

**UNIVERSIDAD ANDRES BELLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**



**INTERFERENCIA DEL ARN MITOCONDRIAL NO
CODIFICANTE MEDIADO POR LENTIVIRUS
PSEUDOTIPIFICADOS.**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
BIOTECNOLOGIA**

MANUEL ALEJANDRO VARAS GODOY

**Directores de Tesis: Dr. Pablo D.T. Valenzuela
Dr. Luis O. Burzio**

**Santiago-Chile
Noviembre 2012**

A Carolina con mucho amor

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Pablo Valenzuela y al Dr. Luis Burzio por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, creer en mí, apoyarme en cada momento que los necesite en el transcurso de mi trabajo, pero mas importante aun ayudarme en mi formación profesional.

También agradezco al Dr. Mario Rosemblatt y al Dr. Gareth Owen por haber participado en mi comisión y apoyado mi proyecto de tesis.

De manera muy especial quiero agradecer a la persona mas importante dentro de lo que fue el transcurso de mi doctorado, la persona que vivió junto a mi todo este proceso tan lindo y que comenzamos con un simple pololeo y lo terminamos dando el importante paso del matrimonio, a Carolina muchas gracias por todo tu apoyo y estar en las buenas y en las malas, y espero nos sigamos apoyando mutuamente en las desafíos que nos esperan juntos.

Por otro lado quiero agradecer a mis suegros Eduardo e Ingrid, a mi cuñada Macarena, y a toda la familia Cabezas Glaser por acompañarme y apoyarme todos estos años en los que he compartido con ellos, gracias por alentarme y estar ahí cuando se les necesitaba y espero estén todos los años que vienen.

Además agradezco a mis padres Miguel y Maritza y mis hermanos por apoyarme desde el momento que decidí estudiar la carrera de bioquímica, sin su apoyo desde esos comienzos no hubiese logrado descubrir este lindo mundo que es la ciencia.

Un agradecimiento muy grande a mis amigos Andrea Villagran y Mauricio Sandoval, los cuales fueron un apoyo constante tanto en el comienzo de esta aventura llamada doctorado tanto a nivel personal como académico.

Agradezco a mis compañeros de la Fundación & Vida y amigos Nicolás Cifuentes, Gonzalo Barriga, Simón Vidal, Rodrigo Acuña, Álvaro Lladser, Vincenzo Borgna, Macarena Fritz, Claudio Villota y a algunos que se pueden quedar en el tintero por su compañía, conversaciones y gran apoyo que me dieron.

Por ultimo quiero agradecer de muy especial forma a Nicole Farfan y Vanessa Campos por su ayuda en lo que fue el desarrollo de mi tesis, muchas gracias por todo.

Muchas gracias a toda la gente, amigos y profesores que me apoyaron todos estos años.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por el Programa Conicyt PFB16, el Proyecto UNAB DI-11-11/I, y la empresa Andes Biotechnologies S.A. Además esta fue realizada en los laboratorios de la Fundación Ciencia & Vida.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	viii
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Mitocondria.....	1
1.1 Estructura básica	1
1.2. ADN mitocondrial	1
1.3. ADN mitocondrial y patologías	2
1.4. ADN mitocondrial y cáncer.....	2
2. ARNs mitocondriales no-codificantes	2
3. ARN de interferencia	3
4. Métodos de entrega de ARN de interferencia.....	4
II. HIPOTESIS.....	9
III. OBJETIVOS.	9
1. Objetivo general.....	9
2. Objetivos específicos.	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1. Soluciones.....	10
2. Reactivos y material de uso general	10
3. Oligonucleótidos para subclonamiento de shRNAs.....	10
4. Alineamiento de oligonucleótidos.....	11
5. Subclonamiento de oligonucleótidos	12
6. Transfección <i>in vitro</i> de células de melanoma de ratón B16F10.....	13
7. Producción y purificación ADN plasmidial.....	13
8. Células	13
9. Producción de partículas lentivirales pseudotipificadas	14
10. Cálculo del título viral.....	14
11. Transducción <i>in vitro</i> de células de distintas líneas celulares.....	14
12. Transducción <i>in vitro</i> de células de melanoma de ratón B16F10.....	15
13. Extracción de ARN total de células B16F10.	15

14. Reacción de transcripción reversa (RT).	16
15. Partidores	16
16. Reacción de amplificación mediante PCR en tiempo real.....	17
17. Ensayo de TUNEL (<i>terminal transferase-mediated dUTP nick labeling</i>).	17
18. Ensayo de Anexina-V	17
19. Animales	18
20. Formación de tumores sólidos subcutáneos.....	18
21. Inyección lentiviral intratumoral.....	18
22. Formación de metástasis pulmonar.....	19
23. Inyección lentiviral sistémica.	19
24. Técnicas histológicas.....	19
25. Análisis estadístico.	19
V. RESULTADOS.....	20
1. Diseño y generación de un sistema lentiviral que permita la expresión de shRNAs dirigidos contra el ARNm _{tnc} y su evaluación en células tumorales en cultivo.	20
1.1 Construcción de plásmidos codificantes de shRNAs dirigidos contra los ARNm _{tnc}	20
1.2 Selección de shRNA dirigido contra los ARNm _{tnc}	23
1.3 Producción de partículas lentivirales.	25
1.4. Desarrollo de un método de purificación y concentración de partículas lentivirales para su uso in vivo.	28
1.5. Evaluación de la capacidad de transducción de líneas celulares por las partículas lentivirales.....	30
1.6. Evaluación del porcentaje de transducción de partículas lentivirales en células de melanoma de ratón B16F10.	31
1.7. Evaluación de la expresión de los distintos ARNm _{tnc} en células B16F10 transducidas con partículas lentivirales in vitro.	33
1.8 Efecto de la interferencia de los ARNm _{tnc} sobre la muerte celular mediada por lentivirus en células B16F10.	40
1.8.1 Fragmentación de ADN (TUNEL)	40
1.8.2 Traslocación de Fosfatidilserina.....	42

2. Diseño y desarrollo de modelos animales tumorales, para su posterior desafío con las partículas lentivirales que expresan el shRNA contra el ARNm^{tnc}.....	44
2.1. Establecimiento de modelo tumoral subcutáneo mediante células B16F10	45
2.2. Establecimiento de modelo tumoral metastásico B16F10.....	47
3. Evaluación del efecto del shRNA dirigidos contra el ARNm^{tnc}, mediado por partículas lentivirales, en un modelo tumoral animal.....	49
3.1. Modelo Subcutáneo	49
3.1.1. Evaluación de la infección de las partículas lentivirales en células B16F10 in vivo.	49
3.1.2. Evaluación de la expresión de los distintos ARNm^{tnc} en células transducidas con partículas lentivirales in vivo.....	51
3.1.3. Determinación del crecimiento tumoral	55
3.1.4. Determinación del peso tumoral	56
3.2. Modelo Metastásico	57
3.2.1. Determinación de número de focos metastásicos en pulmón	57
3.2.2. Determinación de peso pulmonar	58
3.2.3. Histología del tejido pulmonar.	59
3.2.5. Sobrevida	60
VI. DISCUSIÓN.....	61
VII. CONCLUSIONES.....	68
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	69
X. Productividad científica en el periodo de tesis.....	84
Presentaciones a congresos	84
Nacionales.....	84
Internacionales.....	85
Publicaciones en preparación	85
Publicaciones aceptadas	85

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Esquema del mecanismo de ARN de interferencia.....	5
Figura 2: Esquema de la generación de partículas lentivirales y posterior transducción de las partículas lentivirales en una célula blanco.....	7
Figura 3: Esquema de la construcción de un short hairpin RNA.....	21
Figura 4: Análisis del patrón de digestión de clones positivos sh-ARNmtnc y sh-Luc.....	21
Figura 5: Secuenciación de construcciones pLL3.7 sh-ARNmtnc, shLuc.....	22
Figura 6: Muerte celular mediada por transfección de plasmidios pLL3.7 sh-ARNmtnc y sh-Luc.....	24
Figura 7: Representación esquemática de los elementos contenidos en los diferentes plasmidios que componen el sistema lentiviral.....	25
Figura 8: Tamaño de los fragmentos derivados de la digestión con enzimas de restricción luego de su separación por electroforesis en gel de agarosa.....	26
Figura 9: Cálculo del título partículas lentivirales pseudotipificadas.....	27
Figura 10: Procedimiento de concentración de lentivirus para su uso in vivo.....	29
Figura 11: Porcentaje de transducción de distintas líneas celulares con Lv-EGFP a diferentes MOI.....	30
Figura 12: Transducción de células B16F10 a diferentes MOI.....	32
Figura 13: Representación esquemática de los diferentes ARNmtnc de origen murino.....	34
Figura 14: Curva de amplificación y disociación de RT-PCR de los distintos ARNmtnc en células B16F10.....	35
Figura 15: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Sentido in vitro.....	36

Figura 16: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Asentido1 in vitro.....	37
Figura 17: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Asentido2 in vitro.....	38
Figura 18: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Asentido3 in vitro.....	39
Figura 19: Muerte celular inducida por interferencia de los ARNmtnc mediada por partículas lentivirales en células B16F10: Fragmentación de ADN.....	41
Figura 20: Muerte celular inducida por interferencia de los ARNmtnc mediada por partículas lentivirales en células B16F10: Traslocación de <i>fosfatidilserina</i>	43
Figura 21: Procedimiento experimental de generación modelo tumoral subcutáneo.....	46
Figura 22: Procedimiento experimental de generación modelo tumoral metastásico.....	48
Figura 23: Partículas lentivirales son capaces de infectar células B16F10 in vivo.....	50
Figura 24: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Sentido in vivo.....	51
Figura 25: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Asentido1 in vivo.....	52

Figura 26: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Asentido2 in vivo.....	53
Figura 27: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Asentido3 in vivo.....	54
Figura 28: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en el crecimiento de tumores subcutáneos de células B16F10 ..	55
Figura 29: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en el peso de tumores subcutáneos de células B16F10.....	56
Figura 30: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en el número de focos metastásicos de ratones con metástasis pulmonar de células B16F10.....	57
Figura 31: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en el peso pulmonar de ratones con metástasis pulmonar de células B16F10	58
Figura 32: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en la estructura interna pulmonar de ratones con metástasis pulmonar de células B16F10.....	59
Figura 33: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en la sobrevida de ratones con metástasis pulmonar de células B16F10.....	60

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNmtnc	ARN mitocondrial no codificante
ARNnc	ARN no codificante
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN transferencia
ATP	Adenosin trifosfato
cDNA	ADN complementario
CMV	Citomegalovirus
CO₂	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Medio Eagle modificado Dulbecco's
dNTP	Deoxiribonucleótido trifosfato
dsARN	ARN de doble hebra
DTT	Ditiotreitol
dUTP	Deoxiuridina trifosfato
EDTA	Ácido etilenediaminetetraacético
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa
gDNA	ADN genómico
HE	Hematoxilina eosina
HEBS	Tampón-Hepes salino
HFK	Keratinocito de prepucio humano
HEK	Riñón de embrión humano
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	Acido 4-(2-hidroxyetyl)-1-piperazineetanesulfónico
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
IR	Invertido repetido
In	Intranasal
It	Intratraqueal
iv	Intravenoso
kb	Kilobase
KCl	Cloruro de potasio

kDa	Kilodalton
KSFM	Medio de keratinocito libre de suero
LB	Luria Bertani
LUC	Luciferasa
Lv	Lentivirus
ml	Mililitro
MOI	Índice de multiplicidad de infección
NaCl	Cloruro de sodio
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio dibásico
nt	Nucleótido
ODN	Oligonucleótido
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RLT	Tampón de lisis RNeasy
ROS	Especie reactiva de oxígeno
rpm	Revolución por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Transcripción reversa
RT-PCR	PCR en tiempo real
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón
sc	Subcutáneo
SEM	Error estándar de la media
shRNA	Horquilla corta de ARN
siRNA	Pequeño ARN de interferencia
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris acetato edta
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal
TNE	Tris cloruro de sodio edta
Tto	Tratamiento
UT	Unidad de transducción
VSV-G	Proteína G de virus de estomatitis vesicular
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMEN

Burzio y colaboradores han descrito una familia de ARNs mitocondriales no codificantes (ARNmtnc) denominados ARNmtnc Sentido (ARNmtnc-S) y ARNmtnc Antisentido (ARNmtnc-AS) que se encuentran diferencialmente expresados en células normales y tumorales. Células normales en proliferación expresan altos niveles tanto del ARNmtnc-S como del ARNmtnc-AS. En contraste, células que no están en división expresan bajos niveles de ambos transcritos. Interesantemente, células tumorales expresan el ARNmtnc-S y disminuyen la expresión del ARNmtnc-AS. Estas características son observadas tanto en células en cultivo como en biopsias de tejidos.

Previamente, Burzio y colaboradores demostraron que la transfección transiente con oligonucleótidos complementarios a estos ARNmtnc induce muerte en diferentes tipos de células cancerígenas *in vitro*, pero no en células normales, dando la posibilidad de usar la interferencia de estos ARNs mitocondriales como un potencial tratamiento contra el cáncer.

El objetivo de este estudio fue determinar si la administración *in vivo* de lentivirus que codifican shRNA (del inglés *short hairpin RNA*) dirigidos contra los ARNmtnc podría inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis en modelos animales de melanoma de ratón. Para esto se construyeron vectores lentivirales no-replicativos que codifican un shRNA contra los ARNmtnc (Lv-ARNmtnc) y luciferasa (Lv-Control) y su efecto fue evaluado *in vitro* por transducción de células de melanoma de ratón B16F10.

Mediciones por PCR en tiempo real indican una disminución de aproximadamente 6 veces en la expresión del ARNmtnc-S y del ARNmtnc-AS en células transducidas con Lv-ARNmtnc en comparación a células transducidas con Lv-Control. Además, la transducción de Lv-ARNmtnc induce muerte celular apoptótica determinada por exposición en la superficie celular de fosfatidilserina y fragmentación del ADN.

La capacidad de estos lentivirus para inhibir el crecimiento de tumores sólidos y metástasis de células de melanoma B16F10 fue evaluada *in vivo*. Ratones C57BL/6 a los cuales se les indujeron tumores subcutáneos con células B16F10 fueron tratados cada dos días con cinco inyecciones intratumorales de 4×10^7 Lv-ARNmtnc o LV-Control en un volumen de 100 μ l. Los ratones tratados con Lv-ARNmtnc mostraron una significativa disminución en el volumen tumoral comparado a ratones tratados con LV-Control observado hasta el día 20 post inoculación de las células. Para el ensayo de metástasis, ratones C57BL/6 fueron inyectados por vía intravenosa con células B16F10 y cuatro días después se les administraron cada tres días 4 inyecciones intravenosas de 5×10^7 Lv-ARNmtnc o Lv-Control en un volumen de 200 μ l. Los ratones fueron sacrificados dos semanas después de la inyección de las células para el análisis de metástasis pulmonar. Los ratones tratados con Lv-ARNmtnc mostraron una significativa reducción en el número de focos metastásicos comparados a los ratones tratados con Lv-Control y también una reducción en

el peso pulmonar. Tinción de secciones de tejido con hematoxilina-eosina indica que los pulmones de los ratones tratados con Lv-ARNmtnc presentan solo unos pocos nódulos. En contraste, los nódulos metastásicos ocupaban la mayoría del tejido pulmonar cuando los ratones fueron tratados con Lv-Control. Estos resultados sugieren que la administración intratumoral y sistémica de shRNA dirigidos a los ARNmtnc representan una promisorio estrategia hacia el desarrollo de una potencial terapia contra el cáncer.

