

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN *wt1* POR MEDIO DE UN shRNAi
ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS ESTÉRICOS DIRIGIDOS CON
TRANSFERRINA EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO”

POR

MC. SANTIAGO SAAVEDRA ALONSO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

FEBRERO, 2017

“EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN *wt1* POR MEDIO DE UN shRNAi
ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS ESTÉRICOS DIRIGIDOS CON
TRANSFERRINA EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO”

Comité de tesis

Director de tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Vocal 1

Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal 2

Dr. Moisés Armides Franco Molina

Vocal 3

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, le agradezco tanto a Dios por tanta paciencia, amor y cuidados hacia mi persona y mi familia. Le agradezco por esta oportunidad de desenvolverme profesionalmente y que, además, se ha encargado de hacerme crecer internamente, sin embargo, aun sigo pensando que aun me falta mucho por aprender.

Le agradezco también a mi esposa, ya que ha sido mi apoyo, y literalmente ha estado conmigo en las buenas y en las malas. Muchas gracias Karina por darme tu apoyo a pesar de todo lo que hemos pasado, gracias por tu paciencia en los momentos difíciles, gracias por darme ese empuje a ir por mas cosas y por ser alguien quien ve siempre algo bueno en mi, te amo mucho y espero servirte igual de apoyo, así como tú lo eres conmigo. Agradezco por las enseñanzas de vida que me han dado mis hijas Sarita y Kenya, gracias por su amor y que a pesar de todo siempre tienen una sonrisa que regalarme, eso para mí vale oro.

Les agradezco a mis padres el Sr. Santiago Saavedra y la Sra. Graciela Alonso quienes me han brindado su apoyo, y la verdad no tengo palabras para explicar lo que han sembrado en mi persona, ya que son esas las herramientas que me han sacado adelante, gracias por darme ese empuje y creer en mí. A mi abuela Juanita quien siempre se preocupó porque no me faltara nada y eres para mí, un ejemplo vivo de dar más por los demás que por uno mismo, muchas gracias abuela.

Dra. Cristina Rodríguez que no tengo palabras para agradecerle, muchas gracias por su apoyo tanto en lo profesional, así como sus consejos. Gracias por ser un ejemplo de profesionalismo y en verdad tengo mucho que aprenderle.

Otra persona que ha sido parte clave en mi desarrollo es el Dr. Pablo Zapata. Muchas gracias por su apoyo brindado en todos los aspectos, en verdad, lo veo como un ejemplo a seguir y quisiera en un futuro llegar a ser igual o como usted dice “el alumno tiene que superar al maestro”, (dicho de una manera humilde y con respeto), siempre ha estado cuando mas he necesitado, y eso nunca se me olvidará, muchas gracias Dr Pablo.

Manilla canijo muchas gracias por tu apoyo y tu cariño mostrado a mí y mi familia, gracias por ser una persona dispuesta siempre ayudar.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Ashanti, Daniela, Fernanda, Ramiro, Evelyn, Efraín, Juan, Felipe, Adriana, Karla, Erika, Jarys, Baldomero, José Luis, al Dr. Alberto V. y todos aquellos que se me olvida mencionar pero que de alguna u otra manera me han brindado su apoyo desinteresadamente, muchas gracias.

Gracias a CONACYT por su apoyo en la beca de manutención durante el doctorado. Gracias al Laboratorio e Inmunología y Virología por brindarme las instalaciones, equipo y materiales para poder desarrollar este trabajo y muy atentamente a su personal, quienes hacen que este laboratorio siga adelante ya que termina siendo tu segundo hogar.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi esposa que con tanto amor me ha apoyado y a mis hijas Sara Mayte y Kenya Isabella quienes hacen que todo tenga un sentido.

Índice general

<i>Contenido</i>	<i>Pág.</i>
<i>CONTRAPORTADA</i>	<i>I</i>
<i>COMITE DE TESIS</i>	<i>II</i>
<i>ÁREA DE TRABAJO</i>	<i>III</i>
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>IV</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>VI</i>
<i>INDICE GENERAL</i>	<i>VII</i>
<i>INDICE DE TABLAS</i>	<i>XI</i>
<i>INDICE DE FIGURAS</i>	<i>XII</i>
<i>LISTA DE SÍMBOLOS Y</i>	
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>XIV</i>
<i>RESUMEN EN</i>	
<i>ESPAÑOL</i>	<i>XVII</i>
<i>RESUMEN EN INGLES</i>	<i>XIX</i>
<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
<i>2. ANTECEDENTES</i>	<i>3</i>
<i>2.1 Epidemiología del cáncer</i>	<i>3</i>
<i>2.2 Melanoma</i>	<i>4</i>
<i>2.3 Melanoma en México</i>	<i>6</i>
<i>2.4 Clasificación de melanoma</i>	<i>7</i>
<i>2.5 Factores de riesgo</i>	<i>10</i>
<i>2.5.1 Radiación solar</i>	<i>10</i>
<i>2.5.2 Exposición a radiación UV artificial</i>	<i>10</i>
<i>2.5.3 Factores de riesgo genéticos</i>	<i>10</i>
<i>2.6 Diagnóstico</i>	<i>11</i>
<i>2.7 Tratamientos para melanoma</i>	<i>12</i>
<i>2.7.1 Cirugía</i>	<i>13</i>
<i>2.7.2 Inmunoterapia</i>	<i>14</i>
<i>2.7.3 Quimioterapia</i>	<i>16</i>

2.8	<i>Marcadores tumorales</i>	17
2.9	<i>El gen wt1</i>	18
	2.9.1 <i>Propiedades biológicas de las</i>	
	<i>isoformas de wt1</i>	20
	2.9.2 <i>WT1 en cáncer</i>	21
2.10	<i>Terapias en desarrollo</i>	23
	2.10.1 <i>Terapia génica</i>	23
2.11	<i>RNA interferencia</i>	24
	2.11.1 <i>RNAi terapéutico</i>	25
2.12	<i>Entrega de material genético</i>	28
2.13	<i>Ligandos empleados en terapias dirigidas</i> ...	32
2.14	<i>Receptor de la transferrina (CD71)</i>	32
2.15	<i>Vía de internalización del receptor de la</i>	
	<i>transferrina</i>	36
2.16	<i>Conjugación de la transferrina con proteínas</i>	
	<i>tóxicas</i>	39
2.17	<i>Aplicación de transferrina en terapia génica.</i>	39
2.18	<i>Liposomas anclados a Tf o anticuerpos de</i>	
	<i>reconocimiento al TfR</i>	43
3.	<i>JUSTIFICACIÓN</i>	45
4.	<i>HIPOTESIS</i>	46
5.	<i>OBJETIVO</i>	
	<i>GENERAL</i>	47
	5.1 <i>OBJETIVOS</i>	
	<i>PARTICULARES</i>	47
6.	<i>MATERIAL Y</i>	48
	<i>METODO</i>	
	6.1 <i>Diseño experimental</i>	49
	6.2 <i>Cultivo celular</i>	50
	6.3 <i>Viabilidad celular determinada por la técnica</i>	
	<i>de MTT</i>	50

6.4 Western blot.....	51
6.5 Citometría de flujo.....	52
6.6 Extracción de RNA total y síntesis de cadena de DNA complementaria.....	52
6.7 Reacción de PCR cuantitativo.....	53
6.8 Estructura del vector	54
6.9 Secuencia codificante para el RNA de interferencia.....	54
6.10 Preparación de liposomas.....	55
6.11 Modelo de melanoma murino	56
6.12 <i>Á</i> lisis estadístico.....	56
7. RESULTADOS	57
<i>Ensayos “in vitro”</i>	
7.1 Tamaño e índice de dispersión del complejo <i>Lip+RNAi+Tf</i>	57
7.2 Expresión de <i>wT1</i> y del receptor de la transferrina en la línea celular B16F10.....	59
7.3 Efecto del complejo <i>Lip+RNAi+Tf</i> en células de melanoma murino B16F10.....	60
<i>Ensayos “in vivo”</i>	
7.4 Evaluación del peso general de los grupos de ratones tratados con el complejo <i>Lip+RNAi+Tf</i> ...	62
7.5 Evaluación del volumen tumoral de los grupos de ratones tratados con el complejo <i>Lip+RNAi+Tf</i>	63
7.6 Evaluación del peso tumoral de los grupos de ratones tratados con el complejo <i>Lip+RNAi+Tf</i> ...	64
7.7 Sobrevida de los ratones tratados con el complejo <i>Lip+RNAi+Tf</i>	65
7.7.1 Imágenes de los ratones con tumor y tumores colectados de los grupos en tratamiento.....	66

	<i>7.8 Determinación de la expresión del gen wt1</i>	<i>68</i>
<i>8. DISCUSIÓN</i>	<i>.....</i>	<i>69</i>
<i>9. CONCLUSIÓN</i>	<i>.....</i>	<i>74</i>
<i>10. PERSPECTIVAS</i>	<i>.....</i>	<i>75</i>
<i>11. BIBLIOGRAFIA</i>	<i>.....</i>	<i>76</i>
	<i>11.1 Bibliografía electronica.....</i>	<i>95</i>
<i>12. AUTOBIOGRAFÍA</i>	<i>.....</i>	<i>96</i>
<i>ANEXOS</i>	<i>.....</i>	<i>97</i>

Índice de tablas

<i>Número de tabla</i>	<i>Pág.</i>
<i>Tabla 1. Supervivencia estimada a 5 y 10 años en pacientes con melanoma...</i>	6
<i>Tabla 2. Clasificación de Clark para melanoma.....</i>	8
<i>Tabla 3. Propiedades de la proteína WT1 en la regulación génica.....</i>	20
<i>Tabla 4. Elementos del vector</i>	54
<i>Tabla 5. Características de los reactivos empleados en la formulación del liposoma.....</i>	57

Índice de figuras

<i>Número de figura</i>	<i>Pág.</i>
<i>Figura 1. Los 10 más comunes tipos de cáncer diagnosticados</i>	3
<i>Figura 2. Los 10 más comunes tipos de cáncer que causan muerte.....</i>	4
<i>Figura 3. Diagrama de la estructura de la piel</i>	5
<i>Figura 4. Esquema de clasificación de melanoma invasivo.....</i>	8
<i>Figura 5. Estructura del gen wt1</i>	19
<i>Figura 6. Esquema del proceso de silenciamiento por RNA interferencia.....</i>	25
<i>Figura 7. Clasificación de Nano partículas y otros acarreadores de drogas...</i>	29
<i>Figura 8. Estructura de los dominios del receptor de la transferrina.....</i>	33
<i>Figura 9. Esquema de la vía de internalización celular del receptor de la transferrina.....</i>	36
<i>Figura 10. Estrategias de internalización vía receptor de la transferrina</i>	37
<i>Figura 11. Producción de liposomas por medio de la técnica de congelación-descongelación.....</i>	48
<i>Figura 12. Diagrama experimental de los ensayos “in vitro” e “in vivo”</i>	49
<i>Figura 13. Estructura del vector</i>	54
<i>Figura 14. Secuencia de inserción</i>	54
<i>Figura 15. Distribución del tamaño y homogeneidad del complejo Liposomal.</i>	58
<i>Figura 16. Expresión de las proteínas wt1 y receptor de la transferrina en la línea celular B16F10.....</i>	59
<i>Figura 17. Expresión de GFP en células de melanoma murino B16F10.....</i>	61
<i>Figura 18. Análisis de viabilidad de las células de B16F10 tratadas con el complejo Lip+RNAi+Tf.....</i>	61
<i>Figura 19. Análisis del peso general de los grupos de ratones</i>	62
<i>Figura 20. Análisis del volumen tumoral de los grupos de ratones en tratamiento.....</i>	63
<i>Figura 21. Análisis del peso del tumor de los grupos de ratones en tratamiento.....</i>	64
<i>Figura 22. Porcentajes de supervivencia Kaplan-Meier de los grupos de ratones sin tratamiento, Lip+RNAi+Tf, Lip+RNAi y Lip+GFP+Tf</i>	65

<i>Figura 23. Imágenes del grupo de ratones sin tratamiento</i>	66
<i>Figura 24. Imágenes del grupo de ratones Lip+RNAi+Tf</i>	66
<i>Figura 25. Imágenes del grupo de ratones Lip+RNAi</i>	67
<i>Figura 26. Imágenes del grupo de ratones Lip+GFP+Tf</i>	67
<i>Figura 27. Análisis de la expresión relativa de wt1 en muestras de tejido tumoral de los grupos analizados en el ensayo “in vivo”</i>	68

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos y/o Abreviaturas	Definición
<i>wt1</i>	Gen del Tumor de Wilm's
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
%	Porcentaje
SFB	Suero fetal bovino
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
TfR	Receptor de la transferrina o CD 71
UV	Ultravioleta
Cm	Centímetro
Mm	Milímetro
Nm	Nanómetro
µm	Micrómetro
µL	Microlitro
DE	Desviación estándar
BAP1	Proteína 1 asociada a BRCA
MC1R	Gen receptor de melanocortina
<i>CDK4</i>	Cinasa 4 dependiente de ciclina
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
IL2	Interleucina 2
NK	Células natural killer.
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
FDA	Food and Drug Administration
Her2/neu	Receptor del factor del crecimiento epidermal 2
EGFR	Receptor del factor del crecimiento epidermal
ER	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de la progesterona

Kb	Kilobases
KDa	Kilo daltones
Pb	Pares de bases
IGFR	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina II
PDGF	Factor del crecimiento derivado de plaqueta
TGF	Factor transformante de crecimiento
RAR	Receptor del ácido retinoico
CSF	Factor estimulante de colonias
IL7	Interleucina 7
RNAi	RNA de interferencia
nt	Nucleótidos
RISC	RNA-induced silencing complex (complejo de silenciamiento inducido por RNA)
RB	Retinoblastoma
FC	Fragmento cristalizabile
IgG	Inmunoglobulina G
IgA	Inmunoglobulina A
HPV	Virus del papiloma humano
DT	Toxina diftérica
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
HIF1 α	Factor de inducción de hipoxia uno alfa
shRNA	RNA de simple horquilla
RES	Sistema reticuloendotelial
scFv	Fracciones variables de cadena simple
mM	Milimolar
DNAc	DNA complementario
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CMV	Citomegalovirus
GFP	Proteína verde fluorescente
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine

DDAB	Bromuro de dimetil-dioctadecil-amonio		
DSPE-PEG2000	Diasteroil-glicerol-fosfatidil-etanolamina polietilenglicol 2000	anclado	a
DSPE-PEG2000-MAL	Diasteroil-glicerol-fosfatidil-etanolamina polietilenglicol 2000 maleimide	anclado	a
FITC	Fluoresceína		

RESUMEN

El melanoma es un tipo de neoplasia que presenta un incremento en la incidencia en comparación a otros tipos de cáncer. A la fecha se han desarrollado diversos tratamientos que van desde quimioterapia hasta inmunoterapia, presentando la tendencia a ser personalizados. Estudios recientes, han demostrado que *wt1* es un buen blanco terapéutico para atacar el cáncer, además, el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos, lo ubicó como antígeno ideal de tumor. WT1 es altamente expresado en células tumorales, como melanoma. La terapia con RNA de interferencia, ha tomado gran auge en últimos años, sin embargo, la selectividad celular es una de sus principales limitantes en la administración de tratamientos sistémicos. Estudios recientes han demostrado una mejora en la dirección de tratamientos antitumorales cuando estos son acompañados con transferrina, ya que selectivamente estos complejos se dirigen a las células tumorales las cuales presentan una alta expresión del receptor de la transferrina. Por ello, en este trabajo, realizamos la evaluación de un complejo conformado con liposomas estéricos guiados por transferrina y conteniendo en su interior un plásmido codificante para un RNAi dirigido en contra de *wt1*. Su análisis “*in vitro*”, mostró tener baja eficiencia de transfección a células de melanoma murino B16F10, el cual fue debido al uso de fosfolípidos pegilados. Posteriormente se llevo a evaluación en un modelo “*in vivo*” inoculando células tumorales vía subcutánea en ratones C57BL/6 y aplicando los tratamientos vía intravenosa. En los resultados se muestra un incremento en el peso corporal de los ratones de $34\% \pm 24.92\%$ para el grupo sin tratamiento y de $41\% \pm 12.78$ para el grupo Lip+RNAi+Tf; para los grupos de Lip+RNAi y Lip+GFP+Tf se observaron incrementos de $1.5\% \pm 12.97$ y $10\% \pm 6.87$ respectivamente, sin observarse diferencia significativa entre grupos analizados. Estos dos últimos grupos, no presentaron ratones sobrevivientes al día 30 en que finalizó en ensayo. En el análisis del volumen tumoral, se observó una disminución en el promedio del volumen tumoral de $5981\text{ mm}^3 \pm 2099$ para el grupo Lip+RNAi+Tf, en comparación al grupo sin tratamiento que presentó un volumen promedio de $7871\text{ mm}^3 \pm 2087$. En el análisis del peso final del tumor, se observó una reducción de $5.5\text{ g} \pm 0.87$ de peso

para el grupo Lip+RNAi+Tf en comparación a $8.8 \text{ g} \pm 0.30$ para el grupo sin tratamiento. En el análisis de supervivencia, se observó un incremento en los porcentajes de supervivencia el cual corresponde a los valores de 62 % para el grupo Lip+RNAi+Tf en comparación al 22 % del grupo sin tratamiento. Finalmente, en un análisis de expresión relativa de *wt1*, se observó una disminución en la expresión de *wt1*, al cual le corresponden los valores de 0.2145 ± 0.2867 para el grupo Lip+RNAi+Tf y $1,809 \pm 2.4937$ para el grupo sin tratamiento. Con estos resultados, se demostró que la aplicación vía sistémica del complejo Lip+RNAi+Tf puede atacar células tumorales de manera sistémica.

ABSTRACT

Melanoma is a tumor type which has an increased incidence compared to other cancers. To date, several treatments have been developed as chemotherapy and immunotherapy, presenting a tendency to be customized. Recent studies have shown that WT1 is a good therapeutic target and in addition, the National Cancer Institute, ranked it as the ideal tumor antigen. WT1 is highly expressed in tumor cells such as melanoma. Therapy RNA interference, has prospered in recent years, however, one of its main limitations are the cell selectivity and transportation via systemic. The transferrin protein is a major in the direction of systemically administered treatments because it tends to prefer to cells with high expression of the transferrin receptor, in which is highly expressed in tumor cells. Therefore, in this paper, we conducted the evaluation of a complex of liposomes steric guided by transferrin and containing inside a plasmid encoding an RNAi directed against *wt1*. Analysis "*in vitro*" showed low transfection efficiency in B16F10 murine melanoma cells, due to the use of pegylated phospholipids. Then an "*in vivo*" model was evaluated inoculating tumor cells subcutaneously in C57BL/6 mice using intravenous treatments. Results in an increase in body weight of 34% ($\pm 24.92\%$) for the untreated group and 41% (± 12.78) for Lip+RNAi+Tf group; for groups Lip+RNAi and Lip+GFP+Tf shown increments of 1.5% (± 12.97) and 10% (± 6.87) respectively. No significant difference was observed between groups analyzed. Lip+RNAi and Lip+GFP+Tf groups no presented survivors at day 30 mice that ended in trial. In the analysis of tumor volume, a decrease of 5981 mm^3 (± 2099) for was observed in comparison to untreated group that presented a value of 7871 mm^3 (± 2087). In the final weight of the tumor analysis, a reduction of weight was observed, corresponding to 5.5 g (± 0.87) for Lip+RNAi+Tf compared to 8.8 g (± 0.30) for the untreated group. In a survival analysis was observed an increase of survival in which corresponds to 62% for Lip+RNAi+Tf compared to 22% in the untreated group. Finally, an analysis of relative expression of *wt1*, shown a decrease in the expression of *wt1*, in Lip+RNAi+Tf corresponding to 0.2145 (± 0.2867) folds and 1.809 (± 2.4937) folds

for the untreated group. Results showed the systemic application of Lip+RNAi+Tf complex attack tumor cells seeded in the subcutaneous layer.

1. INTRODUCCION

El cáncer es una enfermedad con una alta tasa de mortalidad. En la lucha contra el cáncer, se han obtenido grandes logros, debido a la tendencia a realizar tratamientos personalizados, adicionando al desarrollo de nuevas tecnologías que mejoran el diagnóstico. En la actualidad, ciertos tipos de cáncer con alta incidencia han llegado a ser controlados, disminuyendo su mortalidad, como por ejemplo en cáncer de mama, cáncer cervicouterino y cáncer de pulmón, sin embargo, otras neoplasias presentan incrementos en las tasas de incidencia y mortalidad, como lo es el melanoma.

Melanoma es una neoplasia muy agresiva que presenta una baja supervivencia cuando es diagnosticado en etapas avanzadas. El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos ha mejorado la respuesta, sin embargo, la mayoría de los tratamientos tienden a presentar graves efectos secundarios. La terapia con RNA de interferencia es una nueva modalidad terapéutica en estudio. Esta ha tomado gran relevancia en tiempos recientes, ya que con esta metodología se puede modular la expresión génica de marcadores tumorales. Una proteína la cual merece estudio es WT1, ya que recientemente se le ha involucrado en nuevos procesos de la carcinogénesis tales como angiogénesis y quimio-sensibilización. Un trabajo reciente “*in vivo*” en el cual se administró un RNA de interferencia en contra de *w11*, se observó una reducción en la masa tumoral, además de una reducción del número de vasos sanguíneos. En otro trabajo “*in vitro*”, empleando el mismo RNAi se observó que el silenciamiento del RNAm de *w11*, sensibilizaba las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos convencionales, ampliando así su uso terapéutico.

Una de las limitantes para este tipo de terapia, es su administración sistémica. Los liposomas podrían ofrecer una alternativa como vía de administración, debido a que pueden ser dirigidos por ligandos y así realizar la entrega de drogas, proteínas y material génico. Uno de los ligandos ampliamente usados en la dirección de drogas anti-cáncer ha sido la transferrina (Tf) o anticuerpos que reconocen al receptor de la transferrina (TfR), ya que TfR se encuentra altamente expresado en células tumorales, por ello, en este trabajo, nos planteamos la administración de liposomas cargados con un RNAi en contra *w11* y dirigidos por la transferrina administrados vía

sistémica con la finalidad de atacar células tumorales a distancia, empleando un modelo murino.

2. ANTECEDENES

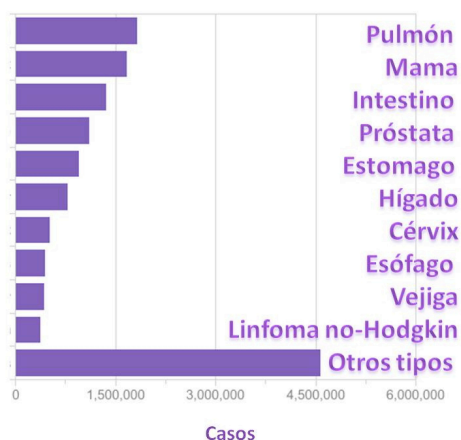
El cáncer en sus diferentes modalidades, es una enfermedad que representa una de las primeras causas de muerte a nivel mundial y se distingue por no diferenciar edad, estatus económico, sexo o tipo de raza. El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizado por el crecimiento y diseminación incontrolado de células anormales. Las células cancerígenas se caracterizan por tener desórdenes genéticos involucrados en los procesos de proliferación y muerte celular programada, adquiriendo capacidad de diseminarse a otras partes del cuerpo.

2.1 Epidemiología del cáncer

El número de muertes por cáncer a nivel mundial presenta una incidencia al alza. Tan solo en el 2012, fueron estimadas 14.1 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial, 7.4 millones se presentaron en el sexo masculino y 6.7 millones en el sexo femenino.

La **incidencia** de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial (presentados en ambos sexos y sus porcentajes tomados del total de canceres) son: el cáncer de pulmón con 13%, cáncer de mama con 12%, cáncer intestinal con 10%, cáncer de próstata con 9% y cáncer de estómago con 8% (Figura 1).

Fig 1. Los 10 más comunes tipos de cáncer diagnosticados(*)

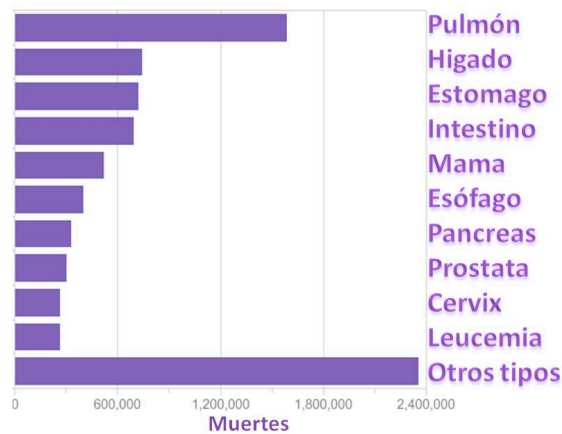


* Estimaciones realizadas en el año 2012.

Número total y porcentajes de casos nuevos diagnosticados por año, a nivel mundial.

En el año 2012, la **mortalidad** por cáncer, fue estimada en 8.2 millones de muertes al año a nivel mundial, de las cuales 4.7 millones corresponden al sexo masculino y 3.5 millones al sexo femenino. Los tipos de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial son: cáncer de pulmón con 19 %, cáncer de hígado con 9 %, cáncer de estómago con 9 %, cáncer intestinal con 8 % y cáncer de mama con 6 % (Ferlay J, et al. 2013) (Figura 2).

Fig 2. Los 10 más comunes tipos de cáncer que causan muerte (*)



* Estimaciones realizadas en el año 2012.
Número total y porcentajes de muertes por cáncer al año, a nivel mundial.

El descubrimiento de nuevos medicamentos y nuevas tecnologías de diagnóstico, han logrado reducir la tasa de mortalidad en las neoplasias de mayor incidencia y mortalidad, sin embargo, algunas otras neoplasias han presentado un incremento gradual en incidencia y mortalidad, tal y como ocurre con melanoma.

2.2 Melanoma

Melanoma es un tipo de cáncer de la piel, y constituye el 1.6 % en incidencia anual estimada en el 2012 y anualmente constituye el 0.7 % de muertes del total de pacientes por cáncer. (Ferlay J, et al. 2013)

El melanoma tiene como origen celular los melanocitos, que son las células que se encuentran entre la dermis y epidermis. Los melanocitos también son encontrados en ojo, (Figura 3). La función normal de los melanocitos es ofrecer protección contra rayos UV contenidos en los rayos solares por medio de la formación de un pigmento

denominado melanina. Personas que normalmente están más expuestas a los rayos solares, tienden a presentar mayor pigmentación por melanina.

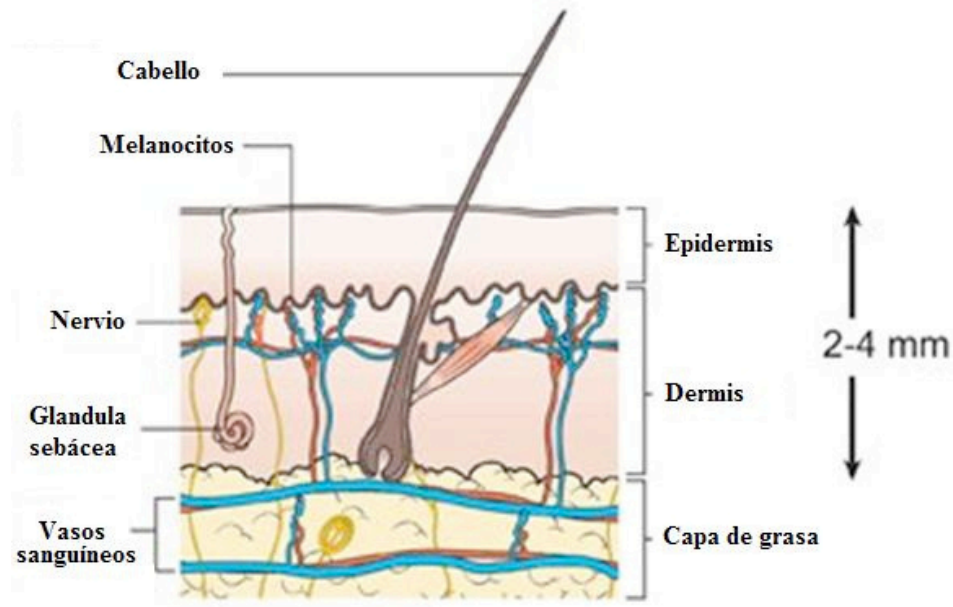


Figura 3.- Diagrama de la estructura de la piel

Copyright © CancerHelp UK.

El melanoma no es uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia, ni mortalidad en comparación con el total de incidencia en casos y muertes por cáncer a nivel mundial, sin embargo, en las últimas cuatro décadas, se ha presentado como uno de los cánceres con un constante incremento en la incidencia y principalmente en población caucásica (Nikolaou y Stratigos 2014; Parker et al. 1996; Greenlee et al. 2001).

La incidencia de melanoma varía geográficamente presentándose con una mayor incidencia en Australia, Estados Unidos, Canadá y países de la región europea (Ferlay J, et al. 2013).

Su incidencia se ve afectada por factores de riesgos propios de la neoplasia tales como el color de piel, edad, exposición natural a los rayos solares, exposición artificial a rayos UV, nevos múltiples y factores genéticos (Williams et al. 2014).

La supervivencia de melanoma estimada según la American Cancer Society varía según la etapa de diagnóstico. La supervivencia estimada de melanoma en etapas tempranas (I y II) a 5 años está entre 53 a 97% y en etapas tardías entre un 78% y 15% (ver Tabla 1). Otra forma de estimación de la supervivencia es en consideración al tamaño del grosor en la invasión del melanoma a través de la piel, de los cuales se considera que los melanomas de 1mm de profundidad son pequeños y presentan poca capacidad de migración. Para melanomas entre 1.5 mm y 4 mm se ha observado que presentan una supervivencia estimada a 5 años de 70% en comparación al 45% de supervivencia en pacientes con melanomas mayores de 4 mm (Breslow, 1970).

Tabla 1. Supervivencia estimada a 5 y 10 años en pacientes con melanoma.

ETAPA	SUPERVIVENCIA ESTIMADA	
	5 AÑOS	10 AÑOS
Etapa IA:	97%	95%
Etapa IB:	92%	86%
Etapa IIA:	81%	67%
Etapa IIB:	70%	57%
Etapa IIC:	53%	40%
Etapa IIIA:	78%	68%
Etapa IIIB:	59%	43%
Etapa IIIC:	40%	24%
Etapa IV:	15-20%	10-15%

Los siguientes porcentajes de supervivencia están basados en casi 60,000 pacientes que fueron parte del AJCC Melanoma Staging Database de 2008 (American Cancer Society).

*La tasa de supervivencia es mayor para los cánceres en etapa IIIA que para algunos cánceres en etapa II. Es probable que esto se deba a que el tumor principal (primario) a menudo es menos avanzado para los cánceres en etapa IIIA, aunque esto no está claro.

2.3 Melanoma en México

En México, no existe como tal un registro único en el país, debido a la falta de alta en el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas por algunos laboratorios de diagnóstico, dificultando así, obtener un número confirmatorio de números de casos, incluyendo que probablemente grupos de pacientes ni siquiera acuden a recibir atención médica (Jurado-Santa Cruz et al. 2011; Arias Soto et al. 2012). Sin embargo, se han reportado incidencias en algunos reportes, tales como el realizado por Parada J. en 1998, donde estimó una incidencia de melanoma en 1.01 casos por cada 100 000

habitantes (Parada et al. 2003), posteriormente en el 2008, la Secretaría de Salud reportó una tasa de mortalidad de 1.2% por cada 100 000 habitantes.

En el periodo de 1986 a 1995, un estudio realizado por el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) del estado de Sonora, registró 60 casos de cáncer de piel de los cuales 76% corresponden a carcinoma basocelular, 15% a espinocelular y 6.6% a melanoma (Correa-Aranda. 1996).

Otro trabajo realizado durante 1995 y 2005 en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” reportaron 1326 casos de cáncer de piel de los cuales 67% corresponden a basocelular, 19% a espinocelular y 8% de melanoma (Reyes-Martinez. 2007). En un estudio realizado en el estado de Zacatecas durante los años 1998 al 2007 reportaron 731 casos de cáncer de piel, de los cuales 62.1 % corresponden a carcinoma basocelular, 26.3% a espinocelular y 11.8 % a melanoma, presentado una incidencia de 1.4 por cada 100 000 habitantes (Pinedo-Vega et al. 2014). En este último trabajo realizado en el estado de Zacatecas, concluyen que las comparaciones de las incidencias de Parada en 1998 de 1.01 casos de melanoma por cada 100 000 habitantes y la obtenida por su grupo de trabajo de 1.4 casos por cada 100 000 habitantes es superior a la tasa estimada de 0.4 casos por cada 100 000 habitantes para países en vías de desarrollo, explicando la falta de estudios epidemiológicos concluyentes en países de América Latina (Pinedo-Vega et al. 2014).

2.4 Clasificación del melanoma

El melanoma que se presenta en la epidermis puede crecer en dos planos, horizontal y vertical. Para su clasificación histológica son empleadas las clasificaciones:

Clasificación de Clark: el cual se divide en 5 niveles dependiendo de la profundidad del tumor. De los cuales los primeros 2 son considerados como superficialmente invasivos y los niveles 3 al 5 son considerados profundamente invasivos (Ver Tabla 2)

Tabla 2. Clasificación de Clark para melanoma

Nivel	Descripción
1	in situ: el tumor se encuentra presente sobre la membrana basal
2	es cuando el melanoma se extiende hacia la dermis papilar
3	es cuando el tumor invade y llena la dermis papilar extendiéndose hacia la dermis reticular, pero sin atravesarla
4	es cuando el tumor invade la dermis reticular
5	es cuando el tumor se extiende hacia la grasa subcutánea

La otra clasificación empleada es la de **Breslow**: la cual clasifica en base al grosor del tumor y lo clasifica en 4 categorías (Figura 4):

T1 ≤ 0,75 mm

T2 = 0,75- 1,5 mm

T3 = 1,51- 4 mm

T4 > 4 mm

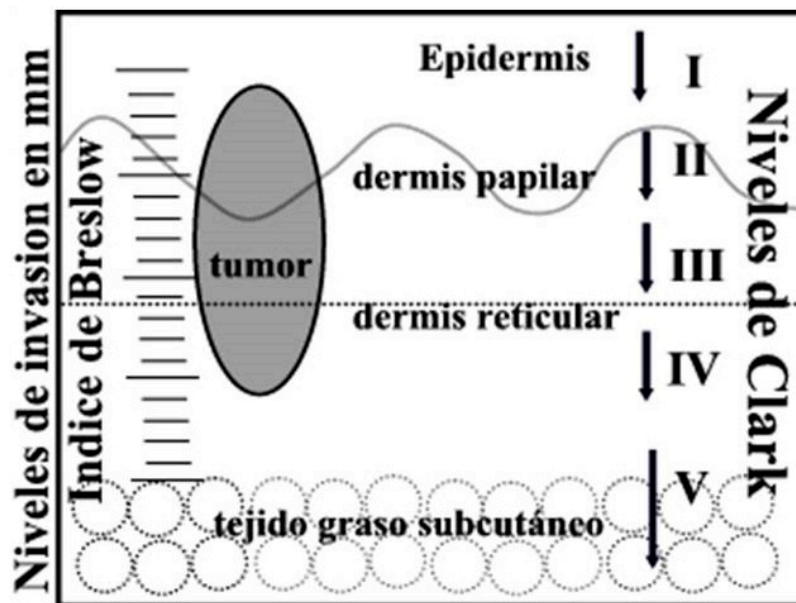


Figura 4. Esquema de la clasificación de melanoma invasivo.

Las formas clínico-patológicas de melanoma cutáneo en relación a la localización anatómica y a su evolución se clasifican en:

Melanoma de extensión superficial: se encuentra en una frecuencia del 70% de los casos de melanoma. Afecta principalmente pacientes jóvenes en áreas del cuerpo que son expuestas al sol como las piernas en mujeres y torso en hombres. La lesión clínica suele ser una placa pigmentada, palpable, de 1 a 2,5 cm de diámetro, de color

marrón oscura, negra o parduzca, que puede presentar áreas claras que reflejan regresión tumoral.

