgue la capacidad de monitorizar la localización de las NpO en el organismo [122].

Actualmente existen algunos reportes acerca de la utilización de NpO como vehículo para la entrega de miRs o siRNAs en formulaciones que

incorporan moléculas de polietilenglicol, demostrando aumentar la estabilidad y la eficiencia en la internalización celular. De esta manera la entrega y el efecto silenciador génico *in vitro* se demuestra más eficientemente que la administración de miRs o siRNAs sin vehiculizar [123]. Sin embargo, en tales desarrollos no se ha contemplado la multifuncionalización de las NpO con moléculas tales como ácido fólico, péptidos o FSH para el direccionamiento selectivo, lo cual es importante para aplicaciones *in vivo*.



**Figura 12. Nanopartículas de oro y su superficie modulable.** Las NpO pueden ser fácilmente funcionalizadas con diversas moléculas a la vez; la molécula terapéuticamente activa, moléculas de reconocimiento de la diana y reporteros fluorescentes o luminiscentes [124].

El mecanismo por el cual las NpO cargadas con miRs ingresan a la célula y son capaces de entregar el material genético ha sido poco estudiado. No obstante, se ha observado que NpO de entre 10 – 50 nm son capturadas por la vía clásica endocítica, mediante endocitosis adsorptiva [125]. En tanto, se ha demostrado que NpO que han sido funcionalizadas con moléculas que poseen afinidad por receptores sobreexpresados en la superficie celular, ingresan por la vía de la endocitosis mediada por receptor, lo cual involucra principalmente endocitosis mediada por clatrina [126]. Respecto del escape endosomal y la entrega del material genético, el mecanismo de escape no ha sido dilucidado, sin embargo, han sido cuantificados los efectos del silenciamiento génico, lo que deja en evidencia que las NpO y las moléculas activas que estas cargan en su superficie son capaz de alcanzar el citoplasma, evadiendo el endosoma y posterior lisosoma, siendo capaces de entregar los miRs o siRNAs a su blanco molecular [123, 127]. Hasta la fecha, solo existe un reporte con NpO solidas que incorpore direccionamiento con moléculas de folato y un miR como molécula terapéutica [110]. En este sentido, las NpO ofrecen una plataforma ideal para la incorporación de todas las características necesarias para la vectorización de miRs con ventajosas propiedades para una terapia contra el cáncer de ovario.

## II. PROPUESTA

El objetivo de esta investigación es desarrollar un sistema nanoparticulado de entrega de miRs como agente activo, vectorizado en nanoesferas de oro (GNS) de 12 nm, funcionalizadas con moléculas de ácido fólico (FA) o con el péptido FSH33 (una fracción central de la hormona folículo estimulante, FSH), para entregar direccionalidad y especificidad por el tejido tumoral (figura 13).

La incorporación del miR-145 en la superficie de las GNS y su posterior entrega en las células de cáncer ovárico podrá inhibir procesos importantes para la progresión de cáncer, tales como la angiogénesis, proliferación, migración e invasión. Debido a los diversos blancos y procesos moleculares regulados que han sido reportados para el miR-145, este nanosistema podrá tener la potencialidad de actuar como agente citotóxico o citostático. De esta manera, el sistema desarrollado podrá ser utilizado como terapia neoadyuvante (en caso de ser citotóxico) antes de la cirugía de citoreducción, o como terapia adyuvante (en caso de ser citostático), luego de la cirugía, en administración conjunta endovenosa o intraperitoneal para eliminar células residuales, así como también, luego de la aparición de recurrencias post cirugía.

Una vez obtenido el nanosistema, se evaluarán los efectos citotóxicos *in vitro*; Si el sistema solo presentase efectos citostáticos, los estudios y evaluaciones posteriores se realizarán en conjunto con un fármaco de uso clínico, tal como cisplatino y se evaluarán los efectos como adyuvante. Todo esto debido a que el nanosistema solo podrá utilizarse post-cirugía y en el tratamiento de recurrencias en conjunto con terapias existentes. El nanosistema se evaluará *in vitro* en 2 líneas celulares; la línea celular de cáncer ovárico epitelial humano A2780 la cual presenta las características celulares y moleculares similares a células tumorales de cáncer de ovario y la línea SKOV3 derivada de ascitis de cáncer ovárico que presenta resistencia a fármacos citotóxicos de uso clínico como cisplatino. Ambas líneas celulares, son las más utilizadas para estudios en cáncer de ovario en la actualidad, ambas presentan sobreexpresión del receptor de folato FR $\alpha$  y del receptor de la hormona FSH, por lo que se presentan como modelos celulares adecuados para ensayar el nanosistema.

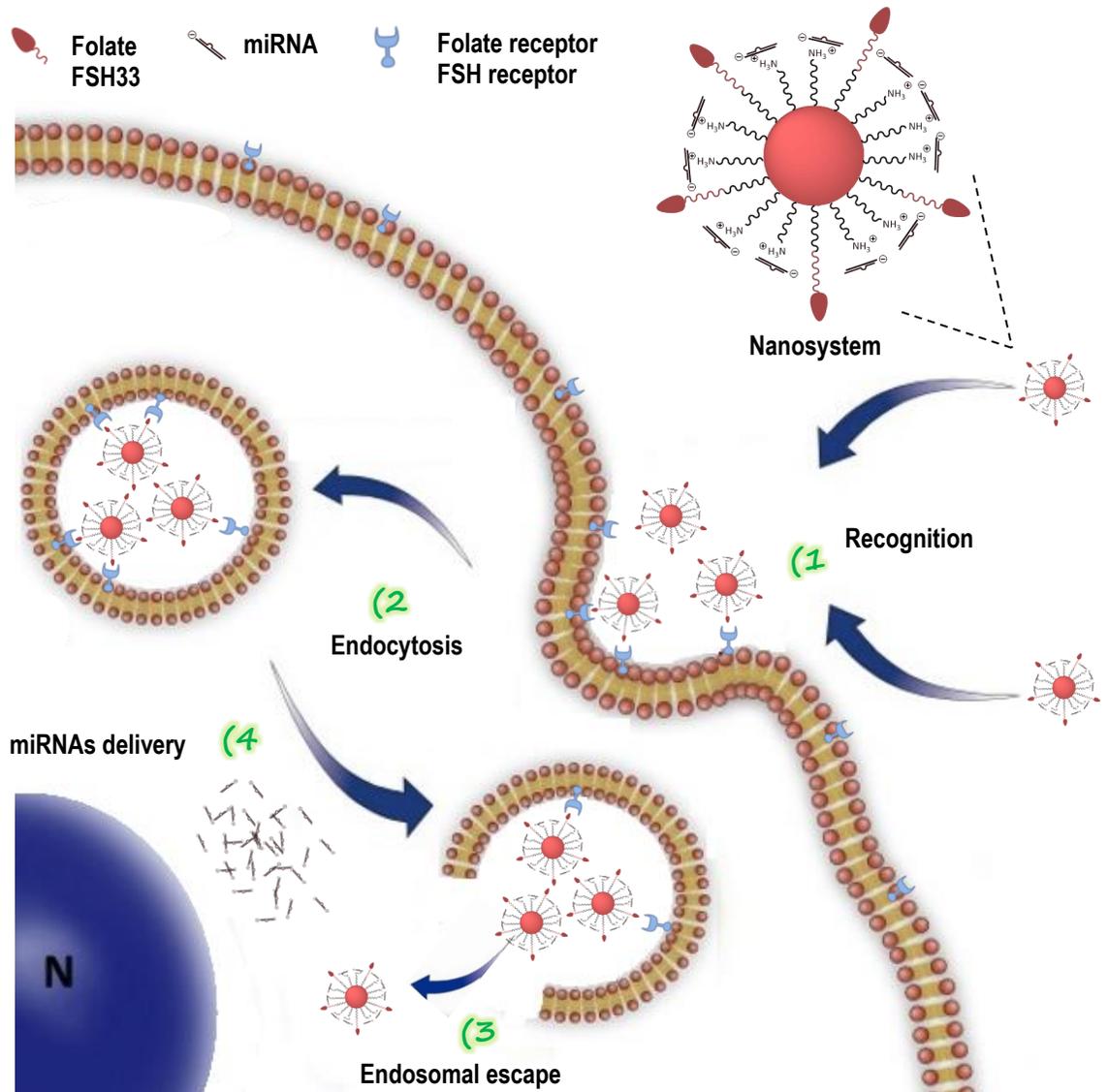


Figura 13. Esquema de la propuesta del desarrollo del nanosistema y su acción.

## **Hipótesis**

El nanosistema GNS-FA-miR-145 y/o GNS-FSH33-miR-145 disminuye *in vitro* procesos importantes para el desarrollo de cáncer ovárico

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Desarrollar un nanosistema de entrega selectiva de miR-145 hacia células de cáncer ovárico para disminuir sus capacidades cancerígenas

### **Objetivos específicos**

- 1) Obtener y caracterizar GNS de 12 nm, conjugar y funcionalizar con ácido fólico o FSH33 y el miR-145.
- 2) Evaluar *in vitro* la selectividad e incorporación celular de los nanosistemas
- 3) Evaluar *in vitro* los efectos celulares y moleculares de la nanoterapia

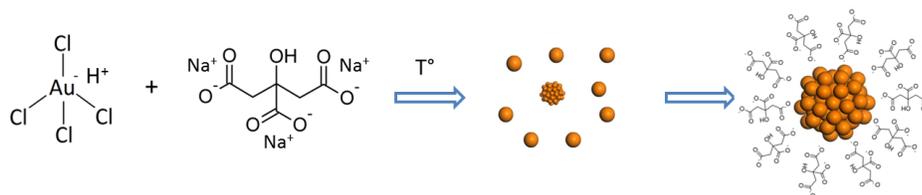
## **Capítulo 2: Metodología**

### **III. METODOLOGÍA**

#### **1. Obtención y caracterización de GNS de 12 nm, conjugación y funcionalización con FA o FSH33 y el miR-145**

##### **1.1. Obtención de GNS**

Se obtuvieron GNS de 12 nm de diámetro mediante el método de reducción química de la sal  $\text{HAuCl}_4$  con citrato de sodio en condiciones controladas de tiempo y temperatura [128]. Se procedió a preparar una disolución de  $\text{HAuCl}_4$  0,01 M en matraz de aforo, la cual fue vertida en un balón de dos bocas con una columna de refrigeración acoplada, sobre un agitador magnético con control de temperatura, hasta alcanzar los 185 °C esperando un reflujo constante por al menos 3 minutos. Posteriormente, se añadió por una de las bocas un volumen de 10 mL de una disolución de citrato de sodio 38,8 mM previamente calentada hasta 60 °C. Se dejó reaccionar por 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La dispersión resultó de un color rojo borgoña, la cual se filtró con filtro de jeringa de 0,22 micras de poro para eliminar residuos aglomerados desde la síntesis, se ajustó pH a 9 y se almacenó a 4 °C.



**Figura 14. Representación esquemática de la síntesis de GNS.** Reacción de óxido-reducción a partir de sal de oro y citrato de sodio como reductor.

## 1.2. Conjugación de GNS con polietilenglicol

De la dispersión obtenida de GNS de aproximadamente 12 nM, se tomó una alícuota y se llevó a la concentración de 5 nM con citrato de sodio 1,2 mM (concentración de citrato presente en la dispersión inicial). Para un volumen de 20 mL de GNS, se masó 4 mg de polietilenglicol con terminales sulfhidrilo y amino (SH-peg-NH<sub>2</sub>) de 5 kDa de peso molecular. Esta masa se disolvió en 1 mL de citrato de sodio 1,2 mM y se añadió gota a gota a los 20 mL de GNS 5 nM bajo agitación magnética en un vaso de precipitado. Se dejó reaccionar por 5 horas. Una vez cumplido el tiempo, para eliminar el exceso de SH-peg-NH<sub>2</sub> que no se quimisorbió sobre la superficie de las GNS y para eliminar el citrato de sodio presente en la dispersión inicial, todo el volumen se centrifugó en tubos cónicos de 1,5 mL, por 30 min a 16000 g. El sobrenadante se descartó y las GNS conjugadas al SH-peg-NH<sub>2</sub> (GNS-peg-NH<sub>2</sub>) que quedaron en la pella, se redispersaron en el mismo volumen con

agua mili Q. Este procedimiento se realizó 3 veces para asegurar la eliminación completa de las moléculas en exceso.

### **1.3. Funcionalización del sistema GNS-peg-NH<sub>2</sub> con FA o FSH33**

Para funcionalizar el sistema GNS-peg-NH<sub>2</sub> con FA o FSH33 se procedió a activar los grupos de ácido carboxílico presentes en la molécula de FA o FSH33 para hacerlos más reactivos frente a las aminas primarias del sistema nanoparticulado. Para esto, se incubó 1 mg de FA o FSH33 en 1 mL de tampón MES (ácido 4-morfolinoetanosulfónico) a pH 5 con el agente entrecruzante EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) el cual forma un éster intermediario del reactivo O-acilisourea con la molécula de FA o FSH33, este éster es fácilmente desplazado vía ataque nucleofílico por parte de grupos amina primaria, sin embargo, es inestable en agua por lo que en la disolución se agregó el reactivo NHS (N-hidroxisuccinimida) que desplaza la molécula de isourea y se establece un éster-NHS con el FA o FSH33, el cual es estable en agua y es reactivo frente a aminas primarias. Se dejó reaccionar por 15 min bajo ultrasonido y 15 minutos bajo agitación. Posteriormente, se agregó el volumen total gota a gota a 20 mL de una dispersión de GNS-peg-NH<sub>2</sub> 5 nM y se dejó incubar por 3 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, todo el volumen se centrifugó por 30 min a 16000 g en tubos cónicos de 1,5 mL y se reconstituyó la pella en el mismo volumen de agua Milli-Q. Este procedimiento se repitió al menos 3 veces para eliminar el exceso de reactivos que no reaccionaron. De esta manera se obtuvo el sistema de GNS conjugado con moléculas de polietilenglicol y funcionalizado con FA (GNS-FA) o con el péptido FSH33 (GNS-FSH33).

#### **1.4. Recubrimiento con el miR-145**

Se utilizó 1 mL de concentración 1 nM del sistema GNS-FA o GNS-FSH33 diluido con agua milli Q, al cual se le adicionó 0,5  $\mu$ L de miR-145 de concentración 25 $\mu$ M, se resuspendió y sonicó por 15 min, una vez preparado se utilizó inmediatamente para caracterización y para los ensayos *in vitro*. Se obtuvieron dos sistemas, uno que contuvo el miR-145 y otro que se funcionalizó con un miR control de secuencia aleatoria, sin blanco molecular. Ambos miRs poseen estructura de doble hebra, en donde el miR-145 es de 23 nucleótidos y el miR control de 21 nucleótidos. Ambos miRs poseen la modificación química de adición del fluoróforo CY5 en el extremo 3' de la hebra antisentido.

### miR *scramble*

Sentido 5'-UUGAUGUGUUUAGUCGCUAAU-3'  
Antisentido 5'-UUAACUACACAAAUCAGCGAU/Cy5Sp-3'

### miR-145

Sentido 5'-GUCCAGUUUCCCCAGGAAUCCCU-3'  
Antisentido 5'-GGAUUCUGGGAAAACUGGACUU/Cy5Sp-3'

**Figura 15. Secuencia miR-145 y miR *scramble*.** Secuencia nucleotídica de las hebras sentido y antisentido de los miRs utilizados para la funcionalización.

## 1.5. Caracterización fisicoquímica de los sistemas obtenidos

### 1.5.1. Espectrofotometría de absorción molecular

Una vez sintetizadas las GNS se procedió a obtener su espectro de absorción molecular característico y la banda de absorción plasmónica correspondiente al tamaño esperado. Previamente, se determinó el coeficiente de extinción molar para este sistema ( $2,266E8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) por lo que también fue posible establecer la concentración a la cual se trabaja en cada paso de la síntesis. Para las mediciones se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer, modelo lambda UV25, realizando barridos desde 300 – 800 nm en cubetas de poliestireno de 1 cm de paso óptico, las mediciones se realizaron por triplicado. Se tomó una alícuota de 300  $\mu\text{L}$  de dispersión de

nanopartícula y se diluyó, para GNS desnudas con 700  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio 1,2 mM (se utilizó esta disolución para no alterar las condiciones en las cuales las nanopartículas se encuentran y así no propiciar inestabilidad) y para GNS-peg-NH<sub>2</sub>, GNS-FA y GNS-FSH33 se diluyó con el mismo volumen de agua Milli-Q. De esta manera la absorción máxima queda entre los límites de linealidad según Lambert-Beer siendo posible estimar la concentración.

### **1.5.2. Dispersión dinámica de la luz**

Para establecer el diámetro hidrodinámico de los nanosistemas obtenidos se procedió a realizar determinaciones análisis de dispersión dinámica de la luz. Esta técnica hace incidir un láser de 633 nm sobre la muestra en estado acuoso, detectando las dispersiones del láser provocadas por la interacción con las partículas, de esta manera se correlaciona la intensidad de la dispersión de la luz con diámetros de partícula. Las mediciones se realizaron en un equipo ZetaSizer Nano ZS (Malvern) en cubetas de poliestireno, los nanosistemas se diluyeron con citrato de sodio 1,2 mM o con agua Milli-Q con un factor de dilución de 3,33 para un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ . Los resultados fueron obtenidos en triplicado con 15 corridas cada uno.

### **1.5.3. Microelectroforésis de laser Doppler**

Para determinar la carga superficial (potencial zeta) de las nanopartículas se realizaron mediciones de microelectroforésis de laser Doppler, la cual se basa en la migración electroforética de los sistemas nanoparticulados al enfrentarse a un potencial eléctrico. Se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern) con cubetas de capilaridad con electrodos de oro. Los nanosistemas se diluyeron con citrato de sodio 1,2 mM o agua mili Q con un factor de dilución de 3,33 para un volumen final de 1 mL. Las mediciones se realizaron en triplicado con aproximadamente 300 corridas cada una.

### **1.5.4. Imagenología de fluorescencia**

Para verificar la funcionalización y recubrimiento de los nanosistemas GNS-FA y GNS-FSH33 con el miR-145, los tubos de reacción fueron visualizados en el equipo de imagenología In-Vivo FX PRO (Bruker). Se observó en modo fluorescencia para fluoróforo Cy5 presente en el miR-145, con una longitud de onda de excitación de 610 nm y un filtro de emisión de 700 nm con un tiempo de exposición de 0,175 segundos.

### **1.5.5. Estimación del recubrimiento de miR-145**

Se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones del miR-145 (1,5625-3,125-6,25-12,5-25-50 nM) en triplicado, determinando la fluorescencia correspondiente a la sonda Cy5 (Ex: 650; Em:670) acoplado a la hebra antisentido del miR. Posteriormente, al funcionalizar el nanosistema con el miR-145, un volumen de este se centrifugó a 1500 x g durante 60 min, se recuperó el sobrenadante y se determinó la fluorescencia en un lector de placas multiscan Biotek excitando a 650 nm y leyendo a 670 nm. Mediante la sustracción con respecto de la fluorescencia del control de miR-145 en solución (25 nM) se estableció la concentración de miR presente en la superficie del nanosistema, obteniendo una estimación de la proporción del número de moléculas de miR-145 por nanopartícula.

### **1.5.6. Microscopía electrónica de transmisión**

Se utilizó esta técnica para observar la morfología y tamaño de los nanosistemas. Se incubó una alícuota de 10  $\mu$ L de cada nanopartícula diluida con citrato de sodio o agua Milli-Q, con un factor de dilución de 3,33 en una grilla de cobre recubierta con polímero *formvar* (resina termoplástica polivinílica) para el soporte de la muestra. dejándose secar por 24 h a

temperatura ambiente antes de visualizar. Se utilizó, para la visualización un microscopio *high resolution scanning transmission electron microscope* (HR-STEM) modelo INSPECT-F50, marca FEI.

### **1.5.7. Microscopía de fuerza atómica**

Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de nanopartículas diluidas con citrato de sodio 1,2 mM o agua mili Q con un factor de dilución de 3,33, a partir de una dispersión concentrada de 12 nM y se depositó sobre la superficie de una mica recién clivada, dejando evaporar el disolvente por 30 min. Se montó la mica con la muestra seca sobre el escáner y se observó la superficie en modo *tapping* (contacto de amplitud modulada intermitente con la muestra) con una punta de nitrato de silicio en un microscopio JEOL, modelo JSPM-4210. Se capturaron imágenes de GNS, GNS-NH<sub>2</sub>, GNS-FA y GNS-FSH33, registrando las alturas comprendidas entre el fondo de la muestra y la parte más alta de las partículas escaneadas, se capturaron un total de 10 imágenes por muestra, promediando las alturas obtenidas.

## **2. Evaluación *in vitro* de la selectividad e incorporación celular de los nanosistemas**

### **2.1. Viabilidad celular con los nanosistemas sin miR-145**

Se evaluó la viabilidad celular en las líneas celulares epiteliales de cáncer de ovario A2780, SKOV3 y cáncer cérvico uterino HeLa a partir de un cultivo celular de confluencia cercana a 70% para todas las líneas celulares. Se sembraron 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos el día previo a la exposición de los tratamientos. Al segundo día se incubó las células con concentraciones crecientes de cada sistema o con una concentración de 1 nM. Los sistemas ensayados fueron GNS; GNS-peg-NH<sub>2</sub>; GNS-FA y GNS-FSH33. Como control de vida se utilizó DMEM/SFB 10% y como control del método, SDS 10%. La exposición a los tratamientos fue de 24 h y se procedió a realizar el ensayo colorimétrico CellTiter 96® AQueous, determinando la absorción de formazán a 490 nm, en un lector de placas Biotek, modelo Synergy H2. Los datos fueron obtenidos al menos en triplicado, con un n = 12.

## **2.2. Selectividad celular de los nanosistemas sin miR-145**

Se utilizaron las líneas celulares de células epiteliales de cáncer de ovario A2780, SKOV3 y de cáncer cérvico uterino HeLa. Se sembró en placas de 24 pocillos un número de 20.000 células por pocillo el día previo a la exposición de los tratamientos, manteniendo la proporción de células de acuerdo al área de los pocillos de placas de 96 pocillos utilizadas para determinar viabilidad celular (donde el área es 8 veces menor). El segundo día se incubó las células con una concentración de 1 nM de cada uno de los sistemas obtenidos (GNS-peg-NH<sub>2</sub>; GNS-FA; GNS-FSH33). Se midió por espectrofotometría UV-Vis la absorbancia máxima en tiempo cero, es decir, luego de aplicar cada tratamiento, registrándola. Este valor se correlaciona con la concentración de nanopartículas con la cual se incubó. Luego de 24 horas de incubación, se tomó una alícuota del sobrenadante y se midió en un espectrofotómetro la absorbancia máxima. El porcentaje de incorporación se estimó basado en la diferencia de la absorbancia máxima del tiempo cero con respecto del tiempo 24 horas.

### **2.3. Incorporación celular de los nanosistemas cargados con miR-145**

Se sembraron 1.000.000 células por pocillo de la línea A2780, en placas de 6 pocillos. Se esperó 4 horas para facilitar la adherencia de las células al fondo de la placa y se aplicaron los siguientes tratamientos: medio DMEM/SFB 10% (control), miR-145 25 nM, GNS-peg-NH<sub>2</sub> 1 nM, nanoterapia 1 nM, quimioterapia (paclitaxel 8 μM + carboplatino 50 μM) y nanoquimioterapia (nanoterapia 1 nM + paclitaxel 8 μM + carboplatino 50 μM). Se incubó por 0, 3 y 24h. Las células adheridas se lavaron 3 veces con PBS, y luego se agregó 500 μL de HNO<sub>3</sub> directamente en el pocillo, resuspendiendo y dejando actuar por 15 min. Posteriormente, el volumen fue transferido en tubos cónicos de 1,5 mL e incubados por 30 min a 70 °C en baño de agua. Finalmente, los tubos se dejaron incubando por 48h antes de las mediciones. Para la cuantificación de oro, se preparó una curva de calibración con soluciones patrones de oro (Merk) de concentraciones 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 1 y 10 ppm en HNO<sub>3</sub> 2% p/v las cuales alcanzaron un coeficiente de correlación  $R^2 > 0,99999$  y un error estándar relativo <2%. Las muestras digeridas fueron diluidas en factores de 10, 100 y 1000 en HNO<sub>3</sub> 2% y se procedió a determinar su concentración mediante espectroscopía de emisión atómica utilizando un espectrómetro de emisión atómica de plasma por microondas MP-AES Agilent® 4100, usando la línea principal para oro en

267,595 nm. Las mediciones fueron realizadas en triplicado con un n=3 para cada punto.