ABSTRACT

Burzio and collaborators have described a family of non-coding mitochondrial RNAs (ncmtRNA) called sense ncmtRNA (S-ncmtRNA) and antisense ncmtRNA (AS-ncmtRNA), which are differentially expressed when comparing between normal and tumor cells. Normal proliferating cells express high levels of both sense and antisense ncmtRNAs. In contrast, nondividing cells express low levels of these transcripts. Interestingly, tumor cells express sense ncmtRNA and down-regulate antisense ncmtRNA. This feature is observed in cell culture and in tissue biopsies.

Previously, Burzio and collaborators showed that transfection with oligonucleotides complementary to these ncmtRNAs induce death in different cancer cells type *in vitro*, but not in normal cells, raising the possibility of using interference to these mitochondrial RNAs as a potential cancer treatment.

The aim of this study was to determine whether *in vivo* administration of a lentivirus encoding shRNA against both ncmtRNAs could inhibit melanoma tumor growth and metastasis in a mouse cancer models.

Non-replicative lentiviral vectors encoding shRNA against ncmtRNA (Lv-ncmtRNA) and luciferase (Lv-Control) were constructed and their effects were evaluated *in vitro* by transducing B16F10 melanoma cells. A 6-fold decrease in relative expression of sense and antisense ncmtRNA was observed in cells transduced with Lv-ncmtRNA in comparison to cells transduced with Lv-control as measured by real time quantitative PCR. In addition, Lv-ncmtRNA transduction induces apoptotic cell death determined by cell surface exposure of phosphatidylserine and DNA fragmentation.

The ability of to inhibit growth of solid tumors and metastasis of B16F10 melanoma cells was evaluated *in vivo*. C57BL/6 mice bearing subcutaneous B16F10 tumors were injected intratumorally every two days with five injections of 4×10^7 Lv-ncmtRNA or Lv-control in 100 μ l. twenty days after cell inoculation, mice treated with Lv-ncmtRNA showed a significant decrease in tumor volume compared to mice treated with Lv-Control. For the metastasis assay, C57BL/6 mice were injected intravenously with B16F10 cells and four days later treated every three days intravenously with 5×10^7 Lv-ncmtRNA or Lv-Control in 200 μ l. Mice were sacrificed for analysis of lung metastasis. Mice treated with Lv-ncmtRNA showed a significant decrease in the number of metastatic foci compared to mice treated with Lv-control as well as in lung weight. In addition, hematoxylin and eosin–stained tissue sections also showed that the lung treated with Lv-ncmtRNA had only a few small nodules. In contrast, metastasis nodules occupied most of the lungs when mice were treated with Lv-control.

These results suggest that intratumoral and systemic administration of shRNA targeting ncmtRNA represents a promising strategy towards the development of potential cancer therapies.

I. INTRODUCCIÓN

1. Mitochondria

1.1 Estructura básica

La mitocondria es el organelo de células eucariotas encargado de suministrar el combustible, denominado adenosin trifosfato (ATP), para impulsar el metabolismo celular, y el cual es producido a través del proceso de fosforilación oxidativa¹. Las primeras observaciones mediante microscopía electrónica de la mitocondria definieron la morfología de esta la cual está compuesta, básicamente por una matriz rodeada por una membrana interna, un espacio inter-membrana y una membrana externa². Ambas membranas poseen distintas propiedades las cuales se caracterizan por el conjunto de proteínas que se encuentran formando parte de éstas³. La membrana externa está compuesta en su mayor parte por proteínas denominadas porinas que permiten el paso de moléculas necesarias para la respiración mitocondrial y el metabolismo⁴, en cambio en la membrana interna se encuentran insertadas un grupo de complejos enzimáticos responsables de la fosforilación oxidativa^{1, 5}. En el año 1963 se identificaron y caracterizaron unas estructuras intra-mitocondriales con características de ADN^{6, 7}, evidenciando que este organelo posee su propio genoma, denominado ADN mitocondrial (ADNmt), y que está ubicado en la matriz mitocondrial.

1.2. ADN mitocondrial

En el año 1981, Anderson y colaboradores secuenciaron el ADNmt humano⁸. El genoma mitocondrial humano es una molécula de ADN de doble hebra circular y cerrada, de aproximadamente 16.600 pares de bases (pb), donde cada hebra presenta distinta densidad en base a su composición de G + T y la cual es visualizada al utilizar una gradiente de cloruro de cesio, y por lo tanto se les denominó hebra H (del inglés *heavy*) y hebra L (del inglés *light*). La mayoría de la información está codificada en la hebra H, con genes para los ARNs ribosomales (ARNr) 12S y 16S, 14 ARNs de transferencia (ARNt), y 12 proteínas, mientras la hebra L codifica 8 ARNt y una única proteína^{1, 8}. Las 13 proteínas codificadas en total son constituyentes del complejo enzimático del sistema de fosforilación oxidativa¹. Si bien la mitocondria posee esta característica de tener un propio genoma, la expresión génica en este organelo no es auto-suficiente ya que las proteínas requeridas para la transcripción y traducción de estos genes codificados en el ADNmt, tan bien como las proteínas y ARNs requeridos para la replicación del ADNmt son codificados por genes nucleares⁹.

1.3. ADN mitocondrial y patologías

El término trastorno o desorden mitocondrial se asocia con síndromes en los cuales están involucradas anomalías en el metabolismo energético¹⁰, pero además la mitocondria es un importante regulador de la apoptosis¹¹, y de la concentración citoplasmática de calcio¹², por lo tanto disfunciones mitocondriales son cada vez más reconocidas como un factor importante que contribuye a las enfermedades metabólicas y degenerativas, el envejecimiento y el cáncer¹³. Una de las causas que se piensa lleva a cabo estos trastornos mitocondriales es la cercanía del ADNmt al sistema de fosforilación oxidativa que se encuentra en la membrana interna. Esta proximidad del genoma mitocondrial lo hace vulnerable a los daños provocados por especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*), lo que provocaría mutaciones en el ADNmt¹⁴. Una de las primeras evidencias de enfermedades en donde está involucrado el ADNmt fueron reportadas en el año 1988, cuando se descubrió que defectos en la cadena de transportadora de electrones, específicamente en los complejos I o III, son provocados por deleciones en el ADNmt en pacientes con miopatías mitocondriales¹⁵. Desde ahí en adelante más de 300 mutaciones del ADNmt asociadas a patologías han sido descritas¹³.

1.4. ADN mitocondrial y cáncer

Una de las principales características que nos permite distinguir entre una célula normal y una célula tumoral es su metabolismo intermediario. En 1956, Otto Warburg observó un alto consumo de glucosa y una alta producción de ácido láctico en células tumorales, incluso en suficiente presencia de oxígeno, sugiriendo que las células tumorales preferencialmente utilizan la glicólisis sobre la fosforilación oxidativa para la producción de ATP¹⁶. Esta característica en células tumorales se puede deber a mutaciones del ADNmt. Un análisis de todas las mutaciones del ADNmt reportadas en tumores humanos reveló que el 72% de éstas fueron variantes de secuencias del ADNmt encontradas en la población general, y que dentro del 28% restante, se podían identificar dos grupos, un grupo de mutaciones del ADNmt que inhiben la fosforilación oxidativa, incrementan la producción de ROS, y promueven la proliferación de células tumorales, y otro grupo de mutaciones que permiten a las células tumorales adaptarse a nuevos microambientes¹⁷.

2. ARNs mitocondriales no-codificantes

Muchos estudios han aportado al conocimiento del ADN mitocondrial (ADNmt) y han dado a conocer nuevos transcritos provenientes de éste. Uno de estos

fueron los estudios realizados por Burzio y colaboradores, quienes caracterizando ARNs de espermios a partir de genotecas de ADN de testículos de ratón, descubrieron la presencia de un ARN de 1685 nucleótidos (nt) que contiene la secuencia del ARN mitocondrial 16S y un invertido repetido (IR) de 120 nt unidos covalentemente al extremo 5' del ARN, y el cual se encuentra enriquecido en los espermios¹⁸. Posteriormente Burzio y colaboradores han obtenido evidencias tanto en células de ratones como humanas¹⁹⁻²¹ que demuestran la existencia de una nueva familia de ARNs mitocondriales (ARNmt), que por sus características caben en la clasificación de ARNs no codificantes (ARNnc)²², por lo que se les ha denominado ARNs mitocondriales no codificantes (ARNmtnc). Pero más interesante aún, es el descubrimiento de la expresión diferencial de esta familia de ARNmtnc entre células normales y células tumorales²³. Esta expresión diferencial ha sido demostrada en una variedad de células tumorales y normales, y también en biopsias humanas^{19, 23}, lo que además da indicios de la universalidad de esta familia de ARNs.

Realizando un resumen general de las evidencias, existen tres tipos de ARNmtnc los cuales son denominados ARNmtnc-S, ARNmtnc-AS1 y ARNmtnc-AS2. Células que no se encuentran en proliferación o en fase G0 no expresan estos ARNmtnc. Células normales en proliferación expresan tanto el ARNmtnc-S como los ARNmtnc-AS, y células tumorales expresan solo el ARNmtnc-S y niveles muy bajos de los ARNmtnc-AS^{19, 23}.

Resultados obtenidos por Burzio y colaboradores demuestran que la degradación del ARNmtnc-S mediado por un oligonucleótido complementario, en diferentes tipos de células tumorales, no sólo detiene la división celular sino que induce muerte celular. También, si los oligonucleótidos son dirigidos contra los bajos niveles de ARNmtnc-AS se produce una mayor inducción de muerte celular.

Por otro lado en células normales en proliferación o en reposo, la interferencia de los ARNmtnc, tanto sentido o antisentido, en las mismas condiciones, no produce muerte celular. Estas evidencias indican que la interferencia específica de los ARNmtnc podría ser una posible herramienta para la eliminación de células cancerosas sin afectar células normales.

3. ARN de interferencia

Desde las primeras descripciones de oncogenes hace aproximadamente 30 años atrás²⁴, la interferencia de estos ha sido utilizada en el estudio de posibles terapias contra el cáncer. Existen varias vías que pueden ser utilizadas con el fin de inhibir la expresión génica mediante oligonucleótidos de tamaño de 12-25 nucleótidos diseñados para unirse al ARNm blanco. Existen varios mecanismos que explican la inhibición del ARN una vez que el oligonucleótido se une a su ARN blanco. Los más estudiados y caracterizados son los que resultan del clivaje de un ARN blanco por una nucleasa celular endógena, tal como la

ARNasa H, la cual es una familia de enzimas que clivan la hebra de ARN de un heteroduplex ARN-ADN, donde el oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión génica contiene un segmento continuo de a lo menos 5 a 7 nucleótidos que apoyan la actividad RNasa H^{25, 26}. Otro mecanismo asociado a nucleasas es el denominado ARN de interferencia (ARNi), donde la introducción de una doble hebra de ARN (dsARN) dentro de células eucariotas lleva a la degradación de una secuencia específica de transcritos de genes homólogos²⁷. Las hebras largas de ARN son metabolizadas a fragmentos cortos de doble hebra de 20-21 nucleótidos, denominados ARN interferente pequeño (en inglés *small interfering RNA*, siRNA), por una ribonucleasa llamada DICER, y luego la molécula de siRNA es enlazada a un complejo proteico denominado RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*, donde las dos hebras se separan permitiendo a la hebra antisentido unirse al ARN blanco, el cual es degradado por medio de la actividad endonucleásica que contiene RISC^{26, 28}. Una de las primeras evidencias del potencial terapéutico del ARNi se obtuvo el año 2003 cuando Song y colaboradores describieron que la administración de siRNA dirigidos contra el ARNm de Fas (proteína que media señales celulares apoptóticas tras su unión a receptores de superficies celulares) en un modelo animal de hepatitis autoinmune, protege a los ratones de fibrosis hepática²⁹.

4. Métodos de entrega de ARN de interferencia

La utilización de siRNA requiere de una efectiva entrega a las células blanco, y para esto existen dos principales estrategias, las no-virales y las virales³⁰. Por el tamaño y la carga negativa que poseen, los siRNA no pueden atravesar fácilmente la membrana celular, y por lo tanto se están desarrollando tecnologías que facilitan la entrega del siRNA como complejos con policationes³¹, nanopartículas³², colesterol³³ o biopolímeros naturales biocompatibles derivados del colágenos^{34, 35}. Si bien la entrega directa de estos siRNAs por medio de estas tecnologías es un método simple y eficiente para una transfección transiente de células, la corta vida de éstos (pocos días) probablemente por su dilución por división celular y también por su degradación³⁶, pueden ser problemáticas en ciertas aplicaciones. La generación intracelular de siRNA desde vectores que expresan un precursor denominado *short hairpin RNA* (shRNA) posibilita una producción continua dentro de la célula. Los shRNAs pueden ser producidos dentro de la célula por sistemas basados en plasmidios y vectores virales³⁶. Varios grupos han descrito vectores retrovirales para la entrega de siRNAs en células de mamíferos^{37, 38}, pero estos vectores tienen limitaciones, al obtener bajos títulos virales³⁹. Otro ejemplo a mencionar son los vectores onco-retrovirales, que si bien integran el transgen en el genoma de la célula blanco sin transferencia de genes virales, éstas solo pueden infectar células que se encuentran en división celular⁴⁰.