Melanoma nodular: es la segunda forma más frecuente de melanoma, representa de un 10-15% de los casos. Presenta una fase de crecimiento corta de entre 6 y 18 meses. Clínicamente aparece como una lesión papulo-nodular de entre 1 y 2 cm de diámetro, pigmentada, de coloración marrón oscura, negra con áreas sonrosadas.

Lentigo Melanoma: aparece como una lesión pigmentada en áreas expuestas con daño solar intenso, especialmente en cara y el cuello de personas mayores. La incidencia anual de lentigo maligno se sitúa entre 1 y 1,5 por cada 100.000 habitantes, con un porcentaje en aumento, que lo sitúa entre el 4 y el 15% de los casos de melanoma.

Melanoma lentiginoso acral: es el menos frecuente, representando un 2-8% de los melanomas y es más frecuente en personas de raza negra y asiáticos. Esta forma se localiza en palmas, plantas, y región periungueal.

Melanoma de mucosas: pueden localizarse en las mucosas genital, oral o conjuntival. Suelen tener una fase de crecimiento radial o pagetoide semejante a la del melanoma de crecimiento superficial.

Melanoma desmoplásico: es poco frecuente, se presenta clínicamente como una lesión banal, que posteriormente desarrolla un tumor profundo, fibroso, con predominio de células fusiformes, caracterizado por una tendencia a las recidivas locales múltiples y con gran capacidad de infiltración local mientras que el riesgo desarrollo de metástasis es similar o más bajo que las formas de melanoma.

2.5 Factores de riesgo

2.5.1 Radiación solar

Exposiciones a periodos largos a radiación solar conteniendo luz ultra violeta (UV), ha demostrado presentar efectos dañinos sobre la piel, ya sea por medio de mecanismos directos e indirectos, como la formación de dímeros de ciclobutano pirimidina, mutaciones genéticas, inmunosupresión y estrés oxidativo (Kanavy y Gerstenblith. 2011). Este fenómeno se ha observado en el incremento a desarrollar melanomas en poblaciones que antes estaban expuestas a menor cantidad de radiación UV y que migran a lugares con mayor cantidad de radiación UV (Holman y Armstrong 1984; Autier et al. 1997).

2.5.2 Exposición a radiación UV artificial

En las últimas 2 décadas, ha tomado mucha popularidad en mujeres y hombres jóvenes de piel blanca, el empleo de camas de exposición a radiación UV con la finalidad de tonificar el color de piel. Esto ha reflejado un incremento en el número de casos de melanoma en pacientes jóvenes (Veierød et al. 2010).

2.5.3 Factores de riesgo genéticos

Las mutaciones en BRAF es una de los principales daños genéticos encontrados en melanoma, detectándose en un 50% de los casos. Estas mutaciones se detectan típicamente en lesiones que surgieron en partes anatómicamente expuestas a radiación UV (Thomas et al. 2007; Besaratinia y Pfeifer 2008; Edwards et al. 2004).

Mutaciones o amplificaciones en c-Kit (presentes en el 6 al 7% de los melanomas en las personas blancas o asiáticas) y amplificaciones del gen de la ciclina D1 son comúnmente detectadas en melanomas acrales y mucosales que están expuestas a radiación solar crónica (Hodi et al. 2008).

A la fecha se han descrito diversas mutaciones en genes involucrados en la proliferación celular, tales como mutaciones en el gen BAP1 (proteína 1 asociada a BRCA) es encontrado en familiares con casos de melanoma uveal y cutáneo (Wiesner et al. 2011).

Algunos polimorfismos provocan la pérdida de la función del gen MC1R (gen receptor de melanocortina), causando cambios en la melanogénesis de la eumelanina, lo cual crea un fenotipo de pelo rojo, piel blanca y pecas lo cual es susceptible a inducir melanoma (Valverde et al. 1995).

NRAS (homólogo del oncogén viral RAS [v-ras] del neuroblastoma) fue el primero de los oncogenes descritos en melanoma. Mutaciones en *NRAS* son frecuentes en aproximadamente el 15 a 20% de los melanomas. La mayoría de las mutaciones *NRAS* se encuentran en el codón 61 las cuales alteran la actividad enzimática para convertir GTP a GDP. Otras mutaciones menos frecuentes se encuentran en el codón 12 y 13 las cuales no permiten que se lleve a cabo la asociación de actividad GAPasa de las proteínas (GAP), que aceleran el débil potencial hidrolítico de RAS. Como resultado, las *NRAS* permanece activo induciendo la proliferación e incrementando la supervivencia y la motilidad celular (Posch y Ortiz-Urda. 2013).

Mutaciones en *CDK4* (cinasa 4 dependiente de ciclina) son encontradas en el 4% de los melanomas, preferentemente en los melanomas mucosos y acrales. (Curtin et al. 2005; Stark y Hayward 2007)

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico de melanoma ocurre primordialmente cuando la persona presenta signos y síntomas propios de la enfermedad. Por lo general el médico revisa el historial clínico, preguntando cuando apareció el cambio en la piel del paciente, si ha cambiado de tamaño o apariencia, si causa algún síntoma como dolor, comezón, sangrado etc., si la persona estuvo expuesta a algún factor de riesgo tales como quemaduras y bronceado, y si hay algún factor de riesgo en familiares.

Posteriormente se realiza un examen físico observando la cantidad de lunares, tamaño, forma e intensidad de pigmentación. También se lleva el examen de ganglios cercanos al lugar de sospecha, ya que frecuentemente provocan un aumento en tamaño, posiblemente sospechando que el melanoma pudo ya haberse propagado. Posteriormente un especialista realizará una técnica llamada dermatoscopia, con la

finalidad de visualizar la piel con mayor claridad. Esta imagen puede ayudar a discernir si la mancha en la piel analizada es benigna o si requiere la toma de biopsia.

Biopsias de piel pueden ser tomadas por raspado, por punción o por incisión y escisión (siempre y cuando se sospeche que aun se encuentra localizado en la piel). Posteriormente esta biopsia será analizada por un anatomopatólogo quien confirmará el tipo de tumoración. En caso de sospechar que el melanoma se ha propagado a otro lugar, es sugerida la toma de biopsia por medio de punción de aguja guiada por alguna técnica de imagenología, las cuales proporcionan su localización y dirección de toma de biopsia. Las técnicas de imagen empleadas van desde el uso de **rayos X** en tórax (con la finalidad de ver si se ha propagado a pulmones), **tomografía computarizada** la cual provee imágenes transversales detalladas del cuerpo, mejorando su búsqueda en tejidos blandos, ya sean ganglios agrandados, pulmones e hígado, que son los lugares más frecuentes de metástasis de melanoma. Otra opción es la obtención de imágenes por resonancia magnética en la cual se emplean ondas de radio y potentes imanes para realizar la captura de imágenes. Esta técnica al igual que la tomografía computarizada, ofrecen una mejoría en la visualización de tejidos blandos, además proporciona imágenes de cerebro y medula espinal.

Otra opción es la **tomografía por emisión de positrones (PET)**. Esta técnica se basa en aprovechar el incremento en el consumo de un radiofármaco de las células cancerosas. La técnica consiste en el envío de un radiofármaco aplicado vía sistémica, la cual marcará preferentemente a las células tumorales al igual que algunos tejidos con alta demanda de glucosa. Posteriormente se realizará la toma de imágenes las cuales deberán ser interpretadas por un especialista radiólogo.

2.7 Tratamientos para melanoma

Melanoma es una neoplasia que puede invadir cualquier órgano, pero presenta predilección por hacer metástasis a pulmón, hígado, cerebro y ganglios linfáticos. En pacientes con metástasis en ganglios linfáticos y/o subcutáneos presentan una media de supervivencia 11 meses, metástasis pulmonares presentan una mediana

supervivencia de 8 a 10 meses y estas anteriores tienen un mejor pronóstico que aquellos con el sistema nervioso central, y las metástasis hepáticas con una mediana supervivencia de 2-4 meses.

El melanoma diseminado prácticamente es incurable, sin embargo, a la fecha existen modalidades para el tratamiento de melanoma como lo son la escisión quirúrgica, quimioterapia sistémica, radioterapia, inmunoterapia, vacunación y terapias con biológicos, que han ayudado a incrementar el tiempo de supervivencia.

2.7.1 Cirugía

La cirugía es practicada principalmente en pacientes con metástasis. Algunas veces la cirugía se ve reflejada en un incremento en la supervivencia a largo plazo, y es debido a la resección quirúrgica y localización de las metástasis en un solo órgano, sin embargo, la resección es limitada al tipo de órgano afectado. Un estudio reciente en el 2002 mostró que 263 pacientes sometidos a resección de metástasis a distancia presentaron una tasa de supervivencia a 5 años del 19% y sin recibir terapia post-operatoria, dejando ver la importancia de la resección quirúrgica de melanoma (Hsueh et al. 2002).

2.7.2 Inmunoterapia

Es sabido que existe una correlación inversa entre el pronóstico y el grado de infiltración linfoide del tumor primario, sugiriendo que la inmunidad de huésped juega un papel importante en la respuesta contra tumor (Day et al. 1982; Balch et al. 1982). A la fecha, la inmunoterapia ha sido cuestionable y por ello, pocos estudios en fase III indican una mejoría cuando se usa en combinación con quimioterapia, pero presentando toxicidad y disminución de la calidad de vida (Eton et al. 2002; Rosenberg et al. 1999).

Desde su obtención y producción vía recombinante de la citocina IL2, ha sido ampliamente evaluada en modelos tumorales (Grimm et al. 1982). Esta citocina puede activar linfocitos granulados para destruir una gran variedad de tumores humanos, sugiriendo así su capacidad antineoplásica. La IL2 ha sido empleada en sistemas de transferencia de inmunidad adoptiva, observándose un incremento en la actividad antitumoral en melanoma, carcinoma renal y carcinoma colorectal (Rosenberg et al. 1985). En pacientes con melanoma, los tratamientos con IL2 con metástasis visceral fueron observados resultados clínicos desfavorables, sugiriendo realizar mejoras en la selección por medio de parámetros clínicos (Tartour et al. 1996).

El interferón *alfa-2b* es una de las primeras terapias médicas adyuvantes para pacientes con resección quirúrgica de melanoma de alto riesgo metastásico. Su función es ligada a la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad del tumor (MHC) y sobre la función de las células T del huésped, las células NK, y células dendríticas. La FDA en 1995 aprobó el interferón α -2b en altas dosis para el tratamiento adyuvante de pacientes con melanoma que hayan sido sometidos a resección quirúrgica total, y que se consideran en alto riesgo de recaída (estadios IIB, IIC, y III). A la fecha estudios aleatorizados, prospectivos y multicéntricos del tratamiento, han encontrado que el interferón α -2b sencillo y pegilado aplicado en altas dosis, mejoran la supervivencia sin recaída, pero no la supervivencia general (Foletto y Haas 2014).

Otro agente aplicado en inmunoterapia contra melanoma es el Ipilimumab (MDX-010, Yervoy; Bristol-Myers Squibb), que es un anticuerpo monoclonal humano dirigido en contra del antígeno CTLA-4, este fue recientemente aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de metástasis de melanoma. Su función radica en inhibir la inmunotolerancia e inducir la regresión tumoral, tanto en etapas tempranas y tardías de la enfermedad. Su aplicación ha sido dirigida en combinación con péptidos antigénicos específicos de melanoma. Un trabajo reciente en fase III, empleando el anticuerpo ipilimumab y una vacuna de melanoma (denominada gp100) mostraron incrementos promedios de 10 meses de sobrevida en el grupo de pacientes tratados con la combinación del anticuerpo Ipilimumab y la vacuna gp100, y a 10.1 meses de supervivencia en pacientes tratados solo con el anticuerpo Ipilimumab en comparación a 6.4 meses de sobrevida al grupo de pacientes tratados solo con la vacuna. Sin embargo, de un 10% a un 15% de los pacientes presentaron efectos adversos a nivel del sistema gastrointestinal, a nivel de la piel, en hígado y a nivel endocrino, sugiriendo que en su administración se emplee una vigilancia cuidadosa y en algunas ocasiones sea necesario el empleo de terapias inmunosupresoras (Lipson y Drake. 2011).

PD1 es un receptor que pertenece a la familia de CD28 y es expresado en linfocitos T y B, además de monocitos, células NK y en linfocitos infiltrantes de tumor. El receptor PD1 (receptor de muerte programada 1) y sus ligandos PD-L1/2 son la llave de muchos tumores para evadir la respuesta inmune debido a que ciertos tumores presentan alta expresión de PD-L1. Actualmente la FDA ha aprobado dos anticuerpos denominados nivolumab y pembrolizumab, estos se unen al receptor PD1 bloqueando la represión de la respuesta inmune y así favoreciendo la presentación de antígeno y el reconocimiento del mismo. Estos anticuerpos han presentado mejor respuesta en comparación a la quimioterapia en termino de tasa de respuesta; además, han presentado mejor respuesta en termino de tiempo de progresión en comparación con pacientes tratados con ipilimumab o inhibidores de BRAF (Gajewski et al. 2010; Dolan y Gupta. 2014).

2.7.3 Quimioterapia

El vemurafenib es un fármaco clásico, inhibidor selectivo de cinasa V600E en *BRAF*, en presentación oral y su indicación está limitada a los pacientes con mutación V600E en *BRAF*, identificada mediante un examen aprobado por la FDA.

Otros de los fármacos clásicos son el dabrafenib, (inhibidor selectivo de *BRAF*), en presentación oral, aprobado por la FDA en 2013 (Hauschild et al. 2012, Grob et al. 2014). El *trametinib* (inhibidor selectivo de *MEK1* y *MEK2*), en presentación oral, que aprobó la FDA en 2013 para pacientes con melanoma irreseccable o metastásico con mutaciones V600E o K en *BRAF*.

Melanomas mucosos o acrales con mutaciones activantes o amplificaciones de c-KIT pueden ser sensibles a una variedad de inhibidores de c-KIT tales como imatinib nilotinib y sorafenib (Hodi et al. 2008; Guo et al. 2011; Carvajal et al. 2011; Hatzivassiliou et al. 2010; Poulikakos et al. 2010; Su et al. 2012).

Otro fármaco es la decarbazina, este fue el primer fármaco aprobado por la FDA en 1970 para el tratamiento de melanoma metastásico. La decarbazina actúa a través de la alquilación del DNA formando uniones entre las hélices evitando su desnaturalización, dañando así, la síntesis de DNA. En ensayos de fase III, la decarbazina presentó una tasa de respuesta general de 10 a 20% y se observó remisión completa en escasas ocasiones (Chapman et al. 1999; Middleton et al. 2000; Avril et al. 2004; Robert et al. 2011; Sosman et al. 2012; Hauschild et al. 2012). Cuando se usó como grupo control en ensayos recientes para el registro de ipilimumab y vemurafenib en pacientes con melanoma metastásico sin tratamiento previo, la decarbazina mostró ser inferior en relación con la supervivencia general. Temozolomida es otro alquilante administrado oralmente, y presenta efectos similares a la decarbazina intravenosa (Middleton et al. 2000; Sosman et al. 2012).

2.8 Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son sustancias y/o moléculas que son producidas por las células tumorales o por otras células en respuesta al cáncer u otras afecciones benignas. Algunos de estos marcadores tumorales son producidos por células normales, sin embargo, en células anormales suelen encontrarse en concentraciones mayores. Estos marcadores suelen encontrarse en orina, sangre, heces fecales, en tejido u otros líquidos corporales.

Existen marcadores específicos para cada tipo de tumor y algunos son expresados en múltiples neoplasias. El conocimiento de sus funciones tiene múltiples aplicaciones tales como el diagnóstico de la neoplasia, pronóstico de la enfermedad, evolución de la enfermedad, tipo de tratamiento a seguir, como molécula de dirección terapéutica, entre otras funciones. Algunos de los marcadores tumorales tienen funciones específicas en la célula, la mayoría de ellos trata de factores de crecimiento, receptores nucleares, inhibidores de la apoptosis, marcadores de angiogénesis.

Algunos de los marcadores comunes en cáncer son:

- **Her2/neu.** - que es un receptor transmembranal tipo tirosina-cinasa, esta proteína frecuentemente es encontrada en cáncer de mama, cáncer de estómago y cáncer de esófago (Appert-Collin et al. 2015).
- **EGFR.** - que es un receptor transmembranal tipo tirosina-cinasa, este marcador frecuentemente es encontrado en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Appert-Collin et al. 2015).
- **Receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP)**- estas proteínas actúan como receptores nucleares que inducen proliferación celular. Frecuentemente son expresados en cáncer de mama y son usadas para determinar tipo de terapia dirigir (Lumachi et al. 2015).
- **Mutación de BRAF (V600):** es una proteína serina/treonina cinasa que se encarga de activar la vía MAP cinasa. Esta mutación es encontrada en melanoma

y cáncer colorrectal. Se emplea para pronosticar la reacción a terapia (Ascierto et al. 2012).

En la actualidad, múltiples herramientas como la proteómica y análisis de microarreglos, han elucidado el papel biológico de tales marcadores en el proceso de carcinogénesis, sin embargo, aún es importante ampliar la búsqueda de nuevos marcadores e investigar cuál es el papel biológico que juegan durante el cáncer.

Recientes trabajos sobre el rol de la proteína WT1 en cáncer, han tomado gran importancia debido a las propiedades biológicas ejercidas por este factor de transcripción, además de ser encontrado en altos niveles en múltiples tipos de tumor.

2.9 El gen wt1

La proteína de wt1 es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación celular, proliferación y apoptosis (Davies et al 1998; Mayo et al 1999). El gen se localiza en el cromosoma 11p13 y es constituido por 10 exones, generando un RNAm de 3.5 kb. En el extremo amino terminal de la proteína, se encuentra un dominio de transactivación rico en prolina y glutamina (Haber et al. 1990; Gessler et al. 1992), un dominio de dimerización y un dominio de represión. En el extremo carboxilo terminal se presenta un dominio de unión a DNA el cual es conformado por cuatro dedos de zinc tipo Kruppel.

El gen de *wt1* posee tres inicios distintos de la traducción generando tres proteínas con pesos moleculares de 36-38 kDa, 52-54 kDa y 60-62 kDa. Además, posee dos splicing alternativos; el primero de ellos se encuentra en el exón 5 el cual elimina o inserta 51 pb (17 aa) y el segundo de los splacing se encuentra en el exón 9 el cual inserta o elimina 9 pb, denominado KTS (Lys-Thr-Ser) (Kumar-Singh et al. 1997; Kumar-Singh et al. 1998; Mrowka y Schedl 2000). (Figura 5).

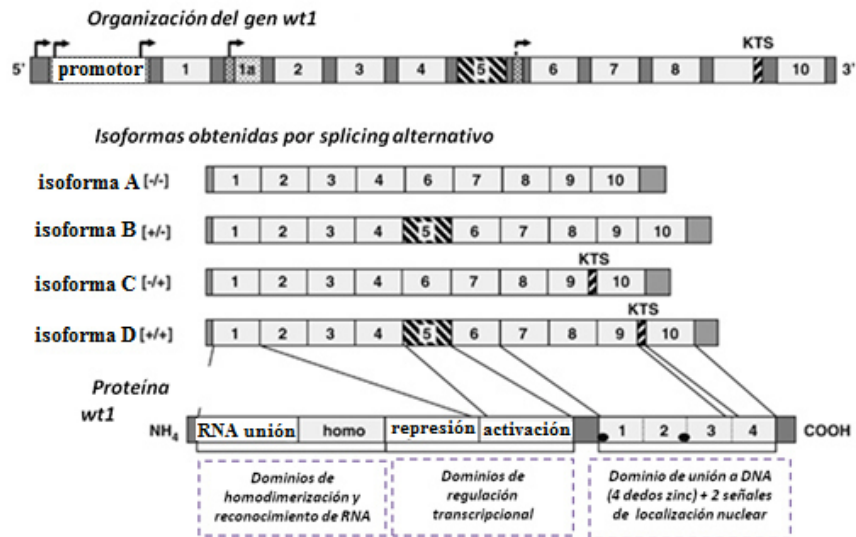


Figura 5. Estructura del gen wt1

Wt1 inicialmente fue descrito como gen supresor de tumor debido a que se encuentra mutado o deletado del 10 al 15% de los tumores de Wilms, el cual se describe como un nefroblastoma pediátrico que presenta una incidencia de 1 por cada 10,000 niños, según estadísticas realizadas en Estados Unidos. Los tumores de Wilms están asociados a los síndromes WARG (tumor de Wilms, aniridia o malformación del iris, anomalías genitourinarias y retardo mental), Fraiser (genitales externos femeninos en individuos XY) y Denys-Drash (insuficiencia renal progresiva por esclerosis mesangial difusa, tumor de Wilms y pseudohermafroditismo masculino), de los cuales, el común es que todos presentan la nefropatía (Konig et al. 1993; Little et al. 1993).

La expresión normal del gen *wt1* se presenta durante la fase embrionaria en el desarrollo renal y gonadal, expresándose en la mesénquima renal fetal, en la gónada primordial, en las células de Sertoli adultas y en las células granulosas foliculares. Se ha observado que ratones que carecen de ambas copias de *wt1*, no desarrollan gónadas ni glándulas suprarrenales, lo que sugiere que su función temprana es necesaria en la formación de estos órganos (Kreidberg 2010; Herzer et al. 1999; Martinerie et al. 1996). Además, se ha encontrado expresión en etapa adulta a nivel de sistema nervioso central, en tejidos hematopoyéticos, medula ósea, nódulos linfáticos y en restauración en infartos a nivel de miocardio (Davies et al. 1999).

Wtl es importante para la diferenciación sexual masculina durante el desarrollo embrionario ya que participa en la cascada de la diferenciación sexual masculina activando el promotor del gen SRY y reprimiendo al promotor de la AMH y al receptor androgénico (AR). Estudios han identificado mutaciones en el gen de *wtl* las cuales se encuentran asociaciones a los síndromes de Denys Drash y Frasier, donde se presenta reversión sexual de varón a mujer ocasionando pseudohermafroditismo y criptorquidismo (Davies et al. 1999).

El gen *wtl* juega un papel importante en la activación y represión de genes como Factores de crecimiento, proteínas involucradas en apoptosis, proteínas de adhesión celular y proteínas involucradas en ciclo celular (Tabla. 5).

Tabla 3. Propiedades de la proteína WT1 en la regulación génica

<i>Función represora</i>	<i>Función activadora</i>
EGFR	MIS
IGF-II	SRY
IGFR	Dax-1
c-myc, n- myc	E-cadherina
PDGF	P21
TGF	Amphiregulina
RAR	Bcl-2
CSF	Ciclina- E
Bcl-2	ETS-1
EGR1	WT1
WT1	

2.9.1 Propiedades biológicas de las isoformas de WT1

A la fecha se han realizado múltiples trabajos los cuales analizan el papel biológico de las isoformas dentro de la regulación génica. La isoforma KTS (-) está asociada principalmente a eventos de transcripción y la isoforma KTS (+) la cual es asociada mas a eventos en la maduración de RNA en los cuerpos de splicing. En cuanto a la presencia y ausencia de los 17 aminoácidos en el exón 5, se le ha relacionado más a interacciones proteína-proteína (Maheswaran et al. 1993; Maheswaran et al. 1995).

2.9.2 *WT1 en cáncer*

Uno de los primeros estudios realizados con *wtl* en cáncer fue realizado por Silberstein y col. donde analizaron tejido sano y neoplasias de mama, de lo cual se concluyó que *wtl* era expresado en tejido sano y no en tejido neoplásico. Posteriormente Loeb y col. realizaron un análisis de expresión de *wtl* en múltiples tumores sólidos y no sólidos, encontrando una alta expresión en el tejido tumoral y observando que la hipermetilación de la región promotora de *wtl* no influía en la expresión de la misma (Silberstein et al. 1997; Loeb et al. 2001).

Posteriormente, en trabajos realizados por un grupo de japoneses (Oji et al 2004), encontraron altos niveles de expresión de la proteína WT1 libre de mutaciones en diversos tejidos tumorales como: cáncer de mama, cáncer de pulmón, leucemias, linfomas, melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de cuello, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer colon-rectal y melanoma (Hosen et al. 2004; Oji, et al. 2004a, Oji et al. 2004b, Oji et al. 2004c, Oji et al. 2004d, Oji et al. 2004e; Keilholz et al. 2005; Nakatsuka et al. 2006; Oka et al. 2006; Wagner et al. 2008; Garrido-Ruiz et al. 2010). Estas discrepancias entre los trabajos antes mencionados, puede deberse a la metodología empleada, sin embargo, a pesar de estas discrepancias, es evidente que WT1 puede jugar un papel doble dependiendo del contexto celular, ya que en el 10% de los nefroblastomas que presentan daño en la proteína sugieren un papel como gen supresor de tumor y por otro lado, también es encontrada la expresión de WT1 en altos niveles en tejido tumoral, adicionando que al disminuir su expresión por medio de oligos antisentido, se ha obtenido como resultado la disminución de la actividad proliferativa de las células tumorales “*in vitro*”, demostrando que juega un papel como “oncogen” (Zapata-Benavides et al. 2002; Zamora-Avila et al. 2007; Baird et al. 1992; Brown et al. 1992; Grubb et al. 1995; Algar et al. 1996; Menke, van der Eb, y Jochemsen 1998).

Wt1 es altamente expresado en más de 80% células malignas de melanoma, pero no está presente en piel sana o tumores benignos de melanocitos (Wagner et al. 2008). Garrido- Ruiz en el 2010 encontró una alta expresión de *wtl* en melanoma, donde

consecuentemente lo determina como marcador tumoral de malignidades de melanocitos. (Garrido-Ruiz et al. 2010)

Otra evidencia del papel dual que juega WT1 en cáncer, es observado en dos trabajos realizados por distintos grupos de trabajo, donde WT1 es capaz de regular positivamente al gen BCL-2, y el otro grupo observa que también es capaz de regularlo negativamente, y esto es debido a que BCL-2 contiene dos regiones consenso para la unión de WT1, una de ellas reprime al gen y en otra lo activa; ambos trabajos se realizaron en diferente línea celular, lo cual sugiere que la actividad transcripcional de *wt1* puede ser afectada por el contexto celular debido a la interacción con otras proteínas (Mayo et al. 1999; Cheema et al. 2003). Considerando su papel como “oncogen” se han desarrollado distintos trabajos “*in vitro*” empleando oligos anti-sentido y RNA interferencia. Los resultados de la reducción en la expresión de *wt1*, reducen la expresión de ciclina D1, decremento de la expresión de BCL-2 e incremento en la inducción de la apoptosis vía caspasa 3 (Zapata-Benavides et al. 2002; Zamora-Avila et al. 2007; Zamora-Avila et al. 2009; Zapata-Benavides et al. 2012; Reddy et al. 1995).

Un trabajo realizado por nuestro grupo de trabajo, donde se empleo un modelo de metástasis a pulmón de células de melanoma B16F10 en ratones C57BL/6, se observó que la aplicación de un shRNAi aplicado vía aerosol, disminuía los focos tumorales, además de disminuir el número de vasos sanguíneos e incrementar la supervivencia de los ratones tratados. En otro trabajo “*in vitro*”, se observó que el silenciamiento de *wt1* era capaz de inducir una sensibilización a los agentes quimioterapéuticos Doxorubicina y Cisplatino (Zapata-Benavides et al. 2012).

En nuestro grupo de trabajo, se han realizado distintos trabajos empleando al RNAi en contra de *wt1* en ensayos “*in vitro*” y en un ensayo de aplicación local (pulmonar), por ello, en este trabajo se buscará ampliar sus capacidades de aplicación empleando Liposomas dirigidos para contraatacar células tumorales instaladas en otras partes del organismo.

2.10 Terapias en desarrollo

2.10.1 Terapia Génica

Los genes son las unidades funcionales en la herencia, los cuales son conformados por secuencias específicas para la codificación de proteínas. Cuando existen anomalías en el material genético, pueden codificarse proteínas que no son capaces de realizar sus funciones habituales conllevando a una disfunción celular. Actualmente se ha desarrollado la **terapia génica** en la medicina, en la cual se manipulan secuencias génicas con la finalidad de reparar el problema. El término de terapia génica aborda a un amplio rango de tipos de tratamientos y en todos ellos se emplea la manipulación de material genético ya sea para modificar células “*in vitro*” o “*in vivo*” (Mulligan. 1993).

Los mecanismos de aplicación de la terapia génica en la medicina van desde:

- a) Inserción de un gen funcional por un gen defectuoso (sitio específico y no sitio específico)
- b) Reparación de los marcos de lectura
- c) Regulación de algún gen por medio del encendido o apagado del gen.

Distintos estudios han llevado las aplicaciones de la terapia génica en enfermedades monogénicas y/o en enfermedades infecciosas tales como: tratamiento de infecciones virales, reparación de problemas metabólicos hereditarios, reparación de problemas inmunitarios y tratamientos contra cáncer.

Las diferentes modalidades de aplicación de terapia génica implican las siguientes estrategias:

Inserción de un gen que sustituye la reparación de un gen defectuoso. Esta aplicación se ha llevado a cabo en cáncer, donde se repara por sustitución al gen p53 en células tumorales, induciendo así la reducción tumoral o induciendo una sensibilidad a radioterapia y quimioterapia (Xu et al. 2001).

Expresión de un gen defectuoso para disminuir la actividad de algún tipo celular. Ejemplo de ello es aplicado en la reducción de la fibrogénesis y estimulación de la

regeneración hepática en cirrosis hepática, donde se lleva a cabo la aplicación del gen TGF- β dañado el cual compite con la proteína normal reduciendo así su activación (Lee et al. 2010).

Regulación negativa por medio de Ribozimas, RNA interferencia y oligos antisentido. Estudios recientes “*in vitro*” aplicando pequeños RNA interferencia dirigidos contra la región codificante del virus de la hepatitis C, han demostrado capacidad de reducción de la replicación viral, ofreciendo así una alternativa de tratamiento (Manzoor et al. 2015).

Producción de una molécula coestimuladora de la respuesta inmune. En modelos en animales con tumores hepáticos a los que se les transfiere el gen de la IL7, se observa una actividad antitumoral significativa por su capacidad de activar Linfocitos T Citotóxicos y natural killer (Manzoor et al. 2015).

En cáncer, las principales vías para contraatacar la enfermedad son por medio de la inmunoterapia, el empleo de virus oncolíticos y transferencia génica. A la fecha se han realizado diversos ensayos preclínicos testeados en gliomas (Prasad et al. 2004), cáncer pancreático (Tseng y Mulligan 2002) y cáncer de hígado (Domvri et al. 2012), entre algunos otros tipos de cáncer.

Como parte de la regulación de genes en la terapia génica se encuentra el uso de los RNA interferencia (Berindan-Neagoe et al. 2009). Los RNAi pueden inducir la degradación específica de RNAm endógenos, de los cuales ya se conocen los mecanismos de acción implicados en el proceso denominado “*silenciamiento*”.

2.11 RNA interferencia

Los **RNA interferencia** efectores son de aproximadamente 21-25 nucleótidos (nt). RNA interferencia de mayor tamaño inicialmente son cortados por **dicer**, que se describe como una miembro de la familia de ribonucleasas tipo III (RNAsas III) (Zhang et al. 2004). Las secuencias cortas de 21-25 nt son incorporadas en un complejo nucleasa-multi-componente conocido como **RISC** (RNA-Induced Silencing

Complex) y posteriormente se une la proteína Argonauta-2 (Ago-2) (Hammond et al. 2000). La secuencia de RNA sirve como guía para darle dirección al complejo y unirse específicamente al RNA mensajero y posteriormente cortarlo (Bartel 2004; Khvorova et al. 2003; Kim y Rossi 2007) (Figura 6).

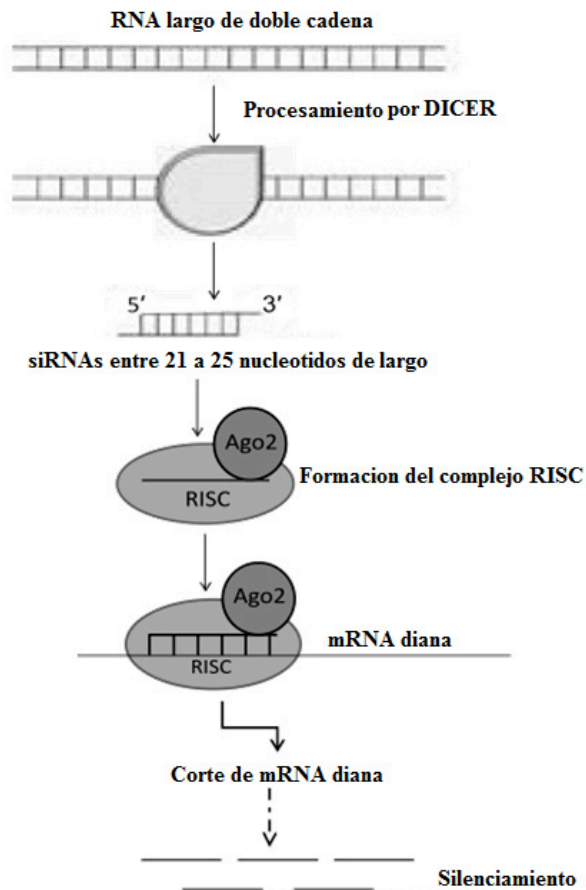


Figura 6. Esquema del proceso de silenciamiento por RNA interferencia

2.11.1 RNAi terapéuticos

El empleo de RNA interferencia en modelos “*in vitro*” e “*in vivo*” han demostrado ser una alternativa cuando la terapia con anticuerpos monoclonales es poco efectiva. Estudios clínicos en pacientes con mieloma múltiple, empleando el anticuerpo monoclonal denominado “CNTO 328” dirigido en contra de IL6, han disminuido sustancialmente a la proteína C reactiva, indicando la inhibición de la IL6, sin embargo, no se observan cambios clínicos significativos (Kim y Rossi 2007). En otro trabajo reciente, donde emplean un RNA interferencia dirigido en contra de IL6 en células del estroma mesenquimal en un modelo “*in vivo*”, demostró ser más efectivo

en la disminución de la proliferación de células de mieloma múltiple del RNAi en comparación a la terapia con el anticuerpo monoclonal. La expresión de IL6 por las células mesenquimales, ha demostrado ser un factor contundente en la evolución de la enfermedad debido a que la IL6 ayuda a las células de mieloma múltiple a migrar y adherirse, además de inducir proliferación celular (Klein et al. 1991; Bataille et al. 1995; Moreau et al. 2000).

En cáncer de mama Zhang y colaboradores han desarrollado múltiples RNAi, tales como el dirigido en contra de ciclina D1 el cual demostró ser citotóxico en la línea celular MCF-7 “*in vitro*”. En otro trabajo del mismo grupo y ahora empleando un RNAi dirigido en contra de c-raf, acompañado en liposomas y aplicado vía intravenosa, demostró reducir un 78% el crecimiento de implantes tumorales de cáncer de mama humanos en ratones SCID (Oh y Park 2014; Zhang y Yu 2014; Zhang y Huang 2014).

A la fecha no existen tratamientos de RNAi aprobados por la FDA, sin embargo, algunos de ellos prometen alentadores resultados tales como un RNAi en contra de BCL-2 en leucemia linfocítica crónica (Resnier et al. 2013). Otro RNAi en estudio dirigido en contra de la sub-unidad de la ribonucleótido-reductasa M2 (RRM2) ha presentado alentadores resultados, ya que puede observarse una importante reducción tumoral en pacientes con tumores sólidos. Este RNAi ha demostrado ser seguro y bien tolerado, sin embargo, aún continúa en estudio (Guzman-Villanueva et al. 2012). Otro estudio en desarrollo iniciado por Alnylam Pharmaceuticals en el 2009, el cual consta del primer ensayo el cual incluye dos RNAi, el cual uno de ellos es dirigido en contra de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y el otro en contra de la proteína kinesina spindle (KSP), el cual aun se encuentra en escalamiento y análisis de tolerancia a altas concentraciones (Taberero et al. 2013).