#### **2.4. Cuantificación del miR-145 en células tratadas con los nanosistemas**

Se sembraron 500.000 células de la línea A2780 por pocillo, en placas de 6 pocillos. Se esperó 4 horas para facilitar la adherencia de las células al fondo de la placa y se aplicaron los siguientes tratamientos: medio DMEM/SFB 10% (control), miR-145 25 nM, nanoterapia 1 nM, quimioterapia (paclitaxel 8  $\mu$ M + carboplatino 50  $\mu$ M) y nanoquimioterapia (nanoterapia 1 nM + paclitaxel 8  $\mu$ M + carboplatino 50  $\mu$ M). Se incubó por 0, 3 y 24h. En cada tiempo final, se descartó el sobrenadante y se lavó con PBS. Posteriormente, las células fueron tratadas con 500  $\mu$ L de reactivo TRIzol®, se homogeneizó y se almacenó a -80° C.

Para la extracción de RNAs totales (>18 nucleótidos) se utilizó el kit miRNeasy mini kit (Qiagen). Para esto se descongelaron los tubos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 g a 4° C por 15 min y se transfirió la fase acuosa a un tubo colector agregando 1,5 veces el volumen en etanol absoluto. Se transfirieron 700  $\mu$ L sobre la columna de afinidad

RNeasy *mini column* y se centrifugó a 8000 g por 15 seg a temperatura ambiente. Luego se agregó 500 µL de buffer RPE y se centrifugó a 8000 g por 15 seg, posteriormente se añadió 500 µL de buffer RPE y se centrifugó por 8000 g por 2 min. Luego se centrifugó a 16000g por 1 min. Finalmente, para obtener los RNAs, se agregó 40 µL de agua libre de RNAsas sobre la columna y se centrifugó a 8000 g por 1 min.

Para realizar la retrotranscripción de los miRNAs obtenidos a cDNA, se utilizó el kit miScript II RT (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor, utilizando un termociclador Mastercycler. Para esta reacción se utilizó la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). A partir de un volumen correspondiente a 1 µg de RNA de cada muestra se realizó la reacción de retrotranscripción utilizando *random primers* (Promega) y dNTPs en concentración 10 mM (Promega).

Para la detección y cuantificación del miR145, se utilizó el kit miScript SYBR Green qPCR (Qiagen) en un equipo StepOne Real-Time PCR (AppliedBiosystems) según instrucciones del proveedor. Como control y normalizador se utilizó RNA endógeno RNU6, como control negativo se utilizó agua estéril, el volumen final de reacción fue de 12 µL. El programa utilizado fue: desnaturalización inicial de 15 min a 95° C, seguido por 40 ciclos de 15 seg

de desnaturación a 94° C, 30 seg de alineación a 55° C y 30 seg de elongación a 70° C. La curva de *melting* fue realizada entre 60 - 95° C.

### **3. Evaluación *in vitro* de los efectos celulares y moleculares del nanosistema**

#### **3.1. Viabilidad celular**

Se evaluó la viabilidad celular en las líneas celulares epiteliales de cáncer de ovario A2780. Para esto, a partir de un cultivo celular de confluencia cercana a 70% para todas las líneas celulares, se sembraron 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos el día previo a la exposición de los tratamientos. Al segundo día se incubó las células con los siguientes tratamientos: GNS-FSH33; GNS-FSH33-miR (nanoterapia), GNS-FSH33-scramble, miR-145, paclitaxel 8  $\mu$ M + carboplatino 50  $\mu$ M (quimioterapia) y GNS-FSH33-miR-145 + carboplatino/paclitaxel (nanoquimioterapia). Como control de viabilidad se utilizó DMEM/SFB 10%, y SDS 10% como control del método. La exposición a los tratamientos fue de 3 y 24 h y se procedió a realizar el ensayo colorimétrico CellTiter 96® AQueous, determinando la absorción de formazán a 490 nm. Los datos fueron obtenidos en triplicado, con un n = 12.

Además, se realizó el método de exclusión molecular de azul de tripán para contabilizar directamente las células vivas posterior a los tratamientos. Para esto se sembraron 100000 células en placas de 12 pocillos y se trataron con los mismos tratamientos por 3 y 24 h. Se descartó el sobrenadante de los pocillos y se lavó con PBS, se tripsinizó y se centrifugó a 4000g por 5 min, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se mezcló igual volumen de células y azul de tripán 4X. Finalmente, las células fueron contadas bajo el microscopio óptico, mediante una cámara de *neubauer*. Los datos fueron obtenidos en triplicado, con un n = 3.

### **3.2. Proliferación celular**

Se evaluó la proliferación celular en las líneas celulares epiteliales de cáncer de ovario A2780 y SKOV3. A partir de un cultivo celular inicial de cada línea celular de confluencia cercana a 70%. Se sembró 2.500 células por pocillo en placas de 96 pocillos el día previo a la exposición de los tratamientos. Al segundo día se incubó las células con los siguientes tratamientos: GNS-FSH33; GNS-FSH33-miR (nanoterapia), GNS-FSH33-scramble, miR-145, paclitaxel 8  $\mu$ M + carboplatino 50  $\mu$ M (quimioterapia) y GNS-FSH33-miR-145 + carboplatino/paclitaxel (nanoquimioterapia). Como control de vida se utilizó DMEM/SFB 10%, y SDS 10% como control del

método. La exposición a los tratamientos fue de 24, 48 y 72 horas, y se realizó el ensayo colorimétrico CellTiter 96® AQueous, determinando la absorción de formazán a 490 nm. Los datos fueron obtenidos en triplicado, con un n = 4.

### **3.3. Migración celular**

Se realizaron ensayos de migración celular para la línea celular SKOV3 mediante el método de *wound healing*. Para esto, a partir de un cultivo celular inicial de 70% de confluencia, se sembraron 50.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos con medio DMEM/SFB 10% por 24 horas. Al segundo día, se verificó una confluencia de 100%, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS estéril, se cambió por medio DMEM/SFB 1% y se agregó cada tratamiento (GNS-FSH33, miR-145, nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia) dejándose incubar por 24h. Al tercer día se verificó que no existieran cambios en la monocapa celular por inspección visual y se realizó una herida vertical con una punta estéril de 200 µL en cada pocillo, tomando como guía la tapa de la placa de 96 pocillos. Luego se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS estéril para remover las células y *debris* que se soltaron luego de la formación de la herida y se renovó con DMEM/SFB 10%. Se capturaron imágenes de la herida formada en cada pocillo a tiempo 0, 4, 8 y 21 horas en un microscopio óptico invertido Olympus U-CMAD3 utilizando

una cámara Nikon DS-F12. Posteriormente, las imágenes obtenidas fueron analizadas por el software Image J, midiendo la distancia entre las fronteras de ambos lados de la herida a cada tiempo, para cada pocillo, tomando como referencia la misma imagen en tiempo 0 de cada pocillo como 100% de apertura (0% recuperación). Los datos fueron obtenidos en triplicado con un n=4.

### **3.4. Liberación de VEGF**

El ensayo de liberación de VEGF se realizó mediante inmunoensayo ELISA. Se obtuvieron medios de cultivo de células A2780 incubadas por 0, 3 y 24h con los tratamientos miR-145, nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia, los cuales fueron centrifugados a 4000 g por 5 min, antes del ensayo. La detección de VEGF se realizó con el kit Quantikine Human VEGF Immunoassay (R&D systems DVEOO). Para esto, se agregaron 50  $\mu$ L del diluyente RD1W en cada pocillo, seguido de 200  $\mu$ L de sobrenadante, la placa se cubrió con tiras adhesivas y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se eliminó el volumen de cada pocillo y se lavó con 400  $\mu$ L de buffer, aspirando como paso final. Se agregó 200  $\mu$ L de conjugado Human VEGF a cada pocillo y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, lavando como en el paso anterior. Posteriormente se agregó 200

$\mu\text{L}$  de la solución de sustrato a cada pocillo, incubándose por 20 min a temperatura ambiente con protección de la luz. Luego se agregó 50  $\mu\text{L}$  de solución de stop a cada pocillo. Las determinaciones de absorbancias fueron llevadas a cabo en un lector de placas de 96 pocillos (Biotek EL800) a 450 nm de longitud de onda. Los datos obtenidos fueron el resultado de muestras en triplicado para cada tiempo.

### **3.5. Proliferación de células endoteliales con medios condicionados**

Se evaluó la proliferación celular de la línea endotelial humana EA.hy926 luego de ser expuesta a medio condicionado de células de cáncer ovárico A2780. Para esto, se trataron células A2780 sembradas en placas de 24 pocillos por 24 horas con GNS-FSH33, miR-145, nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia. Luego, el medio condicionado fue recolectado y centrifugado a 4000 g por 5 minutos para remover células y *debris*. Este medio fue utilizado para tratar células EA.hy926 por 48 horas, sembradas en placas de 96 pocillos con una densidad de 2500 células por pocillo el día previo a la exposición a los tratamientos. Cumplido el tiempo de exposición, se realizó el ensayo colorimétrico CellTiter 96® AQueous, determinando la absorción de formazán a 490 nm. Los datos fueron obtenidos en triplicado, con un  $n = 4$ .

### **3.6. Ensayo de formación de clones tumorales**

Se evaluó la capacidad clonogénica de células de la línea A2780, para esto primero se realizó una curva de crecimiento de clones tumorales con concentraciones crecientes de células, determinando el número óptimo de células a sembrar para obtener clones cuantificables. Se sembraron 7000 células por pocillo en placas de 6 pocillos en *soft agar*, en triplicado, con los siguientes tratamientos: medio DMEM/SFB 10% (control), GNS-FSH33, GNS-FSH33-Scramble, miR-145 25 nM, nanoterapia 1 nM, quimioterapia (paclitaxel 8  $\mu$ M + carboplatino 50  $\mu$ M) y nanoquimioterapia (nanoterapia 1 nM + paclitaxel 8  $\mu$ M + carboplatino 50  $\mu$ M). Las células se incubaron por 14 días y se contaron los clones de >100  $\mu$ m de diámetro formados en cada tratamiento mediante microscopía óptica.

### **3.7. Evaluación de los efectos en esferoides tumorales**

Se formaron esferoides tumorales de las líneas SKOV3 mediante el método de líquido sobrelapante o *liquid overlay technique* (LOT). Se recubrieron placas de 96 pocillos con 50  $\mu$ L de agarosa 1,5% en DMEM. A partir de células en 70% de confluencia, se sembraron 5000 células (previo estudio realizando curvas de crecimiento con diferente número de células

inicial, para llegar a obtener esferoides de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro en un periodo de 4 - 6 días) por pocillo, posteriormente la placa se agitó a 120 rpm por 1,5 horas en un agitador orbital a 37 °C. Se evaluó la formación y crecimiento de los esferoides mediante su visualización en un microscopio óptico invertido Olympus U-CMAD3 utilizando una cámara Nikon DS-F12, adquiriendo imágenes de cada esferoide a tiempo 0, 3, 6, 7 y 11 días. Al sexto día se expuso los esferoides a los tratamientos, que fueron: medio DMEM/SFB 10% (control), miR-145 25 nM, nanoterapia 1 nM, quimioterapia (paclitaxel 8  $\mu\text{M}$  + carboplatino 50  $\mu\text{M}$ ) y nanoquimioterapia (nanoterapia 1 nM + paclitaxel 8  $\mu\text{M}$  + carboplatino 50  $\mu\text{M}$ ). Los efectos morfológicos fueron evaluados mediante microscopía óptica a los 0, 1, 2, 3 y 5 días de tratamiento. Los análisis de las imágenes fueron realizados utilizando el software ImageJ, determinando el área y el diámetro de cada esferoide a cada tiempo. Al quinto día, se evaluó la viabilidad celular en los esferoides intactos con los ensayos de MTS, LDH y Anexina V/Ioduro de propidio (IP).

### **3.8. Análisis estadísticos**

Todos los grupos de datos obtenidos para los experimentos realizados en esta tesis fueron procesados utilizando el programa Graphpad Prism 5.0 para obtener las gráficas correspondientes, realizando las pruebas estadísticas no

paramétricas de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney para validar diferencias significativas entre los tratamientos, según correspondió. Como parámetro de significancia se fijó un p valor menor a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## **Capítulo 3: Resultados y discusión**

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. Obtención y caracterización de GNS de 12 nm, conjugación y funcionalización con FA o FSH33 y el miR-145**

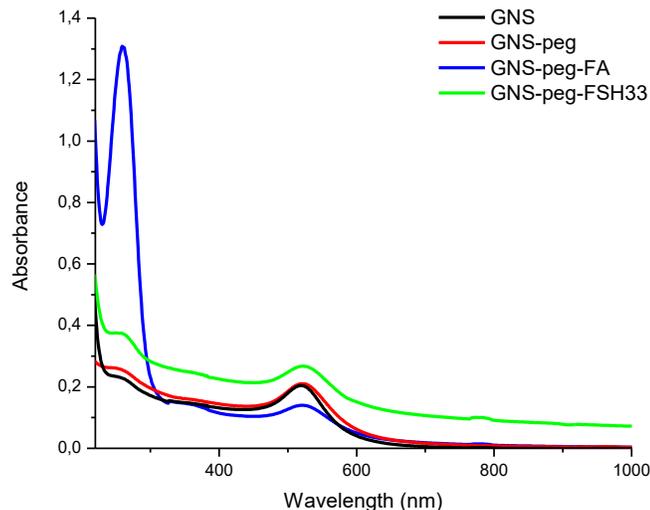
Luego de la síntesis de cada sistema, estos fueron caracterizados fisicoquímicamente mediante diversas técnicas para dar cuenta de su tamaño, diámetro hidrodinámico, morfología, carga superficial, banda de absorción plasmónica y los respectivos cambios en estos parámetros, de acuerdo con las sucesivas modificaciones químicas en la superficie de la nanopartícula. Respecto de la planificación original, se incorporó, además de FA como molécula de reconocimiento celular, el péptido de 21 aminoácidos FSH33, de secuencia YTRDLVYKDPARPKIQKTCTF, que deriva de la región de reconocimiento de la hormona folículo estimulante (FSH) por su receptor. Debido a que las células del epitelio ovárico son el único tipo celular que posee expresión de este receptor y se ha reportado que en células de cáncer ovárico éste se encuentra sobreexpresado [108]; por lo que se presenta como un excelente candidato para su utilización como reconocimiento selectivo hacia células cancerígenas ováricas. Es así que fueron obtenidos dos sistemas distintos para su posterior evaluación como agente transportador del miR-145 (GNS-FA y GNS-FHS33) obteniendo los siguientes sistemas a caracterizar y evaluar: GNS, GNS-peg-NH<sub>2</sub>, GNS-FA, GNS-FSH33, GNS-FA-miR-145 y GNS-FSH-miR-145.

## 1.1. Espectrofotometría de absorción molecular

Todos los nanosistemas obtenidos presentaron la forma característica de espectro de absorción correspondiente a nanoesferas de oro; presentando una banda definida de absorción máxima cercana los 520 nm que se correlaciona con tamaños desde los 10 – 30 nm, según estudios previos en la literatura [129]. Las GNS sin conjugar presentaron un pico de absorción a los 521 nm, obteniéndose que, a medida que se conjugó con moléculas en su superficie, se registró un corrimiento batocrómico del pico máximo de absorción, de esta manera, podemos observar que para GNS-peg-NH<sub>2</sub>; GNS-FA y GNS-FSH33 las bandas de absorción máxima fueron 522, 525 y 527 nm respectivamente (figura 16). Asimismo, es posible correlacionar las bandas en 258 y 328 nm para el FA en el sistema GNS-FA y la banda a 260 nm para el péptido FSH33. Amendola *et al* propusieron que el efecto del corrimiento del pico máximo hacia el lado rojo de espectro de absorción luego de la conjugación, sucede debido a que la incorporación de moléculas sobre las GNS aumenta la constante dieléctrica alrededor de la superficie de las partículas, lo que conlleva a la generación de canales de relajación posteriores a la excitación del plasmón [130]. Este corrimiento en el pico de absorción se condice con el aumento en el diámetro hidrodinámico de la partícula, pudiendo utilizarse como herramienta predictiva del curso de la conjugación y verificar la incorporación de las moléculas orgánicas en la

superficie de la nanopartícula. Por lo tanto, es posible aseverar que el corrimiento batocrómico en la absorción de cada nanosistema, se correlaciona con la incorporación de cada molécula en la superficie del nanomaterial.

La concentración de GNS en estado coloidal se puede determinar mediante espectrofotometría UV-Vis [131] debido a que la absorbancia del pico máximo del plasmón superficial, tiene un comportamiento lineal respecto de la concentración. En nuestro grupo de laboratorio se reportó previamente la relación entre el pico de absorbancia máxima de diferentes diluciones de GNS respecto de la concentración experimentalmente obtenida, determinándose el coeficiente de extinción molar para la síntesis de estas nanopartículas ( $2,266E8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) [117], por lo tanto, es posible obtener la concentración de una suspensión coloidal de GNS integrando el valor de absorbancia obtenida en la fórmula de Lambert-Beer. Para las GNS sintetizadas, se obtuvo que, luego de la determinación espectrofotométrica de las unidades de absorbancia de la síntesis de GNS sin conjugar, el cálculo arrojó una concentración inicial de 12 nM de GNS, el cual fue tomado como referencia para los experimentos posteriores, realizando la misma metodología de cuantificación.



Nanosystem	Plasmon band (nm)	Secondary band (nm)
GNS	520	-
GNS-peg-NH <sub>2</sub>	521	-
GNS-FA	525	258/328
GNS-FSH33	527	260

**Figura 16. Espectrofotometría UV-Vis.** Espectros de absorción molecular para todos los sistemas obtenidos y tabulación de los picos principales de cada nanosistema.

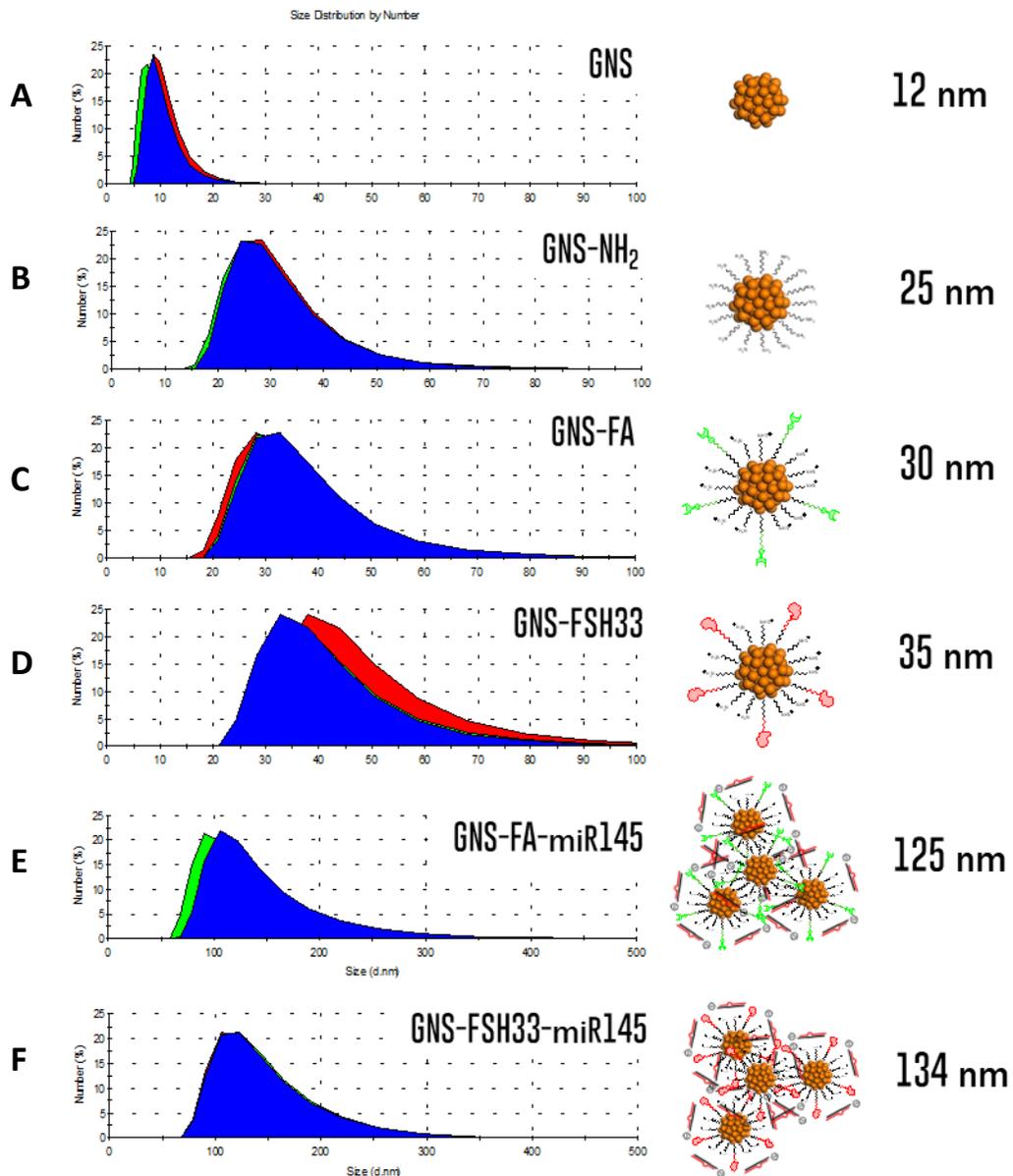
## 1.2. Dispersión dinámica de la luz

Para determinar el diámetro hidrodinámico de las GNS obtenidas, se procedió a realizar análisis de dispersión dinámica de la luz. Esta técnica hace incidir un láser de 633 nm sobre la muestra en suspensión, detectando las dispersiones del láser provocadas por la interacción de la luz con las partículas, de esta manera se correlaciona la intensidad de la dispersión con el diámetro hidrodinámico de la partícula [132]. Las mediciones se realizaron en un equipo Malvern Nano ZS en cubetas de poliestireno, las GNS sin

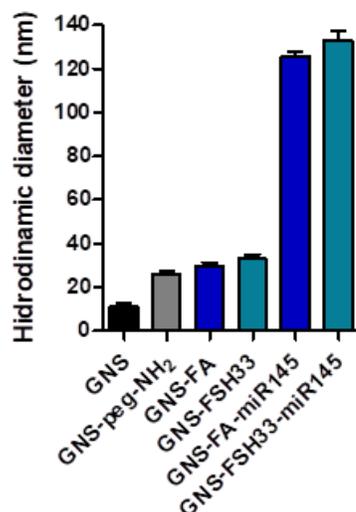
conjugar se diluyeron con citrato de sodio 1,2 mM, para mantener su estabilidad coloidal y los sistemas GNS-peg-NH<sub>2</sub>; GNS-FA, GNS-FA-miR-145, GNS-FSH33 y GNS-FSH33-miR-145 se diluyeron con agua Milli-Q con un factor de dilución de 3,33. Los resultados se presentan como porcentaje de nanopartículas que se encuentran en un tamaño determinado. Los datos fueron obtenidos con un promedio de 45 mediciones (n = 3). Para las GNS sin conjugar se obtuvo un valor promedio de 12 nm de diámetro hidrodinámico, con una distribución homogénea (figura 17 A), tal como se ha reportado para esta metodología de obtención [133, 134]. Se observó que al conjugar las GNS con SH-peg-NH<sub>2</sub> el diámetro hidrodinámico aumentó a 25 nm; esto indica la incorporación de estas moléculas sobre la superficie de la nanopartícula (figura 17 B), generando una capa molecular de 6,5 nm de espesor, lo cual se condice con lo reportado para pegilaciones con polietilenglicol de peso molecular de 5Kda sobre GNS de 13 nm, que demuestran la incorporación de una capa entre 5 y 7 nm de espesor [135]. Al funcionalizar este sistema con moléculas como FA y el péptido FSH33, se evidenció que el diámetro hidrodinámico aumentó hasta 30 y 35 nm respectivamente, lo cual se correlaciona con la incorporación de una nueva especie molecular sobre la superficie del nanosistema (figura 17 C). La diferencia entre el promedio del diámetro hidrodinámico para el nanosistema con FA respecto del sistema con FSH33 (figura 17 D) se explica debido a que el péptido posee un tamaño y peso molecular superior al FA (441,4 g/mol

para FA vs 2543,94 g/mol para FSH33). Al incorporar las moléculas de miR-145 en los nanosistemas, el tamaño aumentó, para GNS-FA y GNS-FSH, en 125 nm y 134 nm, respectivamente (figura 17 E, F). Lo cual da cuenta del proceso de incorporación del miR en la superficie del nanosistema. Este aumento de tamaño se explica, en parte, debido a que el peso molecular del miR-145 es elevado (15.258,5 g/mol) y, además, posiblemente estén ocurriendo fenómenos de agregación primaria, provocados por la presencia del miR, el cual posee carga neta negativa a lo largo de su estructura de doble hebra, lo que podría atraer a dos o más nanopartículas con carga levemente positiva y formar una estructura de tamaño mayor (figura 18). La obtención de este tamaño final de partícula o agregado es favorable para la llegada del nanosistema hacia las células cancerígenas, debido a que se encuentra dentro del tamaño propicio para traspasar a través de las fenestraciones ocurridas en el endotelio vascular tumoral, característica principal del efecto EPR, cuyos espacios representan tamaños desde 100 nm hasta inclusive 4  $\mu\text{m}$  [136]. No obstante el amplio rango de tamaño en las fenestraciones vasculares, los nanosistemas deben ser capaces de ser internalizados en las células tumorales. Se ha descrito que existen diversos mecanismos de endocitosis celular; la endocitosis mediada por clatrin, internalizando a partículas menores a 200 nm y endocitosis mediada por caveolina, que endocitan partículas mayores a 200 nm [137]. Por lo tanto, los nanosistemas obtenidos, son óptimos para hacer uso del efecto EPR y traspasar desde la

sangre hacia el intersticio tumoral, así como, para ingresar mediante endocitosis, probablemente mediante un mecanismo basado en clatrin.