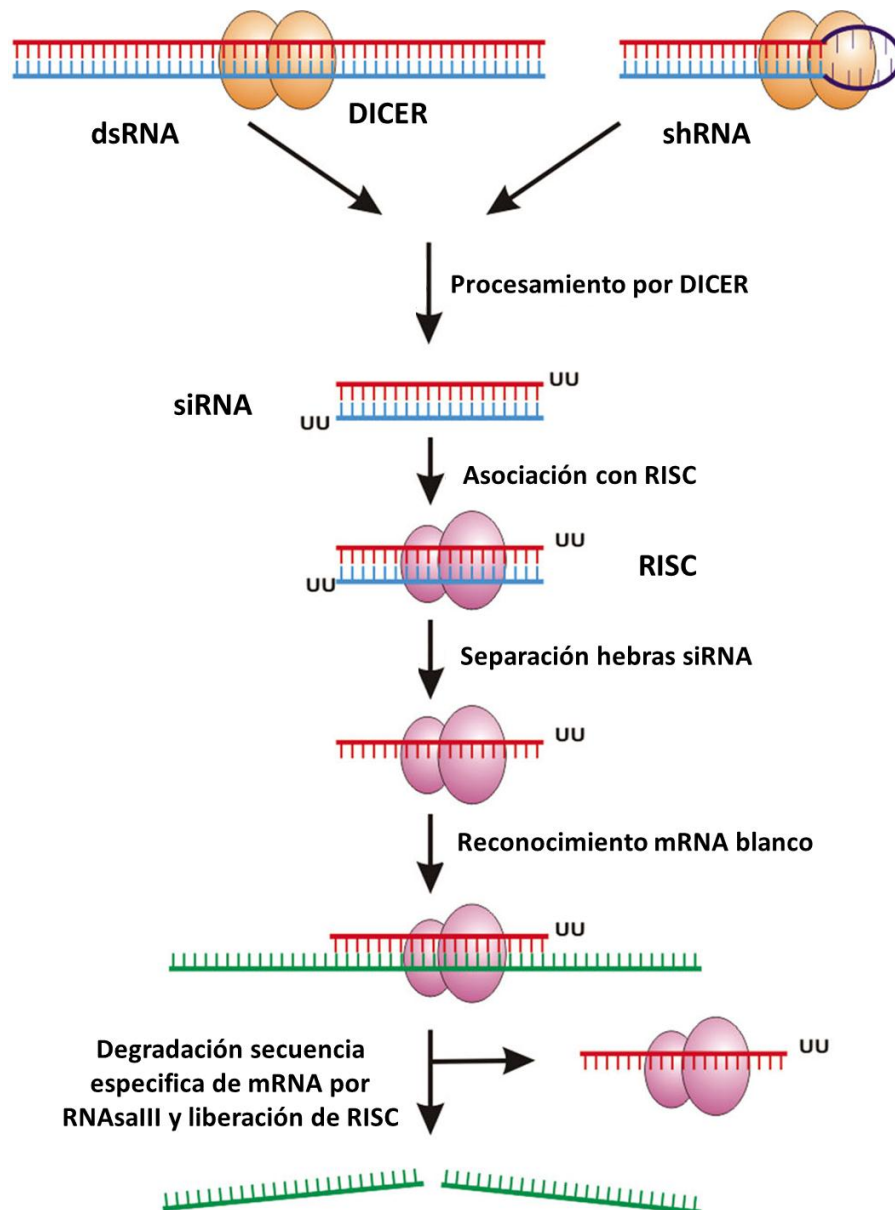


Figura 1: Esquema del mecanismo de ARN de interferencia. Modificado de Rutz and Scheffold⁴¹

5. Partículas lentivirales

Entre los vectores que están bajo investigación, los lentivirales tienen propiedades atractivas de considerar. La aplicabilidad de un vector lentiviral en investigación es amplia porque: i) el rango de huésped del lentivirus es prácticamente ilimitado cuando se usa la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) como envoltura de las partículas virales pseudotipificadas⁴²; ii) El transgen es altamente estable debido a su integración en el cromosoma, y iii) puede ser utilizado in vivo^{40, 43}.

Una de las limitantes del uso de vectores lentivirales es la posible patogénesis asociada a la infección que se puede producir por una manipulación poco cuidadosa. Por esto se han desarrollados virus no replicativos que después de una única ronda de infección son capaces de integrarse establemente el transgen con un mínimo de componentes del genoma viral y ser continuamente expresado sin generar virus infecciosos post infección. La producción de partículas lentivirales generalmente involucra la transfección de células con 3 o 4 plasmidios, donde uno o dos plasmidios de empaquetamiento contienen los genes estructurales virales, otro plasmidio contiene el transgen y los elementos cis necesarios para la integración y el empaquetamiento, y por último un plasmidio que codifique la envoltura viral³⁶. Generalmente como envoltura se utiliza la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular (VSV-G) por el amplio rango de tipos celulares que infecta y por la reducción de proteínas virales accesorias necesarias para infectar^{42, 44-46}.

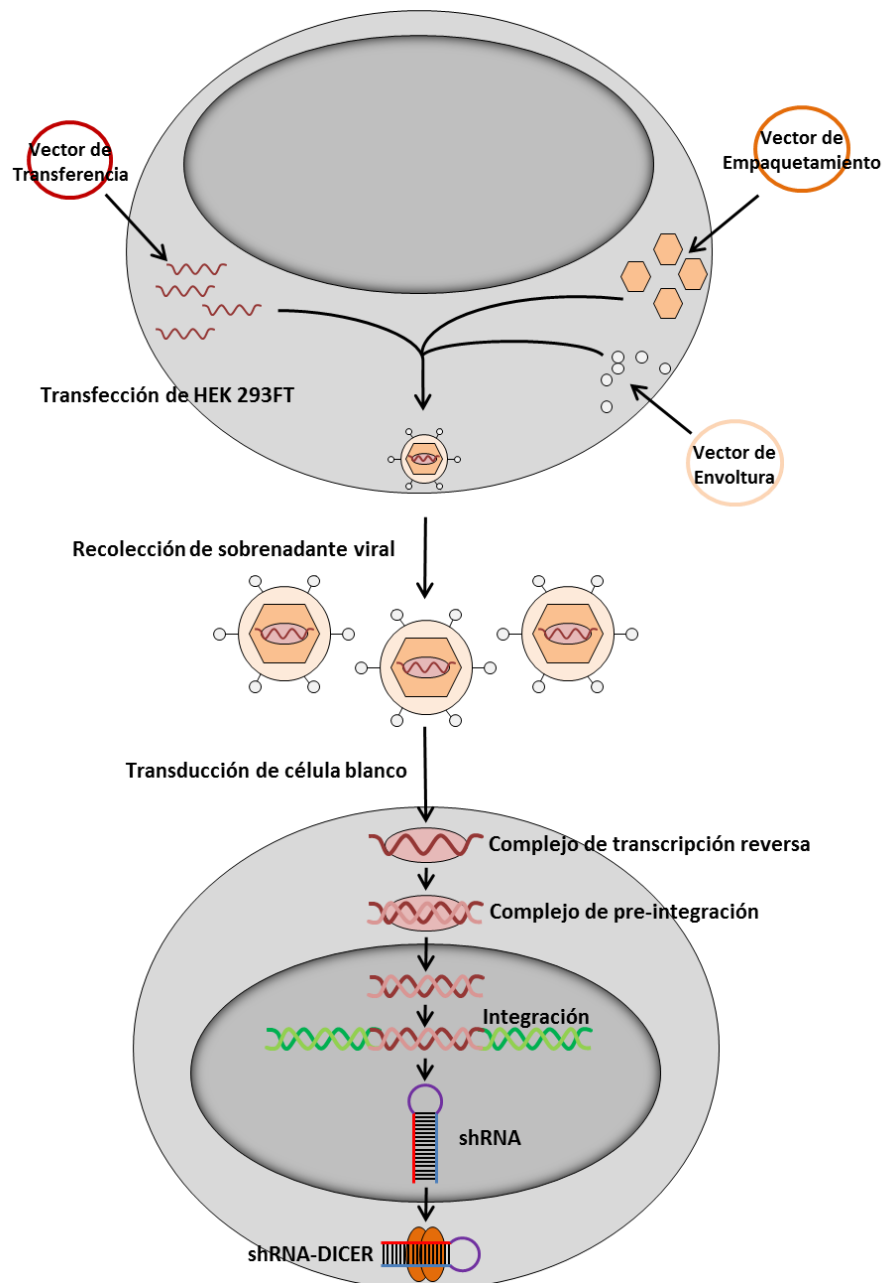


Figura 2: Esquema de la generación de partículas lentivirales y posterior transducción de las partículas lentivirales en una célula blanco. Modificado de Kim y Matrai^{47, 48}.

Por todas las propiedades mencionadas anteriormente, el uso de vectores lentivirales que expresen siRNAs es un eficiente método para silenciar genes blancos y además representa una atractiva opción para la entrega de siRNA en modelos animales *in vivo*.

Si bien las evidencias obtenidas en el laboratorio demuestran que la interferencia de ARNm_{tnc} induce muerte en distintos tipos de células tumorales, estos resultados han sido realizados *in vitro* y con un sistema de entrega de los interferentes basados en una metodología de transfección transiente, por lo que es importante demostrar estos mismos resultados *in vivo* en modelos tumorales animales, y con un sistema basado en la formación estable del interferente por la célula. Por lo tanto este proyecto plantea diseñar y desarrollar un sistema lentiviral que codifique un ARNi contra los ARNm_{tnc}, el cual será utilizado como sistema de entrega del ARNi en los modelos tumorales *in vivo* de melanoma. Se espera obtener resultados que indiquen que la interferencia de los ARNm_{tnc} *in vivo* es un método efectivo para controlar el crecimiento tumoral y aumentar la sobrevida en modelos de cáncer en animales.

II. HIPÓTESIS.

ARN de interferencia dirigido contra los ARNmtnc, entregado por un sistema lentiviral, induce la muerte de células tumorales *in vitro* e *in vivo*.

III. OBJETIVOS.

1. Objetivo general

Diseño, desarrollo y evaluación de un vector lentiviral que expresa shRNAs dirigidos contra los ARNmtnc, y demostración de su capacidad de interferir con el crecimiento de tumores *in vivo*.

2. Objetivos específicos.

- 1.- Diseño y generación de sistema lentiviral que permita la expresión de shRNAs dirigidos contra el ARNmtnc y la evaluación de su efecto en células tumorales en cultivo.
- 2.- Generación de modelos animales tumorales, para su posterior desafío con las partículas lentivirales que generan el shRNA contra el ARNmtnc.
- 3.- Entrega y evaluación del efecto del shRNA dirigidos contra el ARNmtnc, mediado por partículas lentivirales, en modelos animales tumorales.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Soluciones

Medio LB: Triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l.

Medio LB-Agar: Triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, 5 g/l agar.

TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 2mM.

Solución Fekete's: Etanol 95% 580 ml/l, H₂O 200 ml/l, formaldehído 37% 80 ml/l, ácido acético glacial 40 ml/l.

TNE-Sacarosa 25%: Sacarosa 250 g/l, Tris 1M (pH 7,5) 10 ml/l, EDTA 0,5M (pH 8.0) 2 ml/l, NaCl 5M 10 ml/l.

HEBS 2X (pH 7,1): NaCl 16 g/l, KCl 0,7 g/l, Na₂HPO₄ 0,4 g/l, dextrosa 2 g/l, Hepes 10 g/l.

2. Reactivos y material de uso general

Biología Molecular: La ampicilina se obtuvo de Sigma; el extracto de levadura (212750) y la triptona (211713) se obtuvieron de Bacto; el NaCl se obtuvo de AppliChem (A3597,1000); la agarosa se obtuvo de Axygen (AGR-LE-500); los marcadores de peso molecular de 1KB y 100 pb se obtuvieron de Fermentas (Burlington, Ontario, Canada); el Saber Safe se obtuvo de Invitrogen (San Diego, CA, USA); los solventes isopropanol y etanol se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

Biología Celular: Se usaron medios y componentes obtenidos desde Gibco (Carlsbad, California, USA) tales como medio DMEM (11995), medio RPMI 1640 (72400), medio OptiMem-I (51985), PBS 1X (10010), penicilina-estreptomicina (15240), tripsina 0,5% (15400) y suero fetal bovino (16000). El material de cultivo celular se obtuvo de Nunc (Rochester, NY, USA), incluyó placas de cultivo de 12 pocillos (150628) y de 6 pocillos (140675); botellas de cultivo de 25 cm² (117570) y 75 cm² (156499). Las placas de cultivo de 10 cm se obtuvieron de Corning (430117). Los tubos Falcon de 15 y 50 ml se obtuvieron de Axygen (33179101, 33180101).

3. Oligonucleótidos para subclonamiento de shRNAs

Los oligonucleótidos utilizados para el subclonamiento de los shRNAs se sintetizaron en Invitrogen (San Diego, CA, USA), han sido fosforilados en su extremo 5' y poseen la siguiente estructura:

shRNA-Luc

Oligonucleótido sh-Luc *forward*:

5'TGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGGAGAAC
TTTTTTC3'

Oligonucleótido sh-Luc *reverse*:

5'TCGAGAAAAAAGTTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAACGTGACACG
TTCGGAGAAC 3'

shRNA-ARNmtnc1

Oligonucleótido sh-ARNmtnc1 *forward*:

5'TGCACCCTCTAACCTAGAGAAGTTCAAGAGACTTCTCTAGGTTAGAGGGT
GCTTTTTTC3'

Oligonucleótido sh-ARNmtnc1 *reverse*:

5'TCGAGAAAAAAGCACCTCTAACCTAGAGAAGTCTCTTGAACCTTCTCTAG
GTTAGAGGGTGCA3'

shRNA-ARNmtnc2

Oligonucleótido sh-ARNmtnc2 *forward*:

5'TGCCGTGCAAAGGTAGCATAATCTTCAAGAGAGATTATGCTACCTTTGCA
CGGCTTTTTTC3'

Oligonucleótido sh-ARNmtnc2 *reverse*:

5'TCGAGAAAAAAGCCGTGCAAAGGTAGCATAATCTCTCTTGAAGATTATGC
TACCTTTGCACGGCA 3'

4. Alineamiento de oligonucleótidos

Para el alineamiento de los oligonucleótidos se mezclaron 5 µl de cada pareja de oligonucleótido, tanto *forward* como *reverse*, en una concentración 20 µM, 5 µl de tampón de alineamiento, y 35 µl de agua estéril libre de nucleasas. Posteriormente la mezcla se incubó en un termociclador por 4 minutos a 95°C, 10 minutos a 70°C y bajar de 1 grado por minuto hasta llegar a los 4°C. El alineamiento se verifica en un gel de agarosa al 2%. Los oligonucleótidos alineados presentan en sus extremos un sitio de restricción *HpaI* y *XhoI* para su inserción en el vector lentiviral.