Otra área en desarrollo es aplicada en pacientes con infección de hepatitis B, debido a que no pueden recibir tratamientos prolongados con interferones, debido a sus efectos secundarios, además que los análogos de nucleós(t)ido frecuentemente empleados,

generan resistencia viral. Por lo anterior, los RNAi ofrecen una alternativa de tratamiento específica. A la fecha existen diversos RNAi en estudio, uno de ellos es el ARC-520 el cual es acompañado en nanopartículas unidas a ligandos. El ARC-520 va dirigido en contra secuencias codificantes de la maquinaria de replicación viral, observándose como resultado una disminución de la carga viral. Estudios en fase I en pacientes voluntarios sanos, el ARC-520 presentó buena seguridad y tolerancia, y en pacientes infectados, se ha observado que una sola administración es capaz de reducir significativamente la carga viral y actualmente la empresa farmacéutica ha iniciado estudios en fase clínica II [enero 2015] (Wang y Chen 2014).

Otro RNAi en estudio es el ALN-HBV, el cual ha demostrado ser un potente inhibidor viral en infecciones con virus de hepatitis B, ya que bloquea todos los pasos del ciclo viral, incluyendo ensamblaje, secreción del virus, replicación y secreción antígenos sub-virales. ALN-HBV es aplicado vía subcutánea, y presentó buena bioseguridad y tolerancia en pacientes ([Alnylam Pharmaceuticals Inc. Investors 2015. Available from: URL: http://investors.alnylam.com/](http://investors.alnylam.com/)).

Un estudio con RNAi en contra de infecciones virales fue descrito en cáncer cervicouterino, lo cual se caracteriza por ser una enfermedad ligada a la infección por HPV. Las proteínas virales E6 y E7 son las encargadas de llevar a cabo el proceso neoplásico, debido a que E6 se une a p53 bloqueando su translocación a núcleo y la unión de E6-p53 promueve la degradación de P53, por otra parte, la proteína E7 se une a RB promoviendo su ubiquitinación y degradación. A la fecha existe una vacuna la cual es aplicada en mujeres jóvenes entre 10 a 25 años de edad, sin embargo, la eficiencia de la actividad terapéutica no es evidente en pacientes con cáncer cervicouterino. Recientemente, nuevas terapias RNAi antivirales han sido desarrolladas y probadas en ensayos clínicos. Los RNAi han demostrado ser capaces silenciar selectivamente genes como E6 o E7, promoviendo la acumulación de p53 y RB, y eventualmente induciendo apoptosis o senescencia en líneas humanas de cáncer de cérvix positivas para los tipos HPV-16 y HPV-18 (Gu et al. 2006; Hall y Alexander 2003).

2.12 Entrega de material genético

En terapia génica, la entrega del material genético es el principal obstáculo en la aplicación *in vivo*. A la fecha se han clasificado en base a sus características en virales y no virales, y dentro de no-virales existen las subclasificaciones orgánicos e inorgánicos.

Estos agentes de entrega génica deben de conferir diversas propiedades entre ellas, la protección del material génico a la degradación por enzimas plasmáticas, poder capturar y entregar el material en el área deseada, tener la capacidad de facilitar la internalización y el escape a degradación por lisosomas (Young et al. 2015).

Los agentes virales de mayor uso han sido los adenovirus, y estos son los mejores agentes de transfección y entrega del material génico, sin embargo, su limitante es mediada por la respuesta inmunológica en contra del virus. En agentes no virales, los agentes inorgánicos son principalmente materiales que los conforman estructuras bien definidas (esferas, fibras y túbulos). Los materiales más frecuentemente empleados son metales (oro y hierro), óxidos de metales (óxido de hierro) y estructuras de carbón. Estos no son biodegradables y son biopersistentes. Los agentes orgánicos están conformados por moléculas frecuentemente biodegradables y pueden encontrarse de forma natural o realizados de manera sintética tales como: liposomas, nanoemulsiones, dendrimeros y polímeros con carga (Young et al . 2015; Tomalia 2009; Braakhuis et al. 2014) (Figura 7).

Los liposomas son considerados como parte de los nuevos sistemas de transporte y liberación de fármacos que permiten controlar la absorción, concentración plasmática, metabolismo, distribución tisular, así como la captación celular de agentes farmacológicamente activos; además confieren protección de la sustancia activa incrementando la vida media, mejorar el transporte de principios activos para llegar a lugares específicos, aumento en la especificidad de acción y disminución de la toxicidad (Budai y Szógyi 2001).

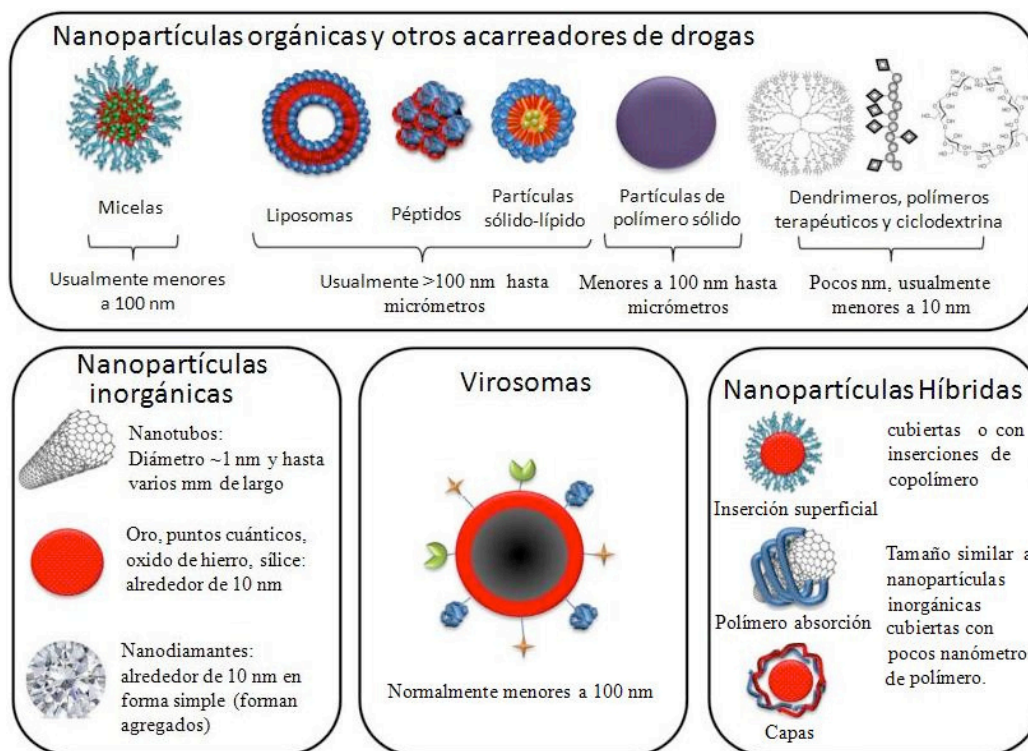


Figura 7. Clasificación de nano partículas y otros acarreadores de drogas.

Los liposomas son vesículas microscópicas constituidas por bicapas de fosfolípidos concéntricas alternando con compartimentos acuosos. En las bicapas, los fosfolípidos se disponen orientados con las cadenas hidrófobas situadas paralelamente entre sí (lo cual constituye una capa) y enfrentadas a las cadenas hidrófobas de la otra capa. De esta forma, se aísla una amplia zona hidrófoba, ya que todas las cabezas polares se hallan en ambos lados, lo cual forma una estructura concéntrica, alterando con compartimentos acuosos. Esta distribución resulta similar a las micelas originadas por la ordenación de las moléculas tensoactivas en medio acuoso, con una importante diferencia: las micelas conforman una esfera cuya cavidad interna puede contener lípidos (por estar en contacto con las cadenas hidrófobas), mientras que la cavidad interna de los liposomas solo contiene agua o una solución acuosa de un principio activo (Gregoriadis. 1988).

Los liposomas poseen una forma, estructura y tamaño diversos, sus dimensiones suelen oscilar entre 0.01 μm y 10 μm . presentando forma esferoide, observándose una sucesión de bandas claras y oscuras, debido a la alternancia entre capas lipídicas y

acuosas. Dada su constitución, tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas (Malam et al. 2009; Drulis-Kawa y Dorotkiewicz-Jach 2010).

El termino de liposomas viene desde los años 60, donde Alec D. Bangham y colaboradores estudiaron el efecto de los fosfolípidos en la coagulación sanguínea, observando que estos al estar dispersos en agua, formaban espontáneamente vesículas multilamelares, las cuales recibieron la denominación de liposomas (Bangham. 1964). Fue esta la primera vez que se concreto la formación artificial de una membrana biológica que coincidía con la teoría presentada por Gorter y Grendel en 1925, las cuales mencionaban que la membrana debía estar conformada por una doble capa de moléculas parcialmente hidrofílica (Gorter y Grendel. 1925).

Solo moléculas anfipáticas (extremo hidrófilo y otro hidrófobo) podían ordenarse en un medio acuoso formando una estructura trilaminar (una zona hidrófoba en el centro y dos zonas hidrofílicas en ambos lados) con capacidad para establecer una compleja permeabilidad selectiva para los componentes moleculares del citoplasma celular (Engelman. 1971).

Singer y Nicolson establecieron en 1972 que la estructura de las membranas biológicas era la de un mosaico fluido, cohesionado por fuerzas de Van der Waals, en la cual los fosfolípidos se ordenan en forma de bicapa, pero incluían en su seno numerosas moléculas todas estas flotaban e incluso desplazarse lateralmente a lo largo de la bicapa, ya que no se establecían enlaces covalentes entre ellas. Esta fluidez es consecuencia de las características de las colas hidrófobas de los fosfolípidos, especialmente de la proporción relativa que existe entre ácidos grasos saturados y no saturados y de la longitud de su cadena. (Singer y Nicolson. 1972)

Destaca el uso de este modelo para el estudio de sistemas bioquímicos, rodeados por membranas. En este sentido, se ha obtenido información sobre algunas de las propiedades básicas referentes a la agregación de las moléculas anfifílicas en

solventes polares, realizándose estudios igualmente relativos a la permeabilidad de las membranas a moléculas, por determinación de coeficientes de partición. Posteriormente, se ha investigado el efecto de diversas sustancias activas (antibióticos poliénicos y esteroides) sobre las características de fluidez de las membranas, mediante el establecimiento de las alteraciones en la permeabilidad de sistemas liposomales (Pecar et al. 1982; Kuczera et al. 1989).

También constituyen un modelo en la elección de la hora de establecer el papel de los lípidos de membranas en la modulación del metabolismo de los medicamentos siendo su composición, carga y presencia de colesterol en las bicapas, factores decisivos que permiten reducir la importancia relativa de factores estructurales y constitucionales de las membranas, al objeto de evidenciar las interacciones entre el mismo medicamento y los fosfolípidos del liposoma, y dilucidar su mecanismo de acción “*in vivo*” (Lichtenberg y Markello. 1984).

Sin embargo, las razones por las cuales se ha abordado el tema, residen en su interés como sistemas de transporte y liberación de fármacos. Los liposomas poseen una arquitectura molecular que les permite captar una variedad de agentes activos, a través de un mecanismo relativamente específico, proporcionando una vía de transporte que lleve al fármaco al lugar de actuación, a concentraciones adecuadas, con objeto de obtener la respuesta farmacológica deseada en condiciones de eficacia y seguridad, de carácter biodegradable, atóxico y no inmunogénico de este sistema de liberación, además, la posibilidad de determinar el lugar de actuación de los liposomas por modificaciones de sus características superficiales, permite optimizar la disposición de las moléculas administradas a receptores específicos restringiendo su área de difusión en el organismo y evitando una distribución innecesaria de las mismas (Gregoriadis et al. 1974; Gregoriadis 1973).

A todo lo anterior, suele ir unida la propiedad de aislar el medicamento del medio durante su paso por el organismo, protegiéndolo de acciones enzimáticas. Igualmente, esta propiedad desempeña la misión de proteger al organismo frente a los efectos

tóxicos derivados de la actuación de ciertos agentes terapéuticos, e incluso impedir las manifestaciones antigénicas de otros (Allison y Gregoriadis 1976).

2.13 Ligandos empleados en terapia dirigida

En la actualidad la aplicación de la terapia génica se ha visto limitada al empleo de sistemas virales y no virales, presentando como primer obstáculo la bioseguridad del organismo. Otros de los principales obstáculos en la aplicación de la terapia génica es la disminución de los complejos terapéuticos por medio del sistema reticular (macrófagos) o a través del hígado y la dirección preferente a células tumorales.

A la fecha, la dirección de los agentes terapéuticos aplicados vía sistémica ha tomado gran importancia. Vías comunes de internalización y el empleo de marcadores de superficie celular son de las principales estrategias de dirección terapéutica. Algunos ejemplos son la expresión del marcador tumoral Her2/neu, el receptor del ácido fólico y el receptor de la transferrina (Licciardi et al. 2006).

2.14 Receptor de la transferrina (CD71)

El hierro es un cofactor requerido de las proteínas hemo y no hemo involucradas en una variedad de procesos celulares tales como el metabolismo, respiración y la síntesis DNA (Ponka y Lok 1999, Richardson y Ponka 1997). El hierro dietético es absorbido principalmente en el intestino. El hierro en la condición férrica (Fe^{3+}) se reduce a la condición ferrosa (Fe^{2+}) en el lumen intestinal, posteriormente como ion ferroso Fe^{2+} es pasado a través del epitelio duodenal por un transportador bivalente de metal denominado Ferroportina, luego está lo exporta a la circulación sanguínea donde es oxidado a Fe^{3+} . Ya en circulación es captado por una familia de proteínas como la ovotransferrina, transferrina (Tf) y lactoferrina, lo cual conducen el hierro hacia las células (Qian et al. 2002). La transferrina es una glicoproteína de 80 kDa conformada por dos subunidades de 40 kDa cada una, conocidas como la N-Lobe y la C-Lobe; cada subunidad es capaz de acarrear un átomo de hierro. La constante de afinidad de la transferrina al momento de tener una molécula de hierro es incrementada 30 veces e incrementa hasta 500 veces cuando se encuentra en forma

diférrica. La transferrina diférrica corresponde del 10 al 30% de la Tf en circulación, permitiendo que la Tf libre se una a otros iones metálicos (Ponka y Lok 1999; Young et al.1984). La síntesis de Tf ocurre primordialmente en hepatocitos y en bajas concentraciones en células de Sertoli, células epidermales y células oligodendrogiales (Gomme, et al. 2005).

Su receptor denominado receptor de la transferrina (TfR) o también llamado CD71 es una glicoproteína transmembranal de tipo II, y es esencialmente involucrada en la ingesta de hierro y la regulación de crecimiento celular (Figura 8).

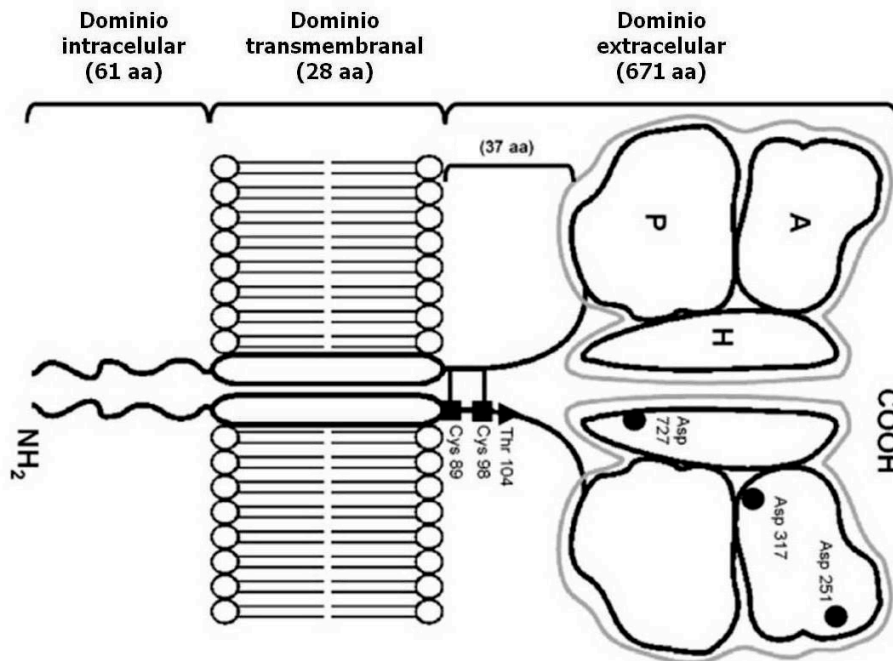


Figura 8 Estructura de los dominios del receptor de la transferrina.

Es constituida como un homodímero de 180 kDa; cada monómero consta de 760 aminoácidos con un peso de 90-95kDa. Contiene 3 dominios, un prominente dominio extracelular de 671 aminoácidos el cual está encargado de la unión con la Tf, un dominio transmembranal de simple paso de 28 aminoácidos y un dominio intracelular en la región amino terminal, el cual consta de 61 aminoácidos. El dominio extracelular contiene 3 sitios de N-glicosilación y uno de tipo O-glicosilación, los cuales son importantes para la correcta función del receptor. El dominio intracelular

contiene un sitio de fosforilación en la serina 24, lo cual no es indispensable para la internalización o reciclo del receptor (Hémadi et al. 2004; Ciechanover et al. 1983).

La regulación del TfR es a través de regulación post-transcripcional en respuesta a las concentraciones de hierro intracelular. Esto es llevado a cabo en la región UTR del TfR, la cual contiene 5 elementos de unión a elementos de respuesta a hierro (IRE). Cada IRE consiste en secuencias de 30 nucleótidos los cuales forman estructuras en forma de asa (loop). Estas regiones IRE son reconocidas por 2 proteínas regulatorias con unión a RNA denominas IRP-1 que es expresada en todas las células. IRP-1 contiene un grupo 4Fe-4s el cual regula su función. En condiciones altas de hierro intracelular el grupo 4Fe-4s es ensamblado en la proteína IRP-1 el cual impide que se una a las regiones IRE's contenidas en el UTR del RNAm del receptor de la transferrina, promoviendo así la degradación del mensajero. En condiciones bajas de hierro intracelular, la proteína IRP-1 queda libre y se une a las regiones IRE's lo cual promueve que sean llevados a traducción del mensajero y que la proteína del receptor de la transferrina sea expuesta al exterior de la célula. Otra de las proteínas involucradas en la regulación es IRP-2, el cual es 61% idéntica a IRP-1. Ambas proteínas comparten el mismo sitio de reconocimiento a IRE's, sin embargo, la unión de IRP-2 promueve la expresión del receptor de la transferrina. La regulación a través de IRP-2 es por medio por la inducción de proteólisis por el hierro. En escases de hierro o condiciones de hipoxia, IRP-2 es estable, y cuando estas condiciones cambian, se hace inestable y es llevada a degradación proteosomal (Ponka y Lok 1999).

El TfR es expresado en niveles bajos en células normales y está expresado en niveles mayores en células con altas tasas de proliferación tales como células de la epidermis basal, células del epitelio intestinal, además, se encuentra expresado en células con baja tasa de proliferación tales como el endotelio vascular en capilares del cerebro, páncreas, túbulos seminíferos en testículos, células de la pituitaria, membrana laminal de las mamas, hepatocitos, células de Kupffer y túbulos en riñones. En sangre periférica los niveles expresión de TfR son incrementados en células mononucleares

tras su activación y en eritrocitos inmaduros, sin embargo, en células eritroides maduras no se expresa (Omary, Trowbridge, y Minowada 1980, Sutherland et al. 1981, Shindelman, Ortmeier, y Sussman 1981). Diversos estudios también han mostrado niveles elevados de expresión del TfR en células de cáncer cuando son comparadas con sus contrapartes normales (Sutherland et al. 1981; Shindelman et al. 1981; Gatter et al. 1983; Taetle. 1990; Prutki et al. 2006; Recht et al. 1990).

En cáncer de mama, se observó que la expresión del TfR puede ser empleada como un marcador de proliferación independiente del estatus hormonal (Tonik et al. 1986; Walker y Day. 1986). En tejido de vejiga, no fue detectada la expresión del TfR en tejido sano, sin embargo, en tejido displásico y carcinomas de vejiga se encontró una relación de la expresión del TfR con el incremento del grado patológico (Seymour et al. 1987). En tejido de cérvico-uterino, se encontró una alta expresión del TfR en tejido displásico y tejido tumoral, pero no en tejido sano (Lloyd et al. 1984). En tumores malignos no sólidos como linfomas, mielomas y leucemias ha sido encontrada una alta expresión del TfR y no en células normales, por lo cual se considera que el receptor de la transferrina está altamente ligado con la proliferación celular y esto puede ser explicado debido a la necesidad de hierro como un cofactor de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en síntesis de DNA de células en división (Daniels et al. 2006).

Otras actividades del TfR han sido poco estudiadas, tales como su posible participación en la función como receptor FC de las inmunoglobulinas IgA descrito por Ivan C Moura y colaboradores (Moura et al. 2001); El receptor de la transferrina puede proveer de un segundo estímulo requerido para la activación de células T, además de estar envuelto en vías de activación independiente de antígeno para la activación de células T (Manger et al. 1986; Cano et al. 1990).

2.15 Vía de internalización del receptor de la transferrina

La forma natural de la internalización del hierro es por medio de la transferrina diférrica, la cual se une al receptor, y ambos son internalizados en vesículas cubiertas con clatrina por medio de endocitosis (Figura 9). Modificaciones en el pH en el interior del endosoma induce cambios conformacionales en la transferrina (Giannetti et al. 2003), los cuales liberan al hierro de la transferrina para después ser dispuesto en el citoplasma; posteriormente el complejo de transferrina-receptor de la transferrina es regresado a la membrana superficial donde es liberada la transferrina fuera de la célula. El proceso de reciclaje de transferrina ha sido estimado en un 10% y es por medio del complejo de Golgi (Ponka y Lok 1999).

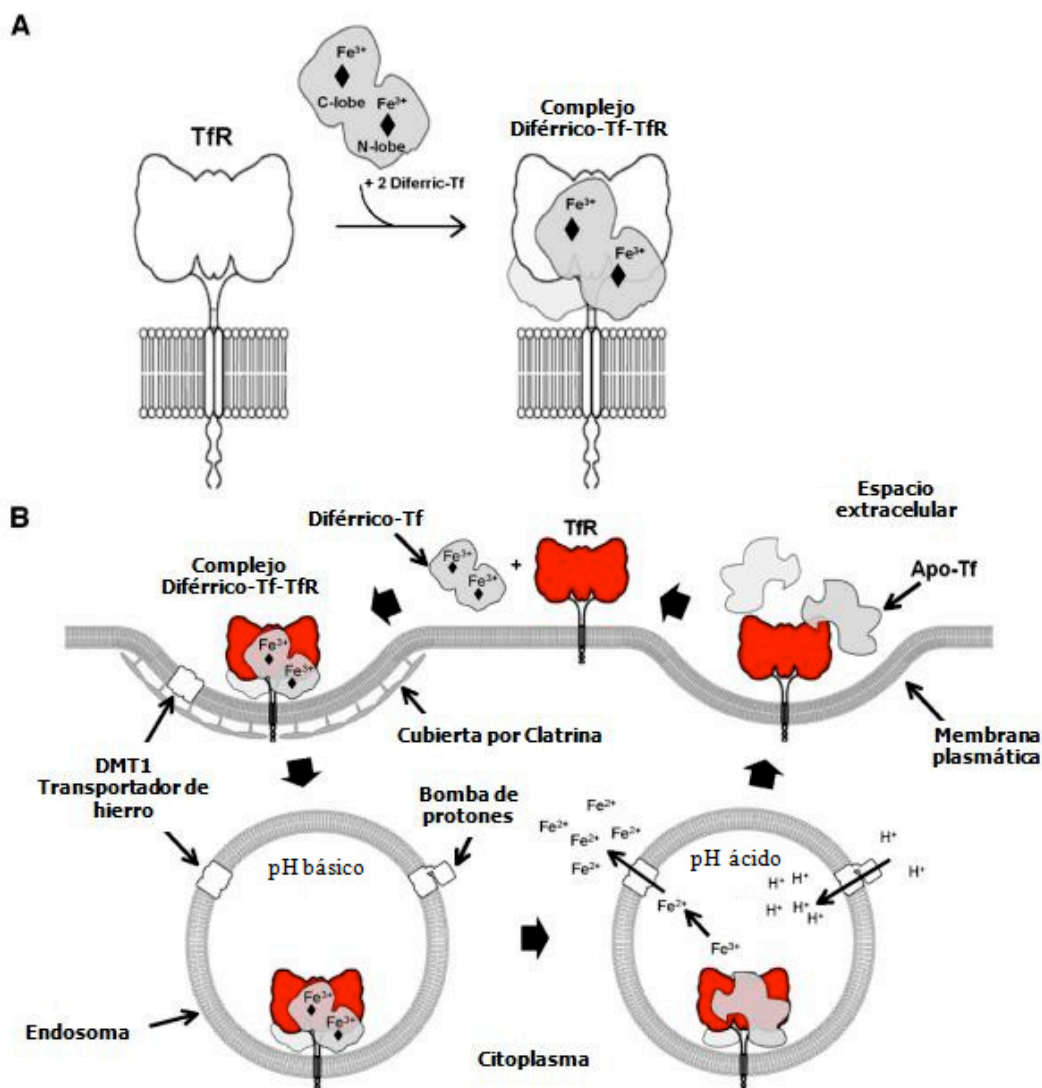


Figura 9. Esquema de la vía de internalización celular del receptor de la transferrina.

Actualmente es usada la vía de internalización del TfR para el acarreo de drogas, toxinas de hongos, toxinas de bacterias y toxinas de plantas. En la internalización puede ser empleada en la transferrina (Tf) o en un anticuerpo que reconozca al TfR. (Daniels et al. 2006)

Debido a incrementos en la expresión del receptor de la transferrina en diversas células tumorales hacen que sea empleado como blanco diana para el desarrollo de tratamientos en cáncer. A la fecha se han desarrollado diversos anticuerpos en contra de distintos sitios de unión, unos compitiendo con el sitio de unión de la transferrina y otros reconociendo sitios aledaños, observándose funciones distintas. (Daniels et al. 2006)

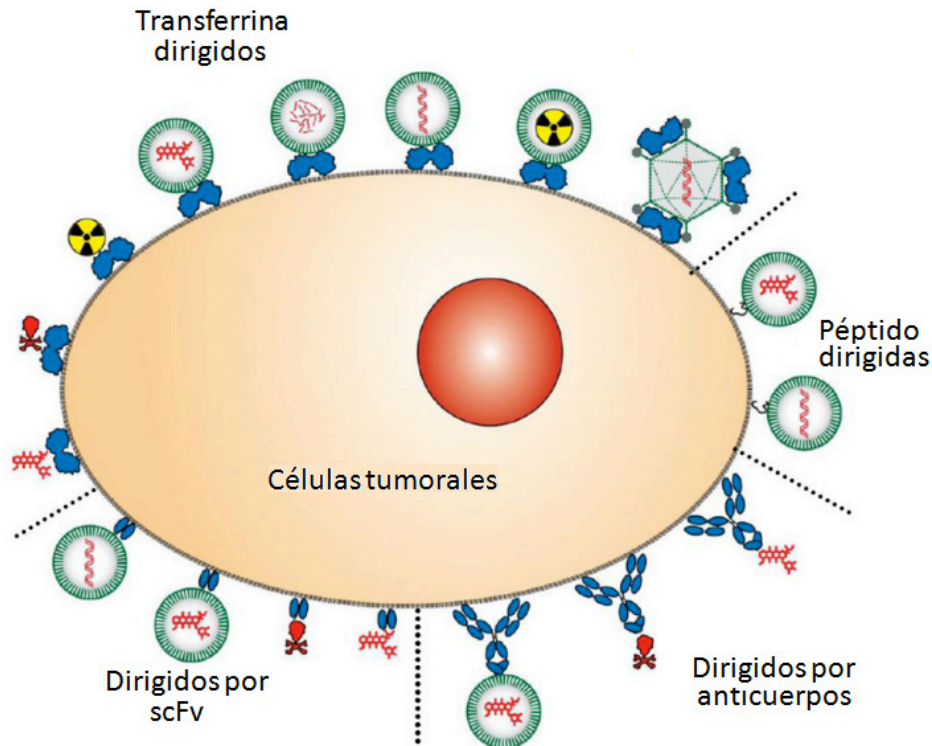


Figura 10. Estrategias de internalización vía receptor de la transferrina.

La propia transferrina también ha sido empleada en diversas estrategias para la liberación de moléculas citotóxicas (Figura 10). Ejemplos de su aplicación en conjunto con moléculas citotóxicas son: La **adriamicina** o mejor conocida como **doxorubicina**, es uno de los fármacos ampliamente estudiados y aplicados en

quimioterapia para cáncer, principalmente leucemias y cáncer de mama. La doxorubicina es una antraciclina anti-cáncer que es capaz de bloquear la síntesis de DNA y bloquear la actividad de la topoisomerasa II (enzima encargada del relajamiento de las cadenas nucleotídicas durante la síntesis de DNA y la transcripción del RNA), sin embargo, sus funciones son limitadas debido a la presentación de resistencia a drogas por las células tumorales, añadiendo los efectos secundarios como toxicidad en corazón, mielosupresión, daño renal y extravasación (Ottewell et al. 2009). La conjugación química entre la doxorubicina y transferrina presentó un incremento 3 a 10 niveles de citotoxicidad en células tumorales humanas tales como la línea Lovo de adenocarcinoma colorectal, la línea HL60 de leucemia, la línea Hep2 de cáncer de hígado, la línea H-MESO-1 de mesotelioma, la línea K562 de leucemia mieloide crónica y la línea HeLa de carcinoma cervical, en comparación a la aplicación de doxorubicina sola (Singh et al. 1998; Berczi et al. 1993; Sun et al. 1992). Además, se observó que en líneas celulares resistentes a la doxorubicina presentaron citotoxicidad al complejo doxorubicina-transferrina (Fritzer et al. 1996); esta sensibilidad fue asociada a que el complejo ofrece una vía alterna de internalización, debido a que la resistencia de las células tumorales a la doxorubicina es asociada al incremento en el secuestro intracelular de la droga y a un decremento en la permeabilidad de la membrana (Wang et al. 2000; Tanaka et al. 2004).

Cisplatin (Platinol-AQ) es un agente alquilante que bloquea la síntesis de DNA, es empleado en diversos tratamientos de cáncer. Complejos de cisplatin-transferrina exhiben inhibición de la proliferación en líneas tumorales de adenocarcinoma y epidermoides (Elliott, Stjernholm, y Elliott 1988). Estudios “*in vivo*” en un modelo de carcinoma mamario en ratas y en un modelo de melanoma murino, se observó que el complejo fue capaz de reducir la masa tumoral en ambos ensayos (Hoshino et al. 1995). Estudios en fase I en pacientes con cáncer de mama avanzado, se observó que el complejo cisplatino-transferrina ofrecía seguridad en el tratamiento y hasta un 36 % de respuesta (4 de 11 pacientes) y uno de ellos presentó respuesta completa. En un segundo ensayo clínico, se observó un incremento en la respuesta de hasta un 87% al

momento de emplear el complejo en combinación con agentes quelantes de hierro (deferroxamina mesilato) (Head et al. 1997).

Chlorambucil (Leukeran) es un agente alquilante que bloquea la síntesis de DNA y es empleado en tratamientos de leucemias, linfomas non-Hodgkin's y en cánceres avanzados de ovario y mama. Ensayos con complejos de chlorambucil-transferrina por medio de uniones maleimida se observó que presentaban mayor citotoxicidad en las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) y MOLT4 (línea de leucemia humana) en comparación a chlorambucil solo (Beyer et al. 1998)

Gemzar también llamado **gemcitabina** es un análogo de pirimidina que bloquea la síntesis de DNA, este fármaco es empleado también en quimioterapias contra cáncer. Conjugaciones químicas con transferrina han incrementado a 6 niveles su respuesta citotóxica en ensayos con las líneas celulares UCRU-BL13 y UCRU-BL28 de cáncer de vejiga (Daniels et al. 2012).

2.16 Conjugación de la transferrina con proteínas tóxicas

Ricina es una proteína altamente tóxica aislada de la planta *Ricinus communis*. Es una proteína inhibidora de ribosomas tipo II compuesta de una cadena A (RTA) y un dominio de unión a células B; la cadena A (RTA) ya en citoplasma inactiva la lectura por los ribosomas, lo cual inhibe la síntesis de proteínas y con ello la inducción de la muerte celular. La proteína sola RTA sin el dominio de unión no presenta efecto tóxico debido a que no se internaliza. La conjugación de la proteína RTA con transferrina fue probada en contra de células CEM de leucemia humana, donde se observó que empleando una concentración 10,000 veces menor se obtenía 50% de citotoxicidad, en comparación con las proteínas por separado. Esta actividad citotóxica fue inhibida al momento de administrar anticuerpos anti- Tf o anti-RTA. Este mismo complejo de RTA-Tf fue analizado en las líneas celulares Daudi y Raji, presentando un menor efecto citotóxico debido a una menor presencia de TfR (Raso y Basala 1984).

La proteína Saporina (SO6) obtenida de *Sapornaria officinalis*, es otra proteína inhibidora de ribosomas debido a que detiene la síntesis de proteínas, la diferencia entre Ricina es que no contiene un dominio de unión, y solo es tóxica al momento de estar en citoplasma. La conjugación con SO6 y Tf presentó toxicidad en las líneas celulares K562 de leucemia humana, HepG2 de hepatocarcinoma humano y en glioblastomas humanos y gliomas aislados de pacientes (Bergamaschi et al. 1988; Ippoliti et al. 1995; Gosselaar et al. 2002).

La toxina de difteria (DT) aislada de *Corynebacterium diphtheriae*, que actúa como inhibidor de la síntesis de proteína uniéndose al factor de elongación-2 de ribosilación del ADP, también ha sido estudiada en conjugación con la Tf, demostrando 10,000 veces más citotoxicidad en comparación a la DT sola, en la línea celular de murino LMTK⁻. Modificaciones en la secuencia de reconocimiento celular en la proteína DT (CRM107), las cuales evitan su unión a la membrana celular, fueron conjugadas con Tf, mostrando citotoxicidad en contra de células de cáncer de mama, neuroblastoma, leucemias y cáncer de ovario. Estudios en fase I en pacientes con tumores cerebrales, el complejo CRM107-Tf mostró respuesta con más de 50 % de reducción del tumor en 9 de 15 pacientes, dos de estos pacientes tuvieron reducción completa y uno de ellos no presentó regresión en al menos 23 meses posteriores de haber recibido tratamiento (Laske et al. 1997).

2.17 Aplicación de transferrina en terapia génica.

La conjugación de Tf con moléculas catiónicas ha sido empleada para la entrega de material génico en células tumorales. Las moléculas policatiónicas mayormente empleadas han sido la PEI y polilisina. La conjugación con Tf ha demostrado tener la capacidad para la internalización de material génico, incluyendo estudios donde solo se mezcla la Tf y no se realiza alguna unión específica. Las conjugaciones comúnmente realizadas son por medio de grupos intercalamiento en grupos Maleimida o en uniones a carbohidratos (Cotten et al. 1990; Wagner et al. 1991; Taxman et al. 1993; Sato et al. 2000).

Trabajos recientes empleando distintas formulaciones de lípidos han mostrado tener ventajas y desventajas en su aplicación. Ejemplo de ello, es observado en un trabajo donde emplearon liposomas catiónicos conteniendo un plásmido codificante para p53 mezclados con transferrina, en un modelo “*in vivo*” con aplicación subcutánea de células de sarcoma humano HOSM-1 en ratones desnudos. Múltiples aplicaciones del tratamiento alrededor del tumor mostraron una reducción tumoral del 90%, en comparación al grupo de ratones tratados con solución salina, sin embargo, a pesar de obtener buenos resultados, su aplicación vía local continúa siendo una limitante ya que reduce su aplicación para atacar tumores superficialmente, y esto es debido al uso de fosfolípidos con carga (Nakase et al. 2005).

Conjugaciones químicas de Tf con polilisina a través de puentes disulfuro o uniones a carbohidratos incrementan la transfección del gen de la luciferasa en células K562. La unión por medio de grupo Maleimida incremento 10 veces la transfección en líneas celulares leucémicas murinas (F-MEL y J2E) comparado con los métodos de transfección habitual. A la fecha son variadas las estrategias del empleo de polilisina acopladas a Tf con la finalidad de transfección celular (Wagner et al. 1991; Taxman et al. 1993; Cotten et al. 1990; Zatloukal et al. 1992).