**Figura 17. Cambios en el diámetro hidrodinámico del nanosistema.** Luego cada modificación estructural de adición molecular, el nanosistema de base comienza con 12 nm aumentando su tamaño hasta 125 y 135 nm para GNS-FA-miR145 y GNS-FHS33-miR145, respectivamente.



**Figura 18. Resumen de los diámetros hidrodinámicos obtenidos para cada nanosistema.**  
 Para todos los valores el índice de polidispersidad se encontró <0,3)

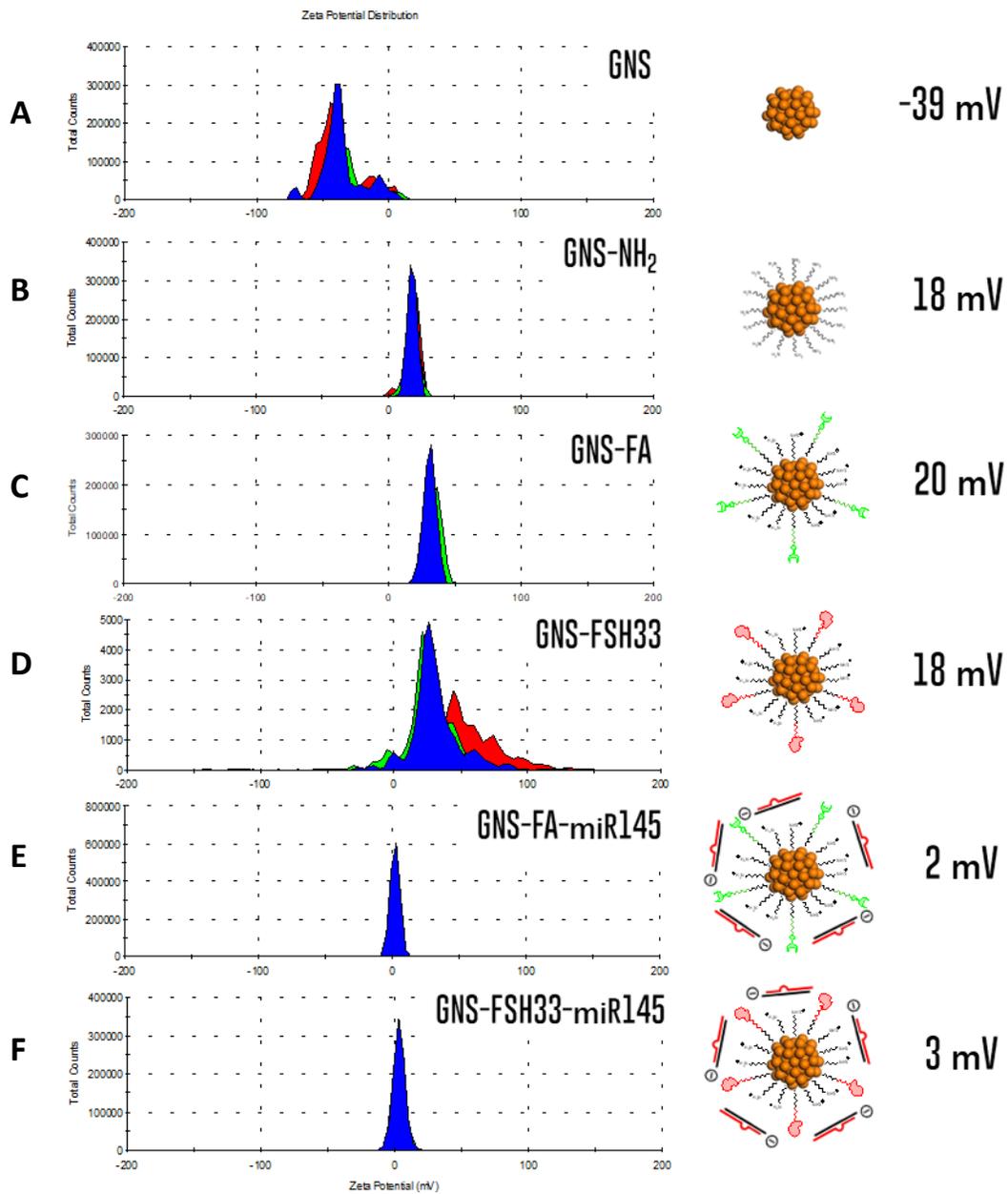
### 1.3. Microelectroforésis de laser Doppler

Para determinar la carga superficial de las nanopartículas, se realizaron mediciones del potencial zeta mediante microelectroforésis de laser Doppler, técnica que se basa en la migración electroforética de los sistemas nanoparticulados al enfrentarse a un potencial eléctrico. Para las mediciones se utilizó un equipo Malvern Nano ZS con cubetas de capilaridad con electrodos de oro. Las GNS se diluyeron con citrato de sodio 1,2 mM en un factor de dilución de 3,33 y los sistemas GNS-peg-NH<sub>2</sub>; GNS-FA, GNS-FA-miR-145, GNS-FSH33 y GNS-FSH33-miR-145 se diluyeron con el mismo factor de dilución en agua Milli-Q. Las mediciones se realizaron en triplicado con aproximadamente 300 repeticiones.

Los resultados indican que las GNS poseen una carga superficial negativa de -39 mV de magnitud (figura 19 A). Este valor se correlaciona con la carga que presentan las moléculas de citrato de sodio debido a la presencia de grupos oxidrilos en su estructura, los cuales se encuentran estabilizando el coloide. Al conjugar con polietilenglicol, la carga superficial cambia de polaridad, registrando un valor neto positivo, de magnitud 18 mV (figura 19 B). Esto se explica debido a que los grupos amina presentes en la molécula quedarían expuestos hacia el solvente, los cuales se encuentran protonados debido a que el pH de la solución es 5, muy por debajo del valor pKa de las aminas del polietilenglicol (9-10).

Al funcionalizar con FA, el sistema GNS-FA mantiene el valor positivo, con una magnitud de 20 mV (figura 19 C), esto debiéndose a que la molécula posee un grupo amina que también otorga carga positiva al sistema. Cuando el nanosistema se funcionalizó con el péptido FSH33, el valor de potencial Z también se mantuvo positivo, con una magnitud de 18 mV (figura 19 D). Esto, ya que el péptido FSH33 posee un punto isoeléctrico de 10 y a pH 5 (pH de la suspensión) los grupos básicos de su estructura (2 argininas y 3 lisinas) se encuentran protonados. Cabe hacer notar que los valores positivos de carga superficial de los sistemas previos a la funcionalización con las moléculas de miRs, son adecuados para la interacción electrostática con los grupos negativos de la doble hebra de miR, lo cual se correlaciona

con el aumento en el tamaño del nanosistema en las gráficas de diámetro hidrodinámico por DLS (Figura 17). Una vez que se incorporan los miRs en el sistema, se observa un cambio en la magnitud del potencial zeta, el cual varía desde 20 mV hasta 1,97 mV para el sistema GNS-FA-miR y desde 18 mV hasta 3,17 mV para el sistema GNS-FSH33-miR (Figuras 19 E, F y figura 20). Ambos valores de carga son favorables, debido a que al acercarse a la neutralidad no generarían absorciones inespecíficas con proteínas del plasma o suero, reportadas para nanopartículas con carga positiva [138]. Además, al ser levemente positivos podrían genera contactos con las membranas celulares promoviendo la interacción ligando-receptor entre el FA o FSH33 y sus receptores celulares.



**Figura 19. Cambios en el potencial Z de cada nanosistema.** Luego cada modificación estructural de adición molecular, el nanosistema de base presenta carga negativa de -39 mV, cambiando su carga hasta 2 y 3 mV para GNS-FA-miR145 y GNS-FHS33-miR145, respectivamente.

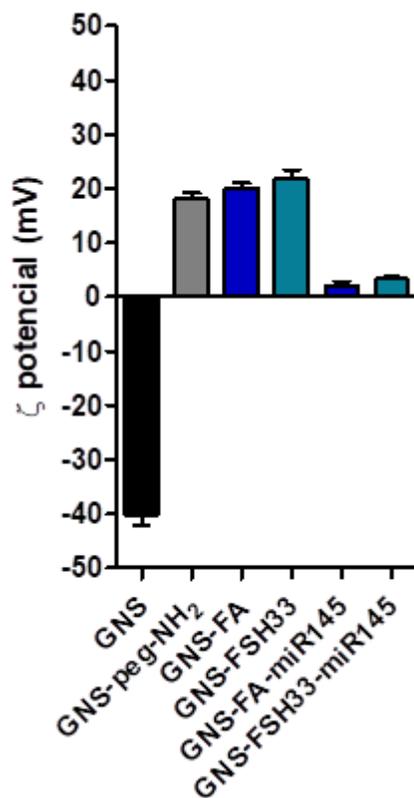


Figura 20. Resumen de los potenciales Z obtenidos para cada nanosistema.

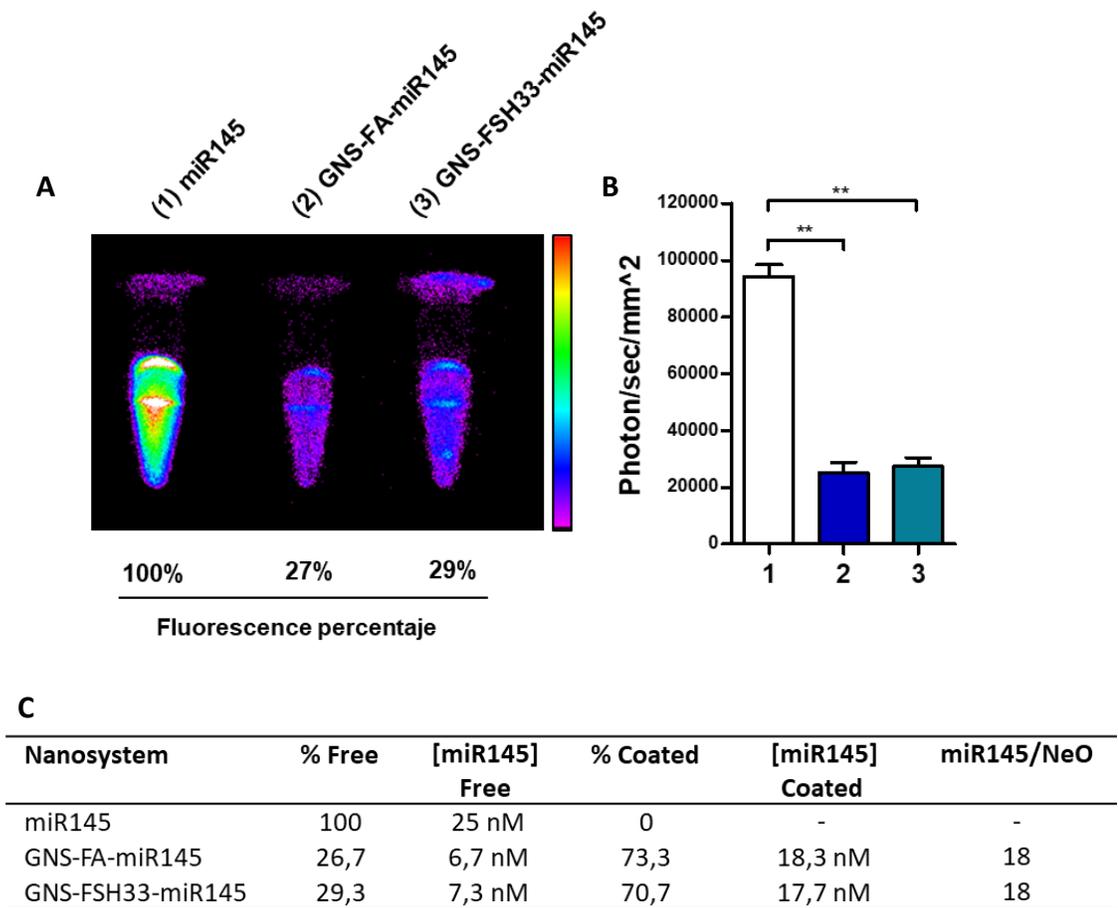
#### 1.4. Estimación del recubrimiento de miR-145

##### 1.4.1. Imagenología de fluorescencia

Debido a que los miRs se encuentran marcados con el fluoróforo CY5, luego de la reacción de funcionalización con los sistemas GNS-FA y GNS-FSH33, se procedió a determinar la presencia de fluorescencia en la dispersión. En la imagen obtenida mediante el equipo In-Vivo FX PRO, se

aprecia que ambos sistemas (GNS-FA-miR-145 y GNS-FSH33-miR-145) presentan una disminución de la fluorescencia con respecto a la misma concentración del miR-145 en solución. Esto se explica debido a que, luego de la funcionalización, probablemente existen interacciones fisicoquímicas entre las moléculas del miR (cargadas negativamente) y el nanosistema GNS-peg-NH<sub>2</sub> (cargado positivamente), como ha sido descrito para nanosistemas conjugados con moléculas positivas como cisteamina y su interacción con RNAs [123, 139], por lo tanto, las moléculas de miR se acumulan en la superficie de la nanopartícula provocando un efecto de apagamiento de la fluorescencia, posiblemente debido a interacciones del tipo  $\pi$ -stacking entre los grupos aromáticos de la molécula fluorescente y la superficie de la nanopartícula [140]. La acumulación de moléculas de miR sobre la superficie de la nanopartícula se correlaciona con el aumento en el diámetro hidrodinámico (figura 18) y el cambio en la carga superficial del nanosistema (figura 20). Por lo tanto, en primer lugar, este fenómeno indica que existe interacción entre las moléculas del miR y el nanosistema, lo que es indicativo de que la funcionalización se ha llevado a cabo. Además, al cuantificar la intensidad de fluorescencia de los sistemas se obtiene un apagamiento de un 73% para el sistema GNS-FA-miR-145 y un 71% para el sistema GNS-FSH33-miR-145 o, dicho de otra manera, una intensidad de fluorescencia de un 27 y un 29%, respectivamente, en relación con el miR-145 libre. De esta forma, al ser la intensidad de fluorescencia un fenómeno

lineal en cuanto al aumento de la concentración y, al considerar que la fluorescencia que es emitida por las moléculas del miR corresponde a aquellas moléculas que se encuentran en estado libre en solución, es posible establecer que luego de la funcionalización existe un 71 - 73% de unión del miR a las nanopartículas, lo que corresponde a 18 moléculas de miR-145 por cada nanopartícula (figura 21).



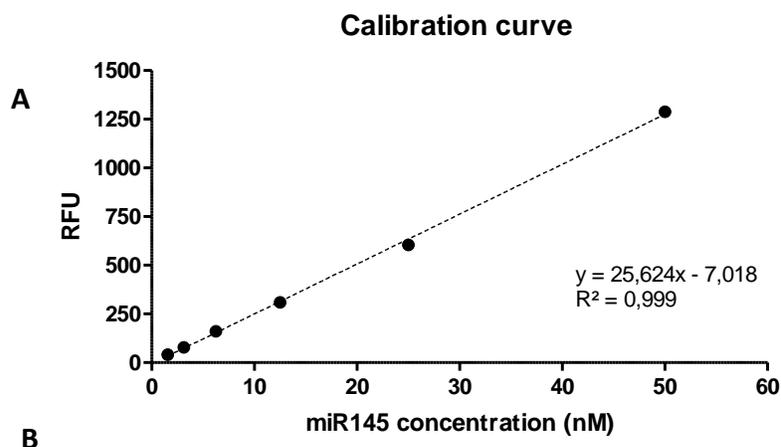
**Figura 21. Recubrimiento por miR-145.** A) Imagen de fluorescencia de los sistemas funcionalizados con miR-145; B) gráfica de cuantificación de la intensidad de fluorescencia para cada sistema; C) tabulación de la intensidad de fluorescencia obtenida y porcentajes de recubrimiento.

#### **1.4.2. Cuantificación de miR-145 por espectroscopía de fluorescencia**

Se estimó la cantidad de miR145 sobre la superficie de la nanopartícula. Para esto, se realizó una curva de calibración con concentraciones crecientes de miR145, obteniendo una linealidad analíticamente adecuada (figura 22 A). Luego de la incubación de los nanosistemas GNS-FA y GNS-FSH33 con el miR145, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante libre de nanopartículas, se determinó la intensidad de fluorescencia y se calculó su concentración utilizando la ecuación de la recta de la curva de calibración. De manera indirecta, por sustracción respecto de la cantidad original incubada de miR145 y considerando una concentración inicial de nanoesferas de 1 nM, se calculó el número de moléculas de miR145 sobre cada nanopartícula, obteniendo un número de 18 moléculas por nanopartícula para cada nanosistema (figura 22 B), lo cual confirma resultado obtenido en el ítem 1.4 (figura 21). Es interesante que tanto el sistema GNS-FA como GNS-FSH33 puedan transportar 18 moléculas de miR, no obstante, probablemente esto se debe a que la carga superficial de ambos sistemas es muy cercana (20 y 18 mV), por lo que tendrían capacidades similares de interacción con los grupos fosfato del miR.

En la literatura se han reportado diversos nanosistemas para el transporte de moléculas cortas de RNAs interferentes, tal como siRNAs o

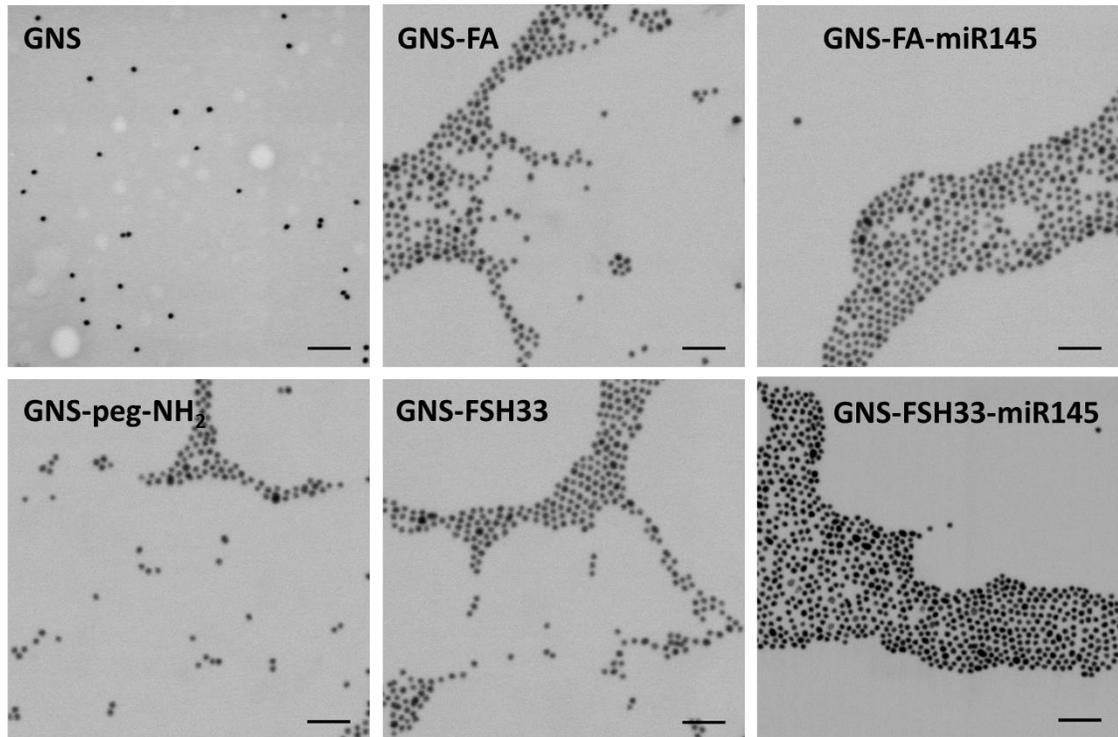
miRNAs, sin embargo, en pocos estudios profundizan en cuanto a la densidad de carga por nanopartícula [123, 141, 142]. En un estudio realizado por Epanchintseva *et al*, cuantifican la densidad de siRNA sobre nanopartículas de oro de 13 nm, encontrando densidades cercanas a las 100 moléculas por nanopartícula, cuyo número sería dependiente de la concentración de sales presentes en la dispersión, para una metodología de unión no-covalente, como en esta tesis [143]. En contraste, en otro trabajo reportado por Crew *et al*, se logran densidades de carga entre 10 y 25 moléculas de miRNAs para nanopartículas de oro de 13 nm de diámetro, utilizando conjugación covalente mediante la unión de grupos sulfhidrilos de miRNAs modificados [144]. Al realizar un cálculo teórico grueso respecto del límite de carga de miRNAs por GNS, considerando que el área superficial de una GNS de aprox. 452 nm<sup>2</sup> y el área de una molécula de miRNAs es 17,5 nm<sup>2</sup> (2,5 nm de ancho x 7 nm de largo) [145], obtenemos que, para nanopartículas de 12 nm, con una disposición acostada de las moléculas de miRNA sobre su superficie, se llega a un número teórico máximo de 25 moléculas de miRNA por GNS, lo que se correlaciona con el número de miRs por GNS determinado en esta tesis. En cualquier caso, el número de moléculas de miRNA por GNS, dependerá de diversos factores, como las funcionalizaciones previas del nanosistema, su carga superficial, la metodología de conjugación al miRNA, la fuerza iónica y las proporciones iniciales de reacción utilizadas, entre otros.



**Figura 22. Cuantificación del recubrimiento de miR145.** A) Curva de calibración de diferentes concentraciones de miR145 con respecto a la fluorescencia del fluoróforo CY5 presente en la molécula. B) determinación del recubrimiento del nanosistema por miR45 mediante determinaciones del sobrenadante.

### 1.5. Microscopía electrónica de transmisión

Se evidenció por micrografías TEM el tamaño y la morfología de todos los sistemas (GNS; GNS-peg-NH<sub>2</sub>; GNS-FA; GNS-FA-miR145, GNS-FSH33 y GNS-FSH33-miR145). De las imágenes representativas obtenidas se extrae que la morfología de las nanopartículas obtenidas es del tipo esferoide para todos los nanosistemas, y los tamaños encontrados son concordantes con los datos obtenidos desde el análisis de DLS (figura 23).