5. Subclonamiento de oligonucleótidos

Para la construcción del vector lentiviral que codifica el shRNAs se utiliza el plasmidio pLL3.7 (ATCC) el cual contiene un promotor de citomegalovirus (CMV) que dirige la expresión de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP, del inglés *enhanced green fluorescent protein*), y un promotor U6 río arriba del sitio de clonamiento múltiple *HpaI-XhoI* que permite la introducción de oligonucleótidos que codifiquen shRNAs. Brevemente, el plasmidio pLL3.7 se hidrolisa con la enzima *HpaI* mezclando: 5 µl tampón 10x, 1,5 µl enzima *HpaI* (15U), 6 µg plasmidio pLL3.7, se afora a 50 µl con agua libre de nucleasa y se incuba a 37°C por 2 horas. Posteriormente el plasmidio es purificado en un volumen final de 30 µl mediante un kit de purificación de oligonucleótidos (Axygen) según recomendaciones del proveedor. La segunda digestión del plasmidio se realiza con la enzima *XhoI* en la siguiente mezcla: 5 µl tampón 10x, 1,5 µl enzima *XhoI* (15U), 30 µl de plasmidio pLL3.7 (proveniente de la digestión anterior), 13,5 µl de agua libre de nucleasa y se incuba a 37°C por 2 horas. El plasmidio con los sitios *HpaI-XhoI* liberados es purificado en 30 µl de agua libre de nucleasa mediante kit de extracción en gel (Axygen) según recomendaciones del proveedor. Los extremos 5' del plasmidio purificado fueron desfosforilados con la enzima SAP mediante la siguiente reacción: 5 µl de tampón SAP, 1 µl de enzima SAP (XU), 30 µl de plasmidio pLL3.7 digerido proveniente de la purificación anterior, 14 µl de agua libre de nucleasa, y se incuba a 30°C por 30 min y se agrega 1 µl más de enzima SAP a la mezcla y se incuba por 30 min a 30°C. Luego se incuba la mezcla a 65°C por 15 min para desactivar la enzima y posteriormente se purifica el plasmidio mediante kit de purificación de oligonucleótidos. Ya con el plasmidio digerido y desfosforilado se procede a la inserción de los oligonucleótidos alineados por reacción de ligación: 4 µl tampón ligasa 5X, 2 µl oligonucleótidos alineados, 20 ng de plasmidio digerido y desfosforilado se afora a 20 µl con agua libre de nucleasa y se incuba a 20°C por 16 horas. La mezcla de ligación fue transformada en la cepa Novablue de *E. Coli* por protocolo estándar de transformación con calcio y el ADN plasmidial purificado por kit de MiniPrep (Axygen) según recomendaciones del proveedor. La correcta inserción del cassette del shRNA fue confirmada por corte en paralelo con enzimas de restricción *NotI-XbaI* de la siguiente forma: 1 µl de tampón 10X, 0,5 µl de enzima *NotI* (15U), 0,5 µl de enzima *XbaI* (10U), 500 ng de plasmidio y se incubo por 1 hora a 37°C. Los clones son analizados en un gel de agarosa al 1,5% con *Saver Safe* en tampón TAE mediante exposición a la luz ultravioleta en un transiluminador comparándose con un marcador de tamaño molecular de ADN de 1 kb. Los clones positivos posteriormente fueron verificados por secuenciación. Se construyeron dos shRNA dirigidos contra el ARNmtnc (sh-ARNmtnc1, sh-ARNmtnc2), y un shRNA control dirigido contra luciferasa (sh-Luc).

6. Transfección *in vitro* de células de melanoma de ratón B16F10.

Un día antes de la transfección 2×10^5 células de melanoma B16F10 fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Al día siguiente se cambia el medio por Optimem-I sin suero ni antibióticos. 4 horas después las células son transfectadas con 4 µg de plasmidio generado en el punto anterior (pLL3.7-sh-Luc, sh-pLL3.7-ARNmtnc1, pLL3.7-shARNmtnc-2) mediante protocolo estándar de transfección con lipofectamina. Luego de 6 horas post-transfección el medio es cambiado por medio completo y a las 48 horas se realizan estudios de muerte celular para seleccionar el mejor shRNA dirigido contra el ARNmtnc para los estudios posteriores.

7. Producción y purificación ADN plasmidial

Las bacterias *E. coli* (Novablue) transformadas con las distintas construcciones se crecen en 250 ml de medio LB, ampicilina 100 µg/ml en un matraz de 2 L a 37°C, a 250 rpm, durante toda la noche. Las bacterias se centrifugan 10 min a 3500 rpm y se procede a la extracción. La purificación del ADN plasmidial se hizo mediante el kit de maxiprep NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel) según el protocolo del proveedor. Este protocolo consiste en una lisis alcalina seguida de la neutralización y de la separación del lisado celular. El lisado celular se hace pasar a través de una resina que retiene el ADN plasmidial, se lava y se eluye. El ADN plasmidial eluido se precipita con isopropanol y se lava con etanol 75%, se seca y se resuspende en agua estéril libre de nucleasas. La concentración y calidad del ADN se determinó mediante Nanodrop El patrón de migración electroforética de los plásmidos se analiza en un gel de agarosa 1% con *Saver Safe* en tampón TAE mediante exposición a la luz ultravioleta en un transiluminador, y comparación con un marcador de tamaño molecular de ADN de 1 kb. Las preparaciones usadas para la producción de partículas lentivirales tenían una razón de absorbancia 260/280 > 1,9.

8. Células

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo: HEK 293FT (embrión de riñón humano, Invitrogen), HeLa (cáncer cervico-uterino humano, ATCC), DU145 (cáncer de próstata humano, ATCC) y NSO/2 (mieloma murino, ATCC) se cultivan con medio DMEM suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/ml. Las líneas celular B16F10 (melanoma murino, ATCC), TC1 (epitelio de pulmón murino transformado con HPV-16 y c-H-Ras, ATCC) y H441 (adenocarcinoma pulmonar humano, ATCC) se cultivan con medio RPMI 1640 suplementado con

SFB 10% y penicilina 100 U/ml. El cultivo primario de HFK (keratinocitos de prepucio humano, Invitrogen) es cultivado en medio KSFM. Tanto las líneas celulares como el cultivo primario se cultivan en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C.

9. Producción de partículas lentivirales pseudotipificadas

Células HEK 293FT crecidas en placas de 10 cm hasta 80-90% de confluencia son transfectadas con los siguientes tres plasmidios usando el protocolo de fosfato de calcio (Soneoka y cols., 1995): i) 8 µg de pCMVΔ8.91 (codifican para Gag/Pol de HIV-1), iii) 4 µg de pVSV-G (codifica la glicoproteína G del Virus de la estomatitis vesicular), y ii) 8 µg de pLL3.7 vacío o que codifique shRNA. A las 16 horas post-transfección el medio es remplazado por Optimem-I fresco (Gibco) y a las 60 horas post-transfección, los sobrenadantes que contienen partículas lentivirales pseudotipificadas son cosechados y filtrados a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm de tamaño de poro. Para el trabajo con células las partículas fueron ultracentrifugadas a 28.000 rpm por 1:15 h a 4°C en un rotor SW41 Beckman, las partículas fueron resuspendidas durante 4 h en medio RPMI. Para el trabajo en animales, las partículas son concentradas en una primera etapa por ultrafiltración en tubos Amicon de 100 kDa de corte centrifugando a 3800 g a 4° C, y en una segunda etapa son ultracentrifugadas como se describe anteriormente. Las partículas lentivirales son almacenadas a -80°C.

10. Cálculo del título viral.

Se siembran 2×10^5 células HEK 293FT en placas de 6 pocillos un día antes de la transducción. En el día de la transducción se agregan diluciones seriadas del stock de partículas lentivirales en tres rangos de volúmenes 1 µl, 10^{-1} µl, 10^{-2} µl y se incuban a 37°C y 5% de CO₂. 72 horas post-transducción se analiza la expresión de EGFP en las células transducidas mediante citometría de flujo (BD FACS Cantoll, Facultad de Ciencias U. de Chile, laboratorio de la Dra. María Rosa Bono).

11. Transducción *in vitro* de células de distintas líneas celulares.

En el día de la transducción 5×10^4 células (HeLa, DU145, H441, HFK, TC1 o NSO/2) son sembradas en placas de 12 pocillos. 8 h después de sembradas las células son transducidas con las partículas lentivirales que codifican EGFP a distintos MOI (del inglés *multiplicity of infection*) (1, 5, 10). 72 h post-transducción se analiza el porcentaje de transducción de las células a los

diferentes MOI mediante expresión de EGFP por citometría de flujo (BD FACS Cantoll, Facultad de Ciencias U. de Chile, laboratorio de la Dra. María Rosa Bono).

12. Transducción *in vitro* de células de melanoma de ratón B16F10.

En el día de la transducción 5×10^4 células de melanoma B16F10 son sembradas en placas de 12 pocillos. 8 horas después de sembradas las células son transducidas con las partículas lentivirales que codifican EGFP a distintos MOI (1, 5, 10, 20, 50, 100, 150), en ausencia o presencia de polibreno (8 $\mu\text{g/ml}$)⁴⁹⁻⁵¹. 72 horas post-transducción se analiza el porcentaje de transducción de las células mediante expresión de EGFP por citometría de flujo (BD FACS Cantoll, Facultad de Ciencias U. de Chile, laboratorio de la Dra. María Rosa Bono).

De la misma forma descrita anteriormente, células B16F10 son transducidas con partículas lentivirales que codifican un shRNA dirigido contra los ARNmtnc o partículas lentivirales control que codifican un shRNA contra luciferasa con un MOI determinado para los estudios de expresión de los distintos transcritos como para los estudios de apoptosis.

13. Extracción de ARN total de células B16F10.

Luego de 48 horas post-transducción se extrajo ARN de células B16F10 sin tratar, de células transducidas con partículas lentivirales que codifican un shRNA dirigido contra los ARNmtnc o un shRNA contra luciferasa 48 horas post-transducción. Para la extracción de ARN se utiliza el kit RNeasy Plus Mini de Qiagen según protocolo del proveedor. Brevemente, las células son tratadas con tripsina 0,05% y posteriormente centrifugadas a 500 g por 5 min. El pellet celular es lisado agregando 600 μl tampón RLT plus y pasando la suspensión a lo menos 5 veces a través de una jeringa de 3 ml con aguja de 20-gauge de espesor. El homogenizado lisado fue transferido a una columna gDNA y se centrifuga por 30 s a 8.000 g para eliminar el ADN genómico. La solución resultante se mezcla con 600 μl de etanol 70%, se transfiere a una columna RNeasy spin y se centrifuga por 15 s a 8.000 g. Luego se agrega 700 μl de tampón RW1 a la columna y se centrifuga 15 s a 8.000 g. Posteriormente se realiza un lavado de la columna con 500 μl de tampón RPE y se centrifuga 15 s a 8.000 g y un segundo lavado con 500 μl de tampón RPE y se centrifuga 2 min a 8.000 g. Posteriormente se centrifuga la columna vacía a máxima velocidad por 1 min para eliminar los posibles remanentes de tampón RPE. Se coloca la columna RNeasy spin en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se adiciona 30 μl de agua estéril libre de nucleasa directamente en la membrana de la columna, y se centrifuga por 1 min a 8.000 g. Posteriormente se mide la concentración de las

muestras por Nanodrop y se verifica la integridad de éstas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

14. Reacción de transcripción reversa (RT).

El RNA (3 µg) se mezcla con 3 µl tampón DNAsa 10X, 0, 5 µl RNAsa out, 1 µl DNAsa y se completa 30 µl con agua estéril libre de nucleasa. Se incuba por 30 min a 37°C, se agrega 3 µl de tampón de inactivación, se centrifuga a 10.000 g por 5 min y se recolecta el sobrenadante el cual fue luego cuantificado.

La reacción de transcripción reversa (RT) se efectúa mezclando: 4 µl tampón FSB 5x, 1 µl dNTP (10mM), 2,5 µl “random primer” (100 ng/µl), 2 µl DTT, 0,5 µl RNAsa out, 500 ng ARN total (previamente tratado con DNAsa) y se afora a 18,5 µl con agua libre de nucleasa. La mezcla de reacción se incuba a 25 °C por 10 min y luego a 42 °C por 2 min. Posteriormente se agrega 1,5 µl transcriptasa reversa y se incuba a 40 °C durante 60 min y posteriormente se calienta a 75 °C por 10 min y se almacena a 4 °C.

15. Partidores

ARNmtnc-Sentido

Oligo Sentido 5'-TAGTCTTTCATCTTCCCTTGCGGC-3'

Oligo Antisentido 5'-AGAAATTCGTACATCTAGGAGC-3'

ARNmtnc-Antisentido1

Oligo Sentido 5'-AATAAGACGAGAAGACCCTATGGAG-3'

Oligo Antisentido 5'-TAAACCTAATAACCTTCTCTAGGTTAGAGG-3'

ARNmtnc-Antisentido2

Oligo Sentido 5'-AAACCTAATGGCCCAAAAAC-3'

Oligo Antisentido 5'-CGAATGATTATAACCTTCTCTAGGTTA-3'

ARNmtnc-Antisentido3

Oligo Sentido 5'-CAATCCAGGTCGGTTTCTATCT-3'

Oligo Antisentido 5'-TATATACGTACAACCTTCTCTAGGTTAGAG-3'

GAPDH

Oligo Sentido 5'-GATGCCCCCATGTTTGTGAT-3'

Oligo Antisentido 5'-ATTGTGGAAGGGCTCATGACC-3'

16. Reacción de amplificación mediante PCR en tiempo real.

Para la reacción de PCR de los ARNm_{tnc} se mezclan en un volumen final de 20 µl, 1 µl de cDNA, 600 nmoles de cada partidor, 10 µl de master mix Promega, y se completa con agua libre de nucleasa. Luego se sigue el siguiente programa: 15 s a 25 °C, 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 56 °C, 15 s a 72 °C y posteriormente 10 s a 95 °C, 5 s a 25 °C, 1 s a 55 °C, y 1 s a 95 °C. Para GAPDH se sigue con el mismo protocolo descrito anteriormente utilizando 200 nmoles de cada partidor.

17. Ensayo de TUNEL (*terminal transferase-mediated dUTP nick labeling*).

Para la identificación de células apoptóticas utilizando el ensayo de TUNEL⁵² se utiliza un kit comercial (*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR-Red, Roche). El procedimiento es aplicado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, células B16F10 son transducidas por 24, 48, o 72 h con Lv-ARN_{tnc} o Lv-Control en un MOI de 100. Una vez concluido el tratamiento, las células se centrifugan a 200 x g durante 10 min. El sedimento se resuspende en 10 µL de PBS 1X, se montan en portaobjetos cargados y se dejan secar a temperatura ambiente. Luego, las muestras se fijan en formaldehído al 4% por 1 hora entre 15°C - 25°C y después se lavan con PBS 1X por 5 min. Posteriormente se incuban con solución de permeabilización (0.1% Triton X-100 en 0.1% citrato de sodio) por 2 min entre 2°C-8°C y luego se lavan con PBS 1X. Se adicionan 50 µl de la mezcla de TUNEL del kit y se incuban las muestras en ambiente húmedo por 1 hora a 37°C en oscuridad. Se lavan las muestras 3 veces con PBS 1X. Finalmente, se incuban con DAPI diluido 1/1000 en PBS 1X por 5 min a TA y se realiza un lavado final con PBS por 5 min a TA. Luego se agrega medio de montaje fluorescente (DAKO) y se observan bajo el microscopio de epifluorescencia (Olympus BX 51). La cuantificación de las células TUNEL positivas se realiza bajo observación microscópica, contando aproximadamente 20 campos por tratamiento, de al menos tres experimentos independientes.

18. Ensayo de Anexina-V

Para analizar células apoptóticas mediante traslocación de fosfatidilserina⁵³ se utiliza el kit comercial Vybrant Apoptosis Pacific Blue-annexin V (Invitrogen). El procedimiento es realizado según recomendaciones del proveedor. Células B16F10 son transducidas por 72 horas con Lv-ARN_{tnc} o Lv-Control en un MOI de 100. Una vez concluido el tratamiento las células son recolectadas, centrifugadas a 800 x g por 5 minutos a TA y lavadas en PBS 1X frío. Las células se re-centrifugan y el pellet celular se resuspende en 100 µl de tampón

de unión-anexina 1X. Posteriormente se adiciona 5 µl de Pacific Blue-anexina V y las células se incuban por 30 min a TA en oscuridad. Después del período de incubación se adicionan 400 µl de tampón de unión-anexina 1X, se mezcla suavemente, se traspasan a tubos de citómetro BD y se pusieron en hielo hasta su medición. Previo al análisis mediante citometría de flujo (BD FACS Aria II cell sorter) se agregó 1 µl de ioduro de propidio (1mg/ml).