El implemento de péptidos virales unidos a complejos de Polilisina-Tf han mejorado significativamente la eficiencia de transfección, esto fue observado en un trabajo, donde intercalaron la sub-unidad de hemaglutinina HA-2 del virus de la influenza, ya que este péptido a demostrado estar involucrado en la destrucción de membranas lipídicas. En este trabajo se demostró que la mejora en la eficiencia de transfección, fue debido al empleo de este péptido el cual promovía la lisis vesicular y con ello la entrega del ácido nucleico en el interior de la célula (Wagner et al. 1992; Plank et al. 1994). El intercalamiento de PEI a Tf ha sido también objeto de estudio, debido a que diversos trabajos han demostrado tener eficiencias de transfección similares a las obtenidas por adenovirus. Esta metodología fue implementada al igual en un modelo “*in vivo*” de melanoma murino, donde se llevo a cabo su aplicación vía intratumoral, obteniéndose un incremento de 8 a 1 veces los niveles de expresión del transgen IL2

en comparación contra su contra parte de PEI-DNA sin transferrina. Además, el intercalamiento de PEG al complejo PEI-Tf-DNA incremento su vida media en circulación. Esta conjunción llevo a presentar menor toxicidad y selectividad de respuesta en contra de tumores originados a partir de las líneas Neuro2A de neuroblastoma murino y M3 de melanoma murino desarrollados subcutáneamente en animales singénicos (Wightman et al. 1999; Ogris et al. 1999; Kircheis et al. 1999).

En otro trabajo, donde se entrega TNF α , la cual es una potente citocina con propiedades antitumorales, fue administrada acomplejando PEI-TNF α el cual fue administrado vía intravenosa en ratones, donde se observó un incremento específico en tumor del transgen TNF α y no observándose expresión en suero, conllevando a una reducción tumoral de Neuro2A de neuroblastoma murino, M3 de melanoma murino y MethA de fibrosarcoma murino (Kircheis et al. 2002; Kursa et al. 2003).

Otro trabajo en donde se emplea PEI unido a Tf para transfectar un shRNA dirigido en contra de HIF-1 α , ya que HIF-1 α es altamente expresado en condiciones deficientes de oxígeno y esta proteína juega un importante papel en la angiogénesis, metabolismo de la glucosa y supervivencia tumoral. Los resultados de este trabajo mostraron que con una simple inyección del complejo de Tf-PEI-shRNA específico contra HIF-1 α fue capaz de reducir ocho niveles el crecimiento de tumores de melanoma implantados en ratones desnudos en comparación al tratamiento con Tf-PEI-shRNA inespecífico (control negativo) (Liu et al. 2009; Koh et al. 2010).

Otra modalidad de administración fue empleando Tf acomplejada a biotina. El complejo fue mezclado con avidina y complejos de PEI biotinilada acarreando un plásmido codificante para p53. Este complejo fue analizado “*in vitro*”, demostrando tener capacidades de transfectar células tumorales que tienen una alta expresión del receptor de la transferrina y no a células que presentan niveles bajos de receptor. Posteriormente empleando esta misma modalidad fue transfectado un plásmido codificante de GFP, observándose una distribución en diversos tejidos, sin embargo, al tercer día fue observada exclusivamente en tumores y esta se mantuvo sostenida hasta el séptimo día post-inoculación (Zeng et al. 2010; Sato et al. 2000).

2.18 Liposomas anclados a Tf o anticuerpos de reconocimiento al TfR

A la fecha existen diversos estudios donde se han marcado liposomas con transferrina conteniendo moléculas en contra del cáncer, tales ejemplos son: liposomas conteniendo doxorubicina y marcados con Tf, los cuales demostraron tener efecto en contra de células de cáncer de colon murino 26 tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. Esta formulación ha demostrado incrementar el tiempo en circulación presentando una baja eliminación por el sistema reticuloendotelial (RES), además de potenciar la internalización de la droga en células malignas. Además, se llegó a concluir que la vía de internalización y liberación citoplasmática fue mediada vía endocitosis (Ishida et al. 2001).

Uno de los mayores problemas de la quimioterapia es la presencia de genes involucrados con la resistencia a drogas. Uno de los genes involucrados es PGP (glicoproteína-P) que es una bomba de salida la cual se encarga de purgar moléculas tóxicas en la célula. Una estrategia fue emplear un inhibidor de PGP llamado **verapamil** y adicionando doxorubicina en la misma formulación de liposomas marcados con Tf. Los resultados demostraron una alta eficiencia de transfección en la línea celular de leucemia crónica humana K562, en donde fue ocupada una menor cantidad de doxorubicina para inducir mayor daño citotóxico (Wu et al. 2007).

Cisplatino es otra de las moléculas incorporadas en liposomas dirigidos por Tf. Su efectividad fue evaluada en un modelo de ratón de diseminación peritoneal de células de cáncer gástrico humano MKN45P, donde el complejo llegó a demostrar que podía internalizar altas cantidades de cisplatino en la célula tumoral, con ello se observó un incremento en la supervivencia del ratón en comparación a los grupos de ratones tratados con complejos sin marcaje de Tf (Xu et al. 2011).

Por otra parte, existen diversos estudios donde han analizado liposomas marcados con Tf y conteniendo material genético. Ejemplo de ello, fue un trabajo donde se introdujo un plásmido que codifica para la proteína p53, donde la estrategia a seguir fue de remplazar el gen defectuoso en un modelo vivo con la línea celular tumoral humana DU145 (carcinoma de cabeza y cuello) (Nakase et al. 2009). En otro estudio

fueron analizados liposomas marcados con transferrina conteniendo oligo-antisentido específicos en contra Bcl-2, los cuales resultaron ser efectivos contra células de leucemia humana K562 “*in vitro*” así como “*in vivo*” (Chiu et al. 2006; Zhang et al. 2009).

Otras formulaciones donde se emplean primordialmente fosfolípidos catiónicos han demostrado ser altamente eficientes en la captura de DNA terapéutico y ser buenos agentes de transfección de células en ensayos “*in vitro*”, sin embargo, al momento de llevar estos estudios a modelos “*in vivo*”, pierden especificidad y bajos niveles de transfección (Xu et al. 2001). Debido a ello, nuevas formulaciones conteniendo fosfolípidos neutros ha ayudado mejorar su actividad, además, se han diseñado fracciones de anticuerpos (scFv; fracción variable de cadena sencilla de anticuerpo) que reconocen al receptor de la transferrina, los cuales, al momento de ser incorporados en los liposomas, reducen el tamaño del complejo, mejorando así su capacidad de penetración a tumores sólidos (Xu et al. 2001; Xu et al. 2002; Yu et al. 2004).

A la fecha, existen pocos ensayos en fases clínicas de liposomas dirigidos por Tf o anticuerpos que reconocen al receptor de la transferrina. MBP-426 es un liposoma conjugado con transferrina que entrega oxaliplatino. Este complejo fue sometido en un ensayo clínico el cual ya fue concluido en el año 2006 (NCT00355888) y en el 2009 se iniciaron ensayos clínicos en fase Ib/II, como tratamiento de segunda línea para el tratamiento de pacientes con cáncer gástrico, cáncer gástrico-esofágico y adenocarcinoma esofágico [2009, NCT00964080]. Otro complejo en estudio es SGT-53 el cual es un inmunoliposoma dirigido por scFv que reconocen al receptor de la transferrina y contiene encapsulado un plásmido codificante para la proteína p53, este anterior ensayo se encuentra en fase clínica I [2007, NCT0040613].

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a los resultados favorables del empleo de complejos PEI-RNA interferencia en contra de *wtl* en ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*”, es conveniente seguir trabajando con el RNAi buscando su evaluación en administración vía sistémica. Como antecedentes, un trabajo previo a este, donde fue analizado la aplicación de un complejo PEI-plásmido codificante para un RNA de interferencia en contra de *wtl*, administrado vía aerosol, en pulmones de ratones con metástasis de melanoma, donde se obtuvo como resultado una significativa reducción tumoral, y esto debido al silenciamiento del gen *wtl*, sin embargo, su limitación de aplicación para atacar células tumorales, es que actúa exclusivamente contra tumores alojados en pulmón y no con tumores alojados en otros órganos. Debido a ello, en este trabajo se emplearán las propiedades de aplicación sistémica de los liposomas estéricos, con la finalidad de incrementar su vida media en circulación sanguínea, además, se empleará el anclaje de la proteína de la transferrina, la cual se ligará en la superficie de los liposomas con la finalidad de conferirle dirección. Su aplicación será vía sistémica en un modelo de implantación subcutánea de células de melanoma B16F10 en ratones C57BL/6, esperando reducir la masa tumoral por medio del silenciamiento de *wtl*.

4. HIPÓTESIS

El complejo liposoma estérico dirigido con transferrina y conteniendo un plásmido codificante para un RNAi en contra de *w1* es capaz de disminuir la proliferación “*in vitro*” e *in vivo*, del melanoma murino B16F10.

5. OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de la administración del complejo liposoma estérico dirigido con transferrina conteniendo un plásmido codificante para un RNAi en contra de *wt1* sobre las células de melanoma murino B16F10 “*in vitro*” y en un modelo “*in vivo*”

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

“*in vitro*”

- Determinar el tamaño e índice de polidispersión del complejo liposoma estérico dirigido con transferrina conteniendo un plásmido codificante para un RNAi en contra de *wt1*.
- Determinar la expresión del receptor de la transferrina y *wt1* en la línea celular B16F10.
- Determinar la DL₅₀ del complejo liposoma estérico dirigido con transferrina conteniendo un plásmido codificante para un RNAi en contra de *wt1* en células de melanoma murino B16F10.

“*in vivo*”

- Evaluar la reducción tumoral, tras la administración del complejo liposoma estérico dirigido con transferrina conteniendo un plásmido codificante para un RNAi en contra de *wt1* aplicado vía intravenosa.
- Determinar la supervivencia en los grupos de ratones tratados con el complejo liposoma+RNAi+Tf, Liposoma+RNAi, liposomas+GFP+Tf y control sin tratamiento tras la implantación del tumor.
- Determinar la expresión del gen *wt1* en muestras de tejido de los grupos de ratones tratados.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

A continuación, se presenta el diagrama de flujo de la preparación de los liposomas estéricos dirigido con transferrina conteniendo un plásmido codificante para un RNAi en contra de *wtl* (Figura 11). Esquema del diseño experimental de los ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*” (Figura 12)

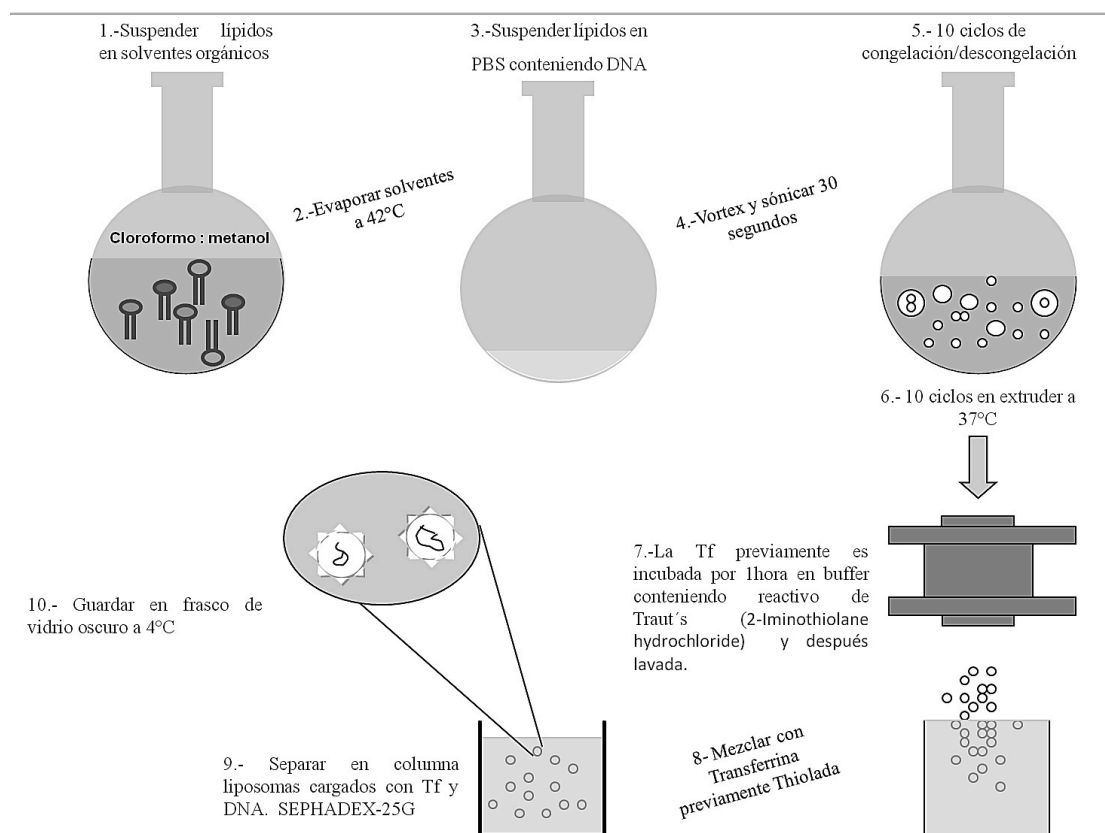


Figura 11. Producción de liposomas por medio de la técnica de congelación-descongelación.

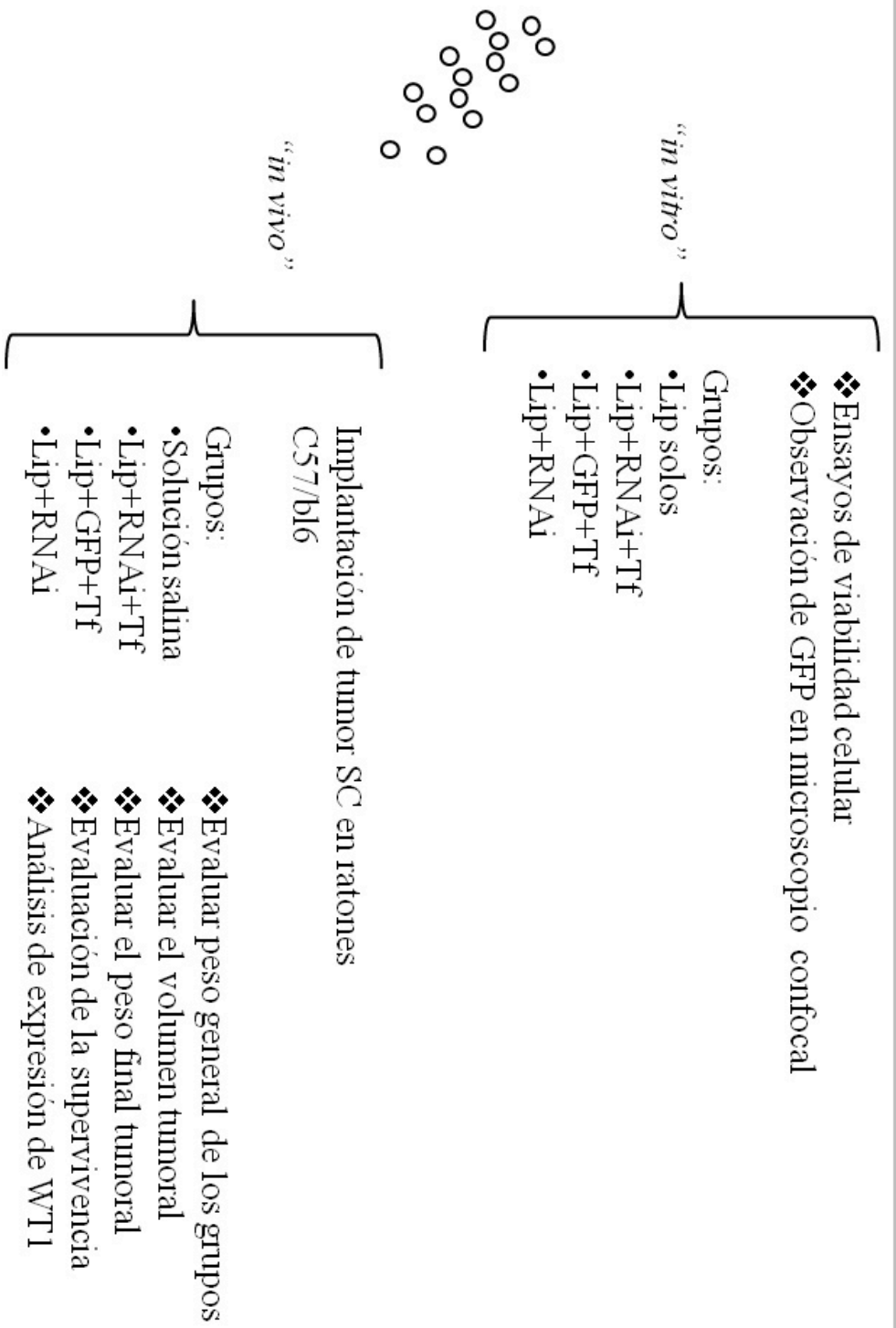


Figura 12. Diagrama experimental de los ensayos “in vitro” e “in vivo”

6.2 Cultivo Celular

La línea celular B16F10 fue obtenida del ATCC (American Type Culture Collection, Manassas VA). La línea celular fue propagada en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) e incubada en 5% de CO₂ a 37 ° C.

6.3 Viabilidad celular determinada por la técnica de MTT

Para los ensayos de proliferación celular fueron sembradas 6×10^3 células en pozos de placa de 96 pozos, posteriormente a las 24 horas de incubación, fueron retirados los 100 μ L de medio y fueron agregados 100 μ L de medio DMEM/F12 con y sin SFB el cual contenía las concentraciones de los complejos lipídicos, después de 4 horas de incubación fueron agregados 100 μ L de medio DMEM/F12 con 20% de SFB cuando las células fueron incubadas en medio sin SFB. Las lecturas de la proliferación se realizaron posteriormente a las 48 horas por medio de la técnica de MTT

El ensayo de proliferación se realizó por medio de la cuantificación colorimétrica de la reducción. El MTT es una sal de tetrasolium utilizada en ensayos de sensibilidad calorimétrica, esta sal es tomada por las mitocondrias de las células en la cadena transportadora de electrones, éste proceso convierte a las sales en compuestos de formazan cuya absorbancia se mide a 570 nm para MTT.

Para realizar la técnica fue preparada una solución de 5 mg/mL en PBS estéril, posteriormente fueron agregados 20 μ L de la solución a cada pozo y la placa fue incubada a 37° C por alrededor de 45 minutos, posteriormente, se observó la formación de sales en el fondo del pozo y se procedió a retirar cuidadosamente el medio por inversión, después las sales fueron disueltas en 200 μ L de DMSO para posteriormente ser leídas en el lector de placas a 570 nm. Los ensayos se realizarán por triplicado y se graficarán incluyendo la desviación estándar.

6.4 Western blot

Para la obtención de proteínas y ácidos nucleicos fueron sembradas 5×10^4 células en pozos de placa de 6 pozos, posterior a las 24 horas de incubación, fue removido el medio de cultivo y fue agregado medio DMEM/F12 sin SFB conteniendo las concentraciones de complejos lipídicos. Después las células fueron incubadas durante 4 horas a 37°C con 5 % CO_2 ; después de las 5 horas fue agregado 1 mL de DMEM/F12 con 20% de SFB. Las células fueron incubadas por 24, 48 y 72 horas a 37°C con 5 % CO_2 . Las extracciones de proteínas y ácidos nucleicos se realizaron a las 48 horas de tratamiento.

Los paquetes celulares fueron suspendidos en 100 μL de buffer de lisis (Tritón 1%, 150mM NaCl, Tris 25mM, pH 7.6) y fueron incubados en hielo por 30 minutos. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 7,500 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo estéril y fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

La concentración de proteínas se determinó empleando el Kit Bio-Rad DC Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregó 1 μL de solución A y 20 μL de solución S a cada pozo de la placa de 96; posteriormente se agregaron 3 μL de la muestra al pozo para después agregar 177 μL de reactivo B e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente; pasando los 10 minutos de incubación la placa fue leída en un lector de placas a una longitud de 595 nm. Como referencia se incluyeron estándares de proteínas empleando el kit Quick Start Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set (Bio-Rad, USA).

Se tomaron 50 μg de proteína total y se desnaturalizaron en buffer de carga que contiene SDS y β -mercaptoentanol, se colocaron a 95°C por 5 minutos y después se cargaron en geles de acrilamida-SDS page al 12%, donde se corrieron a 40 volts por 20 minutos y posteriormente se incrementó el voltaje a 100 volts por 90 minutos, después se procedió a transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa usando un casete de transferencia de proteínas en condiciones de 25 volts por 2.5

horas, finalizando con la transferencia de proteínas se continuó con el bloqueo de la membrana con una solución de TBS con leche al 5 % y tween al 5 % por una hora.

Para la inmuno-detección fueron empleados los siguientes anticuerpos primarios: C-19 anti-WT1 policlonal (Santa Cruz Biotechnology) y GAPDH monoclonal (Sigma-Aldrich); y como segundos anticuerpos se emplearon anti-ratón y anti-conejo proveídos por BIORAD; para su detección se empleó el Kit de quimioluminiscencia de Roche y los resultados se visualizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.5 Citometría de Flujo.

Para el análisis de la expresión del receptor de la transferrina se realizó un ensayo de citometría empleando el anticuerpo anti-ratón CD71 marcado con FITC. Fueron tomadas 1×10^6 y suspendidas en 200 μ L de buffer PBS, posteriormente se le adicionaron 4 μ L del anticuerpo anti-CD71 y se dejó incubar por media hora en oscuridad y a 4° C, posteriormente las células fueron colectadas por medio de centrifugación a 1600 rpm x 10 minutos a 4°C, después la pastilla celular fue lavada 2 veces empleando 500 μ L de buffer PBS y finalmente las células fueron suspendidas en 200 μ L de buffer PBS para su lectura en BD Accuri C6.

6.6 Extracción de RNA total y síntesis de cadena de DNA complementaria.

El RNA total de tejido tumoral se aisló usando 1 mL de reactivo Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 50 mg de tejido tumoral fueron colectados, posteriormente fueron congelados con nitrógeno líquido y macerados en un mortero empleando un pistilo, después fue agregado 1 mL de Trizol y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, después se tomó la muestra y se depositó en un tubo nuevo estéril de 1.5 mL, después fueron agregados 200 μ L de cloroformo y homogenizó con la muestra, después el tubo fue centrifugado a 12,000 rpm por 10 minutos a 4° C, posteriormente se observaron dos fases y una interfase. La fase acuosa fue tomada cuidadosamente y se depositó en un tubo fresco; al tubo conteniendo la fase acuosa le fueron agregados

500 μL de isopropanol y después fue centrifugado a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, después, se decantó y se lavó la pastilla formada con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente se decantó el tubo por inversión y se dejó secar a temperatura ambiente.

La pastilla conteniendo el RNA se disolvió en agua DEPC y fue cuantificado en espectrofotometría a 260-280 nm. El DNAc se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Se usaron 5 μg de RNA total, 1 μL de oligo (dT-12-18 [0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]), 1 μL de una mezcla de dNTP's (10mM) y se adicionó agua-DEPC hasta alcanzar un volumen de 12 μL , la reacción fue incubada a 65°C por 5 minutos. Después de este tiempo se pasaron las reacciones a hielo para continuar adicionando 4 μL de buffer 5X, 2 μL de DTT (0.1 M) y 1 μL de inhibidor de RNAsa; después la reacción se incubó a 42°C por 2 minutos y adicionó 1 μL de Superscript II (200 unidades/ μL); la mezcla final se incubó a 42°C por 50 minutos y posteriormente se inactivó a 70 °C por 15 minutos. El DNAc fue almacenado a -20°C hasta su uso.

6.7 Reacción de PCR cuantitativo.

Para la cuantificación de la expresión del gen *wt1* fue montado por medio de PCR en Tiempo Real múltiple empleando sondas Taqman. Las reacciones fueron realizadas por triplicado empleando 10 μL de buffer 2X Universal PCR Master Mix (Roche Branchburg, New Jersey USA), 1 μL de la mezcla de primers y sonda Taqman para la detección del gen *wt1* marcado con FAM y 1 μL de la mezcla de primers y sonda Taqman para β -actina marcado con VIC (proveído por Applied Biosystems), 2 μL de DNAc aforando con agua hasta 20 μL para cada reacción. Para realizar la cuantificación fue empleado el método de Livak (Livak y Schmittgen. 2001).

6.8 Estructura del vector

Map of pGSH1-GFP: 5318 bps, Circular DNA

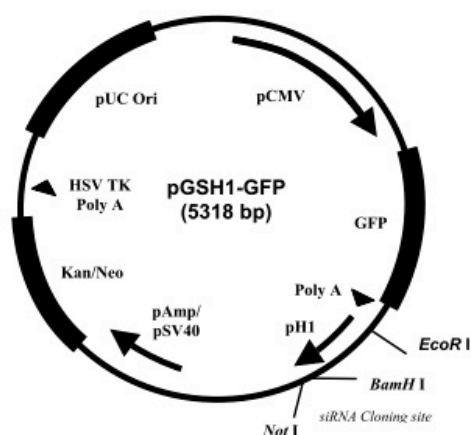


Figura 13. Estructura del vector

Tabla 4.- Elementos del Vector

Elemento	Inicio – Termino	Descripción
pCMV	59-808	Secuencia del promotor de CMV
GFP	843-1500	Secuencia del gen codificante GFP
Poly A	1572-1801	Paro de la transcripción y secuencia de poliadenilación
pH1 promotor	1808-1900	Secuencia del promotor H1 RNA polimerasa III
pAMP/pSV40	2689-3030	Promotores de ampicilina y SV40 (en tándem)
Kan/Neo	3152-3942	Secuencia de los genes de resistencia a la kamanicina y neomicina
HSV TK Poly A	4182-4200	Secuencia señal de poliadenilación de la Timidina-quinasa de HSV
pUC Ori	4531-5174	Secuencia del origen de replicación pUC

6.9 Secuencia codificante para el RNA de interferencia

El plásmido recombinante empleado contiene la siguiente secuencia nucleotídica (sentido y antisentido) que codifican para el RNAi dirigido contra *wt1*:

WT1-1: 5'-GATCCGGCTGTCCCACTTACAGATGGAAGCTTGCATCTGTAAGTGGGACAGCTTTTTTGAAG -3',
3'-GCCGACAGGGTGAATGTCTACCTTCGAACGTAGACATTCACCCTGTCGAAAAACCTTCGCCGG-5'

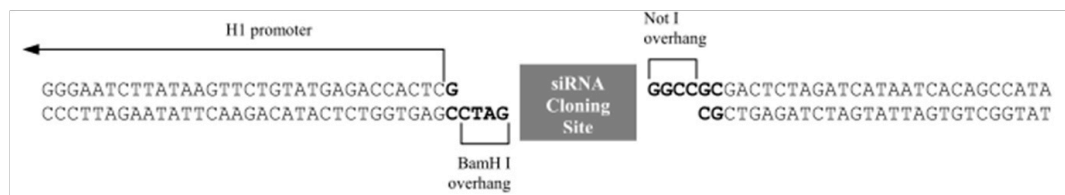


Figura14. Secuencia de inserción

Estas secuencias fueron insertadas en el plásmido pGSH1-GFP para generar el plásmido recombinante *wtl-1*; Posteriormente fueron transformadas bacterias calcio-competentes, de las cuales fueron seleccionadas las clonas positivas y se procedió a inocular en 500 mL de caldo LB para realizar la extracción a mediana escala utilizando el kit comercial de QUIAGEN (Zamora-Avila et al. 2007). (Figuras 13, 14 y Tabla 4)

6.10 Preparación de liposomas.

Para la preparación de los liposomas estéricos fueron empleados los siguientes lípidos POPC, DDAB, DSPE-PEG (2000) y DSPE-PEG (2000)-Maleimida proveídos por Avanti Polar Lipids USA, en las siguientes concentraciones: POPC 19.2 μmol , DDAB 0.2 μmol , DSPE-PEG 2000 0.6 μmol y DSPE-PEG 2000-maleimide 30 nmol, la mezcla fue suspendida en cloroformo:metanol relación 2:1 en un volumen total de 3 mL, posteriormente los solventes fueron evaporados empleando gas nitrógeno. Después de evaporados los solventes se dio pie a la formación de una delgada capa sobre el matraz, posteriormente fueron suspendidos en 0.2 mL de buffer PBS conteniendo 200 μg de DNA plasmídico; después la mezcla fue agitada vigorosamente en vortex por 2 minutos y sonicada por 5 periodos de 30 segundos, posteriormente la mezcla fue pasada por 10 ciclos de congelación y atemperación a 40°C (4 minutos en congelación y 2 minutos en incubación a 40°C por 2 minutos). El ajuste del tamaño de los liposomas fue realizado empleando membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm, las cuales fueron acopladas en el extruder; los liposomas fueron pasados 10 veces a través de la membrana; terminando el proceso, los liposomas fueron guardados a 4° C en oscuridad. Para eliminar el DNA no incorporado fue empleado 10 U de endonucleasa I y 5 mM de Mg_2Cl , la mezcla fue incubada por 1 hora a 37°C. Terminado el proceso los liposomas fueron analizados por medio del Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments.

Para el anclaje de la transferrina murina fue realizado un protocolo con un exceso de 40 veces más de proteína en relación al DSPE-PEG (2000) MAL. Para activar los grupos thiol a la proteína se realizó haciendo uso del reactivo de Traut's en relación

molar de 400 moles más suspendidos en 100 μ L de buffer EDTA-boratos pH 8.5 (borato de sodio al 0.15 M y EDTA al 0.1 mM), la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 2 horas en movimiento y en oscuridad, para posteriormente separar la proteína por medio de ultrafiltración en columnas de AMICON de tamaño de corte de 10 kDa a 16000g por 10 minutos y concentradas en 50 μ L de buffer PBS. Inmediatamente después, las proteínas fueron mezcladas con los liposomas conteniendo al grupo maleimida del fosfolípido DSPE-PEG (2000) MAL, y para llevar a cabo en entrecruzamiento, fueron incubados a 4° C toda la noche (16 horas). Para la separación de las moléculas de proteína acopladas a los liposomas fue llevado a cabo por medio de diálisis empleando una membrana de 50 kDa.

6.11 Modelo de melanoma murino

5 x10⁶ células B16F10 de melanoma murino suspendidas en medio DMEM F12 sin SFB fueron inoculadas vía sub-cutánea en la extremidad posterior de ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas. Para el ensayo se generaron 2 grupos inoculados, los cuales un grupo fue tratado con los complejos de liposomas y otro sin tratamiento, ambos grupos fueron mantenidos en condiciones de ciclos de iluminación de 12 horas diarias de luz, con libre acceso al alimento y al agua. Al día 4, posterior a la inoculación de las células, el grupo de ratones con tratamiento fueron inyectados con 50 μ L del complejo vía intravenosa por la vena del tallo de la cola y posteriormente cada 5 días, fue aplicado el tratamiento hasta llegar a 29 días. Posteriormente los ratones fueron sacrificados el día 30 para la colección y pesaje de los tumores. Para el ensayo de supervivencia fueron tomados en cuenta los datos de la fecha de muerte de los ratones previo al día 30.

6.12 Análisis estadísticos

Todos los resultados del volumen, peso general y peso tumoral fueron analizados mediante ANOVA (SPSS versión 17.0.) y la comparación de medias fue mediante Dunnett, los resultados el análisis de supervivencia fueron analizados por medio del análisis Kaplan-Meier.

7. RESULTADOS

7.1 Tamaño e índice de dispersión del complejo Lip+RNAi+Tf

La formulación que ofreció las características requeridas para este trabajo fueron establecidas empleando los siguientes reactivos (Ver tabla 5):

Tabla 5. Características de los reactivos empleados en la formulación del liposoma

nombre del reactivo	concentración	%	Función	Carga
POPC palmitoil-oleil-fosfatidilcolina	19.2 μ mol	96	estructural	Neutro
DDAB Bromuro de dimetil-dioctadecil-Amonio	0.2 μ mol	1	encapsular al DNA	+
DSPE-PEG2000 diasteroil-glicerol-fosfatidil-etanolamina polietilenglicol 2000	0.6 μ mol	3	Estérico	Neutro
DSPE-PEG2000-MAL Diasteroil-glicerol-fosfatidil-etanolamina polietilenglicol 2000 maleimida	30 nmol	<1	Estérico y unión a proteína	Neutro

El porcentaje de incorporación calculado fue estimado entre 50 y 60% el cual fue cuantificado en Nanodrop 2000. El tamaño promedio obtenido de liposoma fue de 86 nm antes y después de incorporar la transferrina, con un índice de dispersión de 0.154, indicando homogeneidad de tamaño del liposoma. La incorporación de la transferrina se realizó por una reacción previamente mencionada en la sección 6.10 *Preparación de liposomas* de Material y Método donde se describe la activación de grupos thiol (-SH) en la transferrina y estos posteriormente reaccionan con el grupo imida. Su unión no modifico en tamaño ni homogeneidad en la formulación de liposomas (Figura 15).

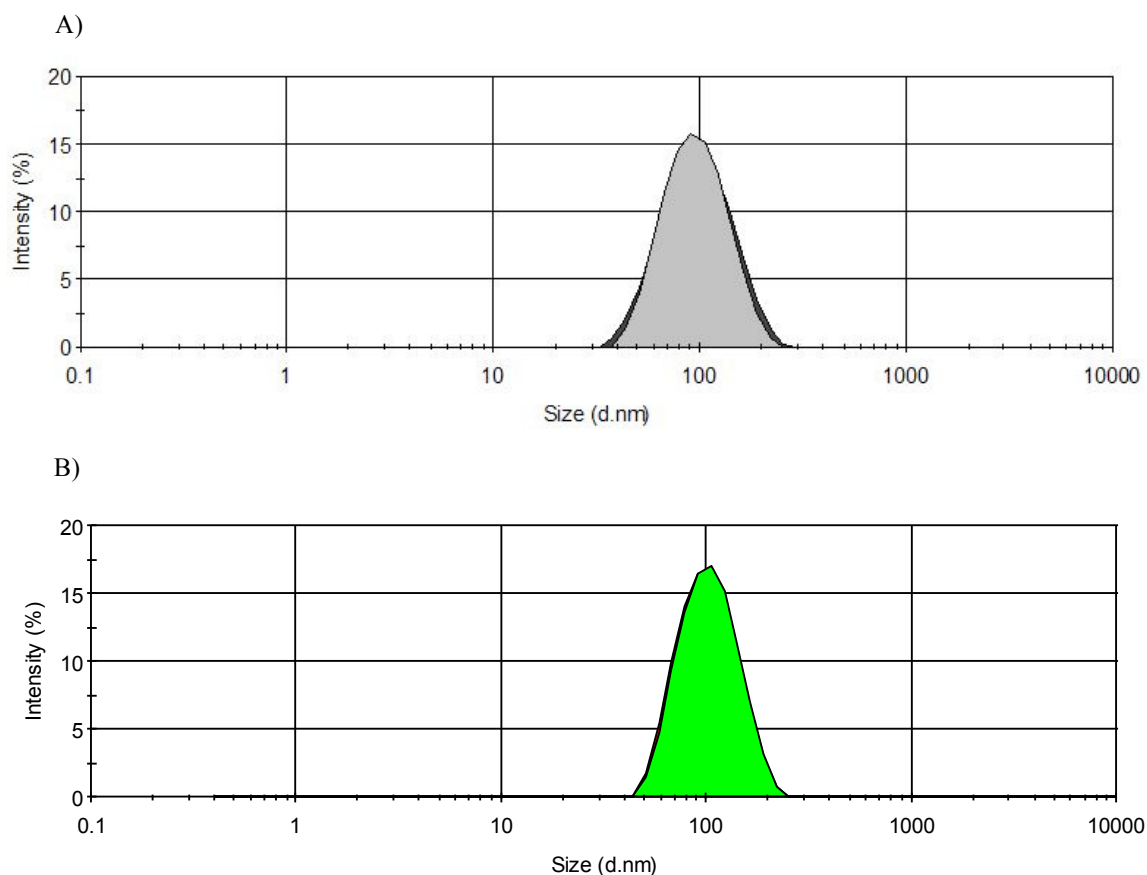


Figura 15. Distribución del tamaño y homogeneidad del complejo Liposomal. A) Evaluación por dispersión de luz dinámica (DLS) del tamaño de partícula del complejo liposomal sin la incorporación de la transferrina y B) Evaluación por dispersión de luz dinámica (DLS) del tamaño de partícula del complejo liposomal con la incorporación de la transferrina. Ambos gráficos son representativos y fueron obtenidos en el equipo Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments. Para la lectura se tomaron 50 μL del formulado y fueron suspendidos en 950 μL de buffer de fosfatos pH 7. La gráfica es representativa de las lecturas realizadas. En el grafico se muestra el porcentaje de intensidad en relación al tamaño (diámetro del complejo) expresado en nm.