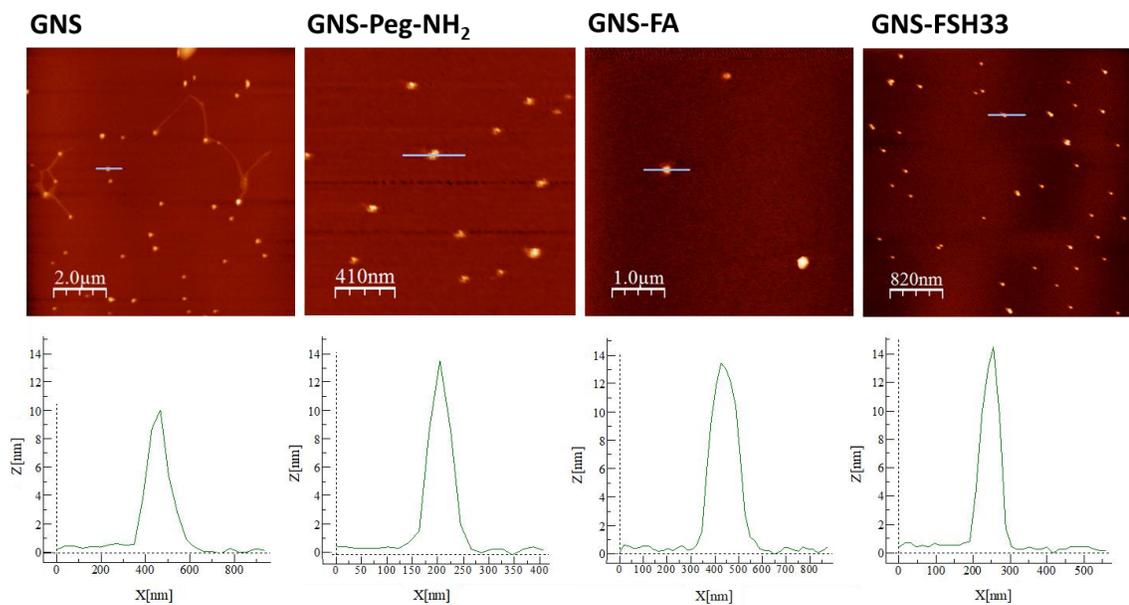


**Figura 23. Micrografías de TEM para los nanosistemas.** Se observa la morfología de los sistemas GNS, GNS-peg-NH<sub>2</sub>, GNS-FA, GNS-FSH33, GNS-FA-miR145 y GNS-FSH33-miR145.

## 1.6. Microscopía de Fuerza Atómica

Mediante microscopía de fuerza atómica se determinó el tamaño y altura de los diferentes nanosistemas con respecto al sustrato (mica). Observamos que existe correlación en cuanto al grado de funcionalización y el aumento en la altura de sistema, que correspondería al diámetro de partícula. Para las nanoesférás sin funcionalizar, la altura registrada por el equipo fue de 10 nm; para GNS-peg-NH<sub>2</sub> se registraron alturas de 12 nm; para el sistema GNS-FA, 13 nm y para GNS-FSH33 14 nm (figura 24). Lo

que concuerda con el aumento en el tamaño de los sistemas conforme a las mediciones realizadas por DLS. No obstante, la magnitud de los tamaños determinados no es la misma, ya que se debe considerar que la determinación del tamaño mediante AFM corresponde al diámetro físico, en tanto, la determinación mediante DLS, corresponde al diámetro hidrodinámico. Además, las alturas obtenidas por AFM son determinadas en una muestra seca, por lo que el componente polimérico u orgánico que se encuentra recubriendo la superficie de las nanopartículas no se encuentra en su estado elongado como en una suspensión líquida, sino directamente sobre la superficie de las nanopartículas de manera superpuesta, lo cual disminuye el diámetro hidrodinámico determinado por DLS, concordando con lo encontrado en la literatura [146].



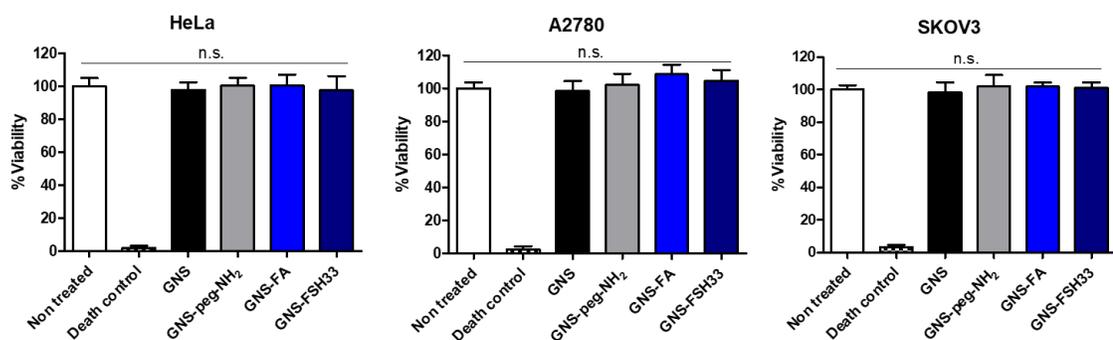
**Figura 24. Micrografías de AFM para los nanosistemas.** Se observan las alturas de los nanosistemas GNS, GNS-peg-NH<sub>2</sub>, GNS-FA y GNS-FSH33.

## **2. Evaluación *in vitro* de la selectividad e incorporación celular de los nanosistemas**

### **2.1. Viabilidad celular con los nanosistemas sin miR-145**

Se realizaron ensayos de viabilidad celular en la línea celular de cáncer cérvico uterino, HeLa, y en las líneas de cáncer ovárico A2780 y SKOV3, exponiendo por 24 horas a una concentración de 3,2 nM de cada sistema nanoparticulado (GNS, GNS-peg-NH<sub>2</sub>, GNS-FA y GNS-FSH33) sin la presencia del miR145, con el objetivo de evaluar si los nanosistemas que serán funcionalizados con el miR145 presentan características tóxicas para las células. De acuerdo con los resultados obtenidos, no hubo diferencias significativas con respecto al control, por lo tanto, ningún nanosistema ejerció efectos sobre la viabilidad celular en las tres líneas evaluadas (figura 25). Debido a la baja reactividad de las nanopartículas de oro y su baja toxicidad, estos resultados entran en concordancia con lo reportado en la literatura, que demuestran que las GNS obtenidas mediante la metodología planteada por Turkevich *et al.*, presentan reducida toxicidad *in vitro* incluso en tamaños pequeños como 3,5 nm o en altas concentraciones [147-149]. Al funcionalizar la superficie de la GNS, se modifican las características fisicoquímicas del nanosistema, ante esto, se ha reportado que las conjugaciones con polietilenglicol reducen los efectos tóxicos tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a la capacidad de disminuir las interacciones

con otras especies moleculares, como proteínas que pudieran favorecer la incorporación celular o con la misma superficie celular [150, 151]. En otros sistemas nanoparticulados como nanopartículas de sílice, se ha demostrado que la incorporación de FA reduce la toxicidad celular tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con nanopartículas funcionalizadas con peg-NH<sub>2</sub> [152]. De la misma manera, se ha utilizado el péptido FSH33 para disminuir la citotoxicidad de formulaciones co-poliméricas de nanopartículas [153]. Ambas moléculas, FA y FSH33, interactúan con los receptores correspondientes en líneas celulares de cáncer ovárico, demostrándose su utilidad en la entrega de fármacos hacia células ováricas [154, 155], por lo tanto aumentarían la captación celular de los nanosistemas, no obstante, los resultados obtenidos no demuestran efectos en la viabilidad celular.



**Figura 25. Ensayo de viabilidad celular realizado en células HeLa, A2780 y SKOV3.** Se utilizó el método colorimétrico MTS. Los resultados fueron obtenidos en triplicado con un n = 10. Barras de error: desviación estándar.

## **2.2. Selectividad celular de los nanosistemas sin miR145**

Se evaluó la capacidad de los nanosistemas funcionalizados con ácido fólico y con el péptido FSH33 de interactuar de manera selectiva con células de cáncer de ovario, para esto se determinó la presencia de nanopartículas de oro en las líneas celulares HeLa, A2780 y SKOV3 luego de su incubación por 24 horas. El parámetro de medición se estableció como incorporación celular, por medio de espectrofotometría, debido a que la metodología empleada para este ensayo no permite establecer si los nanosistemas se encuentran dentro de la célula o en el confinamiento de la membrana celular.

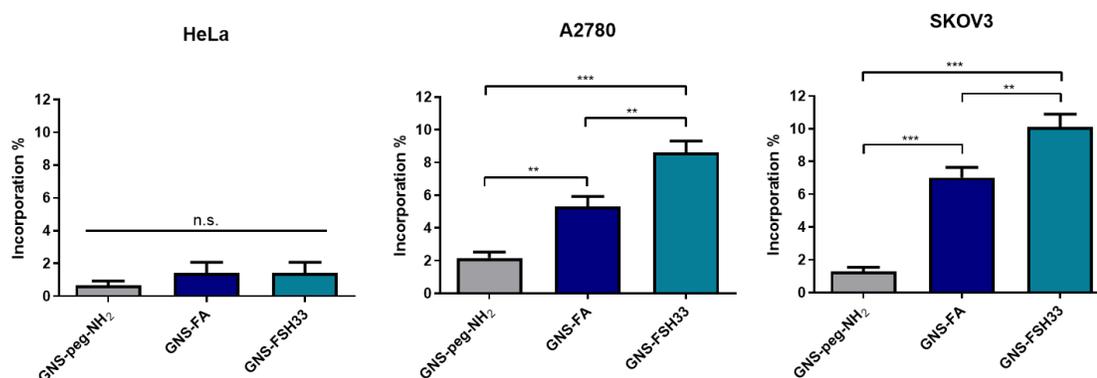
Luego de ser incubados los nanosistemas a una concentración de 3,2 nM, se observó que, en células HeLa, estos presentan una baja incorporación, con porcentajes cercanos al 1% de la concentración incubada. No obstante, tanto en células A2780 como en SKOV3, observamos que para todos los sistemas evaluados existe un aumento significativo en la incorporación. En la línea celular A2780, el sistema GNS-FA aumentó 3,9 veces, mientras el sistema GNS-FSH33 lo hizo en 7,2 veces, respecto de lo detectado para la línea celular HeLa. Asimismo, en la línea SKOV3 los sistemas GNS-FA y GNS-FSH33 aumentaron su incorporación en 5,6 y 9,7 veces, respectivamente (figura 26). Estos resultados se explican debido al posible reconocimiento de los receptores para cada molécula de direccionamiento presente en ambos nanosistemas (FA o

FSH33) en donde se destaca la mayor incorporación del nanosistema conjugado con el péptido FSH33.

Las células del ovario son las únicas que presentan receptores de membrana para la molécula FSH [108]; estos receptores se encuentran sobreexpresados en cáncer de ovario [109], al igual que el receptor para FA [105] y en las líneas celulares A2780 y SKOV3 [110, 156, 157]. Por lo tanto, existe una correlación positiva entre la presencia de estos receptores y la incorporación estos nanosistemas en las líneas celulares de cáncer de ovario, tal como se ha reportado para nanosistemas conjugados FA o FSH en otros estudios [154, 155].

La incorporación celular es de alta relevancia para obtener un direccionamiento selectivo de la carga de miR-145 hacia las células de cáncer ovárico para hacer más eficiente su entrega y por lo tanto el efecto molecular producido.

A partir de estos resultados se seleccionó para los experimentos posteriores, el nanosistema GNS-FSH33 para cargar el miR-145 y ser utilizado como nanoterapia, debido a que éste evidenció la mayor incorporación celular en las sin afectar la viabilidad celular.



**Figura 26. Evaluación de la selectividad celular de los nanosistemas mediante el porcentaje de incorporación celular.** Se evaluó mediante la absorbancia de la banda plasmónica correspondiente a los sistemas de GNS, en el sobrenadante de los cultivos de células HeLa, A2780 y SKOV3, estudiados luego de 24 horas de exposición a concentración 3.2 nM. Los datos fueron obtenidos en triplicado; n = 3; barras de error = desviación estándar.

### 2.3. Internalización de la nanoterapia en células ováricas

Se denominará en adelante al nanosistema GNS-FSH33-miR145 como “nanoterapia”, la quimioterapia convencional como “quimioterapia” y la exposición a ambos tratamientos como “nanoquimioterapia”.

Se evaluó la internalización celular de la nanoterapia, cuantificando oro atómico en células tratadas, mediante espectroscopía de emisión atómica. Para esto se incubaron células A2780 en placas de 6 pocillos por 3 y 24 h con medio DMEM/SFB 10% como control, miR-145 25 nM, GNS-peg-NH<sub>2</sub> 1 nM como nanosistema control, nanoterapia 1 nM, quimioterapia y nanoquimioterapia. A cada tiempo final, las células fueron lavadas con PBS y se llevó a cabo la

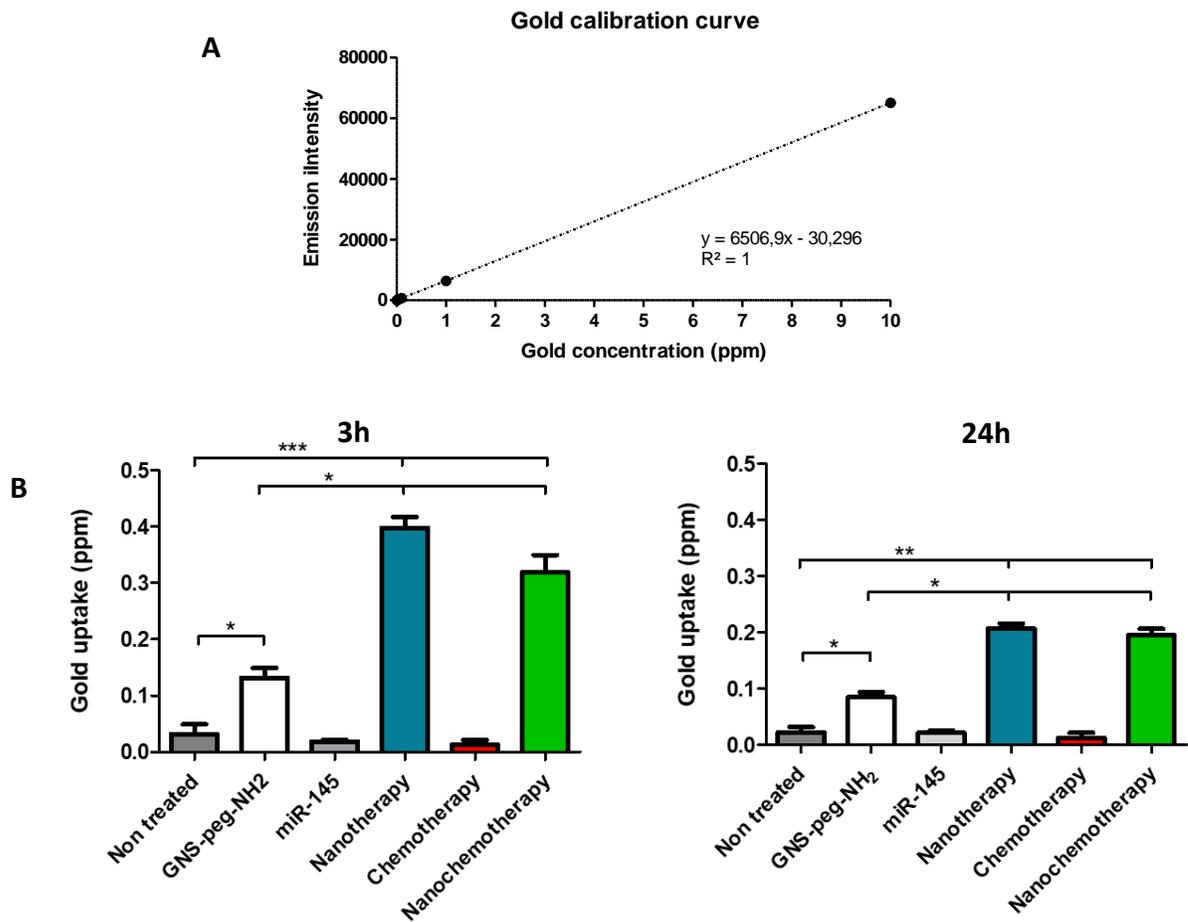
digestión de las nanopartículas internalizadas, directamente en el pocillo, agregando 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  por 15 min, posteriormente incubando a  $70^\circ\text{C}$  por 30 min y finalmente incubando por 48h a temperatura ambiente. Para determinar la concentración de oro para cada tratamiento, se realizó una curva de calibración con patrones de concentración conocida (figura 27 A). Luego, cada muestra se diluyó hasta llegar a una concentración de 2% de  $\text{HNO}_3$  y se procedió a la determinación de concentración de oro.

Los resultados obtenidos dan cuenta de que las células tratadas con nanopartículas (nanosistema control, nanoterapia y nanoquimioterapia) presentaron concentraciones de oro significativamente mayor al control sin tratar, indicando que las GNS fueron internalizadas en las células tratadas. Luego de 3 h de exposición a la nanoterapia, las células presentaron una concentración de 0,4 ppm de oro, mientras que al comparar la incorporación de la nanoterapia con el nanosistema control GNS-peg- $\text{NH}_2$ , se evidencia que la nanoterapia se internalizó 3 veces más, por lo tanto, siendo más selectiva. Esto se explica debido a la estructura molecular de cada sistema; el sistema GNS-peg- $\text{NH}_2$  presenta una amina primaria en su extremo, de carga positiva de 18 mV (Figura 19 B) que favorece la entrada a las células por interacción electrostática con las cargas negativas de los grupos fosfato presente en los fosfolípidos de la membrana celular, mostrando en consecuencia una concentración de 0,13 ppm en las células, en tanto, la nanoterapia presenta carga neta cercana a la neutralidad, de

3 mV (figura 19 F), en comparación con el sistema GNS-peg-NH<sub>2</sub>, esta carga no favorece el ingreso celular mediante interacción electrostática, sin embargo, la mayor concentración encontrada en las células se debe a que la nanoterapia presenta en su extremo el ligando FSH33, que reconoce al receptor de FSH sobreexpresado en A2780, facilitando el ingreso hacia la célula posiblemente mediante endocitosis mediada por receptor, como se ha reportado previamente [105]. En cuanto a la incubación con nanoquimioterapia, se obtuvo que la quimioterapia no desfavoreció la incorporación celular de la nanoterapia, obteniendo una concentración de oro comparable, haciendo viable la administración de las terapias en conjunto.

Luego de 24 h de exposición, la concentración de oro disminuyó en cerca de la mitad para todos los tratamientos con nanopartículas. Esto puede deberse a que las nanopartículas internalizadas están siendo expulsadas de la célula mediante mecanismos de excreción celular, tales como exocitosis, difusión o secreción mediante vesículas extracelular [158, 159]. Así, la internalización de la nanoterapia en las células es rápida, obteniendo un tiempo de mayor incorporación a las 3 h de exposición a los nanosistemas, de acuerdo con los tiempos evaluados (figura 27). Esto se condice con lo reportado en la literatura, en donde se ha estudiado que la internalización y tráfico del receptor de FSH, sigue un modelo de endocitosis mediado por clatrin [160], que puede ser el camino utilizado para la ingreso de la nanoterapia a la célula, lo que se

correlaciona además con los tiempos de internalización alcanzados para nanopartículas de <200 nm, estimado en 30 minutos, siguiendo una ruta de endocitosis clatrina-dependiente [137].



**Figura 27. Cuantificación de la incorporación celular de la nanoterapia.** A) Curva de calibración de oro atómico. B) Cuantificación de oro en células A2780 a las 3 y 24h. Los datos fueron obtenidos en triplicado; n = 3; barras de error = desviación estándar.

## 2.4. Cuantificación del miR-145 en células tratadas con nanoterapia

Para evaluar la transfección del miR entregado mediante nanoterapia, se cuantificó el miR-145 en células A2780 luego de 0, 3 y 24 horas de incubación, mediante qRT-PCR utilizando partidores específicos para el miR-145 y normalizando con el RNA nuclear RNU6. Los tratamientos efectuados fueron nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia, control sin tratar, para evaluar el nivel basal de expresión de miR-145, control con incubación de miR-145 sin agente de transfección, para evaluar el efecto en un contexto similar al *in vivo*, en donde no es posible la utilización de agentes de transfección tradicionales como lipofectamina o similares debido su toxicidad y amplia distribución.

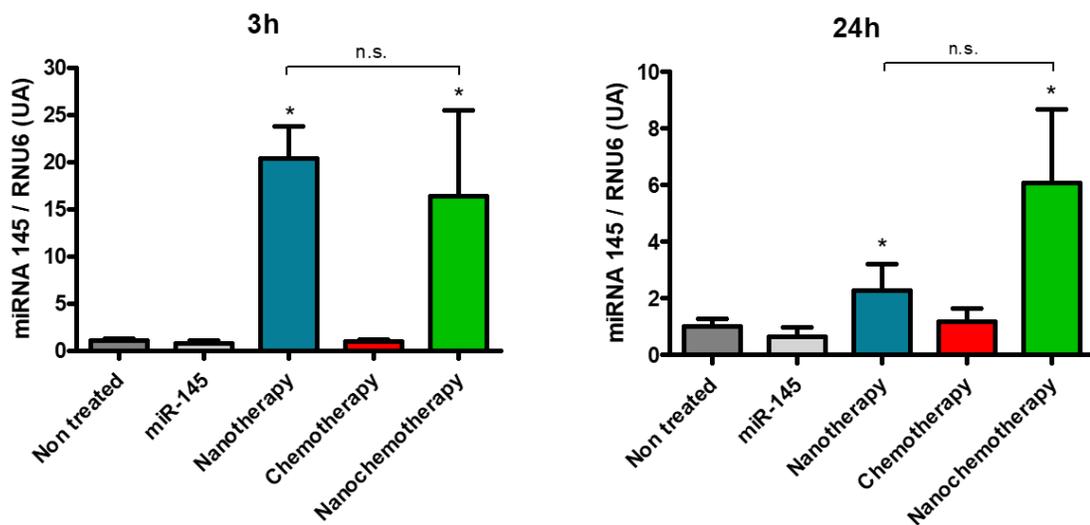
Los resultados indican que los niveles de miR145 para el control sin tratar entre 0 y 3 h no fueron significativamente diferentes (resultado no mostrado). En tanto, luego de 3 h de exposición de las células al nanosistema, el nivel de miR-145 en células tratadas con nanoterapia y con nanoquimioterapia fue hasta 20 veces mayor, en comparación con las células tratadas con el miR-145 libre o con el control de células no tratadas. En tanto, luego de 24 horas de incubación, la presencia de miR-145 en las células tratadas con nanoterapia fue de 2,3 veces mayor en comparación con el control y, para las células tratadas con nanoquimioterapia de 6,1 veces mayor. En ambos tiempos (3 y 24 h), no hubo diferencias significativas entre los tratamientos nanoterapia y nanoquimioterapia

respecto de los niveles de miR-145 (figura 28), lo que indica que la quimioterapia administrada en conjunto con la nanoterapia no interfiere en el mecanismo de ingreso celular de esta última, pudiendo potenciar o sumar los efectos celulares.

Es así como, los resultados obtenidos dan cuenta de que la nanoterapia es efectiva para vehicular el miR-145 hacia el interior de la célula, encontrándose estos miRs disponibles para su cuantificación. A su vez, la incorporación celular del miR-145 transportado por la nanoterapia sucede a intervalos cortos de tiempo, obteniendo que a las a las 3 h de incubación se cuantificaron los mayores niveles de miR-145 celular en los tiempos evaluados (figura 28), lo cual se encuentra en línea con el mayor nivel de oro intracelular cuantificado a este tiempo, aseverando la incorporación celular de la nanoterapia en tiempos acotados (figura 27).

La disminución en los niveles de miR-145 luego de 24 horas de incubación pueden ser producto de procesos de degradación enzimática del miR al interior de las células, mediante modificaciones en los extremos 3' por adición o remoción de nucleótidos [161, 162]. Asimismo, se han demostrado mecanismos de degradación *target*-dependientes, mediados por la interacción del miRNA con sus mRNA *targets*, en específico para el caso de los mRNA *targets* con alto grado de complementariedad con los miRNAs, se ha observado que promueve potentemente su degradación mediante el corte en su estructura por la enzima

AGO2 [163-165]. En un estudio realizado por Marzy *et al*, se evidenció que existen diversas dinámicas de degradación de miRNAs con tiempos de vida media ( $T_{1/2}$ ) de 24h o incluso menor, obteniendo  $T_{1/2}$  de entre 4 – 14h, lo que puede explicar la disminución en los niveles del miR145 hasta las 24 h de incubación.