19. Animales

La presente investigación se realizó de acuerdo a las instrucciones de la Comisión de Investigación y Ética de la Fundación Ciencia & Vida que sigue las instrucciones de Conicyt. Se utilizaron ratones machos C57BL6 de 20-30 g peso. La mantención de los animales se realizó en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz y oscuridad y tuvieron libre acceso a agua y comida.

20. Formación de tumores sólidos subcutáneos.

Se cultivan células B16F10 hasta un 60-80% de confluencia obteniéndose una suspensión celular homogénea en PBS estéril. Las células se mantienen en hielo y se inoculan en el costado de los ratones mediante una inyección subcutánea. Se inyectaron 100 µl que contienen 10^6 células B16F10. El crecimiento tumoral es registrado midiendo los diámetros perpendiculares del tumor. El volumen es calculado usando la fórmula: $d^2 \times D \times 0,5236$, donde d y D representan los diámetros pequeño y grande, respectivamente. Los ratones son sacrificados cuando los volúmenes tumorales sobrepasan 2000 mm³.

21. Inyección lentiviral intratumoral.

Ratones C57BL6 con tumores subcutáneos de células B16F10 de un volumen inicial entre 50 y 100 mm³ son divididos de forma aleatoria en tres grupos. Grupo 1, sin tratamiento (Sin Tto), grupo 2, tratados con lentivirus que codifica un shRNA control (Lv-Control), y grupo 3, tratados con lentivirus que codifica un shRNA contra los ARNmtnc (Lv-ARNmtnc). Los ratones fueron inyectados intratumoralmente una vez cada dos días, a partir del día 7 post-inyección de las células, con una dosis de 4×10^7 UT de Lv-ARNmtnc o Lv-Control cinco veces. Como se menciona anteriormente el crecimiento tumoral es registrado midiendo los diámetros perpendiculares del tumor. Los ratones son sacrificados cuando los volúmenes tumorales alcanzan 2000 mm³. Además un grupo de ratones es

sacrificado al día 15 post-inyección de las células. Los tumores son extraídos y pesados para posteriormente extraer ARN total y realizar los análisis de expresión como se describe anteriormente.

22. Formación de metástasis pulmonar.

Células B16F10 se cultivan hasta un 60-80% de confluencia obteniéndose una suspensión celular homogénea en PBS estéril. Las células se mantienen en hielo y se inoculan en los ratones mediante una inyección intravenosa en la cola de este. Se inyectaron 200 μ l que contienen 4×10^5 células B16F10.

23. Inyección lentiviral sistémica.

Ratones C57BL6 inyectados con células B16F10 vía intravenosa son separados aleatoriamente en los grupos descritos anteriormente (Sin Tto, Lv-Control, Lv-ARNmtnc). Los ratones son inyectados vía intravenosa una vez cada tres días, desde el día 4 post-inyección de las células, con dosis de 5×10^7 UT de Lv-ARNmtnc o Lv-Control 4 veces. Un número de ratones de los distintos grupos son sacrificados al día 14 post-inoculación de las células y los pulmones son removidos y fijados en solución feketete por un día para el conteo de los focos metastásicos y para posterior análisis histológico. El otro número de ratones de los distintos grupos es utilizado para el ensayo de sobrevivencia. En este caso se les realiza un seguimiento hasta el día de su muerte natural o se sacrificaron cuando el ratón se veía moribundo.

24. Técnicas histológicas

Los pulmones fijados en solución feketete son deshidratados a temperatura ambiente y embebidos en parafina, para luego obtenerse cortes seriados de 10 μ m de grosor.

Los cortes son teñidos con hematoxilina y eosina (HE) para observar las características histológicas de los pulmones y comparar entre los distintos grupos.

25. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se expresan como promedio $\pm$ S.E.M. Cada grupo experimental consta de 6-8 animales. Las comparaciones entre los grupos se realizan mediante el test Kruskal-Wallis seguido de un análisis de Mann-Whitney. Se consideran como significativas diferencias con valores $p \leq 0,05$.

V. RESULTADOS

1. Diseño y generación de un sistema lentiviral que permita la expresión de shRNAs dirigidos contra el ARNmtnc y su evaluación en células tumorales en cultivo.

1.1 Construcción de plasmidios codificantes de shRNAs dirigidos contra los ARNmtnc.

Con el propósito de generar partículas lentivirales que contengan la información para la formación de ARNs de interferencia dirigidos contra los ARNmtnc se diseñaron oligonucleótidos tanto *forward* como *reverse* con la secuencia necesaria para la generación de una estructura de shRNA específica para nuestro blanco. La Figura 3 nos muestra un esquema de la construcción y formación del shRNA. En una primera etapa los oligonucleótidos fueron alineados y posteriormente se procedió al ligamiento de estos en el sitio de múltiple clonamiento *HpaI-XhoI* del plasmidio pLL3.7, para luego ser transformados las mezclas de ligación. La inserción del fragmento de oligonucleótidos alineados dentro del plasmidio fue verificada por digestión con las enzimas de restricción *XbaI* y *NotI* y posterior electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. La digestión de los clones positivos que poseen la secuencia que codifica el shRNA libera un inserto de aproximadamente 500 pares de bases (pb) en comparación con un plasmidio sin inserto el cual libera un fragmento de 449 pb (Fig.4). Los clones positivos fueron analizados por secuenciación para su posterior uso (Fig.5).

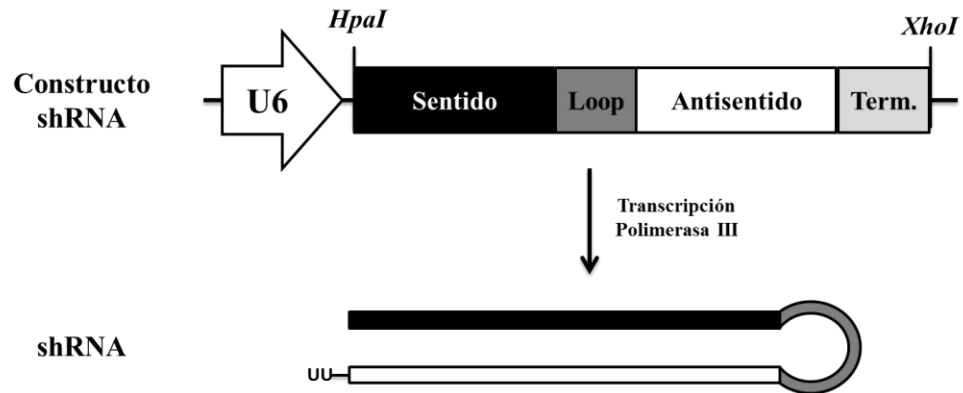


Figura 3: Esquema de construcción y generación de un shRNA. La figura muestra el sitio de múltiple clonamiento *HpaI-XhoI* río abajo del promotor U6 del plasmidio pLL3.7 en donde es insertada la secuencia que da origen posteriormente a un shRNA.

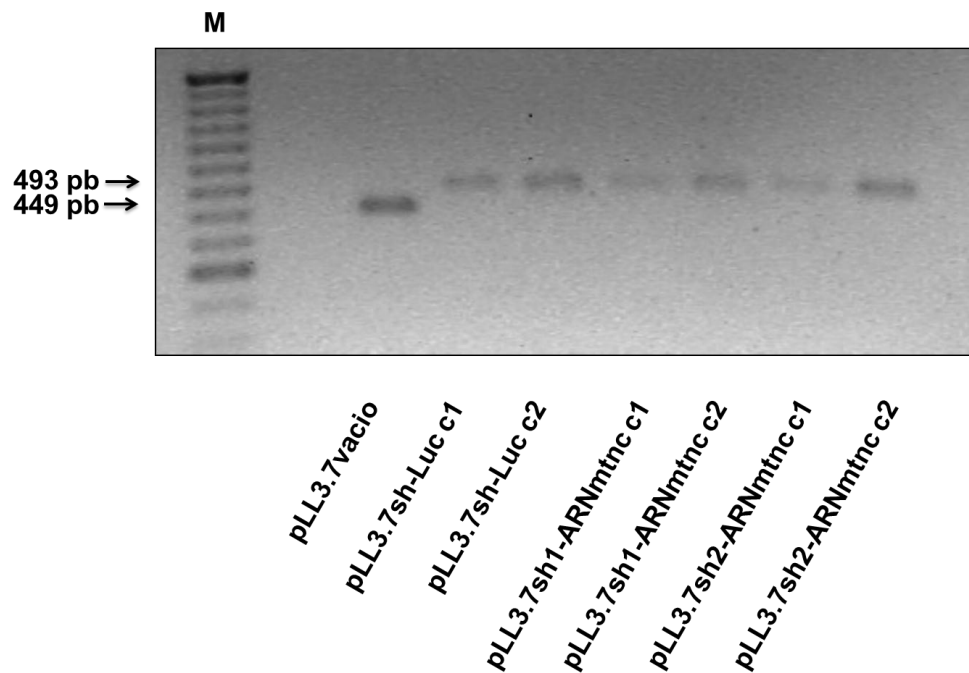


Figura 4: Análisis del patrón de digestión de clones positivos de distintos clonamientos de shRNAs. Las digestiones fueron realizadas con las enzimas de restricción *XbaI-NotI*. Se observa una diferencia de aproximadamente 50 pb en los clones positivos respecto del plasmidio sin inserto (vacío).

pLL3.7 sh-Luc

AGGGGGGGGAGATACAACCTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATTACA
GGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAGTACCGGGCCCGCTCTAGAGATCCGACGCGCCATCTCTAGGCCCG
CGCCGGCCCCCTCGCACAGACTTGTGGGAGAAGCTCGGCTACTCCCCTGCCCCGGTTAATTTGCATATAAT
ATTTCTAGTAACCTATAGAGGCTTAATGTGCGATAAAAGACAGATAATCTGTTCTTTTAACTAGCTAC
ATTTTACATGATAGGCTTGGATTTCTATAAGAGATACAAATACTAAATTATTATTTTAAAAAACAGCACA
AAGGAACTCACCTAACTGTAAAGTAATTGTGTGTTTTGAGACTATAAATATCCCTTGGAGAAAAGCCTT
GTT**TGTTCTCCGAACGTGTACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTTCGGAGAACTTTTTTC**TCGAGGTCGAC
GGTATCGATAAGCTCGCTTCACGAGATTCCAGCAGGTCGAGGGACCTAATAACTTCGTATAGCATACATTA
TACGAAGTTATATTAAGGGTTCCAAGCTTAAGCGGCCGCGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCATTAGTT
ATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAG

pLL3.7 sh1-ARNmtnc

GTATAGCACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATT
ACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAGTACCGGGCCCGCTCTAGAGATCCGACGCGCCATCTCTAGGC
CCGCGCCGGCCCCCTCGCACAGACTTGTGGGAGAAGCTCGGCTACTCCCCTGCCCCGGTTAATTTGCATAT
AATATTTCTAGTAACCTATAGAGGCTTAATGTGCGATAAAAGACAGATAATCTGTTCTTTTAACTAGC
TACATTTTACATGATAGGCTTGGATTTCTATAAGAGATACAAATACTAAATTATTATTTTAAAAAACAGCA
CAAAAGGAACTCACCTAACTGTAAAGTAATTGTGTGTTTTGAGACTATAAATATCCCTTGGAGAAAAGC
CTTGTT**TGCACCCTCTAACCTAGAGAAGTTCAAGAGACTTCTCTAGGTTAGAGGGTGCTTTTTTTC**TCGAGG
TCGACGGTATCGATAAGCTCGCTTCACGAGATTCCAGCAGGTCGAGGGACCTAATAACTTCGTATAGCATA
CATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCCAAGCTTAAGCGGCCGCGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT
TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACT
TACGTAAATGGCCCGCTGCTGACCGCCACGACCCCGCCATTGACGTCATATGACGTATGTTCCCATAGT
ACGCCAATAGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAACCTGCCACTTG

pLL3.7 sh2-ARNmtnc

GTATAGCACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATT
ACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAGTACCGGGCCCGCTCTAGAGATCCGACGCGCCATCTCTAGGC
CCGCGCCGGCCCCCTCGCACAGACTTGTGGGAGAAGCTCGGCTACTCCCCTGCCCCGGTTAATTTGCATAT
AATATTTCTAGTAACCTATAGAGGCTTAATGTGCGATAAAAGACAGATAATCTGTTCTTTTAACTAGC
TACATTTTACATGATAGGCTTGGATTTCTATAAGAGATACAAATACTAAATTATTATTTTAAAAAACAGCA
CAAAAGGAACTCACCTAACTGTAAAGTAATTGTGTGTTTTGAGACTATAAATATCCCTTGGAGAAAAGC
CTTGTT**TGCCGTGCAAAGGTAGCATAATCTTCAAGAGAGATTATGCTACCTTTGCACGGCTTTTTTTC**TCGA
GGTCGACGGTATCGATAAGCTCGCTTCACGAGATTCCAGCAGGTCGAGGGACCTAATAACTTCGTATAGCA
TACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCCAAGCTTAAGCGGCCGCGTGGATAACCGTATTACCGCCATGC
ATTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAA
CTTACGTAAATGGCCCGCTGCTGACCGCCACGACCCCGCCATTGACGTCATATGACGTATGTTCCCATAG
GTACGCCAATAGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAACCTGCCACTTG

Figura 5: Secuenciación de los plasmidios pLL3.7 sh-Luc, pLL3.7 sh1-ARNmtnc y pLL3.7 sh2-ARNmtnc. En gris se observa la secuencia del fragmento insertado.

1.2 Selección de shRNA dirigido contra los ARNmtnc.

Experimentos realizados por Burzio y colaboradores (manuscrito en preparación) demostraron que la interferencia mediada por oligonucleótidos antisentidos de los ARNmtnc inducía muerte en células tumorales, por lo tanto para evaluar cual de las dos construcciones plasmidiales diseñadas anteriormente (pLL3.7 sh1-ARNmtnc, pLL3.7 sh2-ARNmtnc) induce mayor muerte en células B16F10, en comparación con un plasmidio control (pLL3.7 sh-Luc), se transfectaron células B16F10 con los distintos plasmidios y 48 horas post-transfección se analizaron las células mediante microscopía de fase y posteriormente se analizó la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripan.

Al observar las células mediante microscopia de campo claro se puede ver una morfología típica de muerte en aquellas células que fueron transfectadas con los plasmidios que codifican un shRNA dirigido contra los ARNmtnc, y no así en las células transfectadas con el plasmidio control o las células sin tratar (Fig.6A). Al analizar la viabilidad de los distintos grupos mediante tinción con azul de tripan se pudo observar que tanto el plasmidio pLL3.7 sh1-ARNmtnc como el pLL3.7 sh2-ARNmtnc inducen una significativa muerte celular (45%, 55% respectivamente) en comparación con el plasmidio control pLL3.7 sh-Luc (8%) y las células sin tratar (2%) (Fig.6B).