7.2 Expresión de WT1 y del receptor de la transferrina en la línea celular B16F10

Con la finalidad de corroborar si las células de melanoma B16F10 expresaban la proteína del receptor de la transferrina y WT1, un análisis mediante western blot demostró la presencia de ambas proteínas en la línea celular (Figura 16 a), la determinación de la expresión del receptor de la transferrina fue confirmada mediante citometría de flujo, encontrando un 87.7 % de expresión de este receptor en las células de melanoma (Ver Figura 16 b).

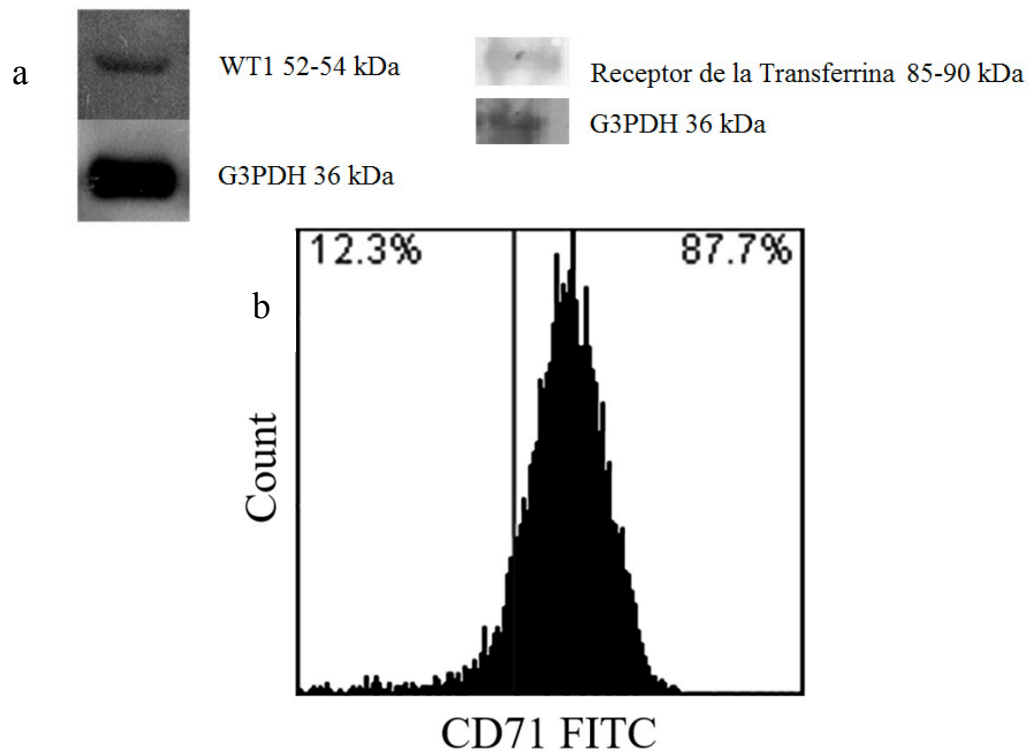


Figura 16. Expresión de las proteínas WT1 y receptor de la transferrina en la línea celular B16F10 a) Western blot donde se detectan las proteínas de WT1 y receptor de la transferrina en la línea celular B16F10. **b)** Expresión de la producción del receptor de la transferrina en la línea celular B16F10 evaluado mediante citometría de flujo.

7.3 Efecto del complejo Lip+RNAi+Tf en células de melanoma murino B16F10

Para determinar el efecto del complejo liposomal en células B16F10 “*in vitro*”, fueron sembradas 3000 células en placas de 96 pozos, posteriormente fueron tratadas con las siguientes formulaciones: Lip+Tf+RNAi, Lip+RNAi, liposomas vacíos, RNAi solo y Lip+GFP+Tf a concentraciones bajas (0.5, 1, 2 y 4 μ L), sin embargo, no se observaron cambios significativos en la proliferación celular ($p < 0.05$). Posteriormente se adicionaron 6, 12, 24 y 36 μ L usando los tratamientos Lip+RNAi+Tf y liposomas solos en condiciones con suero fetal bovino (SFB) y sin/SFB. Las células tratadas en condiciones sin SFB, posterior a 4 horas, se le adicione medio conteniendo 20% de SFB, todos los tratamientos fueron ajustados a 200 μ L con una concentración final de 10% SFB.

Inicialmente las células tratadas con el complejo, fueron observadas en microscopio confocal de fluorescencia a las 48 horas, ya que el vector expresa la proteína GFP. El resultado de la observación en microscopio invertido de fluorescencia presentó un bajo nivel de transfección en la concentración de 6 μ L (3% aproximadamente, calculado visualmente)(Figura 17) posteriormente la placa fue analizada por MTT y el resultado muestra que las células tratadas con Lip+RNAi+Tf a las concentraciones de 6 μ L disminuyeron su viabilidad celular en un 30 %, cuando se incremento la dosis a 12 μ L el porcentaje de viabilidad disminuyo al 100 %, por otra parte el control del tratamiento con liposomas vacíos demostró el mismo efecto citotóxico, asumiendo que la muerte celular fue debido a la concentración de lípidos y no al silenciamiento por el RNAi. Además, se observó que las células que habían sido tratadas al momento de la transfección con Lip+RNAi+Tf en condiciones de medio sin/SFB su porcentaje de citotoxicidad celular fue del 100% en la concentración de 6 μ L. Determinando que la constitución de lípidos contenidos en nuestros complejos liposomales son más citotóxicos en condiciones sin/SFB (Figura 18).

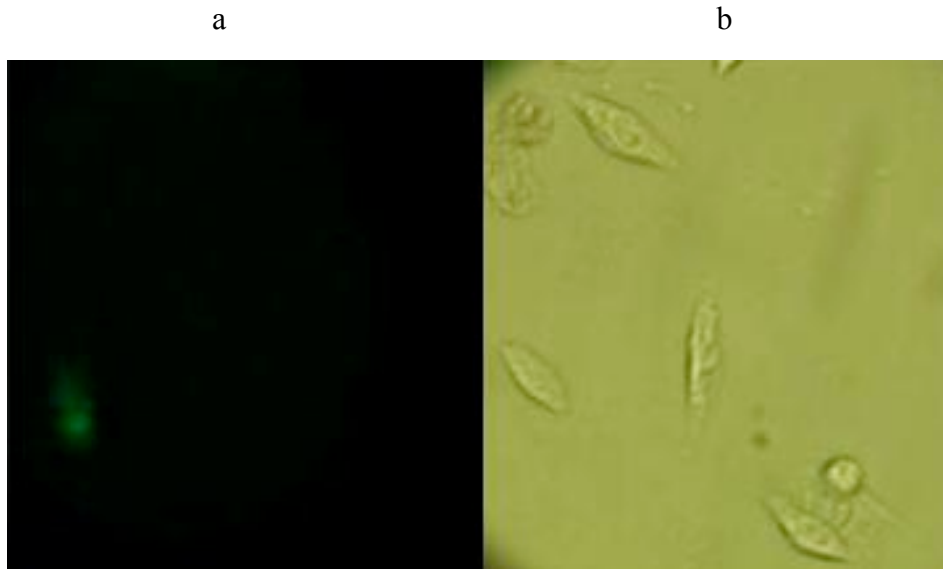


Figura 17. Expresión de GFP tras la transfección con el complejo Lip+RNAi+Tf en células de melanoma murino B16F10. a).- Célula transfectada con el Lip+RNAi+Tf a concentraciones de 6 μ L observada a las 48 horas, mediante microscopía de fluorescencia y b).- Célula transfectada con el Lip+RNAi+Tf a concentraciones de 6 μ L observada a las 48 horas empleando microscopía de campo claro.

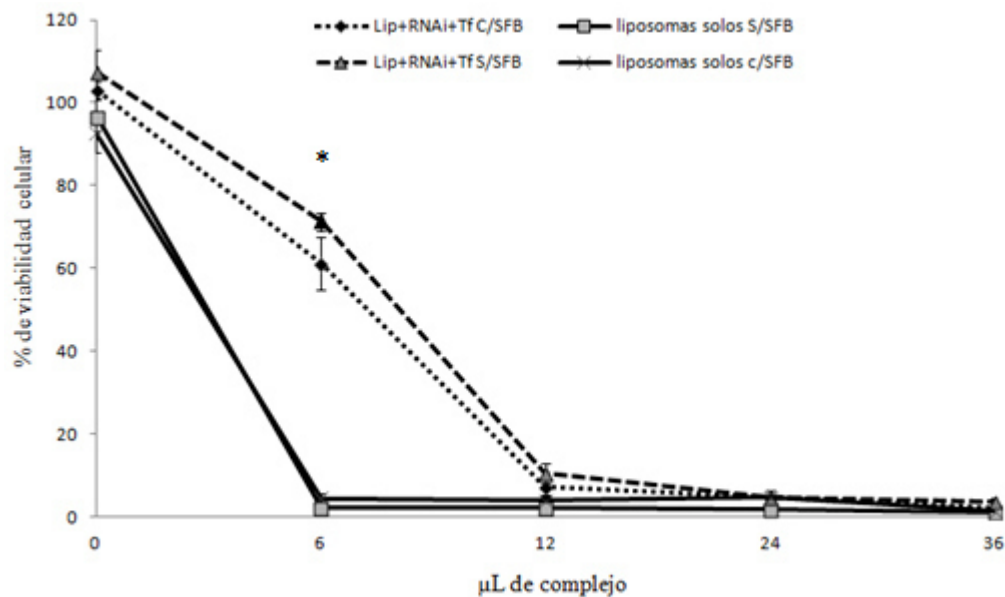


Figura 18. Análisis de viabilidad de las células de B16F10 tratadas con el complejo Lip+RNAi+Tf. 3000 células sembradas en placa de 96 pozos fueron tratadas a distintas concentraciones del complejo Lip+RNAi+Tf y liposomas solos en condiciones con y sin/SFB al momento de la transfección (100 μ L), después de 4 horas de incubación, todos los pozos fueron ajustados a 200 μ L empleando medio DMEM F12 con una concentración final de 10% SFB. El ensayo fue corrido por triplicado. *P<0.05 significancia con respecto al control.

Ensayo “in vivo”

7.4 Evaluación del peso general de los grupos de ratones tratados con el complejo Lip+RNAi+Tf.

Inicialmente el total de ratones empleados en el ensayo fueron inoculados con 500,000 células inyectados vía subcutánea a la altura del muslo posterior derecho. Posteriormente a partir del día 4, fueron separados los ratones por grupo y se realizó la medición del pesaje general. Todos los grupos presentaron un incremento en el peso. Los grupos de ratones sin tratamiento y Lip+RNAi+Tf mostraron un incremento del $34\% \pm 24.92\%$ y $41\% \pm 12.78\%$ de ganancia de peso respectivamente, sin presentar un efecto significativo entre grupos. En los grupos de Lip+RNAi y Lip+GFP+Tf se observó un ligero incremento de $1.5 \pm 12.97\%$ y $10\% \pm 6.87\%$ ganancia de peso respectivamente tomando en cuenta como última lectura el día 19 (Figura 19).

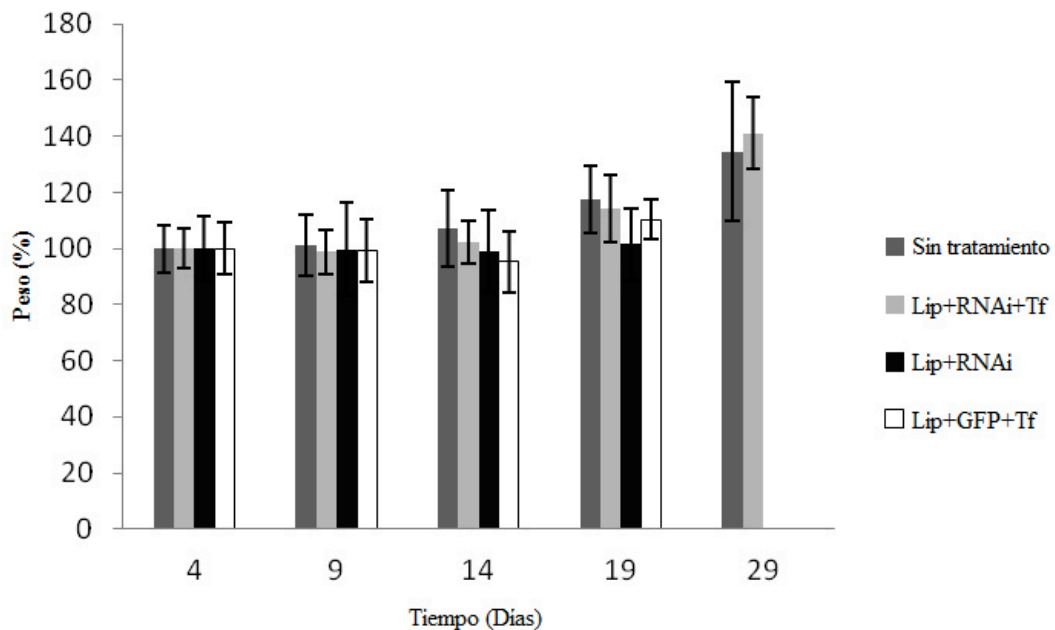


Figura 19. Análisis del peso general de los grupos de ratones. La figura presenta los promedios de los porcentajes del total de los grupos (sin tratamiento, Lip+RNAi+Tf, Lip+RNAi y Lip+GFP+Tf) durante la duración del ensayo. Ninguno de los grupos presentó cambio significativo. Los datos de los grupos Lip+RNAi y Lip+GFP+Tf fueron presentados hasta la supervivencia de los mismos grupos.

7.5 Evaluación del volumen tumoral de los grupos de ratones tratados con el complejo Lip+RNAi+Tf

Los resultados muestran que el grupo de ratones Lip+RNAi y Lip+GFP+Tf presentaron un incremento en el tamaño, sin embargo, se observa disminución en la supervivencia, por esta razón solo fueron colectados los datos hasta el día 19 después del implante de tumor. El grupo de Lip+RNAi+Tf mostró una disminución significativa ($p < 0.05$) en el volumen del tumor comparado con el grupo sin tratamiento, considerando el tiempo y crecimiento del tumor. Las lecturas finales presentan medias de $7,871 \text{ mm}^3 \pm 2,087$ para el grupo sin tratamiento y $5,981 \text{ mm}^3 \pm 2,099$ para el grupo Lip+RNAi+Tf, observándose disminución tumoral (Figura 20).

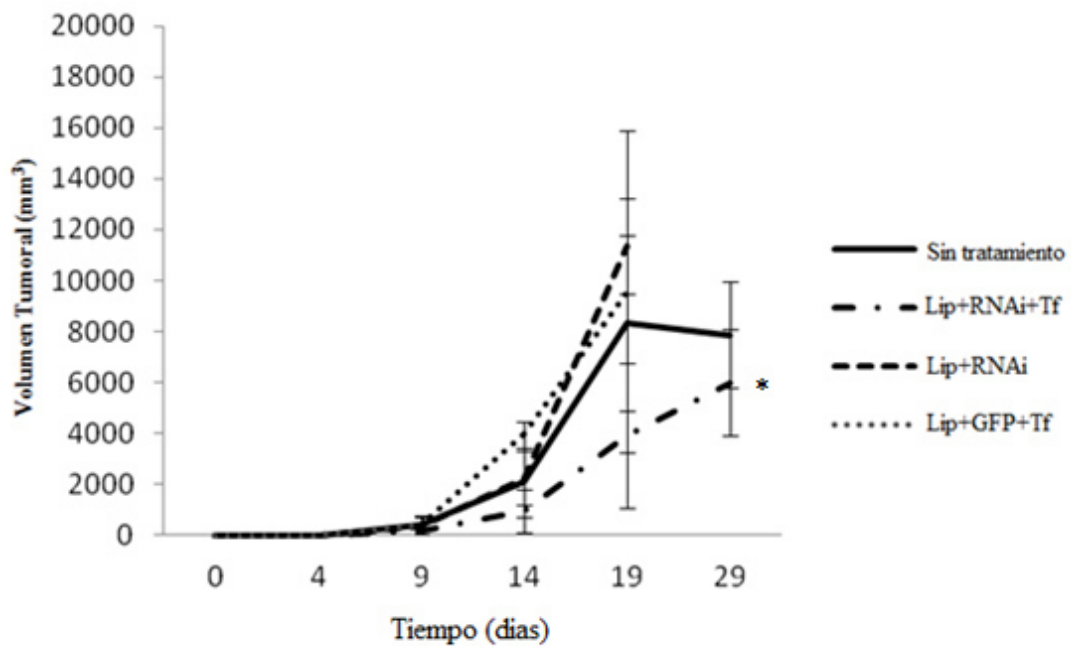


Figura 20. Análisis del volumen tumoral de los grupos de ratones en tratamiento. Los datos del largo y ancho de los tumores de cada uno de los grupos fueron analizados de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. Los datos son expresados en mm^3 y cada grupo presenta su desviación estándar. * $P < 0.05$ significancia con respecto al control.

7.6 Evaluación del peso tumoral de los grupos de ratones tratados con el complejo Lip+RNAi+Tf

Se encontró que en los ratones tratados con el complejo Lip+RNAi+Tf se produjo una reducción en la masa tumoral de manera significativa ($5.5 \text{ g} \pm 0.87$) comparado con el grupo de ratones sin tratamiento ($8.8 \text{ g} \pm 0.30$) ($p < 0.05$) (Figura 21). En estos resultados no se incluyeron los resultados de los grupos restantes tratados debido a que indujo un alto porcentaje de mortalidad en los ratones.

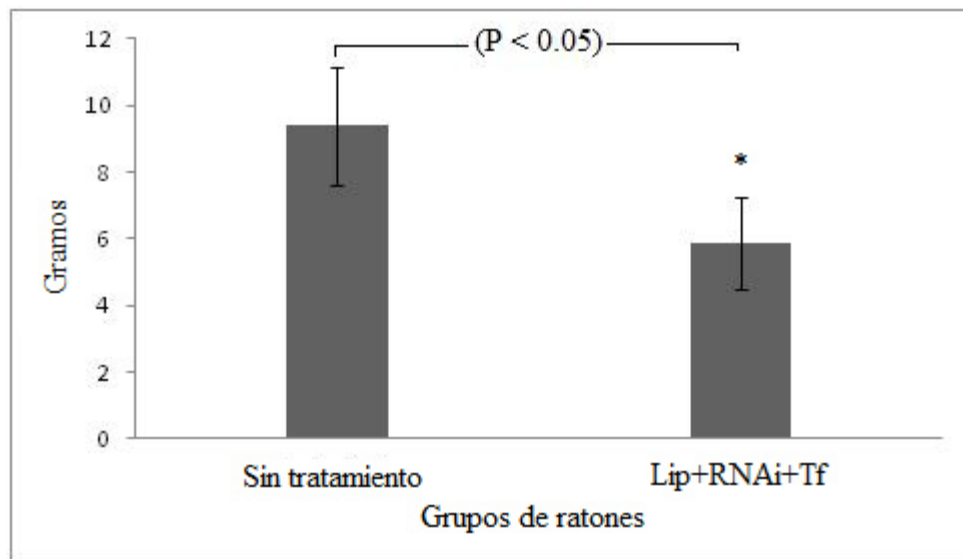


Figura 21. Análisis del peso del tumor de los grupos de ratones en tratamiento.

La figura muestra el promedio del peso de los grupos de ratones sin tratamiento y ratones tratados con Lip+RNAi+Tf y. Significancia $*p < 0.5$ y desviación estándar.

7.7 Sobrevida de los ratones tratados con el complejo Lip+RNAi+Tf

El tiempo promedio obtenido del grupo de ratones sin tratamiento fue de 25 días \pm 1.0. El porcentaje de supervivencia del grupo de ratones sin tratamiento (Figura 23) fue del 22 % de supervivencia en comparación al grupo de ratones Lip+RNAi+Tf (Figura 24) que presento un 62 % de supervivencia, lo cual representa un incremento del 40 % en la supervivencia. Los grupos de ratones Lip+RNAi (Figura 25) y Lip+GFP+Tf (Figura 26) no presentaron ratones vivos al final del análisis (día 30) (Figura 22).

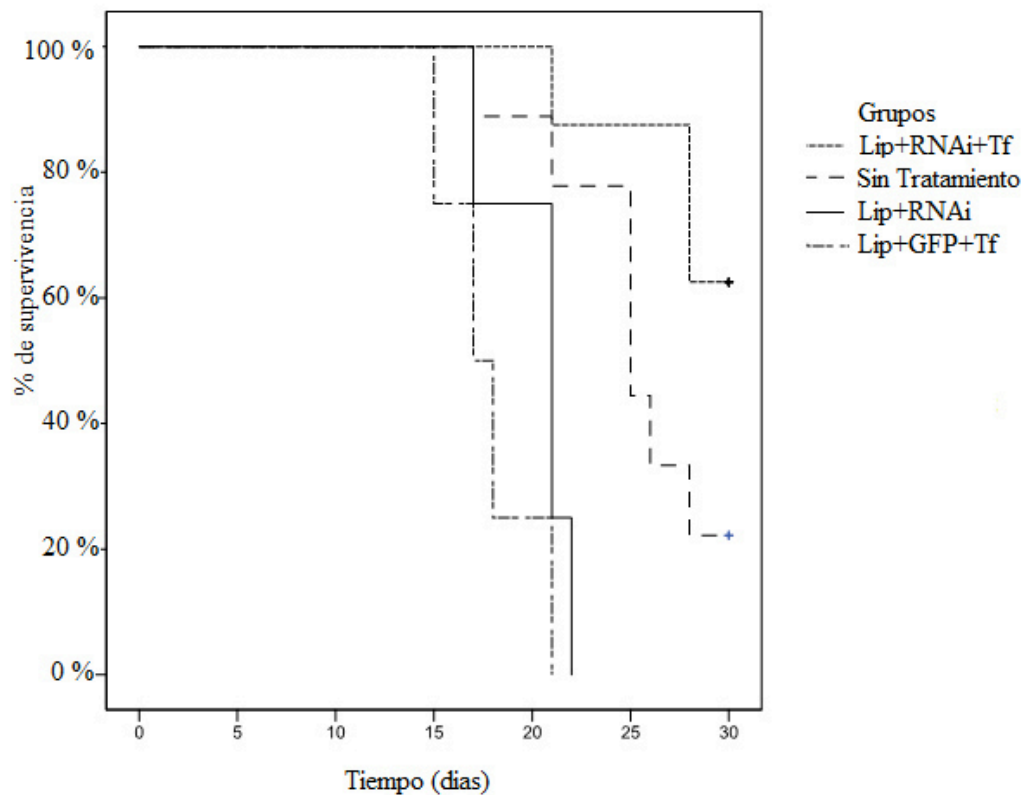


Figura 22. Porcentajes de supervivencia Kaplan-Meier de los grupos de ratones sin tratamiento, Lip+RNAi+Tf, Lip+RNAi y Lip+GFP+Tf. El ensayo fue finalizado con el sacrificio de los ratones sobrevivientes en el día 30. El valor presenta un valor de significancia Log Rank $p < 0.060$ con respecto al grupo de ratones sin tratamiento.

7.7.1 Imágenes de los ratones con tumor y tumores colectados de los grupos en tratamiento



Figura 23.- Imágenes del grupo de ratones sin tratamiento. Las imágenes descritas con los incisos a, b, c y f muestran ratones con tumor expuesto; las imágenes descritas con los incisos d y e muestran ratones con tumor en extremidad posterior derecha; las imágenes descritas con los incisos g, h e i muestran tumores colectados del grupo de ratones.

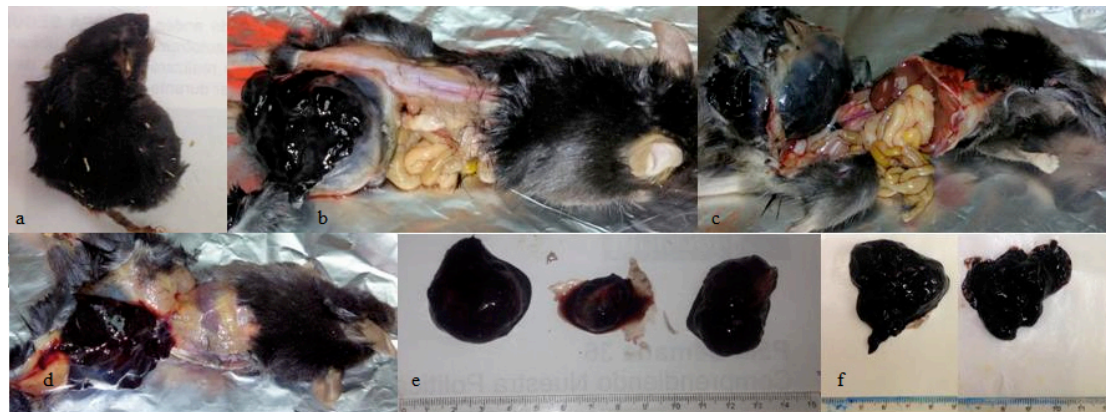


Figura 24.- Imágenes del grupo de ratones Lip+RNAi+Tf. En la imagen descrita con el inciso a se muestra al ratón con tumor en extremidad posterior derecha; en las imágenes descritas con los incisos b, c y d, muestran a los ratones con tumor expuesto; en las imágenes descritas con los incisos e y f muestran los tumores colectados del grupo de ratones.

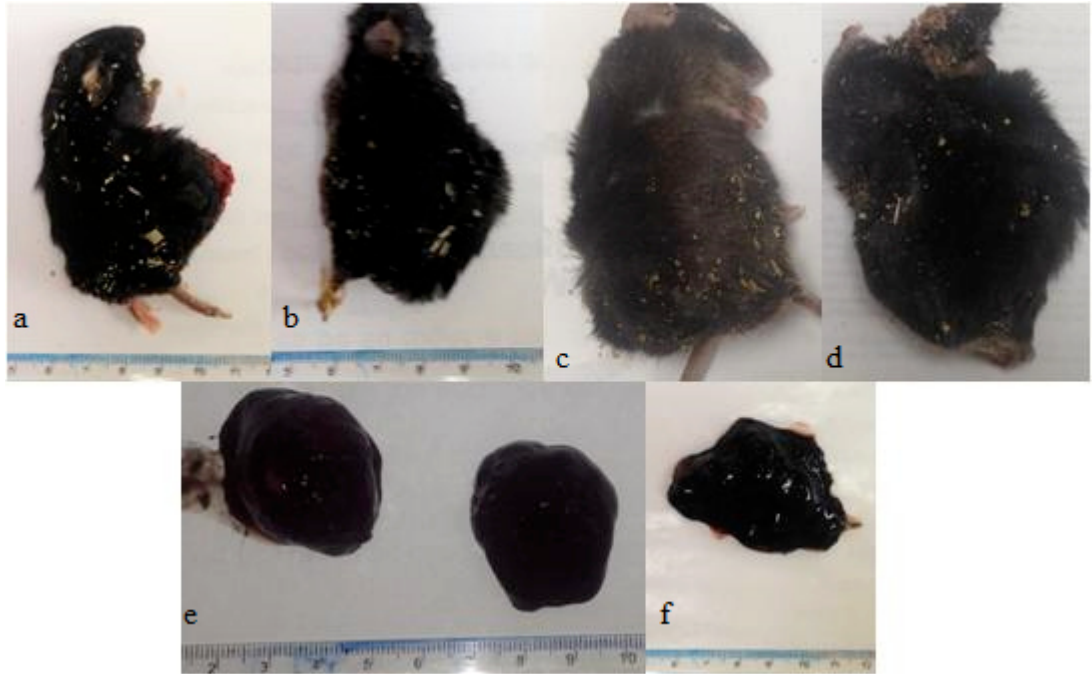


Figura 25.- *Imágenes del grupo de ratones Lip+RNAi. En las imágenes descritas con los incisos a, b y c y d muestra a los ratones con tumor en extremidad posterior derecha; en las imágenes descritas con los incisos e y f muestran los tumores colectados del grupo de ratones.*

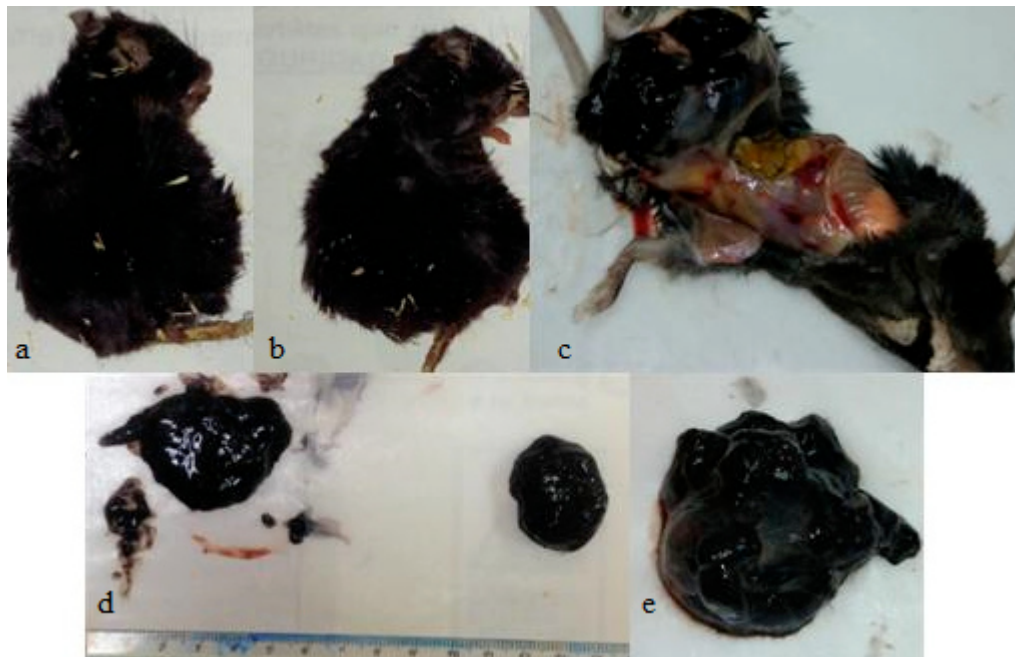


Figura 26.- *Imágenes del grupo de ratones Lip+GFP+Tf. En las imágenes descritas con los incisos a y b muestran al ratón con tumor en extremidad posterior derecha; en la imagen descrita con el inciso c muestran a los ratones con tumor expuesto; en las imágenes descritas con los incisos d y e muestran los tumores colectados del grupo de ratones.*

7.8 Determinación de la expresión del gen *wtl*

Muestras de tejido tumoral pertenecientes a los cuatro grupos de ratones, fueron analizadas mediante PCR cuantitativo, empleando un análisis de expresión relativa descrito por Livak (Livak y Schmittgen. 2001). Las muestras de tejido tumoral fueron colectadas a partir de los ratones sobrevivientes y de los grupos donde no se presentaron sobrevivientes, las muestras de tejido fueron tomadas inmediatamente a la muerte del ratón.

Los tumores del grupo control sin tratamiento mostraron un nivel de expresión de $1,809 \pm 2.4937$, con valores de expresión muy similares a los grupos de ratones tratados con Lip+RNAi 1.3482 ± 0.4387 y Lip+GFP+Tf 1.8915 ± 0.6993 , donde no fue encontrada diferencia significativa cuando se compararon entre grupos. Sin embargo el tratamiento con Lip+RNAi+Tf disminuyó la expresión del gen *wtl* a 0.2145 ± 0.2867

(Figura 27).

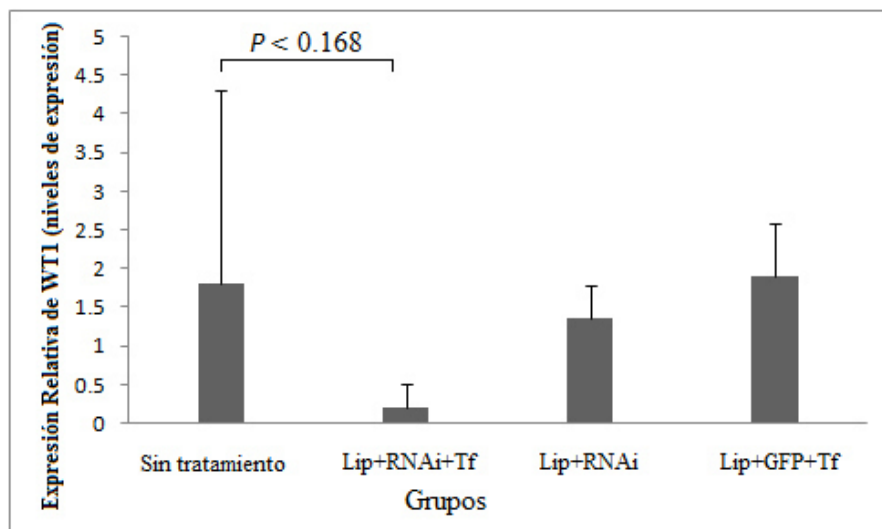


Fig.-27 Análisis de la expresión relativa de *wtl* en muestras de tejido tumoral de los grupos analizados en el ensayo “*in vivo*”. Las reacciones de RT-PCR cuantitativo fueron corridas por duplicado y empleando β -actina como control endógeno. La desviación estándar y el valor estadístico son presentados en la figura ($p < 0.168$).

8. DISCUSIÓN

El propósito del trabajo fue analizar la capacidad de reducción tumoral de melanoma subcutáneo mediante un RNAi en contra de *wt1* encapsulado en liposomas estéricos guiados por transferrina, aplicado vía intravenosa. Como parte inicial del trabajo, fueron analizadas células de melanoma murino B16F10 “*in vitro*”, donde se determinando la expresión de ambas proteínas WT1 y TfR, debido a que era importante demostrar la presencia de ambas proteínas para llevar a cabo el modelo “*in vivo*”. A la fecha no existen trabajos donde se analicen simultáneamente ambas proteínas en células tumorales, sin embargo, trabajos previos han encontrado alta expresión del TfR en eventos de proliferación celular como el cáncer, incluyendo el melanoma (Liu et al. 2009). En cuanto al estudio de WT1, trabajos recientes han optado por clasificarlo como un marcador tumoral, ya que es encontrado altamente expresado en una amplia variedad de neoplasias, incluyendo melanoma (Wagner et al. 2008; Garrido-Ruiz et al. 2010).

Nuestra formulación de liposomas Lip+RNAi+Tf aplicados “*in vitro*” no tuvo el efecto deseado, el cual lo asociamos a la formulación de lípidos estéricos contenidos en el liposoma, y a pesar de contener superficialmente a la Tf, no se observa un incremento en la transfección. Por otra parte, tomando en consideración la disminución de la transfección por el SFB, fue montado un ensayo en condiciones ausentes de SFB al momento de la transfección, sin embargo, no se presentaron cambios significativos a nivel de transfección, pero si en toxicidad, asumiendo que la toxicidad fue debido a la alta concentración de fosfolípidos (Kircheis et al. 1999).

La conformación de fosfolípidos y polímero en el liposoma elaborado en este trabajo, contenían principalmente lípidos en 96% neutros, 1% catiónico, 3% estérico y < 1% de fosfolípido con el grupo funcional maleimida. Estos últimos fosfolípidos contenían polietilenglicol en su extremo hidrofóbico, con la finalidad de no ocultar la transferrina o impedir la unión al momento de formar el complejo (Shi y Pardridge.