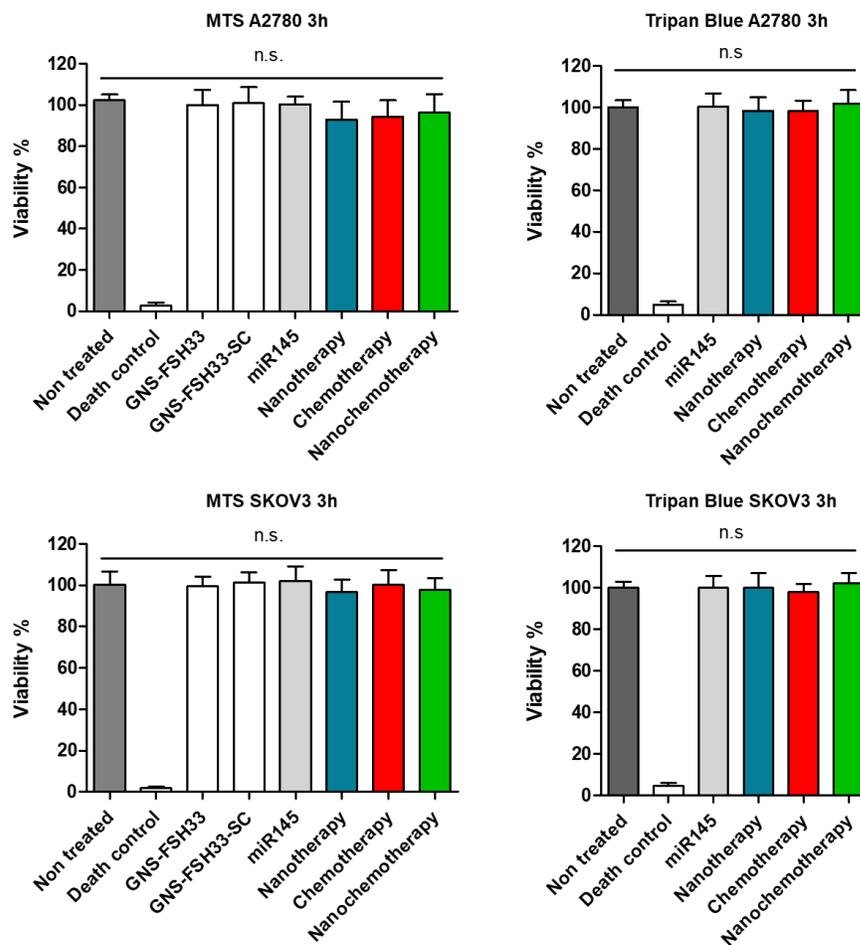
**Figura 28. Cuantificación de miR145 en células tratadas con la nanoterapia.** Niveles normalizados de miR-145 en células tratadas con miR-145 libre, nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia, evaluado a las 3 y 24h, graficas izquierda y derecha, respectivamente. \*= $p > 0,05$  con respecto del control miR-145; n = 4; barras de error = desviación estándar.

### 3. Evaluación *in vitro* de los efectos celulares y moleculares de la nanoterapia

#### 3.1. Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular en las líneas de cáncer ovárico A2780 y SKOV3 mediante los ensayos de MTS y exclusión molecular con azul de tripán. Con el objetivo de evidenciar posibles efectos citotóxicos agudos de corto tiempo, las células se incubaron por 3 horas con los tratamientos de nanoterapia y nanosistemas controles. Esto, ya que en este tiempo cuantificó el mayor ingreso celular de la nanoterapia (figuras 27 y 28). Los resultados indican que para ambas líneas celulares los tratamientos incubados no ejercieron efectos en la viabilidad celular, para ambos métodos ensayados (figura 29). La mayoría de los ensayos de viabilidad se evalúan en largos periodos de exposición, normalmente desde las 24h en adelante, sin embargo, debido a la naturaleza de los nanosistemas, es posible detectar efectos importantes si los nanosistemas logran ingresar a las células en el corto tiempo de incubación, como ha sido reportado anteriormente [166, 167]. Los resultados obtenidos son contrastantes respecto de los tiempos de mayor ingreso a las células de la nanoterapia, lo que puede sugerir, que la mera incorporación de los nanosistemas al interior de las células no genera alteraciones en la viabilidad celular y los mecanismos de citotoxicidad aun no reflejan sus efectos. Esto debido a que probablemente los sistemas moleculares, tanto para la quimioterapia, como aquellos de inhibición de RNA mensajeros, por parte del miR145, están siendo activados y aún no ejercen un efecto celular detectable a las 3 horas de incubación. Por lo que se hace necesario evaluar los efectos a tiempos mayores. En otros estudios, en contraste, se ha demostrado que el ingreso de nanopartículas de oro hacia las células puede provocar efectos

tóxicos dependiendo de su concentración y acumulación [168], generando efectos como la generación de radicales libres que conllevan hasta la apoptosis, en conjunto con otros mecanismos moleculares [150], los que de todos modos, son dependientes de las características fisicoquímicas de cada nanosistema [169].



**Figura 29. Viabilidad celular en las líneas de cáncer ovárico A2780 y SKOV3.** Mediante el ensayo de MTS se determinó la viabilidad celular luego 3 horas de exposición a los nanosistemas. Todos los datos fueron obtenidos con un n=3 al menos en triplicado, barras de error = desviación estándar. n.s.= no significativo.

### 3.2. Proliferación celular

Se evaluó el efecto de la nanoterapia sobre la proliferación celular de células de las líneas A2780 y SKOV3, luego de 24, 48 y 72 h de incubación, determinando por el ensayo MTS. La utilización de este ensayo ha sido de discusión para determinar proliferación, ya que puede presentar algunos interferentes debido a la medición indirecta del número celular y la dependencia de la colorimetría, la cual, en diversos contextos puede verse alterada, como por ejemplo por la presencia de nanopartículas que ejerzan efectos catalíticos, emitan o absorban luz y aumenten o disminuyan la reacción colorimétrica o tratamientos que bajo estimen los efectos antiproliferativos [170, 171]. No obstante, con los controles adecuados, las bajas concentraciones incubadas y los resultados de los ensayos de viabilidad previos, estos efectos pueden ser baipaseados. Así, en los tiempos evaluados mediante este método, es posible determinar los efectos sobre la proliferación, debido a que ya han sucedido varios ciclos de división celular, presentando un aumento exponencial del valor de absorción de formazán, por lo tanto, mayor número de células viables a cada tiempo. Al analizar los efectos de la nanoterapia luego de 24h de incubación, se observó una disminución inicial de la viabilidad celular, al comparar con el tiempo de 3 h, lo cual sugiere un efecto citotóxico inicial provocado por la nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia, con un 8, 58 y 67% en la reducción de la viabilidad para la línea A2780 y un 12, 54 y 62% de reducción para la línea

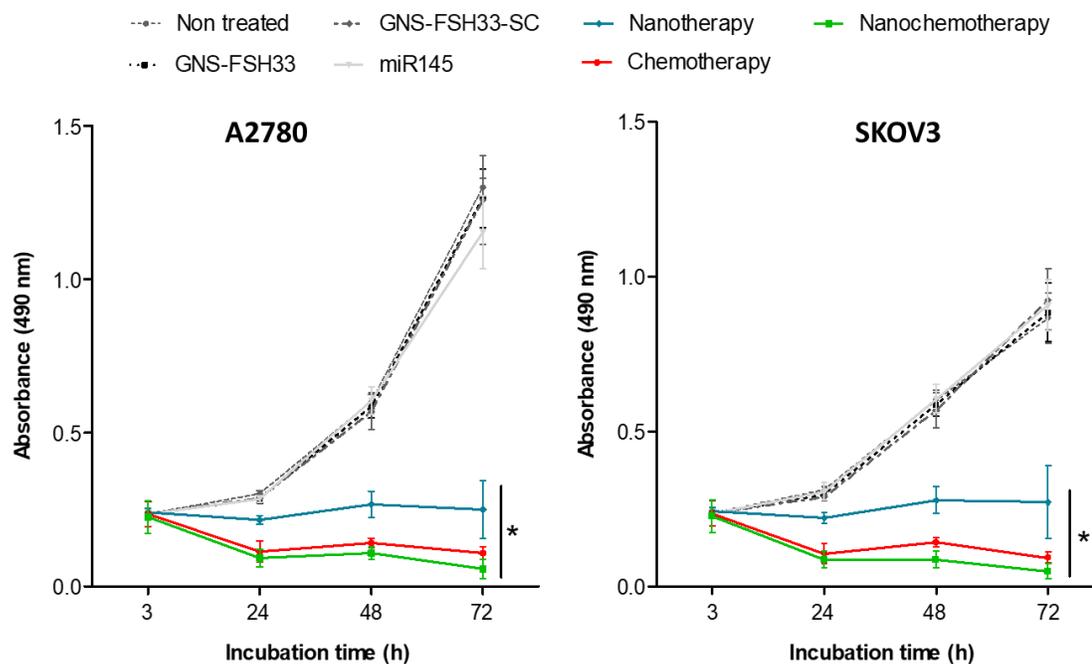
SKOV3, respectivamente. A su vez, se observa que a las 24 h la proliferación celular con respecto a los controles sin tratar, miR145 sin agente de transfección, nanosistema sin miRNA (GNS-FSH33) y nanosistema con miRNA *scramble* (GNS-FHS33-SC), se ve reducida en un 23% para ambas líneas celulares. La quimioterapia respondió a una disminución de un 63%, y a su vez, al exponer a las células a ambos tratamientos en conjunto, la proliferación se redujo hasta en un 70% sin diferencias significativas entre ambos tratamientos.

Al comparar los efectos en la proliferación celular en el tiempo, se observó una significativa disminución de ésta en las células tratadas con nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia, tanto a las 48 como a las 72 horas (figura 30). Luego de 48 horas se observó un efecto claro en la proliferación celular, con una disminución frente a la exposición a la nanoterapia de 48 y 55% para las líneas A2780 y SKOV3, respectivamente. En cuanto a la quimioterapia, la disminución fue de un 76% y la nanoquimioterapia en un 83% para ambas líneas celulares, mostrando diferencias significativas. Asimismo, al evaluar el efecto a las 72 horas, la nanoterapia disminuye la proliferación hasta un 76 y un 69%, la quimioterapia lo hace hasta un 92 y 89% y el tratamiento conjunto hasta un 96 y 94%, respectivamente para A2780 y SKOV3 (figura 30).

Ante esto, los resultados indican que, a tiempos superiores a 3 horas de incubación con la nanoterapia, ésta ejerce efectos celulares, disminuyendo la

viabilidad celular en una primera instancia hasta las 24 h y luego de haber sucedido ciclos replicativos, actúa como un inhibidor de la proliferación celular, provocando un efecto citostático permanente en ambas líneas celulares. Esto se explica debido a que, como se obtuvo en los experimentos anteriores, el nanosistema hace ingreso a las células en 3 horas, sin presentar efectos en la viabilidad, no obstante, la carga de miRNA que probablemente es liberada luego de este tiempo, comienza a ejercer efectos celulares posteriores a las 3 horas, como fue obtenido para 24, 48 y 72 h.

El miR-145 regula negativamente la proliferación celular, como se ha demostrado ampliamente en la literatura, ejerce su efecto inhibitorio mediante la acción en diversos blancos moleculares, tal como mensajeros de proteínas y enzimas de la vía de las MAP-quinasas como p38, ERK, el receptor IRS1, inhibiendo la vía de señalización MARK/ERK [172], a su vez, se ha demostrado la inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT, mediante la regulación directa de NRAS [173].



**Figura 30. Efectos en la proliferación celular en la línea de cáncer ovárico epitelial A2780.** Mediante el ensayo de MTS se determinó la absorbancia celular luego de 24, 48 y 72 horas de exposición a los nanosistemas. Todos los datos fueron obtenidos con un n=3 al menos en triplicado, barras de error = desviación estándar. n.s.= no significativo; \*: p<0,05.

### 3.3. Evaluación de la formación de clones tumorales

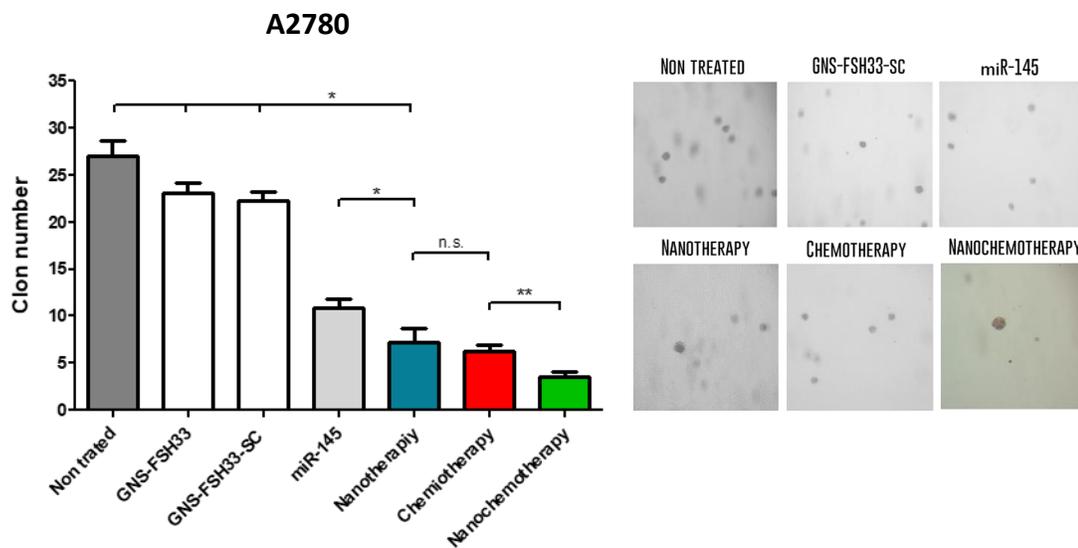
Se evaluó la capacidad de células A2780 luego de la exposición al nanosistema GNS-FSH33-miR145 de producir progenie en condiciones independiente de anclaje en una matriz de *soft agar* en un contexto de tres dimensiones (3D), lo cual es considerado un parámetro de correlación de tumorigenicidad *in vivo* dependiente de células madre oncogénicas. Luego de 2 semanas, se contó el número de clones formados a partir de 7000 células

sembradas, observando que la nanoterapia reduce significativamente, de 27 para el control no tratado a 7, es decir una reducción de un 74%. Este resultado es estadísticamente significativo respecto de los controles (GNS-FSH33, GNS-FSH33-SC). En este ensayo, observamos que el miR145 libre ejerce un efecto sobre la formación de clones, no obstante, este efecto es significativamente mayor cuando el miR se encuentra vehiculizado en nanopartículas. Es interesante apreciar que el efecto de la quimioterapia no es distinto al ejercido por la nanoterapia, en tanto, cuando se exponen ambas terapias en conjunto, el efecto aumenta hasta un 87% de disminución de clones formados. Esto indica que el nanosistema GNS-FSH33-miR145 tiene un efecto importante, mostrando un efecto de reducción en el crecimiento independiente de anclaje, actuando como agente único o en combinación con la quimioterapia convencional, pudiendo disminuir la tumorigenicidad (figura 31).

Kim *et al* observó que la expresión exógena del miR145 inhibe el crecimiento independiente de anclaje, en ensayos de clonogenicidad, y lo asocia a una inducción del proceso de autofagia debido al aumento en la expresión del marcador de autofagia LC3 I y II [174]. Algunos autores, en tanto, han correlacionado la inhibición del mensajero de la glicoproteína transmembrana MUC13 por el miR145, con una disminución en el crecimiento independiente de anclaje, debido a que la proteína MUC13 ejerce un rol importante en la adhesión celular y se ha observado que su inhibición, al sobreexpresar miR145, disminuye

significativamente la proliferación, crecimiento en ensayos clonogénicos y aumenta la movilidad celular inhibiendo los contactos célula-célula y célula-sustrato [175, 176]

Estos resultados van en línea con el efecto antiproliferativo encontrado en cultivo en 2 dimensiones (2D), pero en una conformación tridimensional, la cual aporta un contexto molecular más similar a un escenario tumoral real, entregando información valiosa en el sentido de la proyección de la nanoterapia como tratamiento, debido a que se ha observado que los resultados de tratamientos anticancerígenos candidatos evaluados *in vitro* mediante cultivos celulares en 3D, poseen mejor probabilidad de efectividad en estudios *in vivo*, en comparación con los resultados obtenidos de evaluaciones *in vitro* en 2D [177].



**Figura 31. Evaluación de formación de clones tumorales de la línea A2780.** formación de clones a los 14 días con una sola dosis de cada nanosistema. Los resultados son el promedio de 4 ensayos independientes, n.s. = no significativo; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p > 0,01$

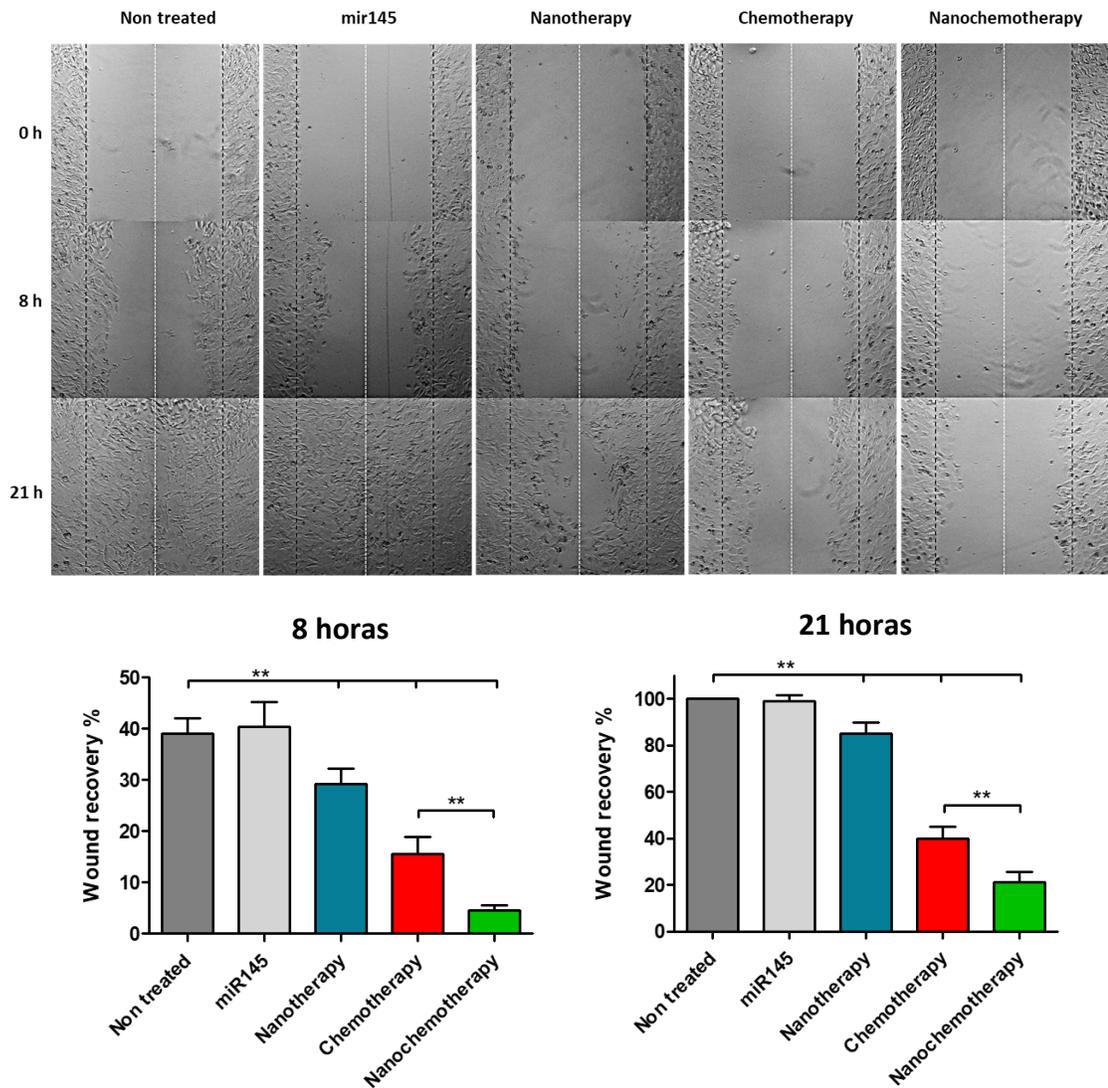
### 3.4. Evaluación de la migración celular

Se evaluó la capacidad de células de cáncer ovárico SKOV3 de migrar luego de la exposición por 24 h al nanosistema GNS-FSH33-miR145 mediante el método de *wound healing* cuyos movimientos imitan los patrones de migración de ciertos tipos celulares como los tejidos epiteliales, mediante la activación de la transición epitelio mesénquima para el cierre de lesiones tisulares. Luego de la incubación con los nanosistemas, se realizó una herida en medio de cada pocillo de una placa de 96 pocillos con una punta de micropipeta, se lavó con PBS de los restos celulares y los tratamientos, luego se agregó medio de cultivo nuevo, dejando cerrar la herida hasta 21h, registrando mediante fotografías en un microscopio óptico.

Los resultados indicaron que el miR145 libre no ejerció efectos en la migración celular dependiente de transición epitelio mesénquima, comportándose igual que el control no tratado. En cuanto a la nanoterapia, se observó un efecto a las 8 h de tiempo de cierre de herida, con un 10% menos de recuperación, observando que a las 21 h la herida no logró cerrar completamente,

llegando a un 85% de recuperación. La quimioterapia logró un porcentaje de recuperación a las 21 h de un 40%, en tanto, el efecto de la exposición a ambas terapias logró una recuperación de tan solo un 21% (figura 32).

Varios autores han reportado el efecto del miR145 sobre la migración celular y su relación con blancos moleculares específicos [178-180]. Cioce *et al*, encontró que la expresión exógena de miR145 reduce los niveles del factor de transcripción OCT4, relacionado con la autorrenovación de células madre, que regula directamente el gen de la proteína ZEB1, relacionada con la transición epitelio mesénquima, provocando un efecto pro-senescente en las células tumorales evaluadas [178]. Por otra parte, Hua *et al* demostró que el miR145 tiene como *targets* directos a los oncogenes CCND2, involucrados en la progresión del ciclo celular, y E2F3, factor de transcripción relacionado con la proliferación celular, evidenciando efectos en la migración, invasión y crecimiento celular mediante la transfección de miR145 mediante nanopartículas magnéticas en células de cáncer ovárico [181]. Los resultados de disminución de la migración en esta tesis, se correlacionan con lo reportado en la literatura, validando el transporte del miR145 mediante nanopartículas de oro.



**Figura 32. Evaluación de la migración celular mediante el ensayo de recuperación de herida.** Se evaluó el cierre de la herida a las 8 horas y hasta las 21 horas. Los ensayos fueron realizados en triplicado con un n=6, \*\* = p<0,01.

### 3.5. Liberación de VEGF

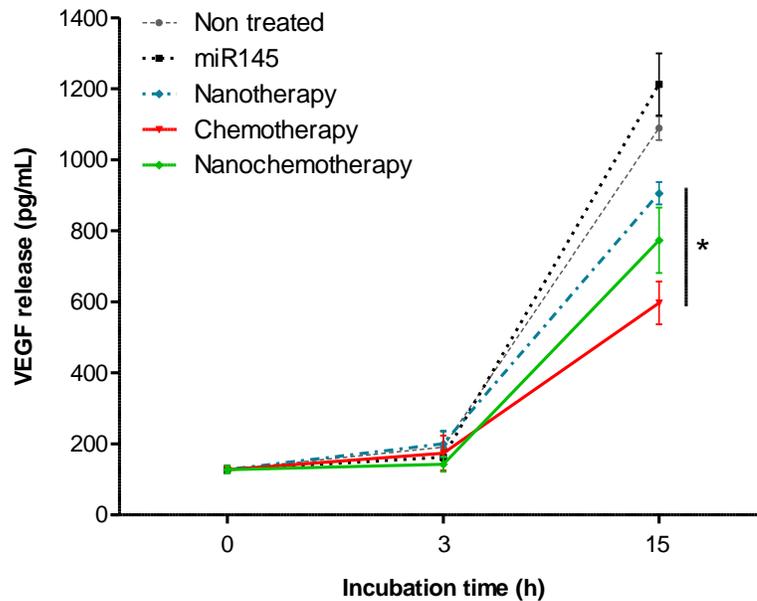
Las células de cáncer ovárico secretan al medio factores de proliferación vascular como VEGF, por lo tanto, la inhibición de su traducción tiene un efecto

directo en la proliferación de células endoteliales y formación *de novo* de vasos sanguíneos. Se ha reportado que el miR145 es inhibidor de la traducción del mensajero de VEGF, disminuyendo sus niveles intracelulares y secretados.

Para evaluar el efecto de la incorporación de la nanoterapia en la liberación del factor angiogénico VEGF, se realizó un inmunoensayo ELISA a medios de cultivo obtenidos de células A2780 incubadas con nanoterapia por 0, 3 y 15 h. Los resultados indicaron que, a las 3 h de incubación, no existieron diferencias significativas en la liberación de VEGF entre los tratamientos. No obstante, a las 15 h de incubación, los medios de cultivo provenientes desde células tratadas con nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia presentaron niveles significativamente menores de VEGF respecto de los controles sin tratamiento y miR145. El tratamiento con nanoterapia provocó una liberación de VEGF de un 25% menos, en comparación con el control tratado con miR145 sin agente de transfección. En tanto, la nanoquimioterapia disminuyó en un 36% la liberación de VEGF y la quimioterapia un 45% (figura 33). Este efecto, se obtuvo luego de 3 h de incubación, lo cual se correlaciona con los tiempos de ingreso de la nanoterapia a las células, teniendo un efecto molecular, en este caso la liberación de VEGF, al menos desde 15 h de incubación.