Al analizar cual de los dos plasmidios induce mayor muerte celular no se observan diferencias significativas entre ellos, pero si una tendencia favorable al plasmidio pLL3.7 sh1-ARNmtnc, por lo que los siguientes ensayos se realizaron utilizando el plasmidio pLL3.7 sh1-ARNmtnc.

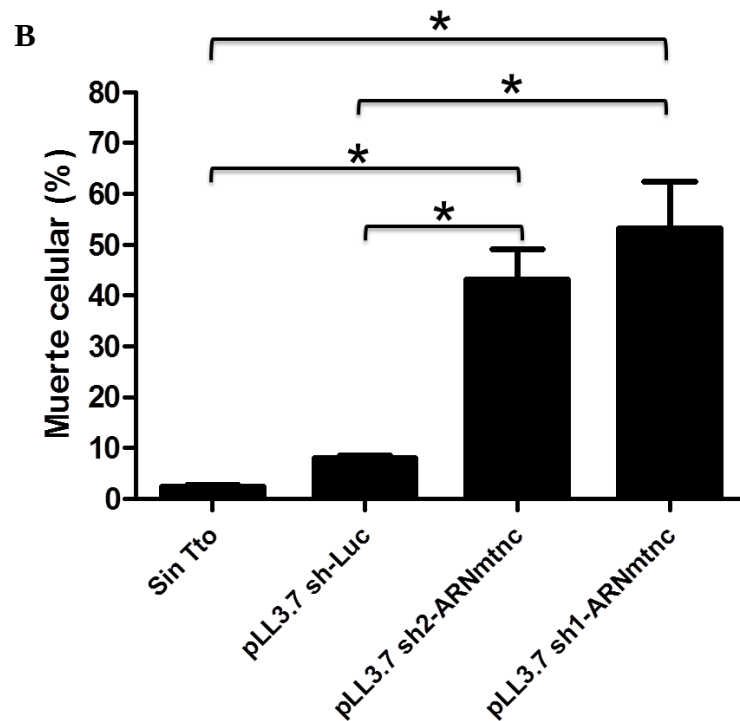
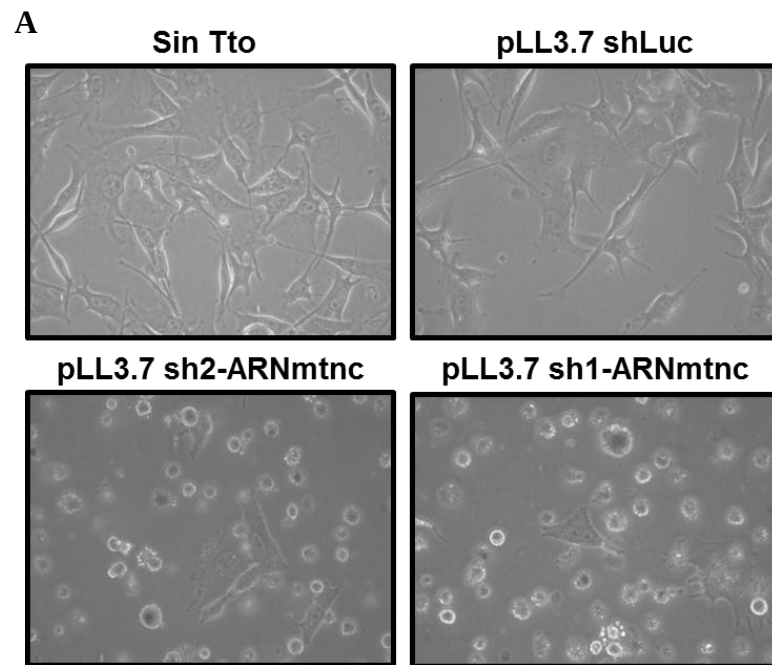
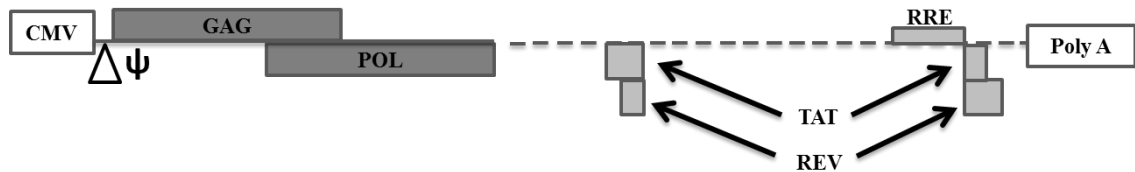


Figura 6: Muerte celular mediada por transfección de plasmidios pLL3.7 sh-ARNmtnc y pLL3.7 sh-Luc en células B16F10. A) Microscopía de fase de células B16F10 post transfección. B) Porcentaje de muerte de células B16F10 post transfección medido por azul de tripan.

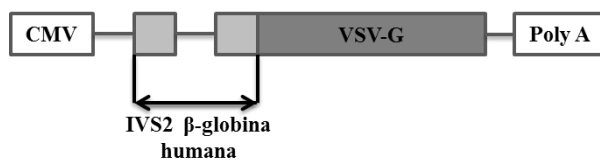
1.3 Producción de partículas lentivirales.

Para la producción de partículas lentivirales pseudotipificadas es necesario utilizar un sistema de diferentes plasmidios que codifiquen tanto el genoma viral como las proteínas necesarias para la encapsidación de este genoma y posterior formación de la partícula lentiviral. Dentro de estos se encuentra el plasmidio pCMV-dR8,91 el cual posee la secuencia gag de HIV-1 que codifica las proteínas virales requeridas para la formación del lentivirus, la secuencia pol de HIV-1 que codifica las enzimas de replicación viral necesarias para la replicación e integración del lentivirus, la secuencia rev que codifica la proteína rev y junto al elemento de respuesta a rev de HIV-1 inducen la expresión de los genes gag y pol⁴⁶. Además se necesita el plasmidio pCMV-VSVG que codifica la glicoproteína de superficie del virus de la estomatitis vesicular la cual permite al lentivirus un amplio rango de huésped a infectar⁴², y el plasmidio de transferencia génica, que en este caso es el pLL3.7 el cual codifica el genoma del virus⁵⁴ (Fig.7).

pCMV-Rd8.91



pCMV-VSV-G



pLL3.7

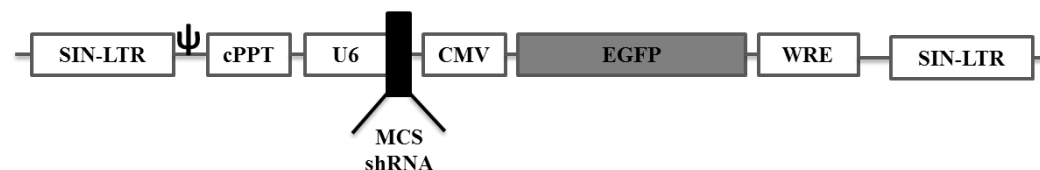


Figura 7: Representación esquemática de los elementos contenidos en los diferentes plasmidios que componen el sistema lentiviral.

Luego de construídos, los plásmidos que se utilizaron fueron analizados mediante un patrón de digestión con enzimas de restricción (Fig.8). Los plásmidos pLL3.7 y pLL3.7 shRNA se digirieron con las enzimas *XbaI* y *EcoRI* los cuales son sitios de restricción únicos dentro de los plásmidos, y al cortar independientemente con cada enzima por separado, éste es linearizado y migra con un tamaño de alrededor de 7 kb, y al cortar con ambas enzimas se liberan dos fragmentos de aproximadamente 5 y 2 kb. Para el plásmido pCMV-Rd8.91 también se utilizaron las enzimas *XbaI* y *EcoRI*, el cual linearizado da un tamaño aproximado de 12 kb, y al utilizar ambas enzimas se liberan dos fragmentos de aproximadamente 10 y 2 kb aproximadamente. Por último se analizó el patrón de restricción del plásmido pCMV-VSV-G utilizando la enzima *BamHI* la cual libera dos fragmentos de aproximadamente 4,8 y 1,5 kb.

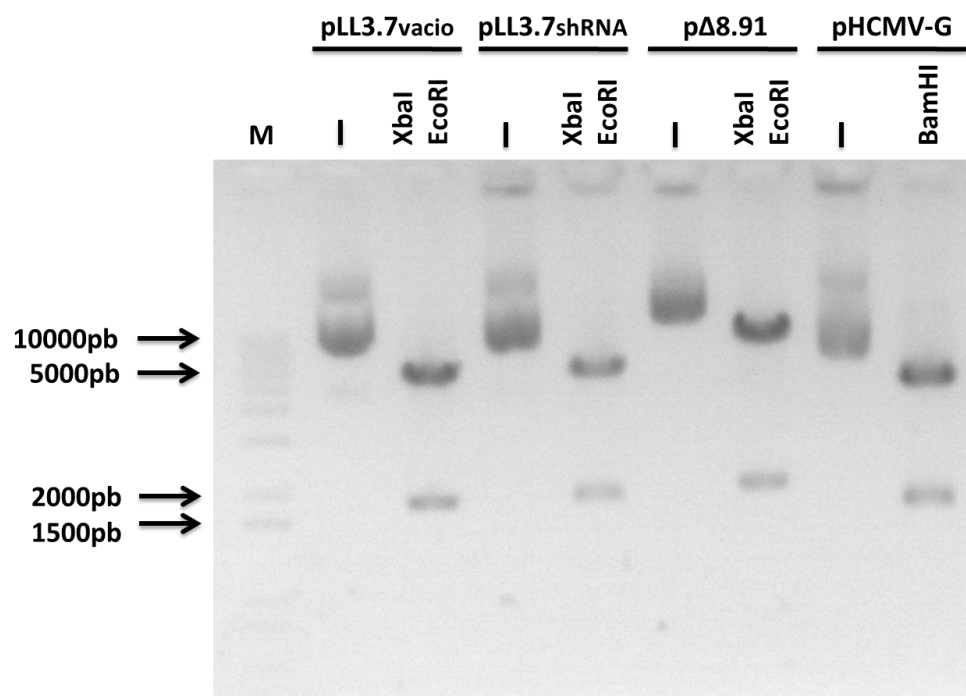


Figura 8: Tamaño de los fragmentos derivados de la digestión con enzimas de restricción luego de su separación por electroforesis en gel de agarosa.

Para la generación de partículas lentivirales se procedió a realizar una cotransfección de los tres plasmidios mencionados anteriormente en células HEK 293FT para la posterior obtención de las partículas en el sobrenadante del cultivo. Estas partículas, después de un proceso de ultracentrifugación, fueron cuantificadas mediante dilución seriada de estas y posterior análisis de la expresión de EGFP (proveniente desde el plasmidio pLL3.7) mediante citometría de flujo (Fig.9A). El título viral fue de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ UT/ml el cual se ve representado en tres distintos tipos de partículas lentivirales (Fig. 9B).

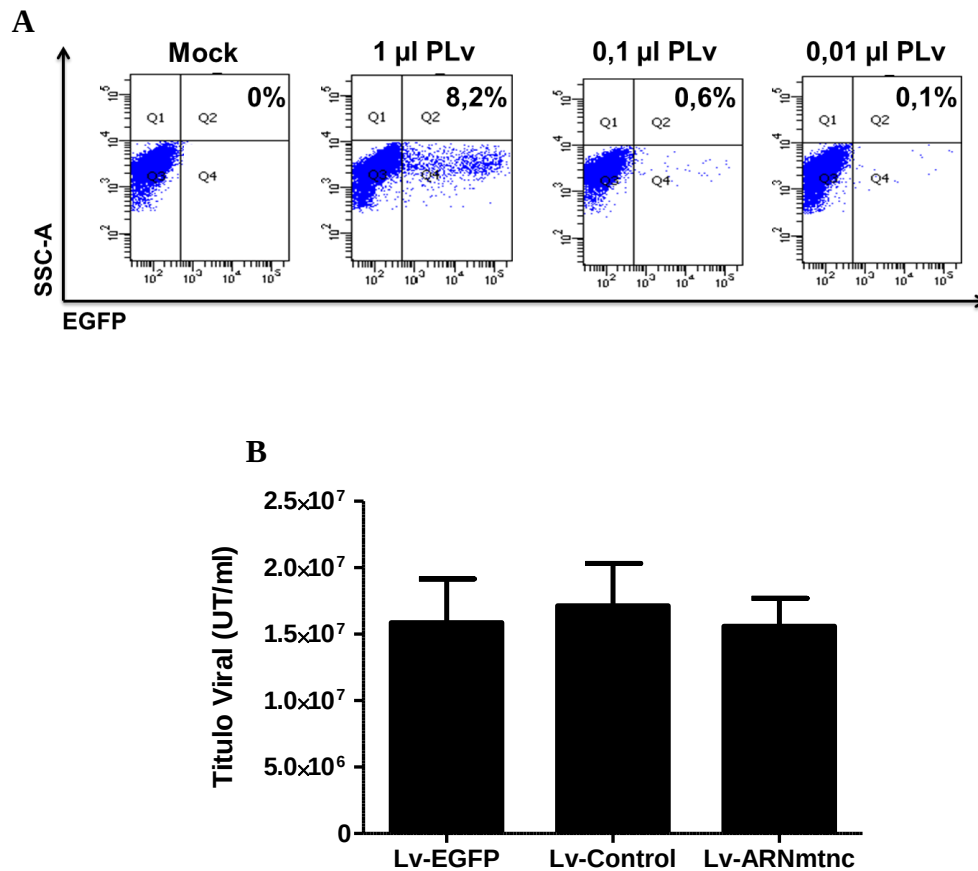


Figura 9: Cálculo del título de partículas lentivirales pseudotipificadas. A) Expresión de EGFP medida por citometría de flujo de diluciones seriadas de PLV en células HEK 293FT. B) Título viral de PLV que codifican o un shRNA contra el ARNmtnc, o un shRNA-control, o EGFP.

1.4. Desarrollo de un método de purificación y concentración de partículas lentivirales para su uso *in vivo*.

El uso de vectores lentivirales para la entrega de genes *in vitro* se ha incrementado en el último tiempo. Estos tienen un uso promisorio para la entrega de genes en modelos animales gracias a la capacidad de transducir células *in vivo*, y a que estos vectores son poco inmunogénicos y no tóxicos. Generalmente el proceso de producción de partículas lentivirales provee virus en una concentración del orden de 10^6 - 10^7 UT/ml, y el uso óptimo de partículas lentivirales en modelos *in vivo* requiere concentraciones del orden de 10^8 - 10^9 UT/ml. Para esto se desarrolló un método de concentración de las partículas lentivirales que permita alcanzar el rango de concentración requerido. El método que se utilizó fue, en una primera etapa, concentrar un volumen grande de sobrenadante que contiene partículas lentivirales mediante filtración con tubos Amicon. En este caso se obtienen partículas concentradas en una fracción de volumen menor al sobrenadante inicial, sobrenadante que es posteriormente ultracentrifugado y el sedimento de partículas virales son resuspendidas en un pequeño volumen para su posterior uso. Como se puede observar en la Figura 10B, 1 μ l de PLv concentradas es capaz de transducir el 100% de un total de 2×10^5 células HEK293FT en comparación a 1 μ l de PLv sin concentrar, el cual fue capaz de transducir solo el 10% de las células. Esta diferencia se refleja en el título viral alcanzado en cada procedimiento donde las PLv que fueron concentradas poseen títulos virales del orden de aproximadamente 2×10^8 UT/ml, en comparación a partículas que no fueron concentradas por filtración que fueron del orden de 10^7 UT/ml (Fig. 10B). Para los ensayos *in vivo* se utilizó el procedimiento de filtración-ultracentrifugación.