2000). Actualmente las transfecciones de ácidos nucleicos “*in vitro*” son caracterizadas por contener mezclas de lípidos y/o polímeros catiónicos, los cuales pueden capturar al ácido nucleico y entregarlo en el interior de la célula, ya sea por fusión de membranas y/o endocitosis. Existen pocas revisiones donde se analicen la transfección con lípidos neutros o estéricos “*in vitro*” y estos son preferentemente analizados “*in vivo*” (Lee et al. 2013; Landen et al. 2005). Además, la formulación empleada en este trabajo contenía fosfolípidos unidos a PEG de 2000 kDa, los cuales son empleados en sistemas en circulación debido a sus propiedades (Davis et al., 2010). Se ha observado que el empleo de PEG incrementa significativamente su vida media en circulación, además de incrementar la selectividad tal y como lo demuestran Whitehead y colaboradores, donde sus resultados se observa un incremento de la vida media en circulación, el cual es asociado a la reducción de los complejos lipídicos por el sistema reticuloendotelial (Whitehead et al. 2009), además Greish y colaboradores describen la presencia de un fenómeno llamado ***permeabilidad mejorada y retención*** (Enhanced Permeability and Retention) lo cual se refiere a que los complejos lipídicos con PEG tienden a ser retenidos en tumores debido a la irregularidad y reducción de la arquitectura de los vasos sanguíneos formados en el tumor (Greish et al. 2007).

Los complejos conformados por lípidos y/o polímeros catiónicos tienden a ser muy inestables en plasma, debido a que interactúan con superficies de membranas o proteínas séricas (Kircheis et al. 1999). Por ello, diversas publicaciones utilizando polímeros con carga se limitan a su aplicación de manera local o intratumoral, limitándose al tratamiento de tumores superficiales (Nakase et al. 2005).

La decisión de usar un tamaño definido menor a 100 nm de diámetro de liposoma y su constitución estructural se realizaron considerando las condiciones referidas por Huwyler y colaboradores. El tamaño y constitución lipídica confiere características propias a los liposomas, ya que le confieren capacidad de viajar por torrente sanguíneo y llegan a pequeños vasos irregulares que son producto del angiogénesis tumoral (Huwyler et al. 1996)

Además, se ha demostrado que complejos lipídicos menores a 100 nm tienden a cruzar la barrera hematoencefálica, lo cual incrementa las posibilidades de empleo para atacar metástasis o tumores propios alojados en cerebro (Huwyler et al. 1996)

La transferrina o anticuerpos que reconocen al TfR, son de las principales moléculas utilizadas en la dirección de agentes terapéuticos aplicados vía sistémica. Otro ejemplo de dirección de drogas han sido los anticuerpos que reconocen al receptor Her2/neu, sin embargo, un estudio donde encapsulaban doxorubicina en liposomas y los dirigían con el anticuerpo Herceptin, fueron observados efectos cardiopáticos graves por lo cual, no fue recomendado su aplicación en fases clínicas (Park et al. 2002).

Considerando más a las referencias de Shi y Huwyler de sus resultados “*in vivo*”, se realizó un ensayo piloto el cual dio pauta a realizar el ensayo completo en ratones (Shi et al. 2000; Huwyler et al. 1996). En los ensayos “*in vivo*” solo se contemplaron los grupos de Lip+RNAi+Tf, Lip+RNAi y Lip+GFP+Tf y un grupo en el cual se inoculo con solución salina “sin tratamiento”. Teniendo como antecedentes previos trabajos en el laboratorio, se estableció un modelo en donde al inocular 500,000 células de melanoma murino B16F10 vía subcutánea en ratones C57BL/6, fue posible formar tumor y visualizarlo entre el día 7 al 9 post-inoculación, e induciendo la muerte del ratón en un promedio de 30 días. El número de aplicaciones de los tratamientos fue considerando la referencia de Nakase y colaboradores, donde administraba liposomas unidos a transferrina conteniendo plásmido codificante de p53 aplicados vía intratumoral. Los tratamientos fueron aplicados por la vena caudal en la cola del ratón, a partir del día 4 con intervalos de 5 días entre tratamiento. (Nakase et al. 2005).

En la actualidad existe un gran auge en el empleo de la vacunación con péptidos de WT1, y en ensayos en fase clínica, realizados por un grupo de japoneses (Morita et al. 2006) ha demostrado tener muy alentadores resultados, además, el National

Cancer Institute en el 2009 categorizo 75 antígenos de los cuales, WT1 fue etiquetado como “el antígeno ideal” para el tratamiento en cáncer, adicionando a ello, que a WT1 lo podemos encontrar en casi cualquier tipo de neoplasia, sin embargo, la inmunoterapia no es capaz de inducir una respuesta apropiada en todos los casos, debido a que la vacunación con péptidos de WT1 es dependiente de HLA.

A la fecha, una limitante en el empleo de ácidos nucleicos terapéuticos ha sido la protección y selectividad por células tumorales al ser aplicados sistémicamente, por ello, la unión superficial de la transferrina al complejo liposomal daría esa dirección hacia las células tumorales y el liposoma protegería y concentraría al ácido nucleico. Existen diversos trabajos donde se emplean RNAi de forma terapéutica, los cuales presentan resultados significativos. El primero de ellos, es el uso de un plásmido que codifica para p53, lo cual, ha demostrado ser efectivo al aplicarlo solo y al combinarlo con otro tipo de terapias, como radioterapia y quimioterapia (Xu et al. 2001) debido a la propiedad de inducir sensibilidad a apoptosis. El empleo de RNAi en contra de WT1 también ha demostrado inducir quimio-sensibilidad, debido a que WT1 regula positivamente a la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Zapata-Benavides et al. 2012; Mayo et al. 1999). El otro trabajo donde se observan resultados favorables, es cuando se emplea un RNAi en contra de HIF1 α . (Liu et al. 2009; Koh et al. 2010). Este es un factor de transcripción el cual se ha observado altamente expresado en múltiples tipos de tumores, el cual se ve inducido a la falta de oxígeno. El efecto principal observado al momento de silenciar HIF1 α , es la reducción del angiogénesis, los cuales cumplen con el objetivo de disminuir los vasos sanguíneos, racionando con ello la disponibilidad de nutrientes y oxígeno al tumor. Estudios recientes han encontrado una regulación positiva de HIF1 α a VEGF. Por otra parte, WT1 también es capaz de regular positivamente a VEGF (Iranparast et al. 2014). Un estudio realizado por nuestro grupo Zamora-Avila y col, demostraron que el silenciamiento de *w1* inducía la reducción del número de vasos sanguíneos (Zamora-Avila et al. 2009)

En los resultados “*in vivo*” de este trabajo, se pudo observar un decremento en el volumen tumoral de $5981 \text{ mm}^3 \pm 2099$ para el grupo Lip+RNAi+Tf, en comparación al grupo sin tratamiento que presentó un volumen promedio de $7871 \text{ mm}^3 \pm 2087$, además se mostro un una reducción en el peso del tumor de $5.5 \text{ g} \pm 0.87$ para el grupo Lip+RNAi+Tf de peso en comparación a $8.8 \text{ g} \pm 0.30$ para el grupo sin tratamiento. En análisis de Kaplan-Meier fue observado un incremento en la porcentaje de supervivencia de los ratones tratados con Lip+RNAi+Tf de 62 %, en comparación con el grupo de ratones sin tratamiento que presentó 22%. El ensayo de expresión cuantitativa corrobora que la reducción de la masa tumoral fue debido al silenciamiento de *wtl* y la dirección dada por la Tf. No se observó cambio significativo en el peso general de los ratones lo cual nos ayuda a indagar que los ratones no presentaron efectos adversos al menos visibles en el peso.

Este modelo “*in vivo*” es caracterizado por ser muy agresivo, ya que es capaz provocar la muerte del ratón en un promedio menor a 30 días, es por ello que no se pudo incrementar el número de aplicaciones en la vena caudal. Debido a ello, será importante realizar estudios donde se analicen a detalle los efectos secundarios del complejo Lip+RNAi+Tf aplicado a escalas más altas o en aplicaciones con mayor frecuencia, además de usarlo en combinación con quimioterapia sistémica o realizar un complejo que contenga ambos agentes terapéuticos encapsulados.

9. CONCLUSIONES

- El complejo Lip+RNAi+Tf conformado con lípidos estéricos presenta muy bajos niveles de transfección “*in vitro*” y el incremento en la concentración de liposomas afecta la viabilidad celular debido a la concentración de lípidos y no al efecto del silenciamiento de *wtl*.
- En los resultados, el Lip+RNAi+Tf demostró no afectar significativamente el peso total de los grupos de ratones en tratamiento
- De los resultados “*in vivo*”, el complejo Lip+RNAi+Tf demostró ser capaz de reducir el volumen tumoral de $7871 \text{ mm}^3 \pm 2087$ correspondiente al grupo sin tratamiento a $5981 \text{ mm}^3 \pm 2099$ para el grupo Lip+RNAi+Tf.
- El complejo Lip+RNAi+Tf demostró ser capaz de reducir el peso final del tumor correspondiente de $8.8 \text{ g} \pm 0.30$ para el grupo sin tratamiento hasta $5.5 \text{ g} \pm 0.87$ para el grupo Lip+RNAi+Tf.
- El complejo Lip+RNAi+Tf demostró un incremento en los porcentajes de supervivencia correspondiente al 62 % para el grupo Lip+RNAi+Tf en comparación al 22 % del grupo sin tratamiento.
- El complejo Lip+RNAi+Tf demostró disminuir la expresión relativa de *wtl* de 0.2145 ± 0.2867 en comparación con $1,809 \pm 2.4937$ del grupo sin tratamiento, 1.3482 ± 0.4387 del grupo Lip+RNAi y 1.8915 ± 0.6993 del grupo Lip+GFP+Tf.

PERSPECTIVAS

- 1.- se tendrían que hacer análisis de los efectos citotóxicos tras la aplicación del complejo Lip+RNAi+Tf, debido a la presencia de WT1 de manera basal.

- 2.- será llevar un análisis de expresión de ambas proteínas de manera simultánea en tejidos tumorales humanos, con la finalidad de asociar ambas proteínas como marcadores tumorales, con la finalidad de generar conocimiento de la especificidad esperada.

- 3.- es llevar esta metodología implementando moléculas activas sin tener que usar el vector, debido a los problemas del uso de secuencias codificantes de resistencia a antibióticos.

- 4.- es llevar a cabo la combinación de este tratamiento del cual se ha observado que es capaz de inducir sensibilidad por medio del silenciamiento de WT1 y posteriormente llevar la aplicación de drogas convencionales en cáncer, como lo es la doxorubicina, cisplatino, taxol, vincristina, entre otras. Esto podría traer consigo la reducción de las concentraciones de la droga y con ello su efecto secundario.

11. BIBLIOGRAFÍA

Algar, E. M., T. Khromykh, S. I. Smith, D. M. Blackburn, G. J. Bryson, y P. J. Smith. 1996. "A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines." *Oncogene* 12 (5):1005-14.

Allison, A. C., y G. Gregoriadis. 1976. "Liposomes as immunological adjuvants." *Recent Results Cancer Res* (56):58-64.

Appert-Collin, A., P. Hubert, G. Crémel, y A. Bennasroune. 2015. "Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion." *Front Pharmacol* 6:283. doi: 10.3389/fphar.2015.00283.

Arias Soto, Julio Cesar, Dania Santos Silva, Madeline de Jesús García Gali, Marlene Ortiz Silveira, y Sulli de la Caridad Matienzo Vergara. 2012. "Caracterización clinicoepidemiológica de pacientes con tumores palpebrales malignos." *MEDISAN* 16:1870-1876.

Ascierto, P. A., J. M. Kirkwood, J. J. Grob, E. Simeone, A. M. Grimaldi, M. Maio, G. Palmieri, A. Testori, F. M. Marincola, y N. Mozzillo. 2012. "The role of BRAF V600 mutation in melanoma." *J Transl Med* 10:85. doi: 10.1186/1479-5876-10-85.

Autier, P., J. F. Doré, O. Gefeller, J. P. Cesarini, F. Lejeune, K. F. Koelmel, D. Lienard, y U. R. Kleeberg. 1997. "Melanoma risk and residence in sunny areas. EORTC Melanoma Co-operative Group. European Organization for Research and Treatment of Cancer." *Br J Cancer* 76 (11):1521-4.

Avril, M. F., S. Aamdal, J. J. Grob, A. Hauschild, P. Mohr, J. J. Bonerandi, M. Weichenthal, K. Neuber, T. Bieber, K. Gilde, V. Guillem Porta, J. Fra, J. Bonnetterre, P. Saiag, D. Kamanabrou, H. Pehamberger, J. Sufliarsky, J. L. Gonzalez Larriba, A. Scherrer, y Y. Menu. 2004. "Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study." *J Clin Oncol* 22 (6):1118-25. doi: 10.1200/JCO.2004.04.165.

Baird, P. N., N. Groves, D. A. Haber, D. E. Housman, y J. K. Cowell. 1992. "Identification of mutations in the WT1 gene in tumours from patients with the WAGR syndrome." *Oncogene* 7 (11):2141-9.

Balch, C. M., S. J. Soong, G. W. Milton, H. M. Shaw, V. J. McGovern, T. M. Murad, W. H. McCarthy, y W. A. Maddox. 1982. "A comparison of prognostic factors and surgical results in 1,786 patients with localized (stage I) melanoma treated in Alabama, USA, and New South Wales, Australia." *Ann Surg* 196 (6):677-84.

BANGHAM, A. D. 1964. "THE ADHESIVENESS OF LEUKOCYTES WITH SPECIAL REFERENCES TO ZETA POTENTIAL." *Ann N Y Acad Sci* 116:945-9.

- Bartel, D. P. 2004. "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116 (2):281-97.
- Bataille, R., B. Barlogie, Z. Y. Lu, J. F. Rossi, T. Lavabre-Bertrand, T. Beck, J. Wijdenes, J. Brochier, y B. Klein. 1995. "Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma." *Blood* 86 (2):685-91.
- Berczi, A., K. Barabas, J. A. Sizensky, y W. P. Faulk. 1993. "Adriamycin conjugates of human transferrin bind transferrin receptors and kill K562 and HL60 cells." *Arch Biochem Biophys* 300 (1):356-63. doi: 10.1006/abbi.1993.1048.
- Bergamaschi, G., M. Cazzola, L. Dezza, E. Savino, L. Consonni, y D. Lippi. 1988. "Killing of K562 cells with conjugates between human transferrin and a ribosome-inactivating protein (SO-6)." *Br J Haematol* 68 (3):379-84.
- Berindan-Neagoe, I., O. Balacescu, C. Burz, C. Braicu, L. Balacescu, O. Tudoran, V. Cristea, y A. Irimie. 2009. "p53 gene therapy using RNA interference." *J BUON* 14 Suppl 1:S51-9.
- Besaratinia, A., y G. P. Pfeifer. 2008. "Sunlight ultraviolet irradiation and BRAF V600 mutagenesis in human melanoma." *Hum Mutat* 29 (8):983-91. doi: 10.1002/humu.20802.
- Beyer, U., T. Roth, P. Schumacher, G. Maier, A. Unold, A. W. Frahm, H. H. Fiebig, C. Unger, y F. Kratz. 1998. "Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug chlorambucil." *J Med Chem* 41 (15):2701-8. doi: 10.1021/jm9704661.
- Braakhuis, Hedwig M., Margriet VDZ Park, Ilse Gosens, Wim H. De Jong, y Flemming R. Cassee. 2014. "Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation." *Particle and Fibre Toxicology* 11 (1):1-25. doi: 10.1186/1743-8977-11-18.
- Breslow, A. 1970. "Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma." *Ann Surg* 172 (5):902-8.
- Brown, K. W., J. E. Watson, V. Poirier, M. G. Mott, P. J. Berry, y N. J. Maitland. 1992. "Inactivation of the remaining allele of the WT1 gene in a Wilms' tumour from a WAGR patient." *Oncogene* 7 (4):763-8.
- Budai, M., y M. Szógyi. 2001. "[Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes]." *Acta Pharm Hung* 71 (1):114-8.
- Cano, E., A. Pizarro, J. M. Redondo, F. Sánchez-Madrid, C. Bernabeu, y M. Fresno. 1990. "Induction of T cell activation by monoclonal antibodies specific for the transferrin receptor." *Eur J Immunol* 20 (4):765-70. doi: 10.1002/eji.1830200409.

Carvajal, R. D., C. R. Antonescu, J. D. Wolchok, P. B. Chapman, R. A. Roman, J. Teitcher, K. S. Panageas, K. J. Busam, B. Chmielowski, J. Lutzky, A. C. Pavlick, A. Fusco, L. Cane, N. Takebe, S. Vemula, N. Bouvier, B. C. Bastian, y G. K. Schwartz. 2011. "KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma." *JAMA* 305 (22):2327-34. doi: 10.1001/jama.2011.746.

Chapman, P. B., L. H. Einhorn, M. L. Meyers, S. Saxman, A. N. Destro, K. S. Panageas, C. B. Begg, S. S. Agarwala, L. M. Schuchter, M. S. Ernstoff, A. N. Houghton, y J. M. Kirkwood. 1999. "Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma." *J Clin Oncol* 17 (9):2745-51.

Chau YY y Hastie ND. 2012. The role of Wt1 in regulating mesenchyme in cancer, development, and tissue homeostasis. *Trends Genet.* 28(10):515-24.

Cheema, S. K., S. K. Mishra, V. M. Rangnekar, A. M. Tari, R. Kumar, y G. Lopez-Berestein. 2003. "Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter." *J Biol Chem* 278 (22):19995-20005. doi: 10.1074/jbc.M205865200.

Cheever M.A., Allison J.P., Ferris A.S., Finn O.J., Hastings B.M., Hecht T.T., Mellman I, Prindiville S.A., Viner J.L., Weiner L.M., y Matrisian L.M. 2009. The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. *Clin Cancer Res.* 15(17)

Chiu, S. J., S. Liu, D. Perrotti, G. Marcucci, y R. J. Lee. 2006. "Efficient delivery of a Bcl-2-specific antisense oligodeoxyribonucleotide (G3139) via transferrin receptor-targeted liposomes." *J Control Release* 112 (2):199-207. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.02.011.

Ciechanover, A., A. L. Schwartz, y H. F. Lodish. 1983. "Sorting and recycling of cell surface receptors and endocytosed ligands: the asialoglycoprotein and transferrin receptors." *J Cell Biochem* 23 (1-4):107-30. doi: 10.1002/jcb.240230111.

Correa-Aranda MA. 1996. Cáncer de piel en la Clínica Hospital ISSSTE, San Luis Río Colorado, Sonora (1986-1995). Memorias del XVII Congreso Mexicano de Dermatología, Monterrey, Nuevo León, México.

Cotten, M., F. Längle-Rouault, H. Kirlappos, E. Wagner, K. Mechtler, M. Zenke, H. Beug, y M. L. Birnstiel. 1990. "Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (11):4033-7.

Curtin, J. A., J. Fridlyand, T. Kageshita, H. N. Patel, K. J. Busam, H. Kutzner, K. H. Cho, S. Aiba, E. B. Bröcker, P. E. LeBoit, D. Pinkel, y B. C. Bastian. 2005. "Distinct

sets of genetic alterations in melanoma." *N Engl J Med* 353 (20):2135-47. doi: 10.1056/NEJMoa050092.

Daniels, T. R., E. Bernabeu, J. A. Rodriguez, S. Patel, M. Kozman, D. A. Chiappetta, E. Holler, J. Y. Ljubimova, G. Helguera, y M. L. Penichet. 2012. "The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer." *Biochim Biophys Acta* 1820 (3):291-317. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.07.016.

Daniels, T. R., T. Delgado, J. A. Rodriguez, G. Helguera, y M. L. Penichet. 2006. "The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer." *Clin Immunol* 121 (2):144-58. doi: 10.1016/j.clim.2006.06.010.

Davies, R., A. Moore, A. Schedl, E. Bratt, K. Miyahawa, M. Lodomery, C. Miles, A. Menke, V. van Heyningen, y N. Hastie. 1999. "Multiple roles for the Wilms' tumor suppressor, WT1." *Cancer Res* 59 (7 Suppl):1747s-1750s; discussion 1751s.

Davis, M.E., Zuckerman J.E. Choi C.H., Seligson D, Tolcher A, Alabi C.A., Yen Y., Heidel J.D. y Ribas A. 2010. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464 (7291), 1067–1070.

Day, C. L., R. A. Lew, M. C. Mihm, A. J. Sober, M. N. Harris, A. W. Kopf, T. B. Fitzpatrick, T. J. Harrist, F. M. Golomb, A. Postel, P. Hennessey, S. L. Gumport, J. W. Raker, R. A. Malt, A. B. Cosimi, W. C. Wood, D. F. Roses, F. Gorstein, D. Rigel, R. J. Friedman, M. M. Mintzis, y R. W. Grier. 1982. "A multivariate analysis of prognostic factors for melanoma patients with lesions greater than or equal to 3.65 mm in thickness. The importance of revealing alternative Cox models." *Ann Surg* 195 (1):44-9.

Dolan DE y Gupta S. 2014. PD-1 pathway inhibitors: changing the landscape of cancer immunotherapy. *Cancer Control*. Jul; 21(3):231-7.

Domvri, K., P. Zarogoulidis, K. Porpodis, M. Koffa, M. Lambropoulou, S. Kakolyris, G. Kolios, K. Zarogoulidis, y E. Chatzaki. 2012. "Gene therapy in liver diseases: state-of-the-art and future perspectives." *Curr Gene Ther* 12 (6):463-83.

Drulis-Kawa, Z., y A. Dorotkiewicz-Jach. 2010. "Liposomes as delivery systems for antibiotics." *Int J Pharm* 387 (1-2):187-98. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.11.033.

Edwards, R. H., M. R. Ward, H. Wu, C. A. Medina, M. S. Brose, P. Volpe, S. Nussen-Lee, H. M. Haupt, A. M. Martin, M. Herlyn, S. R. Lessin, y B. L. Weber. 2004. "Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas." *J Med Genet* 41 (4):270-2.

Elliott, R. L., R. Stjernholm, y M. C. Elliott. 1988. "Preliminary evaluation of platinum transferrin (MPTC-63) as a potential nontoxic treatment for breast cancer." *Cancer Detect Prev* 12 (1-6):469-80.

Engelman, D. M. 1971. "Lipid bilayer structure in the membrane of *Mycoplasma laidlawii*." *J Mol Biol* 58 (1):153-65.

Eton, O., S. S. Legha, A. Y. Bedikian, J. J. Lee, A. C. Buzaid, C. Hodges, S. E. Ring, N. E. Papadopoulos, C. Plager, M. J. East, F. Zhan, y R. S. Benjamin. 2002. "Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial." *J Clin Oncol* 20 (8):2045-52.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>

Foletto, M. C., y S. E. Haas. 2014. "Cutaneous melanoma: new advances in treatment." *An Bras Dermatol* 89 (2):301-10.

Fritzer, M., T. Szekeres, V. Szüts, H. N. Jarayam, y H. Goldenberg. 1996. "Cytotoxic effects of a doxorubicin-transferrin conjugate in multidrug-resistant KB cells." *Biochem Pharmacol* 51 (4):489-93.

Gajewski TF, Louahed J and Brichard VG. Gene signature in melanoma associated with clinical activity: a potential clue to unlock cancer immunotherapy. *Cancer J*. 2010;16(4):399-403.

Garrido-Ruiz, M.C., et al., 2010. WT1 expression in nevi and melanomas: a marker of melanocytic invasion into the dermis. *J Cutan Pathol*, 2010. 37(5): p. 542-8

Gatter, K. C., G. Brown, I. S. Trowbridge, R. E. Woolston, y D. Y. Mason. 1983. "Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance." *J Clin Pathol* 36 (5):539-45.

Gessler, M., A. König, y G. A. Bruns. 1992. "The genomic organization and expression of the WT1 gene." *Genomics* 12 (4):807-13.

Giannetti, A. M., P. M. Snow, O. Zak, y P. J. Björkman. 2003. "Mechanism for multiple ligand recognition by the human transferrin receptor." *PLoS Biol* 1 (3):E51. doi: 10.1371/journal.pbio.0000051.

Gomme, P. T., K. B. McCann, y J. Bertolini. 2005. "Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions." *Drug Discov Today* 10 (4):267-73. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03333-1.

Gorter, E., y F. Grendel. 1925. "ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD." *J Exp Med* 41 (4):439-43.

Gosselaar, P. H., A. J. van-Dijk, G. C. de-Gast, L. Polito, A. Bolognesi, W. C. Vooijs, A. F. Verheul, H. G. Krouwer, y J. J. Marx. 2002. "Transferrin toxin but not

transferrin receptor immunotoxin is influenced by free transferrin and iron saturation." *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 1:61-9.

Greenlee, R. T., M. B. Hill-Harmon, T. Murray, y M. Thun. 2001. "Cancer statistics, 2001." *CA Cancer J Clin* 51 (1):15-36.

Greish, K., 2007. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J. DrugTarget* 15 (7-8), 457-464.

Gregoriadis, G. 1973. "Drug entrapment in liposomes." *FEBS Lett* 36 (3):292-6.

Gregoriadis, G. 1988. "Liposomes as a drug delivery system: optimization studies." *Adv Exp Med Biol* 238:151-9.

Gregoriadis, G., D. Putman, L. Louis, y D. Neerunjun. 1974. "Comparative effect and fate of non-entrapped and liposome-entrapped neuraminidase injected into rats." *Biochem J* 140 (2):323-30.

Grimm, E. A., A. Mazumder, H. Z. Zhang, y S. A. Rosenberg. 1982. "Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes." *J Exp Med* 155 (6):1823-41.

Grob, J. J., M. M. Amonkar, S. Martin-Algarra, L. V. Demidov, V. Goodman, K. Grotzinger, P. Haney, E. Kämpgen, B. Karaszewska, C. Mauch, W. H. Miller, M. Millward, B. Mirakhur, P. Rutkowski, V. Chiarion-Sileni, S. Swann, y A. Hauschild. 2014. "Patient perception of the benefit of a BRAF inhibitor in metastatic melanoma: quality-of-life analyses of the BREAK-3 study comparing dabrafenib with dacarbazine." *Ann Oncol* 25 (7):1428-36. doi: 10.1093/annonc/mdu154.

Grubb, G. R., K. Yun, A. E. Reeve, y M. R. Eccles. 1995. "Exclusion of the Wilms tumour gene (WT1) promoter as a site of frequent mutation in Wilms tumour." *Oncogene* 10 (8):1677-81.

Gu, W., L. Putral, K. Hengst, K. Minto, N. A. Saunders, G. Leggatt, y N. A. McMillan. 2006. "Inhibition of cervical cancer cell growth in vitro and in vivo with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human papillomavirus E6 and E7 oncogenes." *Cancer Gene Ther* 13 (11):1023-32. doi: 10.1038/sj.cgt.7700971.

Guo, J., L. Si, Y. Kong, K. T. Flaherty, X. Xu, Y. Zhu, C. L. Corless, L. Li, H. Li, X. Sheng, C. Cui, Z. Chi, S. Li, M. Han, L. Mao, X. Lin, N. Du, X. Zhang, J. Li, B. Wang, y S. Qin. 2011. "Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification." *J Clin Oncol* 29 (21):2904-9. doi: 10.1200/JCO.2010.33.9275.

Guzman-Villanueva, D., I. M. El-Sherbiny, D. Herrera-Ruiz, A. V. Vlassov, y H. D. Smyth. 2012. "Formulation approaches to short interfering RNA and MicroRNA: challenges and implications." *J Pharm Sci* 101 (11):4046-66. doi: 10.1002/jps.23300.

Haber, D. A., A. J. Buckler, T. Glaser, K. M. Call, J. Pelletier, R. L. Sohn, E. C. Douglass, y D. E. Housman. 1990. "An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor." *Cell* 61 (7):1257-69.

Hall, A. H., y K. A. Alexander. 2003. "RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells." *J Virol* 77 (10):6066-9.

Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach, y G. J. Hannon. 2000. "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." *Nature* 404 (6775):293-6. doi: 10.1038/35005107.

Hatzivassiliou, G., K. Song, I. Yen, B. J. Brandhuber, D. J. Anderson, R. Alvarado, M. J. Ludlam, D. Stokoe, S. L. Gloor, G. Vigers, T. Morales, I. Aliagas, B. Liu, S. Sideris, K. P. Hoeflich, B. S. Jaiswal, S. Seshagiri, H. Koeppen, M. Belvin, L. S. Friedman, y S. Malek. 2010. "RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth." *Nature* 464 (7287):431-5. doi: 10.1038/nature08833.

Hauschild, A., J. J. Grob, L. V. Demidov, T. Jouary, R. Gutzmer, M. Millward, P. Rutkowski, C. U. Blank, W. H. Miller, E. Kaempgen, S. Martín-Algarra, B. Karaszewska, C. Mauch, V. Chiarion-Sileni, A. M. Martin, S. Swann, P. Haney, B. Mirakhur, M. E. Guckert, V. Goodman, y P. B. Chapman. 2012. "Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial." *Lancet* 380 (9839):358-65. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60868-X.

Head, J. F., F. Wang, y R. L. Elliott. 1997. "Antineoplastic drugs that interfere with iron metabolism in cancer cells." *Adv Enzyme Regul* 37:147-69.

Herzer, U., A. Crocoll, D. Barton, N. Howells, y C. Englert. 1999. "The Wilms tumor suppressor gene *wilms1* is required for development of the spleen." *Curr Biol* 9 (15):837-40.

Hodi, F. S., P. Friedlander, C. L. Corless, M. C. Heinrich, S. Mac Rae, A. Kruse, J. Jagannathan, A. D. Van den Abbeele, E. F. Velazquez, G. D. Demetri, y D. E. Fisher. 2008. "Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma." *J Clin Oncol* 26 (12):2046-51. doi: 10.1200/JCO.2007.14.0707.

Holman, C. D., y B. K. Armstrong. 1984. "Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: an analysis separating histogenetic types." *J Natl Cancer Inst* 73 (1):75-82.

Kawamoto M, Horibel T, Kohno M, y Kawakami K. 2011. A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells. *BMC Cancer*, 11:359

Hosen, N., M. Yanagihara, T. Nakazawa, K. Kanato, S. Nishida, T. Shirakata, M. Asada, T. Masuda, Y. Taniguchi, M. Kawakami, A. Tsuboi, K. Ikegame, Y. Oka, H. Ogawa, I. Kawase, Y. Oji, y H. Sugiyama. 2004. "Identification of a gene element essential for leukemia-specific expression of transgenes." *Leukemia* 18 (3):415-9. doi: 10.1038/sj.leu.2403260.

Hoshino, T., M. Misaki, M. Yamamoto, H. Shimizu, Y. Ogawa, y H. Toguchi. 1995. "In vitro cytotoxicities and in vivo distribution of transferrin-platinum(II) complex." *J Pharm Sci* 84 (2):216-21.

Hsueh, E. C., R. Essner, L. J. Foshag, D. W. Ollila, G. Gammon, S. J. O'Day, P. D. Boasberg, S. L. Stern, X. Ye, y D. L. Morton. 2002. "Prolonged survival after complete resection of disseminated melanoma and active immunotherapy with a therapeutic cancer vaccine." *J Clin Oncol* 20 (23):4549-54.

Hémadi, M., P. H. Kahn, G. Miquel, y J. M. El Hage Chahine. 2004. "Transferrin's mechanism of interaction with receptor 1." *Biochemistry* 43 (6):1736-45. doi: 10.1021/bi030142g.

Huwyler J., Wu D., y Pardridge W.M. 1996. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93, pp. 14164–14169

Ippoliti, R., E. Lendaro, I. D'Agostino, M. L. Fiani, D. Guidarini, S. Vestri, P. A. Benedetti, y M. Brunori. 1995. "A chimeric saporin-transferrin conjugate compared to ricin toxin: role of the carrier in intracellular transport and toxicity." *FASEB J* 9 (12):1220-5.

Iranparast S, Assarehzadegan MA, Heike Y, Hossienzadeh M, Khodadadi A. 2014. Wilms' tumor gene (WT1) expression correlates with vascular epithelial growth factor (VEGF) in newly acute leukemia patients undergoing chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 15(21):9217-23.

Ishida, O., K. Maruyama, H. Tanahashi, M. Iwatsuru, K. Sasaki, M. Eriguchi, y H. Yanagie. 2001. "Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo." *Pharm Res* 18 (7):1042-8.

Jurado-Santa Cruz, F., A. Medina-Bojórquez, R. M. Gutiérrez-Vidrio, y J. M. Ruiz-Rosillo. 2011. "[Epidemiological study of skin cancer prevalence in three cities of Mexico]." *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 49 (3):253-8.

Kanavy, H. E., y M. R. Gerstenblith. 2011. "Ultraviolet radiation and melanoma." *Semin Cutan Med Surg* 30 (4):222-8. doi: 10.1016/j.sder.2011.08.003.

Keilholz, U., H. D. Menssen, A. Gaiger, A. Menke, Y. Oji, Y. Oka, C. Scheibenbogen, H. Stauss, E. Thiel, y H. Sugiyama. 2005. "Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia." *Leukemia* 19 (8):1318-23. doi: 10.1038/sj.leu.2403817.

Khvorova, A., A. Reynolds, y S. D. Jayasena. 2003. "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell* 115 (2):209-16.

Kim, D. H., y J. J. Rossi. 2007. "Strategies for silencing human disease using RNA interference." *Nat Rev Genet* 8 (3):173-84. doi: 10.1038/nrg2006.

Kircheis, R., E. Ostermann, M. F. Wolschek, C. Lichtenberger, C. Magin-Lachmann, L. Wightman, M. Kursa, y E. Wagner. 2002. "Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor-alpha induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity." *Cancer Gene Ther* 9 (8):673-80. doi: 10.1038/sj.cgt.7700487.

Kircheis, R., S. Schüller, S. Brunner, M. Ogris, K. H. Heider, W. Zauner, y E. Wagner. 1999. "Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo." *J Gene Med* 1 (2):111-20. doi: 10.1002/(SICI)1521-2254(199903/04)1:2<111::AID-JGM22>3.0.CO;2-Y.

Klein, B., J. Wijdenes, X. G. Zhang, M. Jourdan, J. M. Boiron, J. Brochier, J. Liautard, M. Merlin, C. Clement, y B. Morel-Fournier. 1991. "Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia." *Blood* 78 (5):1198-204.

Koh, M. Y., T. R. Spivak-Kroizman, y G. Powis. 2010. "HIF-1alpha and cancer therapy." *Recent Results Cancer Res* 180:15-34. doi: 10.1007/978-3-540-78281-0_3.

Konig, A., S. Jakubiczka, P. Wieacker, H. W. Schlosser, y M. Gessler. 1993. "Further evidence that imbalance of WT1 isoforms may be involved in Denys-Drash syndrome." *Hum Mol Genet* 2 (11):1967-8.

Kreidberg, J. A. 2010. "WT1 and kidney progenitor cells." *Organogenesis* 6 (2):61-70.

Kuczera, J., T. Janas, A. Fogt, S. Witek, M. Schara, y M. Sentjurs. 1989. "Amphiphilic derivatives of betaine esters as modifiers of macrovesicular BLM." *Gen Physiol Biophys* 8 (3):223-32.

Kumar-Singh, S., W. Jacobs, K. Dhaene, B. Weyn, J. Bogers, J. Weyler, y E. Van Marck. 1998. "Syndecan-1 expression in malignant mesothelioma: correlation with cell differentiation, WT1 expression, and clinical outcome." *J Pathol* 186 (3):300-5. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<300::AID-PATH180>3.0.CO;2-Q.

Kumar-Singh, S., K. Segers, U. Rodeck, H. Backhovens, J. Bogers, J. Weyler, C. Van Broeckhoven, y E. Van Marck. 1997. "WT1 mutation in malignant mesothelioma and WT1 immunoreactivity in relation to p53 and growth factor receptor expression, cell-type transition, and prognosis." *J Pathol* 181 (1):67-74. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199701)181:1<67::AID-PATH723>3.0.CO;2-Z.

Kursa, M., G. F. Walker, V. Roessler, M. Ogris, W. Roedl, R. Kircheis, y E. Wagner. 2003. "Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA

complexes for systemic tumor-targeted gene transfer." *Bioconjug Chem* 14 (1):222-31. doi: 10.1021/bc0256087.