Estos resultados podrían correlacionarse con lo reportado en la literatura, en donde se ha encontrado, por ejemplo, que las vías de señalización

dependientes del factor IGF-1 (*insuline-like growth factor 1*), IRS1 (*insuline receptor substrate 1*) y Ras, que están fuertemente involucradas en la expresión del factor VEGF, se encuentran reguladas directamente por el miR145 [182, 183]. Xu *et al*, demostró que el miR145 inhibe la expresión post-transcripcional de la proteína p70S6K1, que es un regulador río arriba de factores relevantes en la angiogénesis, como HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) y VEGF, los cuales disminuyen sus niveles cuando el miR145 es sobreexpresado tanto *in vitro* como *in vivo* [184]. En esta misma línea, se ha reportado que además el miR145 tiene como *target* directo al mensajero de VEGF, hibridando parcialmente en el extremo 3' e inhibiendo su traducción [185]. Por lo tanto, la disminución en los niveles de VEGF en el medio de células A2780 incubadas con nanoterapia se condicen con los mecanismos inhibitorios del miR145 reportados en la literatura para VEGF.

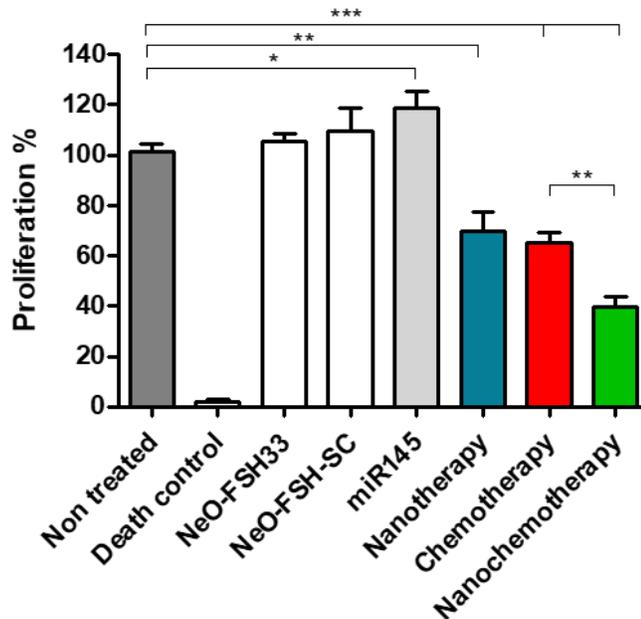


**Figura 33. Liberación de VEGF en células A2780 incubadas con nanoterapia.** Se incubaron células A2780 con nanoterapia y se cuantificó en el medio de cultivo la presencia de VEGF mediante inmunoensayo, luego de 0, 3 y 15 horas de exposición. Todos los datos fueron obtenidos con un n=3 al menos en triplicado, barras de error: desviación estándar. n.s.: no significativo; \*:  $p < 0,05$  respecto del control con miR145 libre.

### 3.6. Proliferación de células endoteliales EA.hy926 por efecto de VEGF en medios de cultivos de células A2780 incubadas con nanoterapia

Se evaluó el efecto de medio condicionado proveniente de células de cáncer ovárico de la línea A2780 tratadas con nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia, en la proliferación de células endoteliales EA.hy926, mediante el método colorimétrico MTS, luego de 48 h de incubación.

Los resultados indican que las células endoteliales incubadas con los medios provenientes de células de cáncer de ovario A2780, tratadas con con nanoterapia, redujeron la proliferación en 31%, quimioterapia en un 35% y la nanoquimioterapia en un 61%, en tanto, el medio proveniente del tratamiento con miR145, no tuvo efectos en la disminución de la proliferación de las células endoteliales (figura 34). Estos resultados, se correlacionan directamente con los niveles cuantificados de VEGF en los medios de células A2780 tratados con nanoterapia (figura 33), resultando en menor proliferación en células endoteliales que fueron incubadas con medios de cultivo con menores niveles de VEGF, como aquellos provenientes de células tratadas con nanoterapia o nanoquimioterapia, en comparación con aquellos provenientes de los controles, que no provocaron efectos inhibitorios en la proliferación de células endoteliales. En línea con estos resultados, se ha demostrado por Cho *et al* que, tanto VEGF-A como N-RAS son *targets* directos del miR145, observando que al sobreexpresar el miR145, los niveles de VEGF disminuyen, provocando importantes efectos inhibitorios en la angiogénesis evaluada tanto *in vitro* como *in vivo* [186].



**Figura 34. Evaluación de la proliferación celular con medio condicionado de células A2780.**

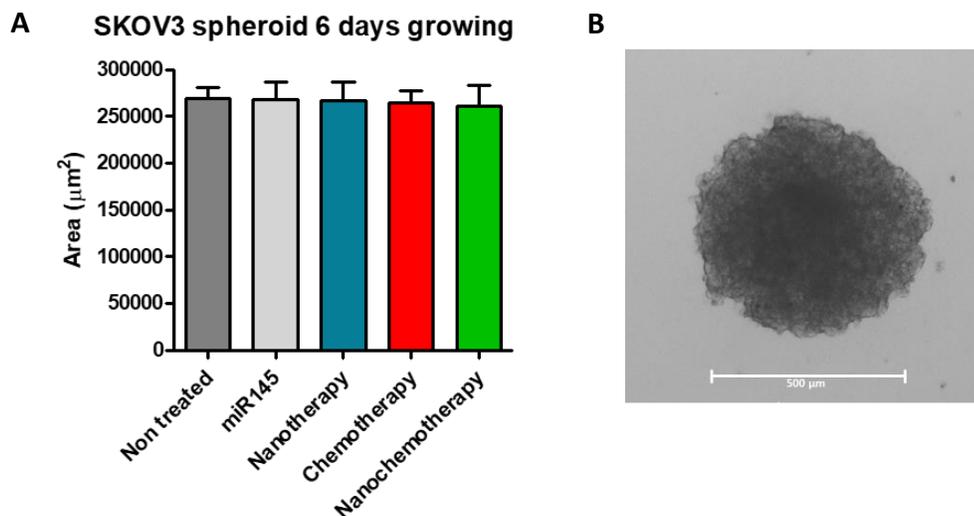
Todos los datos fueron obtenidos en triplicado con un n = 8, barras de error: desviación estándar.

\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.7. Evaluación de los efectos en esferoides tumorales

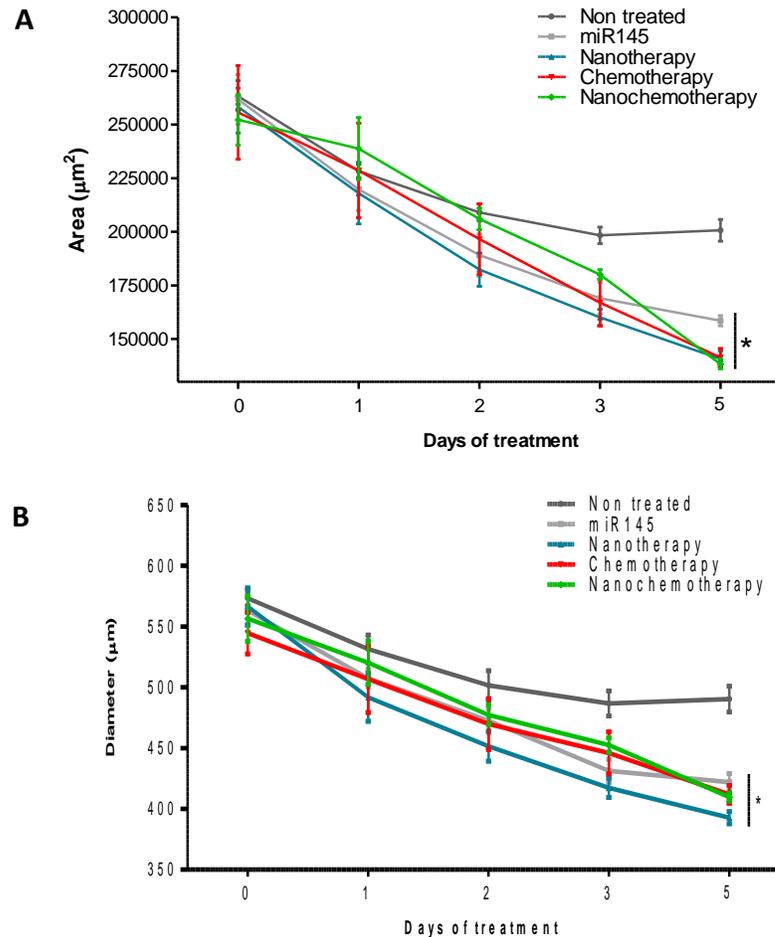
Para evaluar los efectos de la nanoterapia en un contexto celular tridimensional tumoral, se formaron esferoides tumorales sólidos individuales, de la línea SKOV3 en placas de 96 pocillos, mediante el método *liquid overlay technique* (LOT), que consiste en la agrupación espontánea de células tumorales en una superficie antiadherente con fondo cóncavo para obtener la formación de un esferoide por pocillo, los cuales se pueden evaluar individualmente como un microtumor [187].

Al sexto día de incubación a partir de 7000 células individuales, se obtuvieron esferoides homogéneos de aprox. 265 mm<sup>2</sup> de área y 500 μm de diámetro (figura 35), en donde se observó, mediante microscopía óptica, un centro denso, correspondiente con una estructura tridimensional (figura 35 B). Los esferoides formados se expusieron a tratamientos con nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia, se observó su morfología y se midió su tamaño y área diariamente. Al quinto día de exposición a los tratamientos, se hizo la última medición y se procedió a realizar los ensayos de viabilidad mediante el método colorimétrico de MTS, el ensayo de muerte celular mediante la liberación de LDH y el ensayo Anexina V/ioduro de propidio en esferoides intactos.



**Figura 35. Crecimiento de esferoides de la línea SKOV3 hasta el día 6.** A) Gráfico de la medición del área de esferoides seleccionados al azar para cada tratamiento, barras de error = desviación estándar, duplicado, n=12, B) esferoide representativo al día 6 de crecimiento.

Los resultados muestran que los esferoides sin tratar disminuyeron su área y diámetro hasta el día 2, en donde el proceso de compactación se detuvo, manteniendo su tamaño hasta el día 5. En tanto, los esferoides tratados con miR145, nanoterapia, quimioterapia y nanoquimioterapia, redujeron su tamaño y área constantemente hasta el día 5, en comparación con el control sin tratar (figura 36).

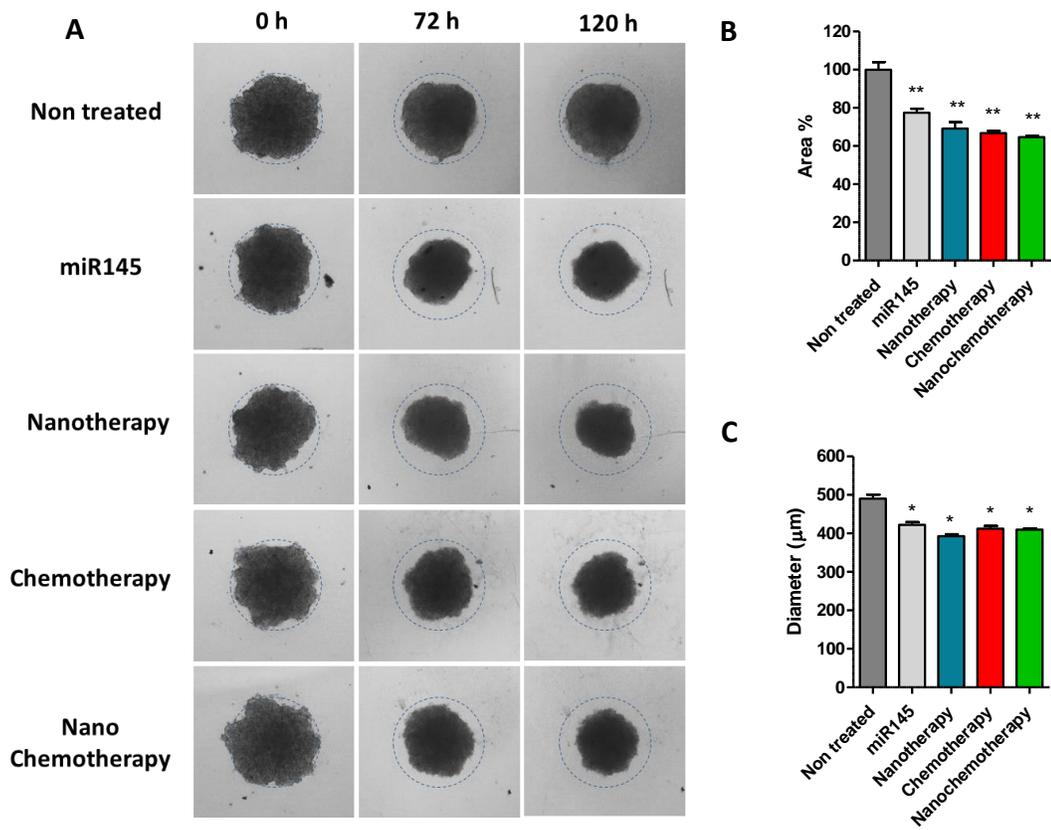


**Figura 36. Curvas de disminución de tamaño de esferoides de la línea SKOV3 tratados hasta el día 5.** A) gráfico de la medición del área y B) gráfico de la medición del diámetro. barras de error = desviación estándar, duplicado, n=12, \*: p<0,05.

Al tercer día de tratamiento se observan efectos significativos en la disminución del área (figura 36 A, figura 37), en tanto, al quinto día de exposición, se observa en la imagen de microscopía óptica una disminución considerable del tamaño de los esferoides tratados, siguiendo al mismo esferoide, representativo de un total de 12 (figura 37 A).

En cuanto a la cuantificación de área, el tratamiento con miR145 redujo en un 33% el área de los esferoides, la nanoterapia un 41%, quimioterapia 43% y la exposición conjunta un 46% todos significativamente distintos del control sin tratar, no obstante, sin diferencias significativas entre ellos (figura 37 B). Asimismo, el diámetro de los esferoides disminuyó de 490 a 392  $\mu\text{m}$  para la nanoterapia, que presentó la mayor disminución en el diámetro, sin ser significativamente distinto del resto de los tratamientos (figura 37 C).

Es de esta manera, que podemos evidenciar que, los tratamientos con miR, nanoterapia, quimioterapia convencional y la exposición a ambas terapias, tuvieron un efecto directo en la disminución del tamaño y área de los esferoides tumorales formados, probablemente mediado por mecanismos específicos de toxicidad en las células de los esferoides.



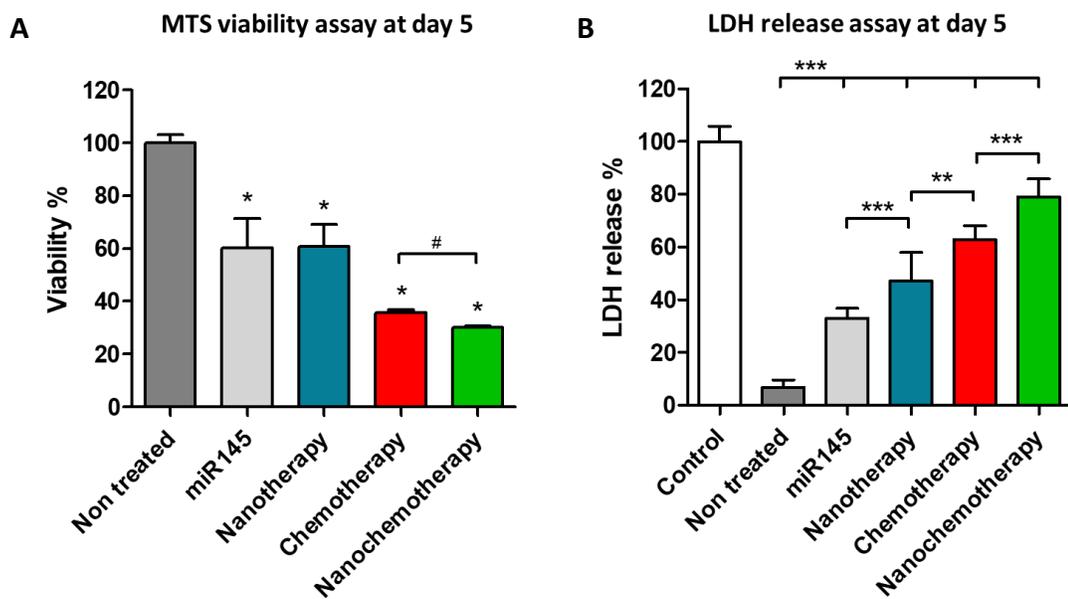
**Figura 37. Efectos de la nanoterapia sobre el tamaño y área de esferoides tumorales de la línea SKOV3.** A) imágenes de microscopía óptica del curso temporal de los tratamientos, B) determinación del área de los esferoides al quinto día, C) determinación del diámetro de los esferoides al quinto día. Experimentos realizados en duplicado, con un n=12, \* = p<0,05; \*\* = p<0,01 respecto del control sin tratar.

Para investigar acerca de los mecanismos que la nanoterapia ejerce sobre la reducción del tamaño de los esferoides tumorales, se realizaron ensayos de viabilidad celular, daño celular y muerte por apoptosis, directamente en los esferoides incubados.

Al evaluar la viabilidad celular en los esferoides intactos, los resultados demuestran que, tanto el miR145 libre, como la nanoterapia disminuyeron la viabilidad en un 40%, en comparación con el control sin tratar, la quimioterapia lo hizo en un 64%, en tanto, la nanoquimioterapia redujo la viabilidad del esferoide un 70% manteniendo diferencias significativas respecto de la quimioterapia (figura 38 A).

El ensayo de permeación de LDH, demostró que el tratamiento con miR145 provocó una permeación del 33%, la nanoterapia con una diferencia significativa respecto del miR145, un 47%, la quimioterapia un 63% y la nanoquimioterapia un 79%, respecto del control sin tratar, significativamente mayor que la quimioterapia (figura 38 B).

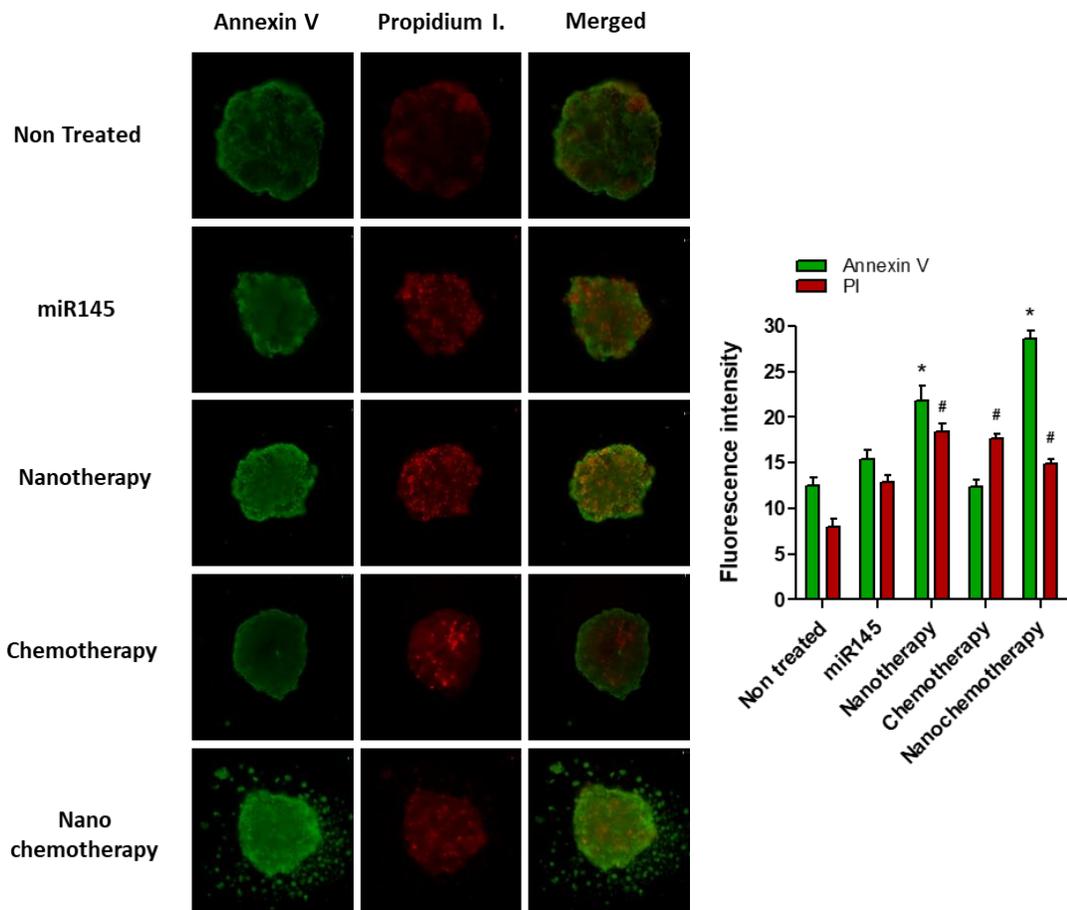
En síntesis, todos los tratamientos lograron reducir el tamaño de los esferoides, provocando injuria celular y daño en la membrana plasmática. La nanoterapia provocó reducción de la viabilidad de manera similar al miR145 libre, sin embargo, ejerció mayor daño en la membrana celular. Interesantemente, la nanoquimioterapia logró un efecto mayor, tanto en la viabilidad como en el daño en la membrana plasmática, en comparación con la quimioterapia. Estos resultados son un indicio de mecanismos de muerte celular como necrosis o apoptosis en estadios tardíos, explicando el comportamiento de reducción de tamaños en los esferoides tratados.



**Figura 38. Evaluación de la viabilidad y muerte celular de los esferoides tratados.** A) ensayo de MTS en esferoides intactos, datos en duplicado, n=8; barras de error = desviación estándar; \* =  $p < 0,05$  respecto del control sin tratar; # =  $p < 0,05$ . B) ensayo de permeación de LDH, datos en duplicado, n=12, barras de error = desviación estándar; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Finalmente, 3 esferoides por condición fueron aislados en una placa de 96 pocillos de lados opacos y fondo claro e incubados con anexina V (AV) y yoduro de propidio (IP) y visualizados en un microscopio de fluorescencia. Es posible apreciar en las imágenes obtenidas y en la cuantificación de la fluorescencia, que los esferoides tratados con nanoterapia y nanoquimioterapia presentaron mayor intensidad de fluorescencia para AV y IP, reflejado en la mayor intensidad amarilla de la imagen superpuesta, revelando marcas positivas para AV (+) / IP (+), lo que se correlaciona con muerte celular por apoptosis tardía o necrosis inducida por estos tratamientos (figura 39). En el caso del tratamiento con quimioterapia convencional, se observa que la marca verde es de intensidad

similar que el control, sin embargo, la marca roja (correspondiente a IP) es significativamente mayor, es decir AV (-) / IP (+) apreciándose pocas zonas de color amarillo en la imagen superpuesta, lo que se correlaciona con muerte celular debido a necrosis. Los resultados para el tratamiento con miR145, en tanto, no son significativamente distintos que el control sin tratar.



**Figura 40. Evaluación del mecanismo de muerte celular en esferoides intactos.** Ensayo de tinción con AV y IP. A) imágenes de fluorescencia representativas de esferoides incubados con AV y IP luego de cada tratamiento. B) cuantificación de la fluorescencia resultante. Ensayo realizado en duplicado, n=3; barras de error = desviación estándar; \* = p<0,05 respecto del control de AV no tratado; # = p<0,05 respecto del control de IP no tratado.

El ensayo de marcaje con AV / IP ha suscitado controversia en la literatura, principalmente debido a la ocurrencia de falsos positivos para la marca de IP. El IP es una molécula impermeable a las membranas celulares que expresa marca fluorescente roja cuando se logra intercalar en el DNA, correlacionándose con una señal de necrosis celular. Así, cuando la célula se encuentra viable o en proceso inicial de apoptosis, no exhibe la marca roja asociada al IP. En etapas de apoptosis temprana, debido a que las membranas celulares se encuentran íntegras, sólo se observa señal positiva para AV debido a la interacción con la fosfatidilserina translocada, no obstante, en el proceso temporal de la apoptosis, entre apoptosis temprana y tardía, en ocasiones, debido a la aparición permeabilidad en la membrana celular y la abundante presencia de RNAs en el medio citoplasmático, se ha reportado marca positiva debido a la intercalación del IP con estos RNAs, generando una señal AV (+) / IP (+). Este marcaje puede ser tomado como consecuencia del proceso de necrosis, sin embargo, lo cual puede ser correcto, sin embargo, también puede ser debido solo a apoptosis tardía debido a marca positiva para PI de los RNAs citoplasmáticos como falso positivo [188]. Para poder discriminar los mecanismos de muerte celular que están ocurriendo, se hace necesario ubicarse en un contexto cinético de los efectos celulares, realizando ensayos en distintas temporalidades para observar la variación dinámica en las marcas observadas [189]. Otros autores han sugerido modificaciones en el protocolo AV / IP que involucran la adición de RNAsas previo a la incubación con la posterior fijación

de las células en un monocultivo en 2D [190]. No obstante, para indagar más profundamente acerca de los mecanismos se hace necesario la realización de ensayos moleculares confirmatorios como la activación de la cascada de caspasas, fragmentación del DNA, entre otros.