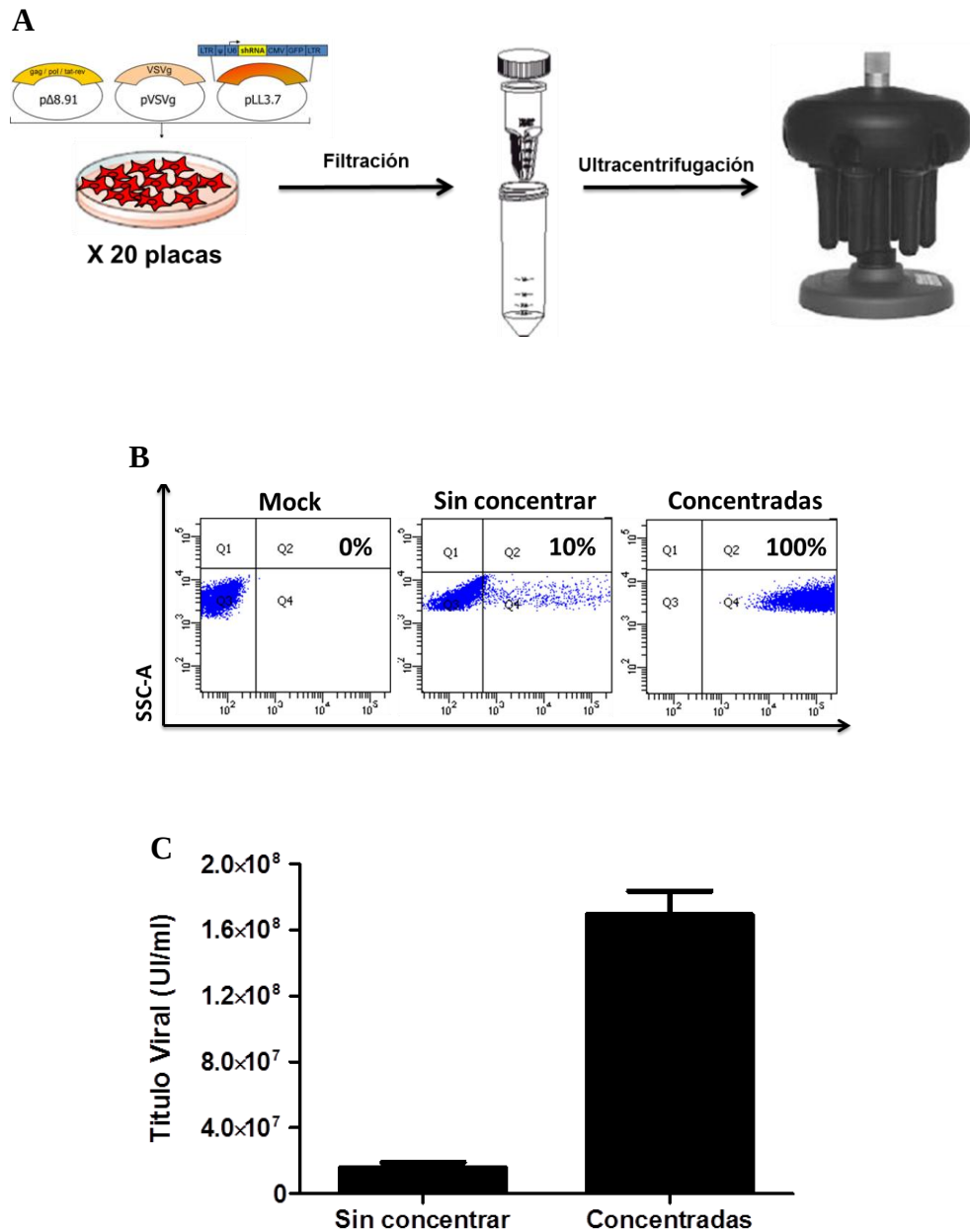


Figura 10: Procedimiento de concentración de partículas lentivirales para su uso *in vivo*:
A) Esquema de la metodología para concentración de PLv. **B)** Citometría de flujo de células 293FT transducidas con 1µl de PLv-EGFP sin concentrar vs 1µl de PLv-EGFP concentradas. **C)** Comparación título virales de PLv sin concentrar vs PLv concentradas. Resultado muestra promedio de tres experimentos independientes

1.5. Evaluación de la capacidad de transducción de líneas celulares por las partículas lentivirales.

Una de las ventajas del uso de partículas lentivirales pseudotipificadas es que poseen la glicoproteína de superficie VSV-G que permite un amplio rango de células huésped que se pueden transducir⁴². Para verificar esta capacidad, distintas líneas celulares tanto de ratón como de humano fueron transducidas con partículas lentivirales que codifican EGFP y se midió el porcentaje de transducción de éstas. Se puede observar que las líneas celulares infectadas con las partículas lentivirales presentan expresión de EGFP la cual aumenta a medida que aumenta el MOI aplicado en cada caso. Además se observa que el porcentaje de transducción es diferente en cada tipo celular a un mismo MOI. Por ejemplo, se observa que las células H441 presentan un 10% de transducción a un MOI de 10 y en cambio las células TC1 presentan aproximadamente un 55% de transducción a un MOI de 10 (Fig. 11).

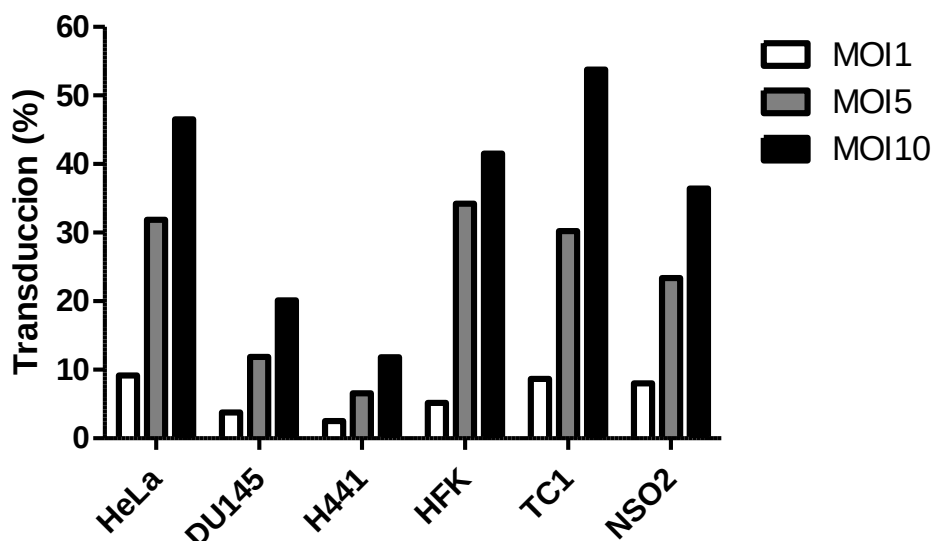


Figura 11: Porcentaje de transducción de distintas líneas celulares con Lv-EGFP a diferentes MOI, medido por expresión de EGFP mediante citometría de flujo. Resultado muestra promedio de dos experimentos independientes.

1.6. Evaluación del porcentaje de transducción de partículas lentivirales en células de melanoma de ratón B16F10.

Para el trabajo experimental de esta tesis fue de interés evaluar la eficiencia de transducción de células de melanoma de ratón B16F10 mediado por partículas lentivirales, y así poder determinar la cantidad de partículas a utilizar en los ensayos posteriores. Para esto células B16F10 fueron cultivadas con partículas lentivirales, las cuales codifican EGFP, a distintos MOI (1-150) y la expresión de la proteína EGFP fue analizada mediante citometría de flujo 72 horas post-transducción. Se observó que la eficiencia de transducción de las partículas lentivirales en células B16F10 fue de aproximadamente 50% a un MOI de 50, y que este porcentaje de transducción se mantiene al utilizar MOIs mayores a 50 (Fig. 12). Para tratar de aumentar la eficiencia de transducción de las partículas lentivirales sobre las células B16F10 se agregó polibreno (8 µg/ml) junto con los lentivirus⁴⁹⁻⁵¹, lo cual si bien incremento el porcentaje de transducción (80%) también se observa mayor muerte celular posiblemente mediada por el polibreno. Basado en estos resultados los siguientes ensayos se realizaron utilizando un MOI de 100.

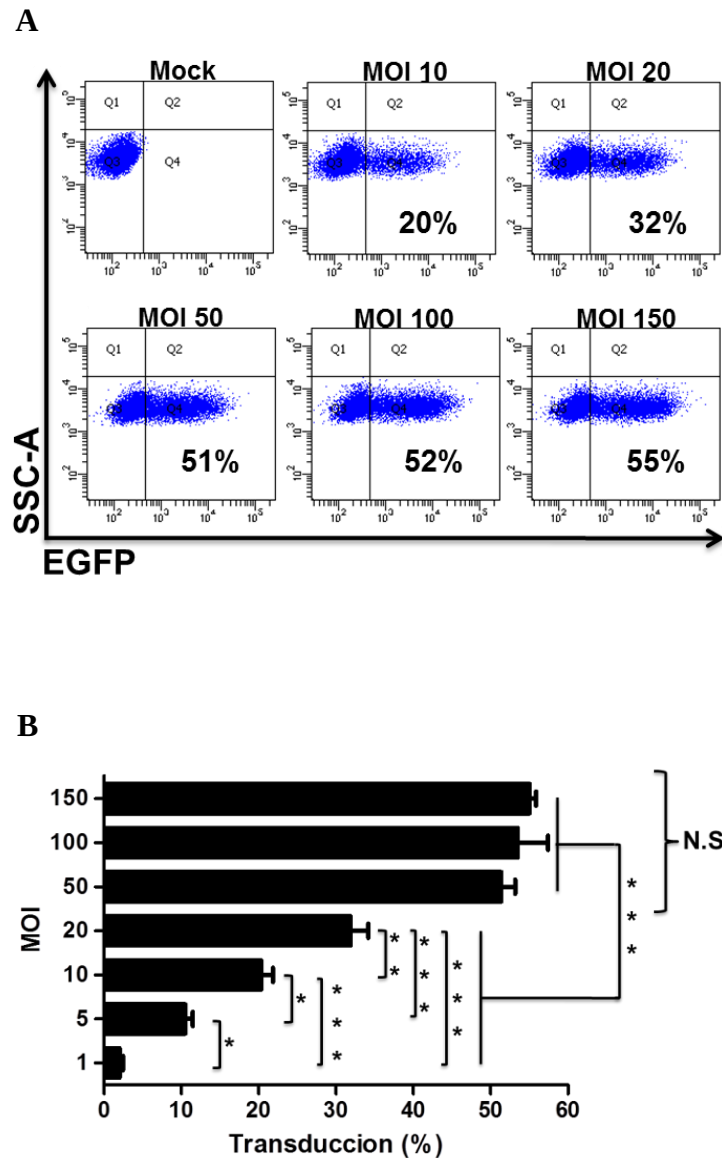


Figura 12: Transducción de células B16F10 a diferentes MOI. A) Porcentaje de expresión de EGFP medido mediante citometría de flujo en células B16F10 a distintos MOI. B) Gráfico de porcentaje de transducción de células B16F10 a diferentes MOI. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=3), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

1.7. Evaluación de la expresión de los distintos ARNm_{mtnc} en células B16F10 transducidas con partículas lentivirales *in vitro*.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la interferencia de los ARNm_{mtnc} en células de melanoma murino B16F10, para lo cual se diseñaron y generaron partículas lentivirales que codifican shRNAs dirigidos contra los ARNm_{mtnc}. En nuestro trabajo se utilizaron células de origen murino en las cuales se han descrito una familia de ARNm_{mtnc} compuesta por el ARNm_{mtnc} sentido (ARNm_{mtnc}-S) y los ARNm_{mtnc} antisentidos 1, 2, y 3 (ARNm_{mtnc}-AS1, ARNm_{mtnc}-AS2, ARNm_{mtnc}-AS3) (Oliveira-Cruz L, datos no publicados). La misión de los shRNAs generados al transducir las células con las partículas lentivirales es la de degradar los transcritos blancos específicos hacia los cuales están dirigidos mediante el mecanismo de RNA de interferencia^{55, 56}. En nuestro caso los transcritos blancos son los ARNm_{mtnc}, por lo tanto para poder verificar si la degradación provocada por los shRNAs esta siendo efectiva se deben medir los niveles de cada ARNm_{mtnc} en la célula desafiada con los lentivirus, y para esto la técnica que se utiliza frecuentemente es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR del ingles *Real Time- Polymerase Chain Reaction*) lo que nos permite evaluar de manera cuantitativa la cantidad de transcrito en la célula⁵⁷. Para poder realizar el RT-PCR se necesitan un par de secuencias cortas de ADN denominada partidores las cuales actúan como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde, y esta secuencia permite realizar una amplificación específica del transcrito que se quiere medir. Como la estructura de los ARNm_{mtnc} comparten gran parte de su secuencia se debió diseñar partidores específicos que nos permitiera diferenciar entre cada transcrito. La Figura 13 nos muestra una representación esquemática de los ARNm_{mtnc} de origen murino y la ubicación de los partidores específicos para cada secuencia.

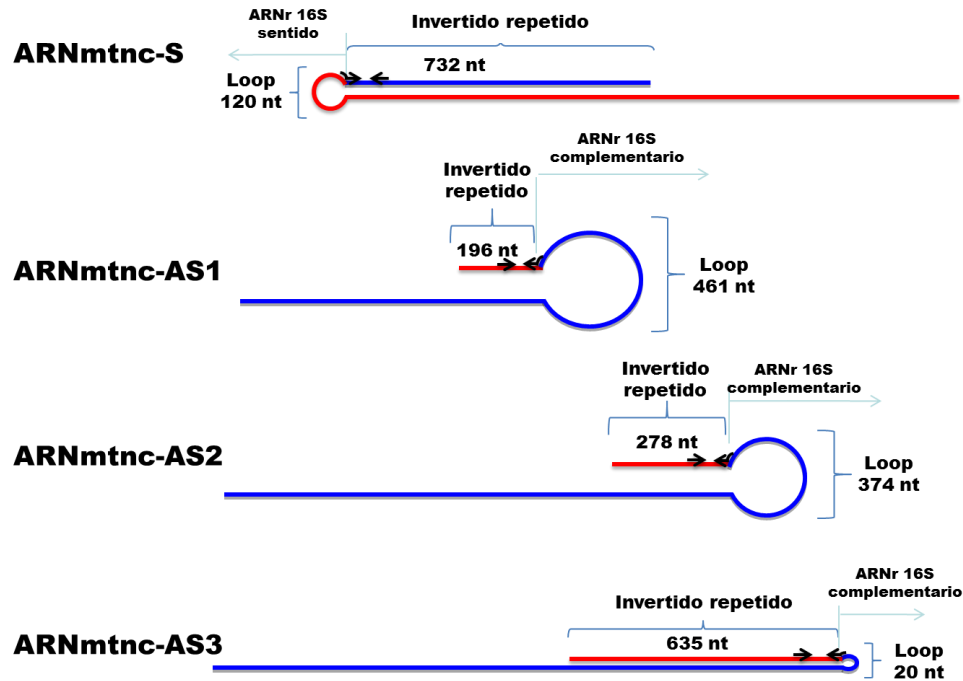


Figura 13: Representación esquemática de los ARNmtnc-Sentido y ARNmtnc-Antisentidos de origen murino y ubicación partidores para RT-PCR. Para cada transcrito se utilizó un partidor “reverse” complementario a la región de empalme entre el ARN 16S (Sentido o Antisentido) y la secuencia inicial del repetido invertido. El partidor “forward” corresponde a una posición determinada del repetido invertido en cada caso.