Landen C.N., Chavez-Reyes A, Bucana C., Schmandt R., Deavers M.T., Lopez-Berestein G., y Sood A.K.. 1997. "Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors." *Nat Med* 3 (12):1362-8.

Lee, J.-M., Yoon, T.-J., Cho, Y.-S., 2013. Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. *BioMed. Res. Int.*, p. 10.

Lee, J. W., J. P. Tutela, R. A. Zoumalan, V. D. Thanik, P. D. Nguyen, L. Varjabedian, S. M. Warren, y P. B. Saadeh. 2010. "Inhibition of Smad3 expression in radiation-induced fibrosis using a novel method for topical transcutaneous gene therapy." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136 (7):714-9. doi: 10.1001/archoto.2010.107.

Licciardi, Mariano, Gaetano Giammona, Jianzhong Du, Steven P. Armes, Yiqing Tang, y Andrew L. Lewis. 2006. "New folate-functionalized biocompatible block copolymer micelles as potential anti-cancer drug delivery systems." *Polymer* 47 (9):2946-2955. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2006.03.014>.

Lichtenberg, D., y T. Markello. 1984. "Structural characteristics of phospholipid multilamellar liposomes." *J Pharm Sci* 73 (1):122-5.

Lipson, E. J., y C. G. Drake. 2011. "Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma." *Clin Cancer Res* 17 (22):6958-62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1595.

Little, M. H., K. A. Williamson, M. Mannens, A. Kelsey, C. Gosden, N. D. Hastie, y V. van Heyningen. 1993. "Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion." *Hum Mol Genet* 2 (3):259-64.

Liu, Y., J. Tao, Y. Li, J. Yang, Y. Yu, M. Wang, X. Xu, C. Huang, W. Huang, J. Dong, L. Li, J. Liu, G. Shen, y Y. Tu. 2009. "Targeting hypoxia-inducible factor-1alpha with Tf-PEI-shRNA complex via transferrin receptor-mediated endocytosis inhibits melanoma growth." *Mol Ther* 17 (2):269-77. doi: 10.1038/mt.2008.266.

Livak, K. J., y T. D. Schmittgen. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25 (4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lloyd, J. M., T. O'Dowd, M. Driver, y D. E. Tee. 1984. "Demonstration of an epitope of the transferrin receptor in human cervical epithelium--a potentially useful cell marker." *J Clin Pathol* 37 (2):131-5.

Loeb, D. M., E. Evron, C. B. Patel, P. M. Sharma, B. Niranjana, L. Buluwela, S. A. Weitzman, D. Korz, y S. Sukumar. 2001. "Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is

expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation." *Cancer Res* 61 (3):921-5.

Lumachi, F., D. A. Santeufemia, y S. M. Basso. 2015. "Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer." *World J Biol Chem* 6 (3):231-9. doi: 10.4331/wjbc.v6.i3.231.

Maheswaran, S., C. Englert, P. Bennett, G. Heinrich, y D. A. Haber. 1995. "The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis." *Genes Dev* 9 (17):2143-56.

Maheswaran, S., S. Park, A. Bernard, J. F. Morris, F. J. Rauscher, 3rd, D. E. Hill, y D. A. Haber. 1993. "Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (11):5100-4.

Malam, Y., M. Loizidou, y A. M. Seifalian. 2009. "Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer." *Trends Pharmacol Sci* 30 (11):592-9. doi: 10.1016/j.tips.2009.08.004.

Manger, B., A. Weiss, K. J. Hardy, y J. D. Stobo. 1986. "A transferrin receptor antibody represents one signal for the induction of IL 2 production by a human T cell line." *J Immunol* 136 (2):532-8.

Manzoor, S., M. Saalim, M. Imran, S. Resham, y J. Ashraf. 2015. "Hepatitis B virus therapy: What's the future holding for us?" *World J Gastroenterol* 21 (44):12558-75. doi: 10.3748/wjg.v21.i44.12558.

Martinerie, C., G. Chevalier, F. J. Rauscher, y B. Perbal. 1996. "Regulation of nov by WT1: a potential role for nov in nephrogenesis." *Oncogene* 12 (7):1479-92.

Mayo, M. W., C. Y. Wang, S. S. Drouin, L. V. Madrid, A. F. Marshall, J. C. Reed, B. E. Weissman, y A. S. Baldwin. 1999. "WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene." *EMBO J* 18 (14):3990-4003. doi: 10.1093/emboj/18.14.3990.

Menke, A. L., A. J. van der Eb, y A. G. Jochemsen. 1998. "The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene?" *Int Rev Cytol* 181:151-212.

Middleton, M. R., J. J. Grob, N. Aaronson, G. Fierlbeck, W. Tilgen, S. Seiter, M. Gore, S. Aamdal, J. Cebon, A. Coates, B. Dreno, M. Henz, D. Schadendorf, A. Kapp, J. Weiss, U. Fraass, P. Statkevich, M. Muller, y N. Thatcher. 2000. "Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma." *J Clin Oncol* 18 (1):158-66.

Moreau, P., J. L. Harousseau, J. Wijdenes, N. Morineau, N. Milpied, y R. Bataille. 2000. "A combination of anti-interleukin 6 murine monoclonal antibody with dexamethasone and high-dose melphalan induces high complete response rates in advanced multiple myeloma." *Br J Haematol* 109 (3):661-4.

Morita S., Oka Y., Tsuboi A., Kawakami M., Maruno M., Izumoto S., Osaki T., Taguchi T., Ueda T., Myoui A., Nishida S., Shirakata T., Ohno S., Oji Y., Aozasa K., Hatazawa J., Ueda K., Yoshikawa H., Yoshimine T., Noguchi S., Kawase I., Nakatsuka S., Sugiyama H. y Sakamoto J. 2006. A Phase I/II Trial of a WT1 (Wilms' Tumor Gene) Peptide Vaccine in Patients with Solid Malignancy: Safety Assessment Based on the Phase I Data. *Jpn J Clin Oncol.* 36(4):231–236

Moura, I. C., M. N. Centelles, M. Arcos-Fajardo, D. M. Malheiros, J. F. Collawn, M. D. Cooper, y R. C. Monteiro. 2001. "Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy." *J Exp Med* 194 (4):417-25.

Mrowka, C., y A. Schedl. 2000. "Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features." *J Am Soc Nephrol* 11 Suppl 16:S106-15.

Mulligan, R. C. 1993. "The basic science of gene therapy." *Science* 260 (5110):926-32.

Nakase, I., B. Gallis, T. Takatani-Nakase, S. Oh, E. Lacoste, N. P. Singh, D. R. Goodlett, S. Tanaka, S. Futaki, H. Lai, y T. Sasaki. 2009. "Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin-transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis." *Cancer Lett* 274 (2):290-8. doi: 10.1016/j.canlet.2008.09.023.

Nakase, M., M. Inui, K. Okumura, T. Kamei, S. Nakamura, y T. Tagawa. 2005. "p53 gene therapy of human osteosarcoma using a transferrin-modified cationic liposome." *Mol Cancer Ther* 4 (4):625-31. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-04-0196.

Nakatsuka, S., Y. Oji, T. Horiuchi, T. Kanda, M. Kitagawa, T. Takeuchi, K. Kawano, Y. Kuwae, A. Yamauchi, M. Okumura, Y. Kitamura, Y. Oka, I. Kawase, H. Sugiyama, y K. Aozasa. 2006. "Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells." *Mod Pathol* 19 (6):804-14. doi: 10.1038/modpathol.3800588.

Nikolaou, V., y A. J. Stratigos. 2014. "Emerging trends in the epidemiology of melanoma." *Br J Dermatol* 170 (1):11-9. doi: 10.1111/bjd.12492.

Ogris, M., S. Brunner, S. Schüller, R. Kircheis, y E. Wagner. 1999. "PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery." *Gene Ther* 6 (4):595-605. doi: 10.1038/sj.gt.3300900.

Oh, N., y J. H. Park. 2014. "Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells." *Int J Nanomedicine* 9 Suppl 1:51-63. doi: 10.2147/IJN.S26592.

Oji, Y., S. Miyoshi, E. Takahashi, S. Koga, Y. Nakano, Y. Shintani, H. Hirabayashi, A. Matsumura, K. Iuchi, K. Ito, Y. Kishimoto, A. Tsuboi, K. Ikegame, N. Hosen, Y. Oka, H. Ogawa, H. Maeda, S. Hayashi, I. Kawase, y H. Sugiyama. 2004. "Absence of

mutations in the Wilms' tumor gene wt1 in de novo non-small cell lung cancers." *Neoplasma* 51 (1):17-20.

Oji, Y., Y. Miyoshi, E. Kiyotoh, S. Koga, Y. Nakano, A. Ando, N. Hosen, A. Tsuboi, M. Kawakami, K. Ikegame, Y. Oka, H. Ogawa, S. Noguchi, y H. Sugiyama. 2004. "Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in primary breast cancer." *Jpn J Clin Oncol* 34 (2):74-7.

Oji, Y., S. Nakamori, M. Fujikawa, S. Nakatsuka, A. Yokota, N. Tatsumi, S. Abeno, A. Ikeba, S. Takashima, M. Tsujie, H. Yamamoto, M. Sakon, R. Nezu, K. Kawano, S. Nishida, K. Ikegame, M. Kawakami, A. Tsuboi, Y. Oka, K. Yoshikawa, K. Aozasa, M. Monden, y H. Sugiyama. 2004. "Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer Sci* 95 (7):583-7.

Oji, Y., T. Suzuki, Y. Nakano, M. Maruno, S. Nakatsuka, T. Jomgeow, S. Abeno, N. Tatsumi, A. Yokota, S. Aoyagi, T. Nakazawa, K. Ito, K. Kanato, T. Shirakata, S. Nishida, N. Hosen, M. Kawakami, A. Tsuboi, Y. Oka, K. Aozasa, T. Yoshimine, y H. Sugiyama. 2004. "Overexpression of the Wilms' tumor gene W T1 in primary astrocytic tumors." *Cancer Sci* 95 (10):822-7.

Oji, Y., M. Yano, Y. Nakano, S. Abeno, S. Nakatsuka, A. Ikeba, T. Yasuda, Y. Fujiwara, S. Takiguchi, H. Yamamoto, S. Fujita, K. Kanato, K. Ito, T. Jomgeow, M. Kawakami, A. Tsuboi, T. Shirakata, S. Nishida, N. Hosen, Y. Oka, K. Aozasa, M. Monden, y H. Sugiyama. 2004. "Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer." *Anticancer Res* 24 (5B):3103-8.

Oka, Y., A. Tsuboi, M. Kawakami, O. A. Elisseeva, H. Nakajima, K. Udaka, I. Kawase, Y. Oji, y H. Sugiyama. 2006. "Development of WT1 peptide cancer vaccine against hematopoietic malignancies and solid cancers." *Curr Med Chem* 13 (20):2345-52.

Omary, M. B., I. S. Trowbridge, y J. Minowada. 1980. "Human cell-surface glycoprotein with unusual properties." *Nature* 286 (5776):888-91.

Ottewell, P. D., J. K. Woodward, D. V. Lefley, C. A. Evans, R. E. Coleman, y I. Holen. 2009. "Anticancer mechanisms of doxorubicin and zoledronic acid in breast cancer tumor growth in bone." *Mol Cancer Ther* 8 (10):2821-32. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0462.

Parada J. 2003. Melanoma maligno cutáneo. Perfil epidemiológico en México. edited by Pineda B: Gac Med Oncol.

Park J.W., Hong K., Kirpotin D.B., Colbern G, Shalaby R, Baselga J, Shao Y, Nielsen U.B., Marks J.D., Moore D., Papahadjopoulos D., y Benz C.C. 2002. Anti-HER2 Immunoliposomes: Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery. *Clinical Cancer Research*. 8, 1172–1181,

Parker, S. L., T. Tong, S. Bolden, y P. A. Wingo. 1996. "Cancer statistics, 1996." *CA Cancer J Clin* 46 (1):5-27.

Pecar, S., M. Sentjurc, M. Schara, M. Nemeč, B. Sorg, y E. Hecker. 1982. "Spin-labeled phorbol esters and their interaction with cellular membranes." *Carcinog Compr Surv* 7:541-53.

Pinedo-Vega, J. L., R. Castaneda-Lopez, J. I. Davila-Rangel, F. Mireles-Garcia, C. Rios-Martinez, y A. Lopez-Saucedo. 2014. "[Skin cancer incidence in Zacatecas]." *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 52 (3):282-9.

Plank, C., B. Oberhauser, K. Mechtler, C. Koch, y E. Wagner. 1994. "The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems." *J Biol Chem* 269 (17):12918-24.

Ponka, P., y C. N. Lok. 1999. "The transferrin receptor: role in health and disease." *Int J Biochem Cell Biol* 31 (10):1111-37.

Posch, C., y S. Ortiz-Urda. 2013. "NRAS mutant melanoma--undrugable?" *Oncotarget* 4 (4):494-5.

Poulikakos, P. I., C. Zhang, G. Bollag, K. M. Shokat, y N. Rosen. 2010. "RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF." *Nature* 464 (7287):427-30. doi: 10.1038/nature08902.

Prasad, G., H. Wang, D. L. Hill, y R. Zhang. 2004. "Recent advances in experimental molecular therapeutics for malignant gliomas." *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4 (4):347-61.

Prutki, M., M. Poljak-Blazi, M. Jakopovic, D. Tomas, I. Stipancic, y N. Zarkovic. 2006. "Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer." *Cancer Lett* 238 (2):188-96. doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.001.

Qian, Z. M., H. Li, H. Sun, y K. Ho. 2002. "Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway." *Pharmacol Rev* 54 (4):561-87.

Raso, V., y M. Basala. 1984. "A highly cytotoxic human transferrin-ricin A chain conjugate used to select receptor-modified cells." *J Biol Chem* 259 (2):1143-9.

Recht, L. D., T. W. Griffin, V. Raso, y A. R. Salimi. 1990. "Potent cytotoxicity of an antihuman transferrin receptor-ricin A-chain immunotoxin on human glioma cells in vitro." *Cancer Res* 50 (20):6696-700.

Reddy, J. C., J. C. Morris, J. Wang, M. A. English, D. A. Haber, Y. Shi, y J. D. Licht. 1995. "WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins." *J Biol Chem* 270 (18):10878-84.

Resnier, P., T. Montier, V. Mathieu, J. P. Benoit, y C. Passirani. 2013. "A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer." *Biomaterials* 34 (27):6429-43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.060.

Reyes-Martinez G. 2007. Caracterización epidemiológica y concordancia clínico-patológica del cáncer de piel en el Hospital Dr. Manuel Gea González. edited by Romero-Guerra y AL: Dermatología, Cosmética, Medica y Quirurgica (DCMQ).

Richardson, D. R., y P. Ponka. 1997. "The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells." *Biochim Biophys Acta* 1331 (1):1-40.

Robert, C., L. Thomas, I. Bondarenko, S. O'Day, J. Weber, C. Garbe, C. Lebbe, J. F. Baurain, A. Testori, J. J. Grob, N. Davidson, J. Richards, M. Maio, A. Hauschild, W. H. Miller, P. Gascon, M. Lotem, K. Harmankaya, R. Ibrahim, S. Francis, T. T. Chen, R. Humphrey, A. Hoos, y J. D. Wolchok. 2011. "Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma." *N Engl J Med* 364 (26):2517-26. doi: 10.1056/NEJMoa1104621.

Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, L. M. Muul, S. Leitman, A. E. Chang, S. E. Ettinghausen, Y. L. Matory, J. M. Skibber, E. Shiloni, y J. T. Vetto. 1985. "Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer." *N Engl J Med* 313 (23):1485-92. doi: 10.1056/NEJM198512053132327.

Rosenberg, S. A., J. C. Yang, D. J. Schwartzentruber, P. Hwu, F. M. Marincola, S. L. Topalian, C. A. Seipp, J. H. Einhorn, D. E. White, y S. M. Steinberg. 1999. "Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b." *J Clin Oncol* 17 (3):968-75.

Sato, Y., N. Yamauchi, M. Takahashi, K. Sasaki, J. Fukaura, H. Neda, S. Fujii, M. Hirayama, Y. Itoh, Y. Koshita, K. Kogawa, J. Kato, S. Sakamaki, y Y. Niitsu. 2000. "In vivo gene delivery to tumor cells by transferrin-streptavidin-DNA conjugate." *FASEB J* 14 (13):2108-18. doi: 10.1096/fj.99-1052com.

Seymour, G. J., M. D. Walsh, M. F. Lavin, G. Stratton, y R. A. Gardiner. 1987. "Transferrin receptor expression by human bladder transitional cell carcinomas." *Urol Res* 15 (6):341-4.

Shi N. y Pardridge W.M. 2000. Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20;97(13):7567-72.

Shindelman, J. E., A. E. Ortmeyer, y H. H. Sussman. 1981. "Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells." *Int J Cancer* 27 (3):329-34.

Silberstein, G. B., K. Van Horn, P. Strickland, C. T. Roberts, Jr., y C. W. Daniel. 1997. "Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (15):8132-7.

Singer, S. J., y G. L. Nicolson. 1972. "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175 (4023):720-31.

Singh, M., H. Atwal, y R. Micetich. 1998. "Transferrin directed delivery of adriamycin to human cells." *Anticancer Res* 18 (3A):1423-7.

Sosman, J. A., K. B. Kim, L. Schuchter, R. Gonzalez, A. C. Pavlick, J. S. Weber, G. A. McArthur, T. E. Hutson, S. J. Moschos, K. T. Flaherty, P. Hersey, R. Kefford, D. Lawrence, I. Puzanov, K. D. Lewis, R. K. Amaravadi, B. Chmielowski, H. J. Lawrence, Y. Shyr, F. Ye, J. Li, K. B. Nolop, R. J. Lee, A. K. Joe, y A. Ribas. 2012. "Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib." *N Engl J Med* 366 (8):707-14. doi: 10.1056/NEJMoa1112302.

Stark, M., y N. Hayward. 2007. "Genome-wide loss of heterozygosity and copy number analysis in melanoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays." *Cancer Res* 67 (6):2632-42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4152.

Su, F., A. Viros, C. Milagre, K. Trunzer, G. Bollag, O. Spleiss, J. S. Reis-Filho, X. Kong, R. C. Koya, K. T. Flaherty, P. B. Chapman, M. J. Kim, R. Hayward, M. Martin, H. Yang, Q. Wang, H. Hilton, J. S. Hang, J. Noe, M. Lambros, F. Geyer, N. Dhomen, I. Niculescu-Duvaz, A. Zamboni, D. Niculescu-Duvaz, N. Preece, L. Robert, N. J. Otte, S. Mok, D. Kee, Y. Ma, C. Zhang, G. Habets, E. A. Burton, B. Wong, H. Nguyen, M. Kockx, L. Andries, B. Lestini, K. B. Nolop, R. J. Lee, A. K. Joe, J. L. Troy, R. Gonzalez, T. E. Hutson, I. Puzanov, B. Chmielowski, C. J. Springer, G. A. McArthur, J. A. Sosman, R. S. Lo, A. Ribas, y R. Marais. 2012. "RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors." *N Engl J Med* 366 (3):207-15. doi: 10.1056/NEJMoa1105358.

Sun, I. L., E. E. Sun, F. L. Crane, D. J. Morr e, y W. P. Faulk. 1992. "Inhibition of transplasma membrane electron transport by transferrin-adriamycin conjugates." *Biochim Biophys Acta* 1105 (1):84-8.

Sutherland, R., D. Delia, C. Schneider, R. Newman, J. Kemshead, y M. Greaves. 1981. "Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (7):4515-9.

Tabernero, J., G. I. Shapiro, P. M. LoRusso, A. Cervantes, G. K. Schwartz, G. J. Weiss, L. Paz-Ares, D. C. Cho, J. R. Infante, M. Alsina, M. M. Gounder, R. Falzone, J. Harrop, A. C. White, I. Toudjarska, D. Bumcrot, R. E. Meyers, G. Hinkle, N. Svrzikapa, R. M. Hutabarat, V. A. Clausen, J. Cehelsky, S. V. Nochur, C. Gamba-Vitalo, A. K. Vaishnav, D. W. Sah, J. A. Gollob, y H. A. Burris. 2013. "First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement." *Cancer Discov* 3 (4):406-17. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0429.

Taetle, R. 1990. "The role of transferrin receptors in hemopoietic cell growth." *Exp Hematol* 18 (4):360-5.

Tanaka, T., S. Shiramoto, M. Miyashita, Y. Fujishima, y Y. Kaneo. 2004. "Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME)." *Int J Pharm* 277 (1-2):39-61. doi: 10.1016/j.ijpharm.2003.09.050.

Tartour, E., J. Y. Blay, T. Dorval, B. Escudier, V. Mosseri, J. Y. Douillard, L. Deneux, I. Gorin, S. Negrier, C. Mathiot, P. Pouillart, y W. H. Fridman. 1996. "Predictors of clinical response to interleukin-2--based immunotherapy in melanoma patients: a French multiinstitutional study." *J Clin Oncol* 14 (5):1697-703.

Taxman, D. J., E. S. Lee, y D. M. Wojchowski. 1993. "Receptor-targeted transfection using stable maleimido-transferrin/thio-poly-L-lysine conjugates." *Anal Biochem* 213 (1):97-103. doi: 10.1006/abio.1993.1391.

Thomas, N. E., S. N. Edmiston, A. Alexander, R. C. Millikan, P. A. Groben, H. Hao, D. Tolbert, M. Berwick, K. Busam, C. B. Begg, D. Mattingly, D. W. Ollila, C. K. Tse, A. Hummer, J. Lee-Taylor, y K. Conway. 2007. "Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16 (5):991-7. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-1038.

Tomalia, D. A. 2009. "In quest of a systematic framework for unifying and defining nanoscience." *J Nanopart Res* 11 (6):1251-1310. doi: 10.1007/s11051-009-9632-z.

Tonik, S. E., J. E. Shindelman, y H. H. Sussman. 1986. "Transferrin receptor is inversely correlated with estrogen receptor in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 7 (2):71-6.

Tseng, J. F., y R. C. Mulligan. 2002. "Gene therapy for pancreatic cancer." *Surg Oncol Clin N Am* 11 (3):537-69.

Valverde, P., E. Healy, I. Jackson, J. L. Rees, y A. J. Thody. 1995. "Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans." *Nat Genet* 11 (3):328-30. doi: 10.1038/ng1195-328.

Veierød, M. B., H. O. Adami, E. Lund, B. K. Armstrong, y E. Weiderpass. 2010. "Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19 (1):111-20. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0567.

Wagner, E., M. Cotten, K. Mechtler, H. Kirlappos, y M. L. Birnstiel. 1991. "DNA-binding transferrin conjugates as functional gene-delivery agents: synthesis by linkage of polylysine or ethidium homodimer to the transferrin carbohydrate moiety." *Bioconjug Chem* 2 (4):226-31.

Wagner, E., C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotten, y M. L. Birnstiel. 1992. "Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (17):7934-8.

Wagner, N., et al., 2008. "The Wilms'tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation." *Pflugers Arch* 455(5): 839-47

Walker, R. A., y S. J. Day. 1986. "Transferrin receptor expression in non-malignant and malignant human breast tissue." *J Pathol* 148 (3):217-24. doi: 10.1002/path.1711480305.

Wang, F., X. Jiang, D. C. Yang, R. L. Elliott, y J. F. Head. 2000. "Doxorubicin-gallium-transferrin conjugate overcomes multidrug resistance: evidence for drug accumulation in the nucleus of drug resistant MCF-7/ADR cells." *Anticancer Res* 20 (2A):799-808.

Wang, Xue-Yan, y Hong-Song Chen. 2014. "Emerging antivirals for the treatment of hepatitis B." *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20 (24):7707-7717. doi: 10.3748/wjg.v20.i24.7707.

Whitehead, K.A., Langer, R., Anderson, D.G., 2009. Knocking down barriers:advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2), 129–138.

Wiesner, T., A. C. Obenauf, R. Murali, I. Fried, K. G. Griewank, P. Ulz, C. Windpassinger, W. Wackernagel, S. Loy, I. Wolf, A. Viale, A. E. Lash, M. Pirun, N. D. Socci, A. Rütten, G. Palmedo, D. Abramson, K. Offit, A. Ott, J. C. Becker, L. Cerroni, H. Kutzner, B. C. Bastian, y M. R. Speicher. 2011. "Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors." *Nat Genet* 43 (10):1018-21. doi: 10.1038/ng.910.

Wightman, L., E. Patzelt, E. Wagner, y R. Kircheis. 1999. "Development of transferrin-polycation/DNA based vectors for gene delivery to melanoma cells." *J Drug Target* 7 (4):293-303. doi: 10.3109/10611869909085512.

Williams, C., C. Quirk, y A. Quirk. 2014. "Melanoma: A new strategy to reduce morbidity and mortality." *Australas Med J* 7 (7):266-71. doi: 10.4066/AMJ.2014.1949.

Wu, J., Y. Lu, A. Lee, X. Pan, X. Yang, X. Zhao, y R. J. Lee. 2007. "Reversal of multidrug resistance by transferrin-conjugated liposomes co-encapsulating doxorubicin and verapamil." *J Pharm Pharm Sci* 10 (3):350-7.

Xu, L., C. C. Huang, W. Huang, W. H. Tang, A. Rait, Y. Z. Yin, I. Cruz, L. M. Xiang, K. F. Pirollo, y E. H. Chang. 2002. "Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes." *Mol Cancer Ther* 1 (5):337-46.

Xu, L., K. F. Pirollo, y E. H. Chang. 2001. "Tumor-targeted p53-gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/radiotherapy." *J Control Release* 74 (1-3):115-28.

Xu, L., W. H. Tang, C. C. Huang, W. Alexander, L. M. Xiang, K. F. Pirollo, A. Rait, y E. H. Chang. 2001. "Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv." *Mol Med* 7 (10):723-34.

Xu, S., Y. Liu, H. C. Tai, J. Zhu, H. Ding, y R. J. Lee. 2011. "Synthesis of transferrin (Tf) conjugated liposomes via Staudinger ligation." *Int J Pharm* 404 (1-2):205-10. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.053.

Young, S. P., A. Bomford, y R. Williams. 1984. "The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes." *Biochem J* 219 (2):505-10.

Young, S. W., M. Stenzel, y Y. Jia-Lin. 2015. "Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy?" *Crit Rev Oncol Hematol*. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.10.015.

Yu, W., K. F. Pirollo, A. Rait, B. Yu, L. M. Xiang, W. Q. Huang, Q. Zhou, G. Ertem, y E. H. Chang. 2004. "A sterically stabilized immunolipoplex for systemic administration of a therapeutic gene." *Gene Ther* 11 (19):1434-40. doi: 10.1038/sj.gt.3302304.

Zamora-Avila, D. E., M. A. Franco-Molina, L. M. Trejo-Avila, C. Rodriguez-Padilla, D. Resendez-Perez, y P. Zapata-Benavides. 2007. "RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line." *Melanoma Res* 17 (6):341-8. doi: 10.1097/CMR.0b013e3282efd3ae.

Zamora-Avila, D. E., P. Zapata-Benavides, M. A. Franco-Molina, S. Saavedra-Alonso, L. M. Trejo-Avila, D. Resendez-Perez, J. L. Mendez-Vazquez, J. Isaias-Badillo, y C. Rodriguez-Padilla. 2009. "WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth." *Cancer Gene Ther* 16 (12):892-9. doi: 10.1038/cgt.2009.35.

Zapata-Benavides, P., E. Manilla-Munoz, D. E. Zamora-Avila, S. Saavedra-Alonso, M. A. Franco-Molina, L. M. Trejo-Avila, G. Davalos-Aranda, y C. Rodriguez-Padilla. 2012. "WT1 silencing by RNAi synergizes with chemotherapeutic agents and induces chemosensitization to doxorubicin and cisplatin in B16F10 murine melanoma cells." *Oncol Lett* 3 (4):751-755. doi: 10.3892/ol.2012.578.

Zapata-Benavides, P., M. Tuna, G. Lopez-Berestein, y A. M. Tari. 2002. "Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation." *Biochem Biophys Res Commun* 295 (4):784-90.

Zatloukal, K., E. Wagner, M. Cotten, S. Phillips, C. Plank, P. Steinlein, D. T. Curiel, y M. L. Birmstiel. 1992. "Transferrinfection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells." *Ann N Y Acad Sci* 660:136-53.

Zeng, X., Y. X. Sun, W. Qu, X. Z. Zhang, y R. X. Zhuo. 2010. "Biotinylated transferrin/avidin/biotinylated disulfide containing PEI bioconjugates mediated p53 gene delivery system for tumor targeted transfection." *Biomaterials* 31 (17):4771-80. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.039.

Zhang, J., X. Li, y L. Huang. 2014. "Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer." *J Control Release* 190:440-50. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.037.

Zhang, Lei, Yecheng Li, y Jimmy C. Yu. 2014. "Chemical modification of inorganic nanostructures for targeted and controlled drug delivery in cancer treatment." *Journal of Materials Chemistry B* 2 (5):452-470. doi: 10.1039/C3TB21196G.

Zhang, M., C. X. Bai, X. Zhang, J. Chen, L. Mao, y L. Gao. 2004. "Downregulation enhanced green fluorescence protein gene expression by RNA interference in mammalian cells." *RNA Biol* 1 (1):74-7.

Zhang, X., C. G. Koh, B. Yu, S. Liu, L. Piao, G. Marcucci, R. J. Lee, y L. J. Lee. 2009. "Transferrin receptor targeted lipopolyplexes for delivery of antisense oligonucleotide g3139 in a murine k562 xenograft model." *Pharm Res* 26 (6):1516-24. doi: 10.1007/s11095-009-9864-8.

11.1 Bibliografía electrónica

<http://www.who.int/topics/cancer/es/>

<http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world/incidence/#By>

<http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepieltipomelanoma/guiadetallada/cancer-de-piel-tipo-melanoma-early-survival-rates>

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LOS_TUMORES_MALIGNOS_M%C3%A9xico.pdf

<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/melanoma/HealthProfessional/page3>

<http://www.uv.es/derma/CLindex/CLmelanoma/CLmelanoma.htm>

<http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepieltipomelanoma/guiadetallada/cancer-de-piel-tipo-melanoma-early-diagnosed>

12. AUTOBIOGRAFÍA

Santiago Saavedra Alonso

Candidato para el grado de

de doctor en ciencias con orientación en microbiología

Tesis: “EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN wt1 POR MEDIO DE UN
shRNAi ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS ESTÉRICOS DIRIGIDOS CON
TRANSFERRINA EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO”

Datos personales: Nacido en San Pedro Garza García Nuevo León el 10 de junio del
año 1982, hijo del Sr. Santiago Saavedra Miranda y la Sra. Graciela Alonso Monreal.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas perteneciente a la
Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Químico Bacteriólogo
Parasitólogo en el año 2003. Posteriormente, la obtención del grado de Maestro en
Ciencias con acentuación en Microbiología en Posgrado de la Facultad de Ciencias
Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el año 2009

Experiencia Profesional:

ANEXO
Publicación realizada

WT1 shRNA delivery using transferrin-conjugated PEG liposomes in an *in vivo* model of melanoma

SANTIAGO SAAVEDRA-ALONSO¹, PABLO ZAPATA-BENAVIDES¹, ANA KARINA CHAVEZ-ESCAMILLA¹,
EDGAR MANILLA-MUÑOZ¹, DIANA ELISA ZAMORA-AVILA²,
MOISÉS ARMIDES FRANCO-MOLINA¹ and CRISTINA RODRIGUEZ-PADILLA¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo León (UANL), San Nicolás de los Garza, Nuevo León;

²Department of Genetics, Veterinary Medicine Faculty, Autonomous University of Nuevo León (UANL), Escobedo, Nuevo León, México

Received January 13, 2016; Accepted May 31, 2016

DOI: 10.3892/etm.2016.3851

Abstract. The global incidence of melanoma is increasing. Mortality from melanoma is influenced primarily by metastasis in advanced stages of the disease. Current treatments are largely ineffective; thus, novel gene delivery approaches that target tumor-specific markers may be useful for the treatment of melanoma. Systemic administration of encapsulated RNA-interference plasmids targeted against tumor cells is a potential alternative therapy for cancer. Formulations of transferrin (Tf)-conjugated polyethylene glycol (PEG) liposomes loaded with short hairpin RNA (shRNA) against *WT1* (Lip + RNAi + Tf), PEG liposomes loaded with shRNA against *WT1* (Lip + RNAi), Tf-conjugated PEG liposomes loaded with pEGFP-N3 (Lip + GFP + Tf) and saline solution as negative control (untreated) were administered systemically to C57BL/6 mice implanted subcutaneously with a melanoma cell line. Tumor volume, body weight, tumor weight, survival and relative expression of *WT1* were evaluated. No significant differences in net body weight were identified between groups. The tumor volume decreased from 7,871 mm³ (SD±2,087) in the untreated group to 5,981 mm³ (SD±2,099) in the Lip + RNAi + Tf group. The tumor weight was reduced, from 8.8 g (SD±0.30) in the untreated group to 5.5 g (SD±0.87) in the Lip + RNAi + Tf group. An increase of 37% in survival was also observed in the group treated with Lip + RNAi + Tf in comparison to the untreated group. Tumors treated with Lip + RNAi + Tf also showed a decrease in the mean relative expression of WT1 of 0.21 (SD±0.28)

folds compared with 1.8 (SD±2.49) folds in untreated group, 1.34 (SD±0.43) folds in Lip + RNAi group and of 1.89 (SD±0.69) folds in Lip + GFP + Tf group. Systemic administration of transferrin-conjugated PEG liposomes loaded with shRNA against *WT1* reduced WT1 expression and tumor size and increased survival.

Introduction

Melanoma originates in pigmented melanocytes derived from neural crest cells that are normally present in the epidermis and dermis (1). Melanoma represents <5% of skin tumors but carries the greatest mortality rate of all skin neoplasms (2). The global incidence of melanoma has increased markedly (3). Melanoma is able to metastasize through the hematogenous or lymphatic system (4,5). Advanced-stage, metastatic disease confers a poor prognosis, with a median survival of less than one year (3,6).

The Wilms tumor 1 (WT1) protein is a transcription factor that regulates the expression of genes involved in cell proliferation and apoptosis (7-11). WT1 expression is essential for genitourinary development, and ~10% of nephroblastomas exhibit *WT1* mutations (12). By contrast, wild-type WT1 is overexpressed in a variety of neoplasms, including lung, breast, thyroid and melanoma (13-17).

WT1 is expressed in >80% of malignant melanoma cells, but is not present *in vivo* in normal skin or benign melanocytic nevi (17). Expression of WT1 is associated with melanoma cell proliferation and is a possible marker of melanocytic invasion into the dermis (18,19). *In vitro* knockdown of WT1 induces apoptosis and increases sensitivity to chemotherapy in B16F10 melanoma cells. Furthermore, *in vivo* *WT1* short hairpin RNA (shRNA) applied by aerosol reduces the number and size of tumors (20,21).

Gene therapy using tumor-targeted liposomes as delivery systems has opened a new era in cancer treatment (22). Liposomes are essentially phospholipid bilayer envelopes capable of systemically delivering drugs or genetic material. The advantage of using phospholipids for systemic delivery is that they are biodegradable, minimally toxic and easily

Correspondence to: Dr Santiago Saavedra-Alonso, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo León (UANL), Unit C, Pedro de Alba S/N, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, México
E-mail: saas100682@hotmail.com

Key words: transferrin-targeted liposome, *WT1*, melanoma, RNA interference

removed (23,24). Recent studies show that the addition of polyethylene glycol (PEG) to phospholipids increases the half-life of liposomes in circulation; this modification also improves the ability to incorporate ligand molecules that specifically recognize superficial tumor targets (25-27).

Transferrin (Tf), a glycoprotein required for cellular absorption of iron, is often used in gene or drug delivery systems (28-37). As the Tf receptor (CD71) is overexpressed on the surface of cancer cells, it is a useful target for the delivery of therapeutic agents such as small-molecule drugs and nucleic acids (26,31,37-40).

The aim of the present study was to analyze the antitumor effects of Tf-conjugated PEG liposomes loaded with *WT1* shRNA applied systemically to a subcutaneous model of melanoma in C57BL/6 mice.