Los resultados obtenidos en esferoides se correlacionan con lo obtenido para cultivos en 2D y se sustentan en lo revisado en la literatura. En cuanto a los mecanismos de muerte celular, se condicen con lo encontrado por Wang *et al* que reportó que el miR-145 puede activar la vía de señalización apoptótica ROCK1/NF- $\kappa$ B, mediante la inhibición en la expresión de ROCK1 inhibiendo el ciclo celular y llevando a apoptosis [191].

Pocos estudios acerca del rol del miR145 se han llevado a cabo en esferoides tumorales. Mediante la transfección de miR145, se ha observado que, el miR inhibe la formación de esferoides en células de cáncer de próstata, aludiendo a la disminución en la capacidad de auto renovación de las células madre cancerígenas, debido a la inhibición de los marcadores CD133 y CD44, en conjunto con los factores de transcripción relacionados a la pluripotencialidad celular Oct4, c-Myc y Klf4 [192]. Por otra parte, Zhu *et al*, reportó que la transfección con miR145 en células SW620 de cáncer de colon, reducen de forma importante la formación de esferoides, proponiendo como blanco el factor de transcripción SNAI1, con rol crítico en la mantención de la capacidad de las

células madre tumorales [193]. En estos estudios, para evaluar los efectos de la incorporación del miR se han utilizado agentes tradicionales de transfección como lipofectamina, logrando la incorporación y aumento en los niveles intracelulares del miR. Los ensayos de incorporación realizados sobre monocultivos de células A2780, evidencian que existe incorporación celular del miR145, siendo la nanoterapia efectiva en vehiculizar al miR al interior celular. Esto entra en correlación con estudios en donde se evalúa el ingreso de nanopartículas en esferoides tumorales. Tchoryk *et al*, demostró que nanopartículas modificadas con polietilenglicol pueden penetrar esferoides tumorales hasta alcanzar su núcleo, lo cual depende del tamaño y las características fisicoquímicas de las nanopartículas [194]. Huang *et al*, demostró que además de la carga superficial y el tamaño, también afecta la corona de proteínas formada y la dinámica del fluido en la penetración de nanopartículas en esferoides [195]. Por otra parte, Durymanov *et al*, mostró que nanopartículas de 100 nm, las cuales tuvieron la mayor eficacia de captación en monocultivo, pudieron penetrar esferoides tumorales, inclusive luego de inhibir procesos de endocitosis, disminuyendo solo la internalización en la periferia del esferoide, concluyendo que co-existen mecanismos de ingreso como la endocitosis, transcitosis, transporte transcelular, así como mecanismos de difusión [196]. Adicionalmente, Wuang *et al*, reportó la utilización de nanopartículas de sílica mesoporosa para la entrega de un miR y un siRNA en esferoides tumorales,

logrando penetrar y liberar la carga de iRNAs mediante el uso de activación por irradiación con láser para promover el escape endosomal [197].

La estructura tridimensional nativa de los carcinomas establece un sinnúmero de interacciones importantes para el desarrollo del tumor, tal como regulaciones autocrinas, paracrinias, regulación del oxígeno, entre otras, así como la expresión diferencial de moléculas de adhesión, contacto celular y señalización, que pueden modificar el contexto del comportamiento celular. Procesos que no ocurren o pueden ser significativamente distintos en comparación con lo que sucede en monocapas de cultivo celular tradicional. Es así como los resultados alentadores obtenidos utilizando estos modelos, muchas veces no prosperan al ser evaluados en modelos preclínicos. De esta manera, el modelo de esferoides tumorales se presenta como un estrato intermedio de complejidad entre los cultivos bidimensionales y los tumores sólidos *in vivo*.

Los resultados obtenidos en esta tesis se encuentran en línea con lo reportado en la literatura, presentado la nanoterapia como una alternativa viable de evaluar en modelos más complejos, como los modelos preclínicos.

## **Capítulo 4: Conclusiones generales y proyecciones**

## V. CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

Los alcances de la nanotecnología en las aplicaciones biomédicas son cada vez más ambiciosos y a su vez cercanos a un uso real. Desde la utilización de nanosistemas para la detección eficiente y de alta sensibilidad de marcadores moleculares de enfermedades [198, 199] hasta sistemas nanométricos para el transporte eficiente y selectivo de fármacos existentes [200, 201] o de nuevos agentes moleculares terapéuticos innovadores, como el uso de microRNAs como terapia de blancos múltiples.

El desarrollo de dispositivos nanobiotecnológicos para la medicina conlleva el acucioso estudio de sus características fisicoquímicas debido a la compleja y delicada interacción de la materia en la nanoescala. De esta manera, se hace indispensable establecer a cabalidad las características del nanosistema en construcción para conformar adecuadamente su estructura final. El conocimiento adecuado de características como el tamaño, diámetro hidrodinámico, carga superficial, morfología, grado de agregación, propiedades ópticas, permiten modular la manipulación de los nanosistemas hasta lograr la conformación deseada. Es por ello, que en la parte inicial de este trabajo se realizó un estudio acabado de las características fisicoquímicas en cada paso de síntesis del nanosistema en construcción, permitiendo obtener un sistema candidato para ser evaluado en modelos biológicos *in vitro*, el cual contó con un

tamaño idóneo para ingresar a los tumores por la vía sanguínea mediante la utilización del efecto EPR y tener la capacidad de ingreso mediante endocitosis a las células tumorales para descargar su contenido terapéutico.

La nanoterapia, como se le denominó al nanosistema final, se conformó de GNS de 12 nm conjugadas con moléculas de polietilenglicol de 5kDa como agente espaciador y estabilizante, funcionalizadas con el péptido FSH33 y moléculas del microRNA *mimic* miR145. Su conformación final se determinó en 134 nm de diámetro, 2 mV de carga superficial, transportando una concentración de 18 moléculas de miR145 por nanosistema. En estudios previos se describió la utilización de sistemas nanoparticulados para el transporte de siRNAs o miRs [141, 144, 202], así como la utilización de moléculas de direccionamiento bajo diversas estrategias [104, 203], no obstante, no se ha descrito un ensamblaje que involucre al péptido FSH33 como molécula de selectividad celular en conjunto con el miR145 como molécula terapéutica, asociada a nanopartículas de oro bajo la conformación desarrollada en esta tesis.

La evaluación *in vitro* de la nanoterapia como agente terapéutico candidato, permitió conocer las propiedades y efectividad contra modelos de cáncer de ovario en 2D y 3D, dilucidando la capacidad de actuar como agente terapéutico citotóxico o citostático y los mecanismos de acción asociados. Estos resultados permiten auspiciar su posible incorporación en un protocolo estándar

para ensayos preclínicos como tratamiento neoadyuvante o adyuvante concomitante, en conjunto con quimioterapia tradicional con agentes derivados del platino y paclitaxel, tratamientos de base para el cáncer ovárico.

En los estudios realizados en este trabajo, la nanoterapia presentó efectos sobre la viabilidad celular a tiempos mayores que 3 horas, observándolos hasta las 24 horas de incubación. Luego de este periodo, presentó efectos citostáticos hasta las 72 horas. En contraste, el tratamiento celular concomitante con carboplatino/paclitaxel + nanoterapia, resultó en un aumento en el efecto sobre la viabilidad y antiproliferativo a las 48 y 72h, en comparación con la quimioterapia por si sola. Resultados similares fueron obtenidos en el ensayo de recuperación de la herida, en donde se observó que la nanoterapia presentó efectos de disminución en la migración celular, no obstante, al ser incubada concomitantemente con la quimioterapia, el efecto antimigratorio se acrecentó en un 50% respecto de la quimioterapia. Asimismo, se determinó que la nanoterapia y nanoquimioterapia disminuyeron la liberación de VEGF al medio de cultivo y que la reducción en estos niveles se correlacionó con una disminución significativa de la proliferación de células endoteliales. En síntesis, la nanoterapia presentó efectos sobre la viabilidad celular y antiproliferativos, manteniendo un comportamiento citostático en el tiempo. Provocó disminución en la migración celular y liberación de VEGF. En un contexto *in vivo*, estos resultados pueden tener una contribución importante en disminución de la formación de vasos

sanguíneos *de novo* en las cercanías del tumor, siendo de elevada importancia para el cáncer ovárico, que se caracteriza por poseer una gran capacidad angiogénica con presencia de alta irrigación sanguínea. En un entorno en 3D la nanoterapia ejerció efectos sobre la formación de clones tumorales, lo cual es una señal de reducción en la tumorigenicidad, en donde en un contexto *in vivo* se encuentra asociada a células madre oncogénicas. En línea con estos resultados, los efectos sobre esferoides tumorales individuales fueron de reducción del tamaño y área, lo que se correlacionó con disminución en la viabilidad del esferoide, mediante mecanismos como daño en la membrana e inducción de la apoptosis celular.

La terapia concomitante con carboplatino/paclitaxel + nanoterapia sostuvo mejores efectos tanto en monocultivos de células de cáncer ovárico, como en estructuras microtumores en 3D, obteniendo, en ambos modelos, resultados alentadores. Esto hace plausible su uso en conjunto con la quimioterapia de base en una posible evaluación preclínica. En sumatoria con esto, se ha reportado que la transfección del miR145 sensibiliza células de cáncer ovárico al tratamiento con quimioterapéuticos, mediante la inhibición directa de los mensajeros de la quinasa-6 ciclina dependiente (Cdk6) un regulador maestro de la progresión del ciclo celular y Sp1, un factor de transcripción constitutivamente expresado que regula genes requeridos para la supervivencia, crecimiento, diferenciación, desarrollo y progresión tumoral llevando a un arresto del ciclo celular y

acumulación de agentes antineoplásicos [204], por lo que el tratamiento con nanoterapia a largo plazo, podría tener efectos potenciadores, al ser administrada concomitantemente con otros agentes quimioterapéuticos.

Los efectos demostrados en un contexto tridimensional entregan importantes resultados en el sentido de la proyección del uso de la nanoterapia, debido a que el contexto celular y molecular del esferoide es cercano a lo que ocurre en un tumor *in vivo*. Las células tumorales crecidas en un contexto tridimensional presentan similitud histomorfológica con los tumores, presentando propiedades de transporte de masas, gradiente de oxígeno y nutrientes correspondientes a tejidos tumorales *in vivo*. Debido a la presencia de matriz extracelular en 3D, presentan interacciones célula-matriz, célula-célula con auténtica patofisiología y patrones de diferenciación similares a los tumores [205]. Se ha observado que la expresión génica resultante en cultivos en 3D es más cercana a los perfiles de expresión de tumores *in vivo* que aquellos obtenidos en cultivos en 2D, presentando patrones de expresión diferentes para moléculas de adhesión, señalización y crecimiento, entre otras [206, 207]. Además, existe una alta probabilidad que fármacos candidatos pierdan su eficacia en un ambiente patofisiológico en 3D, ya que las células de esferoides tumorales *in vitro* pueden adquirir ciertos tipos de resistencia a la apoptosis inducida por fármacos, que imitan la quimiorresistencia encontrada en tumores sólidos [208]. De esta manera, los resultados obtenidos en este trabajo son

auspiciosos y sientan las bases proseguir de una forma más dirigida, futuros estudios en modelos preclínicos de cáncer de ovario [209].

Los protocolos de tratamiento para pacientes con cáncer de ovario son variados y van en acuerdo con la etapa de evolución de la enfermedad, comorbilidades, rango etario, etc. [210]. No obstante, la cirugía de citorreducción sigue siendo la primera línea de tratamiento, la cual puede ser antecedida por terapia neoadyuvante para disminuir la masa tumoral hasta niveles de aceptabilidad adecuados. La terapia neoadyuvante consta de cisplatino o carboplatino + paclitaxel, en conjunto o no, con terapia dirigida anti-VEGF con el anticuerpo humanizado Bevacizumab. De cara a posibles estudios pre-clínicos para la evaluación *in vivo* de la nanoterapia, de acuerdo a los resultados obtenidos en conjunto con la quimioterapia estándar, es probable que pueda incorporarse en la fase neoadyuvante del tratamiento primario, con el objetivo de evaluar los efectos en la disminución del tamaño de tumores ortotópicos implantados en modelo murino, así como atacar posibles focos metastáticos diseminados en el animal de manera más selectiva. En un protocolo estándar, posterior a la cirugía, es posible la utilización de terapia adyuvante, que sigue básicamente los mismos lineamientos que la terapia primaria, con cambios de acuerdo con la patología del tumor. No obstante, la terapia adyuvante puede ser sistémica o intraperitoneal. Debido a los resultados de la nanoterapia en la inhibición de la formación de clones tumorales, así como su efecto en los

esferoides tumorales, es que se podría proyectar su uso en estas fases del tratamiento en un modelo *in vivo* ortotópico. Una de las características importantes y que reflejan alta malignidad en la enfermedad a la hora del diagnóstico, es la presencia de ascitis en la cavidad peritoneal, lo cual refleja principalmente diseminación peritoneal, siendo concordante con bajo pronóstico de vida [211]. La ascitis metastática está compuesta por fluido peritoneal que contiene una serie de factores solubles y celulares que promueven un microambiente pro-inflamatorio y pro-tumoral. En él se encuentran células metastáticas derivadas de los tumores así como esferoides multicelulares, los cuales son los responsables de colonizar sitios distantes y promover la metástasis tumoral [212]. Es así, que la nanoterapia pudiese ser estudiada en el contexto de protocolos de terapia intraperitoneales *in vivo*, en donde pueda ejercer acción antitumoral directamente sobre los esferoides tumorales circundantes en el líquido ascítico. Del mismo modo, evaluaciones *in vivo* de la administración de nanoterapia adjuvante, concomitante con quimioterapia, de manera intravascular, podría ejercer efectos citostáticos, antiproliferativos y proapoptóticos, tanto en las células tumorales remanentes del tumor primario, como de células tumorales metastáticas distantes, en el caso de una evaluación intravascular luego de citorreducción *in vivo*. Adicionalmente, ciertos protocolos para el tratamiento de cáncer ovárico plantean la utilización de olaparib, niraparib o rucaparib, inhibidores de la *poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP), como terapia neoadjuvante o adjuvante en ciertos casos en que los tumores posean

alteraciones en la vía de reparación por recombinación homóloga. Esto, debido a que la inhibición de PARP puede resultar en muerte celular preferente cuando otro mecanismo de reparación celular se encuentra deficiente, como la recombinación homóloga [213]. En este sentido, se ha reportado que el miR145 participa en la inhibición de PARP mediante la regulación de agentes pro-apoptóticos, como Bax, caspasa 3, caspasa 9 y disminución del anti-apoptótico Bcl-2. Esto, otorgaría efectos potenciadores a la quimioterapia convencional y entraría en línea con este tipo de protocolos de acción.

Los efectos celulares de la nanoterapia se deben a la acción del miR145 como agente terapéutico, el cual es transportado y protegido de manera eficiente y selectiva hacia las células tumorales mediante el nanosistema construido. La multiplicidad de blancos moleculares directos e indirectos que posee el miR145, lo hace un agente terapéutico idóneo para el tratamiento de cáncer, debido a que puede abordar múltiples características tumorales, en comparación con los quimioterapéuticos tradicionales o RNAs silenciadores específicos. Se ha demostrado ampliamente que aumentos en los niveles intracelulares del miR145 promueven la inactivación de diferentes proteínas, enzimas y factores de transcripción de importancia para el desarrollo de características tumorales, como proteínas de las vías de señalización celular involucradas en la proliferación celular [173], glicoproteínas de transmembrana asociadas al crecimiento independiente de anclaje [176], factores de transcripción

relacionados con la migración mediante transición epitelio mesénquima [178], crecimiento [56], angiogénesis [183], resistencia a fármacos [204], etc.

Lo anterior registrado en esta tesis, permiten la aseveración del cumplimiento de la hipótesis planteada al inicio de este trabajo, y entregan la perspectiva de que la nanoterapia es un desarrollo plausible de ser propuesto como terapia dirigida que puede ser administrada concomitantemente con la utilización de esquemas de base como la quimioterapia basada en platino/paclitaxel, pudiendo ser insertada en cualquier etapa del tratamiento. Para esto se hace necesario el estudio de las variables mediante la administración en modelos preclínicos de cáncer ovárico.

Por otra parte, es notoriamente interesante que el nanosistema diseñado para cargar moléculas de miR145 en esta tesis, puede igualmente ser utilizado para transportar otras moléculas de miRs eficientemente hacia células de cáncer ovárico, en el caso del nanosistema GNS-FSH33, así como hacia otros tipos de cáncer mediante la utilización del sistema GNS-FA. De este modo, el uso de estos nanotransportadores puede ser modelado en cuanto a la carga y tipo de molécula terapéutica en su superficie. Debido a las características fisicoquímicas prácticamente idénticas, es también factible el transporte siRNAs, ampliando así, las incipientes propuestas terapéuticas mediante la utilización de iRNAs. Es posible de abordar mediante este nanotransportador, terapias de doble o triple

silenciamiento específico mediante siRNAs que tengan como blancos, mensajeros relacionados a distintas características cancerígenas. Así también, en una conformación más “agresiva”, la incorporación de 2 o 3 moléculas de miRs sobre el nanosistema puede provocar efectos anticancerígenos en múltiples blancos moleculares pudiendo debilitar el fenotipo cancerígeno con mayor probabilidad, e inclusive abriéndose a la posibilidad de incorporar medicina personalizada de acuerdo a análisis moleculares de biopsias tumorales [214, 215].

El estudio de desarrollos nanobiotecnológicos como la nanoterapia, se pronostican como auspiciosos, debido a los prometedores resultados obtenidos en diversos estudios en la literatura, sin embargo, requieren de rigurosos análisis y estudios tanto en la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas, como en los ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo* para asegurar la fármaco-seguridad, lo cual puede ser una piedra de tope para la producción masiva de estas formulaciones. No obstante, la medicina del futuro se encuentra fundamentalmente basada en la direccionalidad del tratamiento y la construcción personalizada en el desarrollo de fármacos, por lo que su obtención contribuye positivamente y abre un camino relevante hacia este objetivo último.

## VI.- REFERENCIAS

1. American\_Cancer\_Society, *Cancer Facts & Figures 2014*. American Cancer Society, 2014: p. 1-72.
2. DEI, M.d.S., *Indicadores Básicos de Salud 2013*, M.d. Salud, Editor. 2013, Gobierno de Chile.
3. Malecki, M., *Frontiers in Suicide Gene Therapy of Cancer*. J Genet Syndr Gene Ther, 2012. **2012**(3).
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
5. Garofalo, M., et al., *EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers*. Nat Med, 2012. **18**(1): p. 74-82.
6. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities*. Cancer Cell, 2014. **25**(3): p. 304-17.
7. Carmeliet, P., *VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer*. Oncology, 2005. **69 Suppl 3**: p. 4-10.
8. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 9-29.
9. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
10. Cuello, M.F., *GES en cáncer de ovario epitelial: un avance sanitario necesario pero no exento de riesgos y dificultades futuras*. Rev chil obstet ginecol, 2013. **78**(3): p. 161-166.
11. Jayson, G.C., et al., *Ovarian cancer*. Lancet, 2014. **384**(9951): p. 1376-88.
12. Prat, J., *Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum*. Int J Gynaecol Obstet, 2014. **124**(1): p. 1-5.
13. Koshiyama, M., N. Matsumura, and I. Konishi, *Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 934261.
14. Hennessy, B.T., R.L. Coleman, and M. Markman, *Ovarian cancer*. Lancet, 2009. **374**(9698): p. 1371-82.
15. Geva, E. and R.B. Jaffe, *Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology*. Fertil Steril, 2000. **74**(3): p. 429-38.
16. Mutch, D.G. and J. Prat, *2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer*. Gynecol Oncol, 2014. **133**(3): p. 401-4.
17. Ferrara, N., et al., *Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries*. Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1881-93.
18. Nakagawara, A., *Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development*. Cancer Lett, 2001. **169**(2): p. 107-14.

19. McGregor, L.M., et al., *Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4540-5.
20. Davidson, B., et al., *Expression levels of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 in effusions and solid tumors of serous ovarian carcinoma patients*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(11): p. 3457-64.
21. Campos, X., et al., *Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2007. **104**(1): p. 168-75.
22. Tapia, V., et al., *Tyrosine kinase A receptor (trkA): a potential marker in epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2011. **121**(1): p. 13-23.
23. Suhl, K.H., et al., *Effect of nerve growth factor and its transforming tyrosine kinase protein and low-affinity nerve growth factor receptors on apoptosis of notochordal cells*. Int Orthop, 2012. **36**(8): p. 1747-53.
24. Nomoto, H., et al., *Intracellular interaction of newly synthesized nerve growth factor and its receptors*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **432**(3): p. 456-9.
25. Urzua, U., et al., *Nerve growth factor stimulates cellular proliferation of human epithelial ovarian cancer*. Horm Metab Res, 2012. **44**(9): p. 656-61.
26. Retamales-Ortega, R., et al., *Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(3).
27. Vo, B.T., et al., *TGF-beta effects on prostate cancer cell migration and invasion are mediated by PGE2 through activation of PI3K/AKT/mTOR pathway*. Endocrinology, 2013. **154**(5): p. 1768-79.
28. Greenhough, A., et al., *The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. Carcinogenesis, 2009. **30**(3): p. 377-86.
29. Chan, T.A., et al., *Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 681-6.
30. Bertagnolli, M.M., et al., *Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas*. N Engl J Med, 2006. **355**(9): p. 873-84.
31. Uddin, S., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer*. Int J Cancer, 2010. **126**(2): p. 382-94.
32. Dissen, G.A., et al., *Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles*. Endocrinology, 2000. **141**(12): p. 4736-50.
33. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
34. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
35. Kim, D.H. and J.J. Rossi, *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(3): p. 173-84.
36. van Rooij, E. and S. Kauppinen, *Development of microRNA therapeutics is coming of age*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(7): p. 851-64.

37. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(3): p. 143-59.
38. Miska, E.A., *How microRNAs control cell division, differentiation and death*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(5): p. 563-8.
39. Jansson, M.D. and A.H. Lund, *MicroRNA and cancer*. Mol Oncol, 2012. **6**(6): p. 590-610.
40. Zhang, B., et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 1-12.
41. Ayaz, L., et al., *Circulating microRNA expression profiles in ovarian cancer*. J Obstet Gynaecol, 2014. **34**(7): p. 620-4.
42. Dong, H., et al., *MicroRNA: function, detection, and bioanalysis*. Chem Rev, 2013. **113**(8): p. 6207-33.
43. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA signatures in human ovarian cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8699-707.
44. Dahiya, N., et al., *MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2436.
45. Gadducci, A., et al., *Micro-RNAs and ovarian cancer: the state of art and perspectives of clinical research*. Gynecol Endocrinol, 2014. **30**(4): p. 266-71.
46. Wang, M., et al., *MiR-145 acts as a metastasis suppressor by targeting metadherin in lung cancer*. Med Oncol, 2015. **32**(1): p. 344.
47. Kent, O.A., et al., *Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway*. Genes Dev, 2010. **24**(24): p. 2754-9.
48. Sachdeva, M. and Y.Y. Mo, *MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 378-87.
49. Zhang, W., et al., *MicroRNA-145 function as a cell growth repressor by directly targeting c-Myc in human ovarian cancer*. Technol Cancer Res Treat, 2014. **13**(2): p. 161-8.
50. Liu, Y., et al., *MicroRNA-145 inhibits cell proliferation by directly targeting ADAM17 in hepatocellular carcinoma*. Oncol Rep, 2014. **32**(5): p. 1923-30.
51. Arribas, J. and C. Esselens, *ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(20): p. 2319-35.
52. Yin, Y., et al., *Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(2): p. 239-47.
53. Harper, K.A. and A.J. Tyson-Capper, *Complexity of COX-2 gene regulation*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 3): p. 543-5.
54. Ikemura, K., et al., *MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(2): p. 399-405.