Materials and methods

Materials. One-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine (POPC), dimethyldioctadecyl ammonium bromide (DDAB), pegylated distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG 2000) and DSPE-PEG 2000 conjugated to maleimide were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA). DNase I was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Polycarbonate membranes of 100 nm were purchased from Whatman International, Ltd. (Maidstone, UK). Amicon Centriprep (molecular weight cut-off, 30 kDa) concentrator was purchased from EMD Millipore (Billerica, MA, USA). Holo-transferrin and 2-iminothiolane hydrochloride (Traut's reagent) were purchased from Sigma-Aldrich. *WT1.1* DNA plasmid construction was performed as described by Zamora-Avila *et al* (20). B16F10 murine melanoma cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Rat anti-mouse CD71-(FITC) antibody clone C2 was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). The pEGFP-N3 vector that expressed GFP protein was obtained from Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, USA). Anti-WT1 F6 antibody (sc-7385) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; SAB2500451-100UG) antibody was purchased from Sigma-Aldrich. Anti-goat secondary antibody (#170-6515) was purchased from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA), and anti-mouse secondary antibody (sc-516086) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Construction of *WT1* shRNA plasmid. *WT1* RNAi was designed using siRNA design software available online (Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc., Austin, TX, USA), and synthesized at 0.05 mg (Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) to create one recombinant plasmid (named WT1-1). Oligonucleotides for the WT1-1 plasmid were 5'-GATCCG GCTGTCCCCTTACAGATGGAAGCTTGCATCTGTAA GTGGGACAGCTTTTTTGAAG-3' and 3'-GCCGACAGG GTGAATGTCTACCTTCGAACGTAGACATTCACCCTG TCGAAAAACCTTCGCCGG-5'. The oligonucleotides were resuspended to a final concentration of 1 mg/ml and annealed and ligated into pGSH1-GFP (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA, USA).

Western blot analysis. Tumoral tissue samples (25 mg) were lysed with TRIzol reagent according to manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Inc., Gaithersburg, MD, USA). Protein concentration was determined using a DC protein assay kit. Proteins (50 µg whole-cell lysates) was electrophoresed on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Blocking was realized with 5% lactose-free milk and Tween 20 in incubation for 1 h. Three washes were performed after each hybridizing with the above antibodies. Monoclonal anti-WT1 F6 was used at a dilution of 1:2,500 in Tris-buffered saline (TBS) buffer, and secondary antibody was used at 1:5,000 in TBS buffer. To control for protein loading, anti-GAPDH was used at 1:10,000 in phosphate-buffered saline (PBS), and anti-goat secondary antibody was used at 1:5,000. All antibody incubations were 90 min at room temperature. Protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence using Lumi-Light Western blotting substrate Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA).

Flow cytometric analysis. B16F10 melanoma cells (1x10⁶) were resuspended in 200 µl PBS buffer and stained with anti-mouse CD71 (FITC) antibody. Cells were then incubated at 4°C for 30 min and spun at 400 x g for 10 min at 4°C. Cells were then washed twice with PBS buffer and spun at 1,600 rpm for 10 min at 4°C. Cells were suspended in 200 µl PBS and analyzed using a Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) to assess cellular expression of CD71.

Liposomal preparation. Liposomal formulation was performed according to Shi and Partridge (41). POPC (19.2 µmol), DDAB (0.2 µmol), DSPE-PEG 2000 (0.6 µmol), and DSPE-PEG 2000-maleimide (30 nmol) were dissolved in a mixture of chloroform/methanol (2:1 in a total volume of 3 ml) and subsequently evaporated using nitrogen gas. Lipids were then suspended in 0.2 ml PBS buffer containing 200 µg plasmid DNA and vortexed vigorously for 2 min. The liposome/DNA suspension was frozen in ethanol/dry ice for 4 min and thawed at 40°C for 2 min in a cycle 10 times. Adjustments to the size of the liposomes were performed using polycarbonate membranes containing a 100-nm pore size; this step was repeated five times. After extrusion, the liposomes were graduated to 2 ml and stored in the dark at 4°C. To remove unincorporated DNA inside the liposome, 5 U endonuclease I and 5 mM MgCl₂ were added to the mixture and incubated for 1 h at 37°C. DNA concentration was calculated at ~50 and 60% using NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

Anchoring of the protein to liposome was performed using 10 nmol Tf protein (Sigma-Aldrich) and thiolated using 400 µmol 2-iminothiolane (Traut's reagent) in 100 µl borate-EDTA buffer, pH 8.5 (0.15 M sodium borate and 0.1 mM EDTA). The mixture was incubated for 2 h in the dark at room temperature with shaking. Loaded Tf was washed with PBS in a concentration column (Centricon 30; Amicon) and concentrated to a final volume of 0.2 ml. The loaded Tf was immediately added to the liposomes and incubated for 24 h at 4°C to allow reaction of the maleimide group to generate PEG-immunoliposome complexes. The

complexes were dialyzed using an 50-nm membrane to exclude non-incorporated materials. The mean vesicle diameters were determined using a Zetasizer Nano ZS90 particle size analyzer (Malvern Instruments, Ltd., Malvern, UK).

Subcutaneous in vivo model of melanoma. Female C57BL/6 mice (age, 7-8 weeks; weight, 20-25 g) were obtained from Harlan Laboratories S.A. De C.V. (Distrito Federal, Mexico). Seven mice in each group were used in the assay. Animals were housed under a 12-h light/dark cycle and received an autoclaved rodent diet and water *ad libitum*. All experiments were performed with prior approval from the local animal ethics committee. Four groups of seven mice were used for the *in vivo* assay. A subcutaneous model of melanoma was developed using the B16F10 cell line (CRL-6475; ATCC), which is derived from the same mouse species. A suspension of 200 μ l containing 5×10^5 cells was subcutaneously injected into the posterior right flank of the mouse. Complete complex of Tf-conjugated PEG liposomes (50 μ l) were loaded with shRNA against *WT1* (Lip + RNAi + Tf), PEG liposomes (50 μ l) and loaded with shRNA against *WT1* (Lip + RNAi), Tf-conjugated PEG liposomes (50 μ l) and loaded with pEGFP-N3 vector (Lip + GFP + Tf) and saline solution (50 μ l; untreated group) were delivered intravenously through the tail vein on day 4 and every 5 days subsequently until day 29. Surviving mice were sacrificed on day 30 by cervical dislocation according the good management practices guidelines of laboratory animals, and tumors were collected for further analyses. Mouse weight, tumor weight and date of death were recorded.

RNA isolation and reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNA was isolated from 25 mg tumoral tissue using 1 ml TRIzol according to manufacturer's instructions. The cDNA samples were obtained using 5 μ g total RNA, 200 U Superscript III and 0.5 μ g oligo dT (12-17) at 42°C for 90 min, followed by heating at 70°C for 10 min. TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit manufactured by Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Inc., Foster City, CA, USA).

Each qPCR reaction was performed with 2 μ l cDNA and *WT1* forward primer, TCTGCGGAGCCCAATACAG, reverse primer, CACATCCTGAATGCCTCTGAAGA, and probe FAM-CACCGTGCCTGTGTATT-NFQ. As an endogenous control, a mouse β -actin primer set was used, manufactured by Applied Biosystems. For each reaction, we used Universal PCR Master Mix manufactured by Roche Molecular Systems, Inc. (Branchburg, NJ, USA). The protocol was performed for 40 cycles at 94°C for 30 sec and 64°C for 30 sec using a Real-Time Thermal cycler CROMO4 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Relative quantification was performed using the Livak method (42). All samples were run in duplicate, distilled water was including as negative control of reaction.

Statistical analysis. Significance of different treatments was determined by analysis of variance by Dunnett's test. To survival rate were performed Kaplan-Meier curves, using SPSS software, version 13 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) All data are expressed as the mean \pm the standard errors of

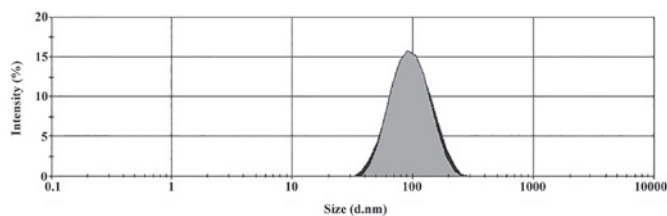


Figure 1. Size distribution according to intensity of liposomes. Approximately 50 μ l complex was suspended in 1 ml phosphate-buffered saline and analyzed using a Zetasizer Nano ZS90. Mean diameters of Tf-conjugated PEG liposomes loaded with shRNA against *WT1* were of 86 nm and 0.154 of poly-dispersity index.

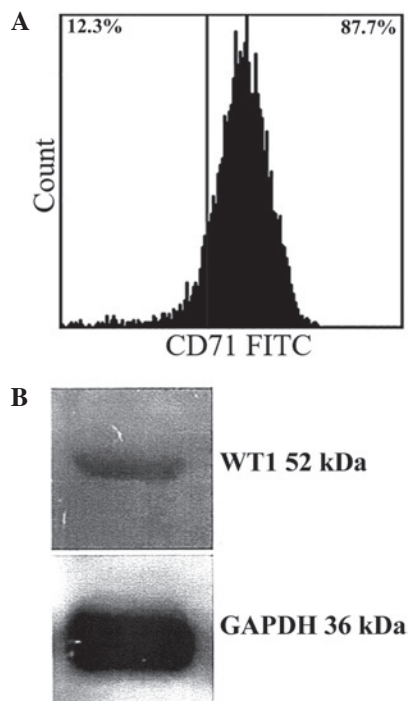


Figure 2. Presence of transferrin receptor and *WT1* protein in B16F10 melanoma cells. (A) 1×10^6 B16F10 cells were incubated with anti-mouse CD71 antibody, then analyzed using flow cytometry. The figure shows the percentage of positivity to FITC dye. (B) 50 μ g total protein extraction of B16F10 were analyzed using western blot analysis. The figure shows proteins of 52-54 kDa *WT1*, and the endogenous control GAPDH.

the mean. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Size distribution according to intensity of liposomes. Sizes of the Tf-conjugated PEG liposomes loaded with *WT1* shRNA are shown in Fig. 1. The mean diameter of the PEGylated Tf-conjugated PEG liposomes loaded with shRNA against *WT1* was 86 nm. The poly-dispersity index (PDI) was 0.154, indicating that the vesicles have a high level of homogeneity. Liposome formulation by vortexing and repeated cycles of freezing-thawing allowed the formation of unilamellar liposomes. Liposomes contained a high concentration of the neutral phospholipid POPC and a minor quantity of cationic lipid DDAB (0.2 mol), which improved the incorporation of nucleic acid into the aqueous liposome center. A smaller

quantity of DSPE-PEG 2000 (0.6 mol) and DSPE-PEG 2000-maleimide (30 nmol) provided steric properties, and the maleimide group allowed the addition of thiolated transferrin.

Transferrin receptor and WT1 expression in the B16F10 cell line. B16F10 cells showed 87% positivity for the Tf receptor according to flow cytometry results (Fig. 2A). In addition, western blotting confirmed expression of WT1 in B16F10 cells (Fig. 2B). Thus, B16F10 cells were selected as a suitable model to test Tf-conjugated PEG liposomes loaded with *WT1* shRNA.

In vivo assay. Administration of different treatments Lip + RNAi + Tf, Lip + RNAi, Lip + GFP + Tf and untreated was initiated four days after cells were injected subcutaneously into mice. Treatments were administered six times through intravenous tail vein injection during a period of five days.

The mean percentage of weights of mice previously inoculated with B16F10 cells and treated with Lip + RNAi + Tf, Lip + RNAi, Lip + GFP + Tf and untreated is shown in Fig. 3A. Untreated and Lip + RNAi + Tf groups showed increases of 34% (SD±24.92) and 41% (SD±12.78) respectively, without significant differences between groups. In Lip + RNAi and Lip + GFP + Tf groups showed a low increase of 1.5% (SD±12.97) and 10% (SD±6.87) respectively, against final reading on day 19.

Fig. 3B we found that Lip + RNAi and Lip + GFP + Tf groups grew, and there was a decrease in survival. For this reason, we were only able to record measurements to day 19 post-implant. The Lip + RNAi + Tf treatment showed a significant decrease (P<0.05) in tumor volume compared to the untreated group. The final readings presented a mean of 7,871 mm³ (SD±2,087) for the untreated group and 5,981 mm³ (SD±2,099) for Lip + RNAi + Tf group. This change represents a reduction in tumor volume of 24%.

Fig. 3C shows the mean final tumors weight of the groups of mice sacrificed at the end of the trial. Only the untreated and Lip + RNAi + Tf groups were analyzed because the mice of the other groups died after day 30. The results showed a reduction in tumor mass in the Lip + RNAi + Tf group and a mean tumor weight of 5.5 g (SD±0.87) compared with the untreated group that showed to mean tumor weight of 8.8 g (SD±0.30). The decrease of 34% in weight of the tumors collected shows that tumor size was significantly reduced (P<0.05) in Lip + RNAi + Tf group.

Fig. 3D the survival rate of C57BL/6 mice with implanted B16F10 melanoma cells subcutaneously into the right thigh of the hind limb was 25.22 days (SD±1.31). The untreated group presented a survival rate of 22.2% and Lip + RNAi + Tf group showed a survival rate of 62.5%, equivalent to an increase of 37%. This difference suggests that treatment with Lip + RNAi + Tf significantly increases survival in melanoma model employed (P<0.060). The Lip + RNAi and Lip + GFP + Tf groups showed a reduced survival compared to the untreated group, with a mean survival estimated at 20.25 and 17.75 days, respectively. The surviving mice were sacrificed on day 30 for humane reasons (+ Censored groups).

Analysis of WT1 expression in mouse tumor tissues. The *WT1* expression levels in all groups of mice were analyzed using

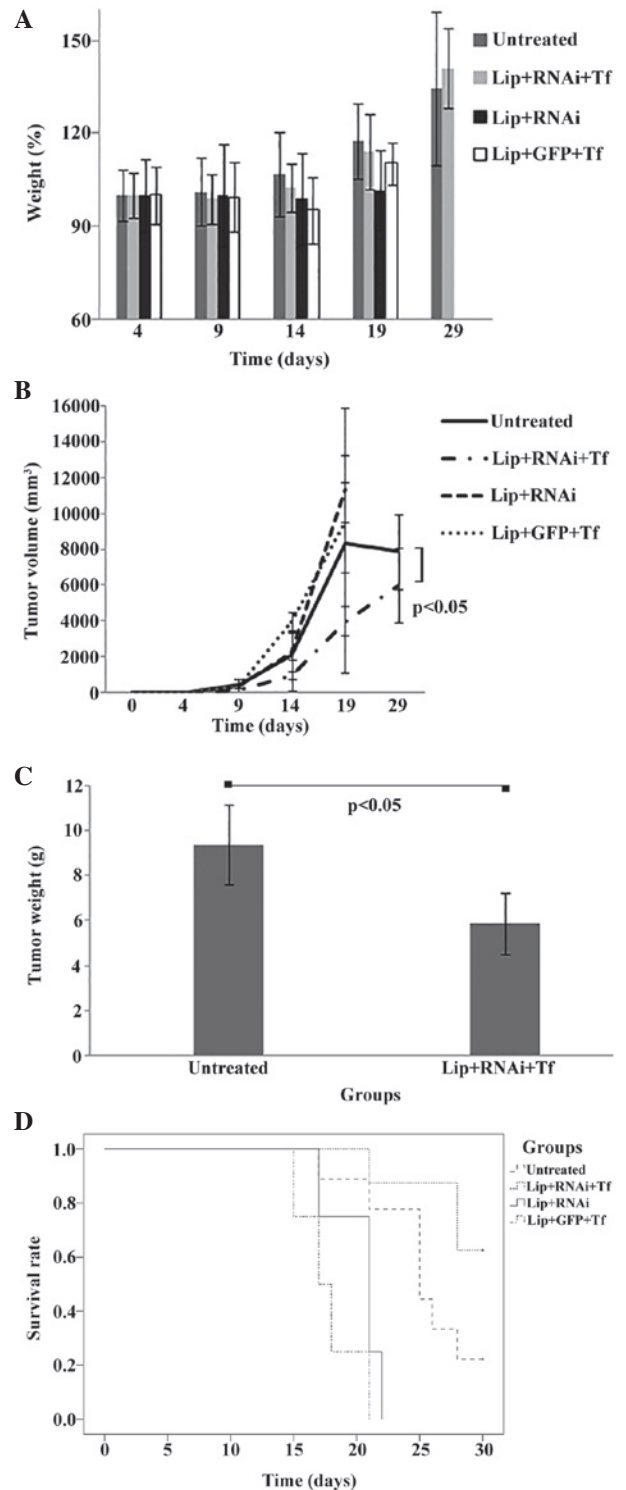


Figure 3. Antitumor activity of treatments in model *in vivo*. (A) Analysis of body weight of 'in vivo' assay. Mean percentages of the total weight of mice groups (untreated, Lip + RNAi + Tf, Lip + RNAi and Lip + GFP + Tf) during the time (days) of assay. Not significant difference was observed between groups. (B) Analysis of tumor volume *in vivo* assay. B16f10 cells were implanted subcutaneously into C57BL/6 mice. Intravenous injection of Lip + RNAi + Tf, Lip + RNAi, Lip + GFP + Tf and untreated treatments were performed. Data are expressed as the mean ± standard deviation (SD). Tumor volume was calculated using the following formula: Length x width² x 0.5 and presented as mm³. (C) Analysis of tumor weight *in vivo* assay. The figure shows the weight mean of collected tumors in grams from groups untreated and Lip + RNAi + Tf. The standard deviation and statistical significance (P<0.05) were included. Data are expressed as mean including SD. (D) Analysis of rate survival *in vivo* assay. Kaplan-Meier curves of survival rate of mice groups. The assay was censored at 30 days after initial seeded of B16F10 cells (+).

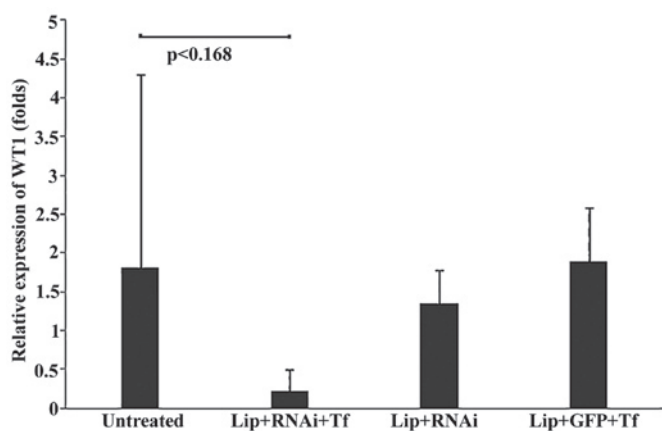


Figure 4. Analysis of WT1 expression in mouse tumor tissues. Figure presents the mean relative expression folds of *WT1* in samples analyzed of the different groups of mice used in the *in vivo* model. Quantitative polymerase chain reactions were run in duplicate and β -actin was used as an endogenous gene. Data are expressed as the mean including standard deviation, and the statistical value were included in the graph ($P < 0.168$).

RT-qPCR analysis. The samples analyzed of Lip + RNAi and Lip + GFP + Tf groups were extracted soon after death of the mouse. In Fig. 4 show the relative expression of WT1 standardized according to the Livak method. To accomplish this, the average obtained from samples of untreated group was established as a calibrator and β -actin was used as endogenous control. Fig. 4 shows that the Lip + RNAi + Tf group showed a mean relative expression level of 0.21 (SD±0.28)-fold, representing a decrease in expression of *WT1*, compared with the other groups of mice which presented mean relative expression levels of 1.8 (SD±2.49)-fold for the untreated group of mice, 1.34 (SD±0.43)-fold for the Lip + RNAi group, and 1.89 (SD±0.69)-fold for the Lip + GFP + Tf group. The reduction in the expression levels of *WT1* in the Lip + RNAi + Tf group suggests that tumor samples decrease in the expression of WT, which in turn suggests internalization directed by Tf.

Discussion

During the last three decades, global incidence of melanoma has rapidly increased, particularly among Caucasian populations (3). The increased mortality rate from melanoma is associated with a relatively late-stage diagnosis and resistance to chemotherapeutic agents (3).

The search for new therapeutic strategies has helped identify new tumor-specific molecules suitable for gene therapy (9). Restoration of tumor suppressor genes, such as *p53*, is a major strategy used for tumor reduction (43). Antisense and RNA interference are additional strategies for targeting genes involved in cancer. Well-defined tumor markers in melanoma include mutations in the oncogenes *NRAS*, *BRAF*, *c-KIT*, *GNAQ* and *GNA11* or reduced function of the tumor suppressor genes *PTEN* and *p53* (44-48). Between 40 and 60% of melanomas exhibit mutations in *BRAF*, and 90% have mutations in *p53*, although only 10% of these mutations actually disable the tumor suppressor activity of *p53* (49). Recent studies show high expression of wild-type WT1 in a large proportion of solid and non-solid tumors, including melanoma (13-16,50). WT1 is a

multifaceted protein involved in cell proliferation, cell death and angiogenesis. WT1 expression is found in 39% of melanomas, and >80% of WT1-positive melanomas is diagnosed in advanced stages of the disease. Thus, WT1 is a potential therapeutic target in melanoma. Antisense oligonucleotide and RNA interference strategies that decrease the expression of WT1 decreased the proliferation of cancer cells (51-54).

One of the limitations of gene therapy is tumor-specific delivery. The use of viral vectors is a good method for delivering genetic material *in vitro* (46-48); this strategy is limited by the host immune response *in vivo* (55-57).

The main advantages of liposomes include considerable concentration of large quantities of antitumor agent and intracellular delivery, increased half-life of tumor agents due to reduced degradation, gradual delivery of antineoplastic molecules, easy removal and reduced toxicity (24).

Phospholipid derivatives are currently used to improve circulating of liposomes and reduce their elimination by the liver and macrophages (58). The incorporation of thiol groups allows crosslinking with lysines in proteins, which can yield liposomes targeted to the ligand-receptor. The Tf receptor is widely used as delivery vehicle targeting tumor cells (41). The Tf receptor, CD71, is involved in the intracellular uptake of iron. The high expression of CD71 in many tumors, including melanoma, and the association with high iron requirements by dividing cells, makes this a good target (59). Tf is a serum protein found in high concentrations in the blood and is the natural ligand for the Tf receptor. Due to the versatility of the Tf receptor, it is useful for the delivery of transferrin antitumor agents, such as toxins, proteins and genetic materials (28,29,32,33,40).

In a previous study, we demonstrated the ability of shRNA to silence the *WT1* gene and induce apoptosis in B16F10 murine melanoma cells (41). In a model of lung metastasis, application of this shRNA via aerosol was successful in reducing the size and number of tumors (60). The delivery system was effectively applied using PEI-DNA complexes, which reached high concentrations in the lung; however, this form application works exclusively in the lung (60). Systemic application of targeted liposomes opens the possibility of targeting WT1 in tumors in other parts of body (60). Liposome therapy would not be exclusive for melanoma, as other types of tumors express WT1 and the Tf receptor. The present results showed a 24% decrease in tumor size without changes in body weight. The final weight of the tumor for the experimental group differed by 34% from that of the control mice (20). In addition, an improvement in survival of 37% was observed in mice treated with Tf-conjugated PEG liposomes loaded with *WT1* shRNA. These are important results, considering that B16F10 cells form very aggressive tumors in C57BL/6 mice (14).

A reduction in *WT1* expression was noted in the Lip + RNAi + Tf experimental treatment group. Although transfection efficiency was not analyzed, RT-qPCR suggests that decreased expression of WT1 was associated with a reduction in tumor mass. Tumors were collected within 24 h of the last treatment. In order to identify transfected cells with decreased expression of WT1, we would have to assess expression of beta-galactosidase about 2-6 h after *in vivo* inoculation (41).

Complete tumor eradication was not possible; thus, further studies should examine increased concentrations of liposome complexes or additional anticancer molecules. Previous studies have shown that *WT1* silencing sensitizes cells to chemotherapeutic agents, such as cisplatin, doxorubicin and radiation. Increased sensitivity to apoptotic stimuli in response to silencing of *WT1* is likely due to the fact that *WT1* regulates *Bcl-2*, multi-drug resistance 1 (*MDR1*) and P-glycoprotein expression, which are involved in chemoresistance (21,61,62).

Acknowledgements

This study was supported by the Microbiology and immunology Department, Biological Sciences Faculty, Autonomous University of Nuevo León (UANL).

References

- Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A and Tymińska A: Skin melanocytes: Biology and development. *Postepy Dermatol Alergol* 30: 30-41, 2013.
- Situm M, Buljan M, Bulić SO and Simić D: The mechanisms of UV radiation in the development of malignant melanoma. *Coll Antropol* 31 (Suppl 1): 13-16, 2007.
- Nikolaou V and Stratigos AJ: Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol* 170: 11-19, 2014.
- Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK and Garbe C: Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: An analysis of the central malignant melanoma registry of the German dermatological society. *J Clin Oncol* 22: 3660-3667, 2004.
- Leiter U, Meier F, Schitteck B and Garbe C: The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol* 86: 172-178, 2004.
- Lee ML, Tomsu K and Von Eschen KB: Duration of survival for disseminated malignant melanoma: Results of a meta-analysis. *Melanoma Res* 10: 81-92, 2000.
- Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJ III and Saunders GF: Regulation of the proto-oncogenes *bcl-2* and *c-myc* by the Wilms' tumor suppressor gene *WT1*. *Cancer Res* 55: 5386-5389, 1995.
- Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, Garvin AJ, Rosner MR and Haber DA: *WT1* suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J* 14: 4662-4675, 1995.
- Maheswaran S, Englert C, Bennett P, Heinrich G and Haber DA: The *WT1* gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev* 9: 2143-2156, 1995.
- Haber DA, Englert C and Maheswaran S: Functional properties of *WT1*. *Med Pediatr Oncol* 27: 453-455, 1996.
- Englert C, Maheswaran S, Garvin AJ, Kreidberg J and Haber DA: Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene *WT1*. *Cancer Res* 57: 1429-1434, 1997.
- Scholz H and Kirschner KM: A role for the Wilms' tumor Protein *WT1* in organ development. *Physiology (Bethesda)* 20: 54-59, 2005.
- Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, Hayashi S, Tamaki H, Nakatsuka S, Yao M, Takahashi E, Nakano Y, Hirabayashi H, *et al*: Overexpression of the Wilms' tumor gene *WT1* in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 100: 297-303, 2002.
- Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D and Sukumar S: Wilms' tumor suppressor gene (*WT1*) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 61: 921-925, 2001.
- Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, Taguchi T, Tamaki Y, Tamaki H, Sugiyama H and Noguchi S: High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 8: 1167-1171, 2002.
- Oji Y, Miyoshi Y, Koga S, Nakano Y, Ando A, Nakatsuka S, Ikeba A, Takahashi E, Sakaguchi N, Yokota A, *et al*: Overexpression of the Wilms' tumor gene *WT1* in primary thyroid cancer. *Cancer Sci* 94: 606-611, 2003.
- Wagner N, Panelos J, Massi D and Wagner KD: The Wilms' tumor suppressor *WT1* is associated with melanoma proliferation. *Pflugers Arch* 455: 839-847, 2008.
- Garrido-Ruiz MC, Rodríguez-Pinilla SM, Pérez-Gómez B and Rodríguez-Peralto JL: *WT 1* expression in nevi and melanomas: A marker of melanocytic invasion into the dermis. *J Cutan Pathol* 37: 542-548, 2010.
- Wilsher M and Cheerla B: *WT1* as a complementary marker of malignant melanoma: An immunohistochemical study of whole sections. *Histopathology* 51: 605-610, 2007.
- Zamora-Avila DE, Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D and Zapata-Benavides P: RNAi silencing of the *WT1* gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res* 17: 341-348, 2007.
- Zapata-Benavides P, Manilla-Muñoz E, Zamora-Avila DE, Saavedra-Alonso S, Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, Davalos-Aranda G and Rodríguez-Padilla C: *WT1* silencing by RNAi synergizes with chemotherapeutic agents and induces chemosensitization to doxorubicin and cisplatin in B16F10 murine melanoma cells. *Oncol Lett* 3: 751-755, 2012.
- Yu KF, Zhang WQ, Luo LM, Song P, Li D, Du R, Ren W, Huang D, Lu WL, Zhang X and Zhang Q: The antitumor activity of a doxorubicin loaded, iRGD-modified sterically-stabilized liposome on B16-F10 melanoma cells: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine* 8: 2473-2485, 2013.
- Maruyama K, Ishida O, Kasaoka S, Takizawa T, Utoguchi N, Shinohara A, Chiba M, Kobayashi H, Eriguchi M and Yanagie H: Intracellular targeting of sodium mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to solid tumors by transferrin-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT). *J Control Release* 98: 195-207, 2004.
- Torchilin V: Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 131-135, 2011.
- Boerman OC, Oyen WJ, van Bloois L, Koenders EB, van der Meer JW, Corstens FH and Storm G: Optimization of technetium-99m-labeled PEG liposomes to image focal infection: Effects of particle size and circulation time. *J Nucl Med* 38: 489-493, 1997.
- Derycke AS and De Witte PA: Transferrin-mediated targeting of hypericin embedded in sterically stabilized PEG-liposomes. *Int J Oncol* 20: 181-187, 2002.
- Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthey K, Huang SK, Lee KD, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C, *et al*: Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11460-11464, 1991.
- Stavridis JC, Deliconstantinos G, Psallidopoulos MC, Armenakas NA, Hadjiminias DJ and Hadjiminias J: Construction of transferrin-coated liposomes for in vivo transport of exogenous DNA to bone marrow erythroblasts in rabbits. *Exp Cell Res* 164: 568-572, 1986.
- Vidal M, Sainte-Marie J, Philippot JR and Bienvenue A: The influence of coupling transferrin to liposomes or minibeads on its uptake and fate in leukemic L2C cells. *FEBS Lett* 216: 159-163, 1987.
- Di Giulio A, D'Andrea G, Saletti MA, Impagnatiello A, D'Alessandro AM and Oratore A: The binding of human serum transferrin to its specific receptor reconstituted into liposomes. *Cell Signal* 6: 83-90, 1994.
- Egea MA, García ML, Alsina MA and Reig F: Coating of liposomes with transferrin: Physicochemical study of the transferrin-lipid system. *J Pharm Sci* 83: 169-173, 1994.
- Corley P and Loughrey HC: Targeting of doxorubicin loaded liposomes to T-cells via the transferrin receptor. *Biochem Soc Trans* 26: S37, 1998.
- Simões S, Slepishkin V, Gaspar R, de Lima MC and Düzgüneş N: Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusogenic peptides. *Gene Ther* 5: 955-964, 1998.
- Singh M: Transferrin as a targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Curr Pharm Des* 5: 443-451, 1999.
- Eavarone DA, Yu X and Bellamkonda RV: Targeted drug delivery to C6 glioma by transferrin-coupled liposomes. *J Biomed Mater Res* 51: 10-14, 2000.
- Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K, Eriguchi M and Yanagie H: Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharm Res* 18: 1042-1048, 2001.
- Voinea M, Dragomir E, Manduteanu I and Simionescu M: Binding and uptake of transferrin-bound liposomes targeted to transferrin receptors of endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 39: 13-20, 2002.

38. Anaboussi S, Laue M, Lehr CM, Bakowsky U and Ehrhardt C: Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 60: 295-303, 2005.
39. Sharma G, Modgil A, Layek B, Arora K, Sun C, Law B and Singh J: Cell penetrating peptide tethered bi-ligand liposomes for delivery to brain in vivo: Biodistribution and transfection. *J Control Release* 167: 1-10, 2013.
40. Kobayashi T, Ishida T, Okada Y, Ise S, Harashima H and Kiwada H: Effect of transferrin receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistant tumor cells. *Int J Pharm* 329: 94-102, 2007.
41. Shi N and Pardridge WM: Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7567-7572, 2000.
42. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 25: 402-418, 2001.
43. Xu L, Pirollo KF and Chang EH: Tumor-targeted p53-gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/radiotherapy. *J Control Release* 74: 115-128, 2001.
44. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, Menzies AM, Hamilton AL, Yu B, Ng CC, Cooper WA, Thompson JF, Kefford RF, *et al*: Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 111: 292-299, 2014.
45. Pilloni L, Bianco P, Difelice E, Cabras S, Castellanos ME, Atzori L, Ferreli C, Mulas P, Nemolato S and Faa G: The usefulness of c-Kit in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions. *Eur J Histochem* 55: 105-111, 2011.
46. Khalili JS, Yu X, Wang J, Hayes BC, Davies MA, Lizee G, Esmaeli B and Woodman SE: Combination small molecule MEK and PI3K inhibition enhances uveal melanoma cell death in a mutant GNAQ and GNA11 dependent manner. *Clin Cancer Res* 18: 4345-4355, 2012.
47. Zhou X-P, Gimm O, Hampel H, Niemann T, Walker MJ and Eng C: Epigenetic PTEN silencing in Malignant Melanomas without PTEN Mutation. *Am J Pathol* 157: 1123-1129, 2000.
48. Terzian T, Torchia EC, Dai D, Robinson SE, Murao K, Stiegmann RA, Gonzalez V, Boyle GM, Powell MB, Pollock PM, *et al*: p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 781-794, 2010.
49. Box NF, Vukmer TO, and Terzian T: Targeting p53 in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 27: 8-10, 2014.
50. Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, Kubonishi I, Koeffler HP and Miyoshi I: Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia* 7: 970-977, 1993.
51. Zapata-Benavides P, Tuna M, Lopez-Berestein G and Tari AM: Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 784-790, 2002.
52. Chen MY, Clark AJ, Chan DC, Ware JL, Holt SE, Chidambaram A, Fillmore HL and Broaddus WC: Wilms' tumor 1 silencing decreases the viability and chemoresistance of glioblastoma cells in vitro: A potential role for IGF-1R de-repression. *J Neurooncol* 103: 87-102, 2011.
53. Huo X, Ren L, Shang L, Wang X and Wang J: Effect of WT1 antisense mRNA on the induction of apoptosis in ovarian carcinoma SKOV3 cells. *Eur J Gynaecol Oncol* 32: 651-656, 2011.
54. Chen Y, Bathula SR, Yang Q and Huang L: Targeted nanoparticles deliver siRNA to melanoma. *J Invest Dermatol* 130: 2790-2798, 2010.
55. Zhang X, Jin Y, Zhang B and Chen H: Preparation of recombinant adenovirus Ad5/F35 containing human WT1 and identification after recombinant adenovirus infected dendritic cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 30: 135-138, 2014 (In Chinese).
56. Sundarasetty BS, Singh VK, Salguero G, Geffers R, Rickmann M, Macke L, Borchers S, Figueiredo C, Schambach A, Gullberg U, *et al*: Lentivirus-induced dendritic cells for immunization against high-risk WT1(+) acute myeloid leukemia. *Hum Gene Ther* 24: 220-237, 2013.
57. Shan XY, Liu ZL, Wang B, Guo GX, Wang MS, Zhuang FL, Cai CS, Zhang MF and Zhang YD: Construction of recombinant lentiviral vector of Tie2-RNAi and its influence on malignant melanoma cells in vitro. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 27: 277-283, 2011 (In Chinese).
58. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB and Papahadjopoulos D: Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 51: 691-743, 1999.
59. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, Mellman I, Prindiville SA, Viner JL, Weiner LM and Matrisian LM: The prioritization of cancer antigen: A national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15: 5323-5337, 2009.
60. Zamora-Avila DE, Zapata-Benavides P, Franco-Molina MA, Saavedra-Alonso S, Trejo-Avila LM, Reséndez-Pérez D, Méndez-Vázquez JL, Isaias-Badillo J and Rodríguez-Padilla C: WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI:RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Ther* 16: 892-899, 2009.
61. Clark AJ, Chan DC, Chen MY, Fillmore H, Dos Santos WG, Van Meter TE, Graf MR and Broaddus WC: Down-regulation of Wilms' tumor 1 expression in glioblastoma cells increases radiosensitivity independently of p53. *J Neurooncol* 83: 163-172, 2007.
62. Shen H, Xu W, Wu Z, Tang H, Xie Y and Zhong X: Down-regulation of WT1/+17AA gene expression using RNAi and modulating leukemia cell chemotherapy resistance. *Haematologica* 92: 1270-1272, 2007.