55. Huang, H., et al., *miR-145 inhibits invasion and metastasis by directly targeting Smad3 in nasopharyngeal cancer*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(6): p. 4123-31.
56. Feng, Y., et al., *MicroRNA-145 inhibits tumour growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fascin-1*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(9): p. 2300-9.
57. Zheng, M., et al., *MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(6): p. 8189-96.
58. Qiu, T., et al., *MiR-145, miR-133a and miR-133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer*. *FEBS Lett*, 2014. **588**(7): p. 1168-77.
59. Shi, L., et al., *miR-145 inhibits migration and invasion of glioma stem cells by targeting ABCG2*. *Neuromolecular Med*, 2014. **16**(2): p. 517-28.
60. Zhang, X. and J. Wu, *Prognostic role of microRNA-145 in prostate cancer: A systems review and meta-analysis*. *Prostate Int*, 2015. **3**(3): p. 71-4.
61. Coleman, R.L., et al., *Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013. **10**(4): p. 211-24.
62. Chang, S.J. and R.E. Bristow, *Evolution of surgical treatment paradigms for advanced-stage ovarian cancer: redefining 'optimal' residual disease*. *Gynecol Oncol*, 2012. **125**(2): p. 483-92.
63. Wang, Y., et al., *Effects of CytoReductive surgery plus hyperthermic IntraPERitoneal chemotherapy (HIPEC) versus CytoReductive surgery for ovarian cancer patients: A systematic review and meta-analysis*. *Eur J Surg Oncol*, 2019. **45**(3): p. 301-309.
64. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. *Eur J Pharmacol*, 2014. **740**: p. 364-78.
65. Holzer, A.K., G.H. Manorek, and S.B. Howell, *Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin*. *Mol Pharmacol*, 2006. **70**(4): p. 1390-4.
66. dos Santos, N.A., et al., *Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats*. *Chem Biol Interact*, 2007. **170**(3): p. 177-86.
67. Ozkok, A. and C.L. Edelstein, *Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 967826.
68. Yu, J., et al., *Oxaliplatin-Based Doublets Versus Cisplatin or Carboplatin-Based Doublets in the First-Line Treatment of Advanced Non-small Cell Lung Cancer*. *Medicine (Baltimore)*, 2015. **94**(27): p. e1072.
69. Atmaca, A., et al., *A randomised multicentre phase II study with cisplatin/docetaxel vs oxaliplatin/docetaxel as first-line therapy in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer*. *Br J Cancer*, 2013. **108**(2): p. 265-70.

70. Barbuti, A.M. and Z.S. Chen, *Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy*. Cancers (Basel), 2015. **7**(4): p. 2360-71.
71. Yamaguchi, H., et al., *Genetic variation in ABCB1 influences paclitaxel pharmacokinetics in Japanese patients with ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2006. **16**(3): p. 979-85.
72. Hopper-Borge, E., et al., *Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel*. Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4927-30.
73. Armstrong, D.K., et al., *Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer*. N Engl J Med, 2006. **354**(1): p. 34-43.
74. Burger, R.A., et al., *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. **365**(26): p. 2473-83.
75. Glasgow, M.A., et al., *Neoadjuvant chemotherapy (NACT) is an effective way of managing elderly women with advanced stage ovarian cancer (FIGO Stage IIIC and IV)*. J Surg Oncol, 2013. **107**(2): p. 195-200.
76. Goff, B.A., *Advanced ovarian cancer: what should be the standard of care?* J Gynecol Oncol, 2013. **24**(1): p. 83-91.
77. Vergote, I., et al., *Overall survival results of AGO-OVAR16: A phase 3 study of maintenance pazopanib versus placebo in women who have not progressed after first-line chemotherapy for advanced ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2019. **155**(2): p. 186-191.
78. Ray-Coquard, I., et al., *Final results from GCG/ENGOT/AGO-OVAR 12, a randomised placebo-controlled phase III trial of nintedanib combined with chemotherapy for newly diagnosed advanced ovarian cancer*. Int J Cancer, 2020. **146**(2): p. 439-448.
79. Ledermann, J.A., et al., *Cediranib in patients with relapsed platinum-sensitive ovarian cancer (ICON6): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. Lancet, 2016. **387**(10023): p. 1066-1074.
80. Monk, B.J., et al., *Final results of a phase 3 study of trebananib plus weekly paclitaxel in recurrent ovarian cancer (TRINOVA-1): Long-term survival, impact of ascites, and progression-free survival-2*. Gynecol Oncol, 2016. **143**(1): p. 27-34.
81. Xiong, X., et al., *Sensitization of ovarian cancer cells to cisplatin by gold nanoparticles*. Oncotarget, 2014. **5**(15): p. 6453-65.
82. Kristen, A.V., et al., *Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis*. Neurodegener Dis Manag, 2019. **9**(1): p. 5-23.
83. Yang, J., *Patisiran for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2019. **12**(2): p. 95-99.
84. Pammolli, F., L. Magazzini, and M. Riccaboni, *The productivity crisis in pharmaceutical R&D*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(6): p. 428-38.
85. Mishra, P.J. and G. Merlino, *MicroRNA reexpression as differentiation therapy in cancer*. J Clin Invest, 2009. **119**(8): p. 2119-23.

86. Hutvagner, G., et al., *Sequence-specific inhibition of small RNA function*. PLoS Biol, 2004. **2**(4): p. E98.
87. Liu, Y.P. and B. Berkhout, *miRNA cassettes in viral vectors: problems and solutions*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1809**(11-12): p. 732-45.
88. Zhu, J., et al., *Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum*. Front Genet, 2014. **5**: p. 149.
89. Liu, C. and N. Zhang, *Nanoparticles in gene therapy principles, prospects, and challenges*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011. **104**: p. 509-62.
90. Ginn, S.L., et al., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update*. J Gene Med, 2013. **15**(2): p. 65-77.
91. Gottesman, M.M., *Cancer gene therapy: an awkward adolescence*. Cancer Gene Ther, 2003. **10**(7): p. 501-8.
92. Robbins, P.D., H. Tahara, and S.C. Ghivizzani, *Viral vectors for gene therapy*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(1): p. 35-40.
93. Davis, M.E., *Non-viral gene delivery systems*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(2): p. 128-31.
94. Wang, A.Z., R. Langer, and O.C. Farokhzad, *Nanoparticle delivery of cancer drugs*. Annu Rev Med, 2012. **63**: p. 185-98.
95. Wang, K., F.M. Kievit, and M. Zhang, *Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies*. Pharmacol Res, 2016. **114**: p. 56-66.
96. Heath, J.R., *Nanotechnologies for biomedical science and translational medicine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(47): p. 14436-43.
97. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*. Cancer Res, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6387-92.
98. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs*. Cancer Research, 1986. **46**(12 Part 1): p. 6387-6392.
99. Peer, D., *Harnessing RNAi nanomedicine for precision therapy*. Mol Cell Ther, 2014. **2**: p. 5.
100. Vera, C., et al., *Role of nerve growth factor and its TRKA receptor in normal ovarian and epithelial ovarian cancer angiogenesis*. J Ovarian Res, 2014. **7**: p. 82.
101. Bogetti, M.E., et al., *NGF, TrkA-P and neuroprotection after a hypoxic event in the developing central nervous system*. Int J Dev Neurosci, 2018. **71**: p. 111-121.
102. Chen, C., et al., *Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors*. Nature, 2013. **500**(7463): p. 486-9.
103. Toffoli, G., et al., *Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers*. Int J Cancer, 1997. **74**(2): p. 193-8.

104. Zwicke, G.L., G.A. Mansoori, and C.J. Jeffery, *Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics*. Nano Rev, 2012. **3**.
105. Parker, N., et al., *Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay*. Anal Biochem, 2005. **338**(2): p. 284-93.
106. Bahrami, B., et al., *Folate-conjugated nanoparticles as a potent therapeutic approach in targeted cancer therapy*. Tumour Biol, 2015.
107. Zhong, Y., et al., *Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy*. Biomacromolecules, 2014. **15**(6): p. 1955-69.
108. Perales-Puchalt, A., et al., *Follicle-Stimulating Hormone Receptor Is Expressed by Most Ovarian Cancer Subtypes and Is a Safe and Effective Immunotherapeutic Target*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(2): p. 441-453.
109. Casarini, L. and P. Crepieux, *Molecular Mechanisms of Action of FSH*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 305.
110. Hong, S., et al., *Targeted gene silencing using a follicle-stimulating hormone peptide-conjugated nanoparticle system improves its specificity and efficacy in ovarian clear cell carcinoma in vitro*. J Ovarian Res, 2013. **6**(1): p. 80.
111. Rai, R., S. Alwani, and I. Badea, *Polymeric Nanoparticles in Gene Therapy: New Avenues of Design and Optimization for Delivery Applications*. Polymers (Basel), 2019. **11**(4).
112. Prabhu, R.H., V.B. Patravale, and M.D. Joshi, *Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 1001-18.
113. Kataoka, K., A. Harada, and Y. Nagasaki, *Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **47**(1): p. 113-31.
114. Christian, D.A., et al., *Polymersome carriers: from self-assembly to siRNA and protein therapeutics*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **71**(3): p. 463-74.
115. Discher, B.M., et al., *Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers*. Science, 1999. **284**(5417): p. 1143-6.
116. Peppas, N.A., et al., *Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology*. Annu Rev Biomed Eng, 2000. **2**: p. 9-29.
117. Prades, R., et al., *Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor*. Biomaterials, 2012. **33**(29): p. 7194-205.
118. Lasagna-Reeves, C., et al., *Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(4): p. 649-55.
119. Cobley, C.M., et al., *Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(1): p. 44-56.

120. Jain, S., D.G. Hirst, and J.M. O'Sullivan, *Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy*. Br J Radiol, 2012. **85**(1010): p. 101-13.
121. Frens, G., *Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions*. Nature, 1973. **241**: p. 20-22.
122. Rana, S., et al., *Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(2): p. 200-16.
123. Ghosh, R., et al., *A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells*. Biomaterials, 2013. **34**(3): p. 807-16.
124. Conde, J., G. Doria, and P. Baptista, *Noble metal nanoparticles applications in cancer*. J Drug Deliv, 2012. **2012**: p. 751075.
125. Riveros, A., et al., *Gold Nanoparticle-membrane Interaction: Implication in Biomedicine*. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, 2013. **3**: p. 18.
126. Langston Suen, W.L. and Y. Chau, *Size-dependent internalisation of folate-decorated nanoparticles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis in ARPE-19 cells*. J Pharm Pharmacol, 2014. **66**(4): p. 564-73.
127. Lee, S.H., et al., *Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers*. Int J Pharm, 2008. **364**(1): p. 94-101.
128. Levy, R., et al., *Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(32): p. 10076-84.
129. He, Y.Q., et al., *A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2005. **61**(13-14): p. 2861-6.
130. Amendola, V. and M. Meneghetti, *Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(11): p. 4277-4285.
131. Haiss, W., et al., *Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra*. Anal Chem, 2007. **79**(11): p. 4215-21.
132. Carvalho, P.M., et al., *Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development*. Front Chem, 2018. **6**: p. 237.
133. Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*. Discussions of the Faraday Society, 1951. **11**(0): p. 55-75.
134. Kimling, J., et al., *Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited*. J Phys Chem B, 2006. **110**(32): p. 15700-7.
135. Uz, M., V. Bulmus, and S. Alsoy Altinkaya, *Effect of PEG Grafting Density and Hydrodynamic Volume on Gold Nanoparticle-Cell Interactions: An Investigation on Cell Cycle, Apoptosis, and DNA Damage*. Langmuir, 2016. **32**(23): p. 5997-6009.

136. Greish, K., *Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting*. *Methods Mol Biol*, 2010. **624**: p. 25-37.
137. Rejman, J., et al., *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 1): p. 159-69.
138. Guo, J., et al., *Therapeutic targeting in the silent era: advances in non-viral siRNA delivery*. *Mol Biosyst*, 2010. **6**(7): p. 1143-61.
139. Paul, A.M., et al., *Delivery of antiviral small interfering RNA with gold nanoparticles inhibits dengue virus infection in vitro*. *J Gen Virol*, 2014. **95**(Pt 8): p. 1712-1722.
140. Ma, L., et al., *Cy5 labeled single-stranded DNA-polydopamine nanoparticle conjugate-based FRET assay for reactive oxygen species detection*. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2015. **3**: p. 92-97.
141. Guo, S., et al., *Enhanced gene delivery and siRNA silencing by gold nanoparticles coated with charge-reversal polyelectrolyte*. *ACS Nano*, 2010. **4**(9): p. 5505-11.
142. Nishio, H., et al., *MicroRNA-145-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles attenuate venous intimal hyperplasia in a rabbit model*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2019. **157**(6): p. 2242-2251.
143. Epanchintseva, A.V., et al., *Long-term stability and scale-up of noncovalently bound gold nanoparticle-siRNA suspensions*. *Beilstein J Nanotechnol*, 2019. **10**: p. 2568-2578.
144. Crew, E., et al., *MicroRNA conjugated gold nanoparticles and cell transfection*. *Anal Chem*, 2012. **84**(1): p. 26-9.
145. Gu, L.Q., et al., *Detection of miRNAs with a nanopore single-molecule counter*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012. **12**(6): p. 573-84.
146. Hoo, C.M., et al., *A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2008. **10**(1): p. 89-96.
147. Connor, E.E., et al., *Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity*. *Small*, 2005. **1**(3): p. 325-7.
148. Shukla, R., et al., *Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview*. *Langmuir*, 2005. **21**(23): p. 10644-54.
149. Villiers, C., et al., *Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions*. *J Nanopart Res*, 2010. **12**(1): p. 55-60.
150. Alkilany, A.M. and C.J. Murphy, *Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?* *J Nanopart Res*, 2010. **12**(7): p. 2313-2333.
151. Soenen, S.J., et al., *The Cellular Interactions of PEGylated Gold Nanoparticles: Effect of PEGylation on Cellular Uptake and Cytotoxicity*. *Particle & Particle Systems Characterization*, 2014. **31**(7): p. 794-800.

152. Calienni, M.N., et al., *Comparative toxicity of PEG and folate-derived blue-emitting silicon nanoparticles: in vitro and in vivo studies*. *Nanomedicine (Lond)*, 2019. **14**(4): p. 375-385.
153. Hong, S.S., et al., *Follicle-stimulating hormone peptide-conjugated nanoparticles for targeted shRNA delivery lead to effective gro-alpha silencing and antitumor activity against ovarian cancer*. *Drug Deliv*, 2018. **25**(1): p. 576-584.
154. Fan, L., et al., *Follicle-stimulating hormone polypeptide modified nanoparticle drug delivery system in the treatment of lymphatic metastasis during ovarian carcinoma therapy*. *Gynecol Oncol*, 2014. **135**(1): p. 125-32.
155. Zhang, X., et al., *Targeted paclitaxel nanoparticles modified with follicle-stimulating hormone beta 81-95 peptide show effective antitumor activity against ovarian carcinoma*. *Int J Pharm*, 2013. **453**(2): p. 498-505.
156. Wen, Y., et al., *Immunotherapy targeting folate receptor induces cell death associated with autophagy in ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(2): p. 448-59.
157. Hou, Z., et al., *Dual Targeting of Epithelial Ovarian Cancer Via Folate Receptor alpha and the Proton-Coupled Folate Transporter with 6-Substituted Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine Antifolates*. *Mol Cancer Ther*, 2017. **16**(5): p. 819-830.
158. Ivosev, V., et al., *Uptake and excretion dynamics of gold nanoparticles in cancer cells and fibroblasts*. *Nanotechnology*, 2020. **31**(13): p. 135102.
159. Sancho-Albero, M., et al., *Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells*. *J Nanobiotechnology*, 2019. **17**(1): p. 16.
160. Sayers, N. and A.C. Hanyaloglu, *Intracellular Follicle-Stimulating Hormone Receptor Trafficking and Signaling*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 653.
161. Marzi, M.J., et al., *Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach*. *Genome Res*, 2016. **26**(4): p. 554-65.
162. Ramachandran, V. and X. Chen, *Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis*. *Science*, 2008. **321**(5895): p. 1490-2.
163. Baccarini, A., et al., *Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells*. *Curr Biol*, 2011. **21**(5): p. 369-76.
164. de la Mata, M., et al., *Potent degradation of neuronal miRNAs induced by highly complementary targets*. *EMBO Rep*, 2015. **16**(4): p. 500-11.
165. De, N., et al., *Highly complementary target RNAs promote release of guide RNAs from human Argonaute2*. *Mol Cell*, 2013. **50**(3): p. 344-55.
166. Djearmane, S., et al., *Cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on cyanobacterium Spirulina (Arthrospira) platensis*. *PeerJ*, 2018. **6**: p. e4682.
167. Coccini, T., et al., *Assessment of cellular responses after short- and long-term exposure to silver nanoparticles in human neuroblastoma (SH-SY5Y)*

- and astrocytoma (D384) cells. ScientificWorldJournal, 2014. 2014: p. 259765.*
168. Gunduz, N., et al., *Intracellular Accumulation of Gold Nanoparticles Leads to Inhibition of Macropinocytosis to Reduce the Endoplasmic Reticulum Stress. Sci Rep, 2017. 7: p. 40493.*
  169. Shin, S.W., I.H. Song, and S.H. Um, *Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. Nanomaterials (Basel), 2015. 5(3): p. 1351-1365.*
  170. Wang, P., S.M. Henning, and D. Heber, *Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. PLoS One, 2010. 5(4): p. e10202.*
  171. Ong, K.J., et al., *Widespread nanoparticle-assay interference: implications for nanotoxicity testing. PLoS One, 2014. 9(3): p. e90650.*
  172. Cai, G., et al., *MicroRNA-145 Negatively Regulates Cell Proliferation Through Targeting IRS1 in Isolated Ovarian Granulosa Cells From Patients With Polycystic Ovary Syndrome. Reprod Sci, 2017. 24(6): p. 902-910.*
  173. Liu, S., et al., *Effects of miR-145-5p through NRAS on the cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion in melanoma by inhibiting MAPK and PI3K/AKT pathways. Cancer Med, 2017. 6(4): p. 819-833.*
  174. Kim, K.W., et al., *Overexpression of microRNA-145 inhibits tumorigenesis through autophagy in chemotherapy and radiation resistant neuroblastoma cells. Oncoscience, 2020. 7(1-2): p. 1-9.*
  175. Setua, S., et al., *Restitution of Tumor Suppressor MicroRNA-145 Using Magnetic Nanoformulation for Pancreatic Cancer Therapy. J Gastrointest Surg, 2017. 21(1): p. 94-105.*
  176. Chauhan, S.C., et al., *MUC13 mucin augments pancreatic tumorigenesis. Mol Cancer Ther, 2012. 11(1): p. 24-33.*
  177. Adcock AF, T.G., Edmondson R, Spearman C, Yang L, *Three-Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for in-vitro Evaluation of Anticancer Drugs*  
J Anal Bioanal Tech 6: 247, 2015.
  178. Cioce, M., et al., *Protumorigenic effects of mir-145 loss in malignant pleural mesothelioma. Oncogene, 2014. 33(46): p. 5319-31.*
  179. Hua, F., et al., *Long Noncoding RNA CCAT2 Knockdown Suppresses Tumorous Progression by Sponging miR-424 in Epithelial Ovarian Cancer. Oncol Res, 2018. 26(2): p. 241-247.*
  180. Zeinali, T., et al., *Regulatory mechanisms of miR-145 expression and the importance of its function in cancer metastasis. Biomed Pharmacother, 2019. 109: p. 195-207.*
  181. Hua, M., et al., *miR145 suppresses ovarian cancer progression via modulation of cell growth and invasion by targeting CCND2 and E2F3. Mol Med Rep, 2019. 19(5): p. 3575-3583.*
  182. Shi, B., et al., *Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. J Biol Chem, 2007. 282(45): p. 32582-90.*

183. Jiang, Z.Y., et al., *Characterization of multiple signaling pathways of insulin in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in vascular cells and angiogenesis*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 31964-71.
184. Xu, Q., et al., *MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(2): p. 761-74.
185. Fan, L., et al., *MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012. **44**(5): p. 407-14.
186. Zou, C., et al., *MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF*. Cell Cycle, 2012. **11**(11): p. 2137-45.
187. Costa, E.C., et al., *Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models*. Biotechnol Bioeng, 2014. **111**(8): p. 1672-85.
188. Rieger, A.M., et al., *Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death*. J Immunol Methods, 2010. **358**(1-2): p. 81-92.
189. Span, L.F., et al., *The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique*. Cytometry, 2002. **47**(1): p. 24-31.
190. Rieger, A.M., et al., *Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death*. J Vis Exp, 2011(50).
191. Wang, R.K., et al., *MicroRNA-145 inhibits proliferation and promotes apoptosis of HepG2 cells by targeting ROCK1 through the ROCK1/NF-kappaB signaling pathway*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019. **23**(7): p. 2777-2785.
192. Huang, S., et al., *miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells*. Oncol Rep, 2012. **28**(5): p. 1831-7.
193. Zhu, Y., et al., *miR-145 Antagonizes SNAI1-Mediated Stemness and Radiation Resistance in Colorectal Cancer*. Mol Ther, 2018. **26**(3): p. 744-754.
194. Tchoryk, A., et al., *Penetration and Uptake of Nanoparticles in 3D Tumor Spheroids*. Bioconjug Chem, 2019. **30**(5): p. 1371-1384.
195. Huang, K., et al., *Nanoparticles Penetrate into the Multicellular Spheroid-on-Chip: Effect of Surface Charge, Protein Corona, and Exterior Flow*. Mol Pharm, 2017. **14**(12): p. 4618-4627.
196. Durymanov, M., et al., *Role of Endocytosis in Nanoparticle Penetration of 3D Pancreatic Cancer Spheroids*. Mol Pharm, 2019. **16**(3): p. 1074-1082.
197. Wang, Y., et al., *Endosomolytic and Tumor-Penetrating Mesoporous Silica Nanoparticles for siRNA/miRNA Combination Cancer Therapy*. ACS Appl Mater Interfaces, 2020. **12**(4): p. 4308-4322.
198. Spain, E., et al., *High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalised polyaniline nanofibres*. Biosens Bioelectron, 2011. **26**(5): p. 2613-8.

199. Pallares, R.M., N.T.K. Thanh, and X. Su, *Sensing of circulating cancer biomarkers with metal nanoparticles*. *Nanoscale*, 2019. **11**(46): p. 22152-22171.
200. Rizvi, S.A.A. and A.M. Saleh, *Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology*. *Saudi Pharm J*, 2018. **26**(1): p. 64-70.
201. Belushkin, A., F. Yesilkoy, and H. Altug, *Nanoparticle-Enhanced Plasmonic Biosensor for Digital Biomarker Detection in a Microarray*. *ACS Nano*, 2018. **12**(5): p. 4453-4461.
202. Shaat, H., et al., *Modified gold nanoparticles for intracellular delivery of anti-liver cancer siRNA*. *Int J Pharm*, 2016. **504**(1-2): p. 125-33.
203. Friedman, A.D., S.E. Claypool, and R. Liu, *The smart targeting of nanoparticles*. *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(35): p. 6315-29.
204. Zhu, X., et al., *miR-145 sensitizes ovarian cancer cells to paclitaxel by targeting Sp1 and Cdk6*. *Int J Cancer*, 2014. **135**(6): p. 1286-96.
205. Carlsson, J. and H. Acker, *Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids*. *Int J Cancer*, 1988. **42**(5): p. 715-20.
206. Friedrich, J., et al., *Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(3): p. 309-24.
207. Poland, J., et al., *Comparison of protein expression profiles between monolayer and spheroid cell culture of HT-29 cells revealed fragmentation of CK18 in three-dimensional cell culture*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(7-8): p. 1174-84.
208. Durand, R.E. and P.L. Olive, *Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumors and spheroids*. *Methods Cell Biol*, 2001. **64**: p. 211-33.
209. Kunz-Schughart, L.A., *Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor*. *Cell Biol Int*, 1999. **23**(3): p. 157-61.
210. Colombo, N., et al., *ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease*. *Int J Gynecol Cancer*, 2019.
211. Ahmed, N. and K.L. Stenvers, *Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 256.
212. Carmignani, C.P., et al., *Intraperitoneal cancer dissemination: mechanisms of the patterns of spread*. *Cancer Metastasis Rev*, 2003. **22**(4): p. 465-72.
213. O'Cearbhaill, R.E., *Using PARP Inhibitors in Advanced Ovarian Cancer*. *Oncology (Williston Park)*, 2018. **32**(7): p. 339-43.
214. Saarenheimo, J., et al., *The Value of Liquid Biopsies for Guiding Therapy Decisions in Non-small Cell Lung Cancer*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 129.
215. Gambardella, V., et al., *Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(4).