Si bien se utilizaron partidores diseñados para cada ARNmtnc, se procedió a comprobar si se producía la amplificación de estos y si realmente son específicos para cada uno de ellos. Como se puede observar en la Figura 14A todos los ARNmtnc lograron ser amplificados presentando distintos valores de Ct para cada uno con las condiciones descritas en materiales y métodos, y además no se observan en la curva de disociación productos inespecíficos de la amplificación de cada transcrito (Fig. 14B).

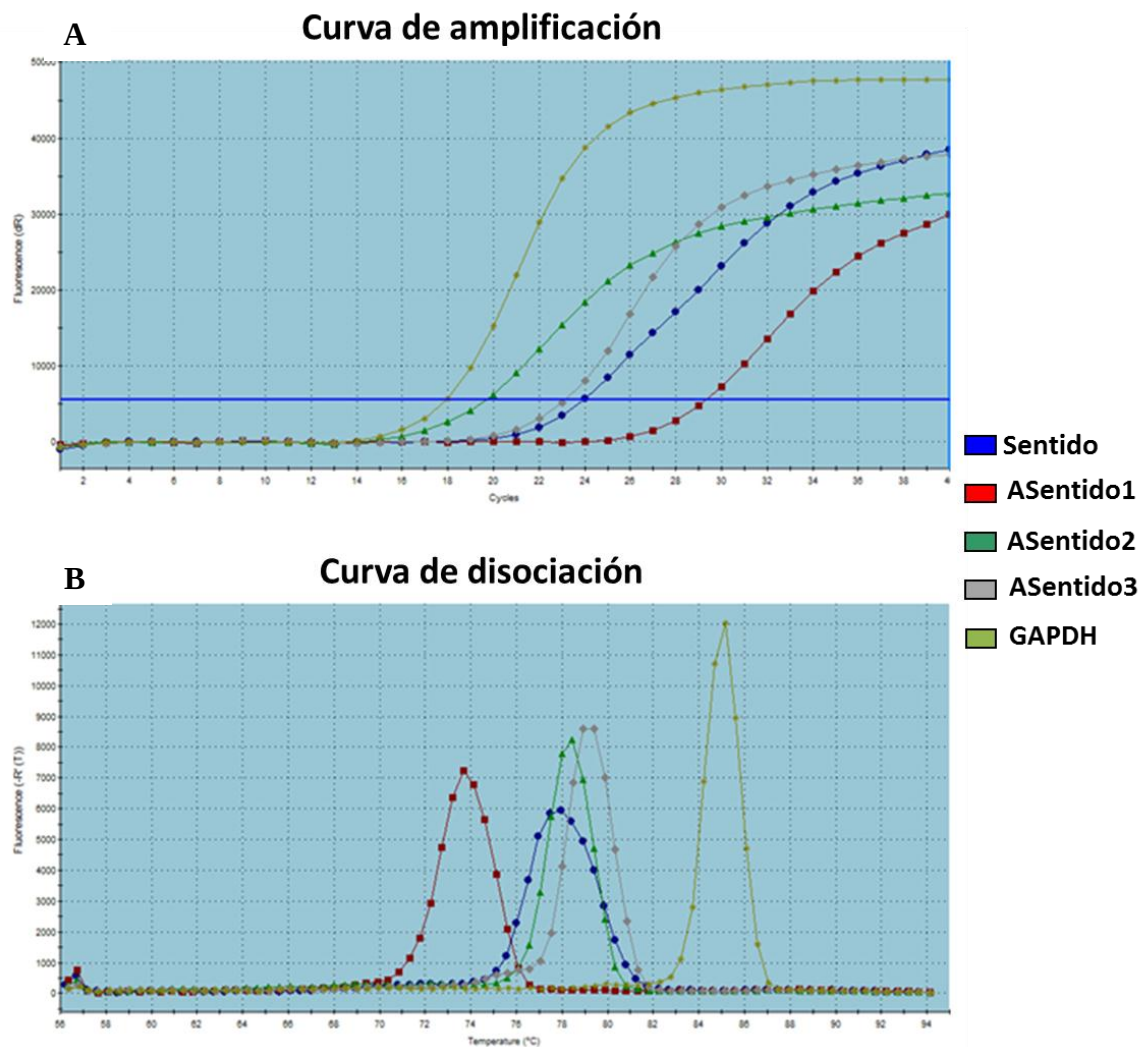


Figura 14: RT-PCR de los distintos ARNm tnc en células B16F10. A) Curva de amplificación. B) Curva de disociación. El color de cada curva corresponde a cada transcrito incluido el ARNm de referencia (GAPDH) como se indica a la derecha de la figura.

Después de comprobar las condiciones óptimas de amplificación de cada ARNm tnc se procedió a analizar los niveles de cada uno de éstos en células B16F10 tratadas por 48 horas con partículas lentivirales que codifican shRNAs dirigidos contra los ARNm tnc.

ARN mitocondrial no codificante Sentido (ARNmtnc-S)

Al analizar la expresión relativa del ARNmtnc-S en células transducidas con Lv-ARNmtnc se observó una disminución significativa de un 50% en los niveles de éste ARN en comparación con células transducidas por 48 h con Lv-Control. Si bien también se observa una disminución de los niveles del ARNmtnc-S en las células tratadas con Lv-Control en comparación a las células sin tratar esta disminución no es estadísticamente significativa (Fig. 15).

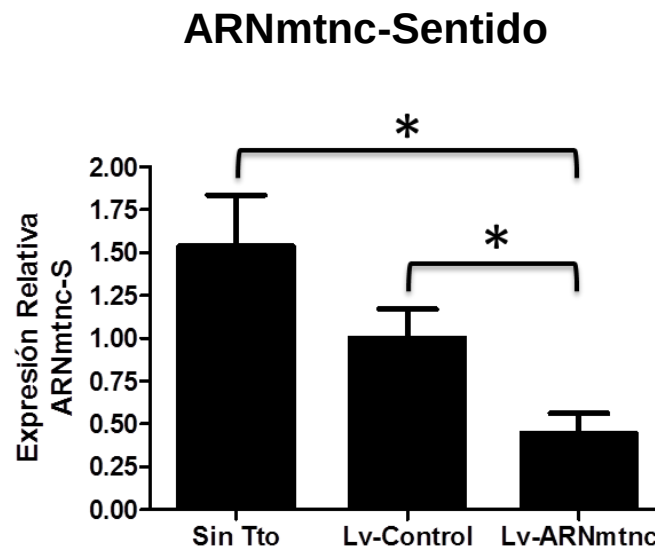


Figura 15: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Sentido, medido por RT-PCR. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=5). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Como referencia se utilizó el ARNm de GAPDH.

ARN mitocondrial no codificante Antisentido 1 (ARNmtnc-AS1)

En el caso de el ARNmtnc-AS1 las células tratadas con Lv-ARNmtnc por 48 h mostraron una disminución significativa del 75% en los niveles del transcrito en comparación con las células tratadas con Lv-Control o las sin tratamiento (Fig. 16).

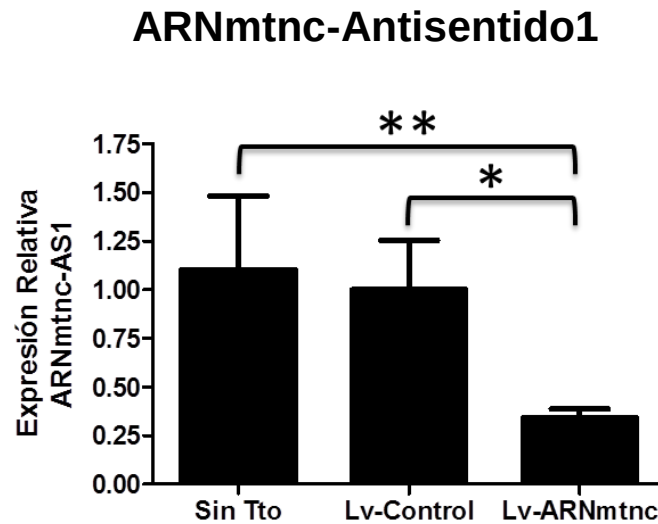


Figura 16: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Antisentido 1, medido por RT-PCR. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=5). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Como referencia se utilizó el ARNm de GAPDH.

ARN mitocondrial no codificante Antisentido 2 (ARNmtnc-AS2)

La interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 mostró una disminución significativa de un 50% en los niveles del ARNmtnc-AS2 en las células tratadas con Lv-ARNmtnc por 48 h, la cual no se observa en las células tratadas con Lv-Control (Fig. 17).

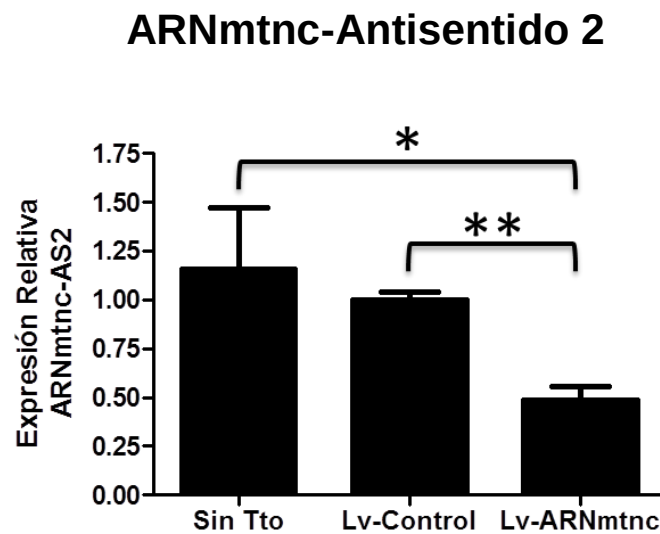


Figura 17: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Antisentido 2, medido por RT-PCR. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=5). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Como referencia se utilizó el ARNm de GAPDH.

ARN mitocondrial no codificante Antisentido 3 (ARNmtnc-AS3)

Los niveles de ARNmtnc-AS3 disminuyeron en un 60% en las células tratadas con Lv-ARNmtnc por 48 h en comparación a las células tratadas con Lv-Control o células sin tratar (Fig. 18).

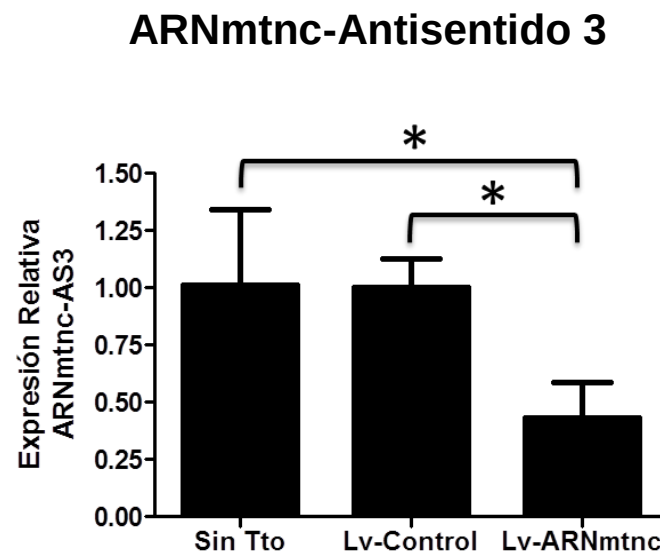


Figura 18: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Antisentido 3, medido por RT-PCR. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=5). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Como referencia se utilizó el ARNm de GAPDH.

1.8 Efecto de la interferencia de los ARNm_{ntnc} sobre la muerte celular mediada por lentivirus en células B16F10.

Como se mencionó en el texto anteriormente Burzio y colaboradores describieron que al realizar interferencia de los ARNm_{ntnc} mediante ODNs en células tumorales se induce la muerte de éstas. Esto fue observado en una primera aproximación midiendo la viabilidad celular donde se evidenció una disminución de ésta en las células tratadas con ODNs dirigidos tanto al ARNm_{ntnc}-S o a los ARNm_{ntnc}-AS. Ahora bien el concepto de muerte celular puede clasificarse en dos tipos, necrosis o apoptosis⁵⁸, y los resultados obtenidos por Burzio y colaboradores (manuscrito en preparación), indican que luego del tratamiento con ODNs anti-ARNm_{ntnc} se induce un desprendimiento de las células de su sustrato en el cultivo celular, se altera la morfología de la membrana plasmática y se induce condensación de la cromatina, sugiriendo que la muerte celular observada podía estar mediada por los clásicos mecanismos de apoptosis. Esto se comprobó mediante una serie de ensayos clásicos, los que permitieron concluir que la muerte celular gatillada por interferencia de los ARNm_{ntnc} ocurre a través de la vía intrínseca de la apoptosis (manuscrito en preparación).

Fue de interés por lo tanto evaluar si la interferencia de los ARNm_{ntnc} mediada por partículas lentivirales produce el mismo efecto que los ODNs sintéticos gatillando hitos específicos de apoptosis.

Dentro de los ensayos de apoptosis mas ampliamente utilizados se encuentran el ensayo de TUNEL (del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling*), el cual se basa en la incorporación dUTPs modificados por la enzima deoxynucleotidil transferasa terminal (TdT) en el extremo 3'-OH del ADN fragmentado, lo cual es una característica distintiva de la apoptosis⁵². Otro de los cambios bioquímicos distintivos del proceso de apoptosis es la pérdida de la asimetría de la membrana celular, donde se produce una traslocación del fosfolípido fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana hacia la cara externa, el cual puede ser medido gracias a la unión de Anexina-V marcada⁵³. Ambas características de la apoptosis fueron utilizadas en nuestros estudios para evaluar si la interferencia de los ARNm_{ntnc} mediada por lentivirus gatilla los mecanismo de apoptosis.

1.8.1 Fragmentación de ADN (TUNEL)

Al analizar la fragmentación de ADN por la técnica de TUNEL se observó un 60% de células positivas a las 48 horas post-transducción de las células infectadas con Lv-ARNm_{ntnc} en comparación a las células transducidas con Lv-Control (Fig. 19).

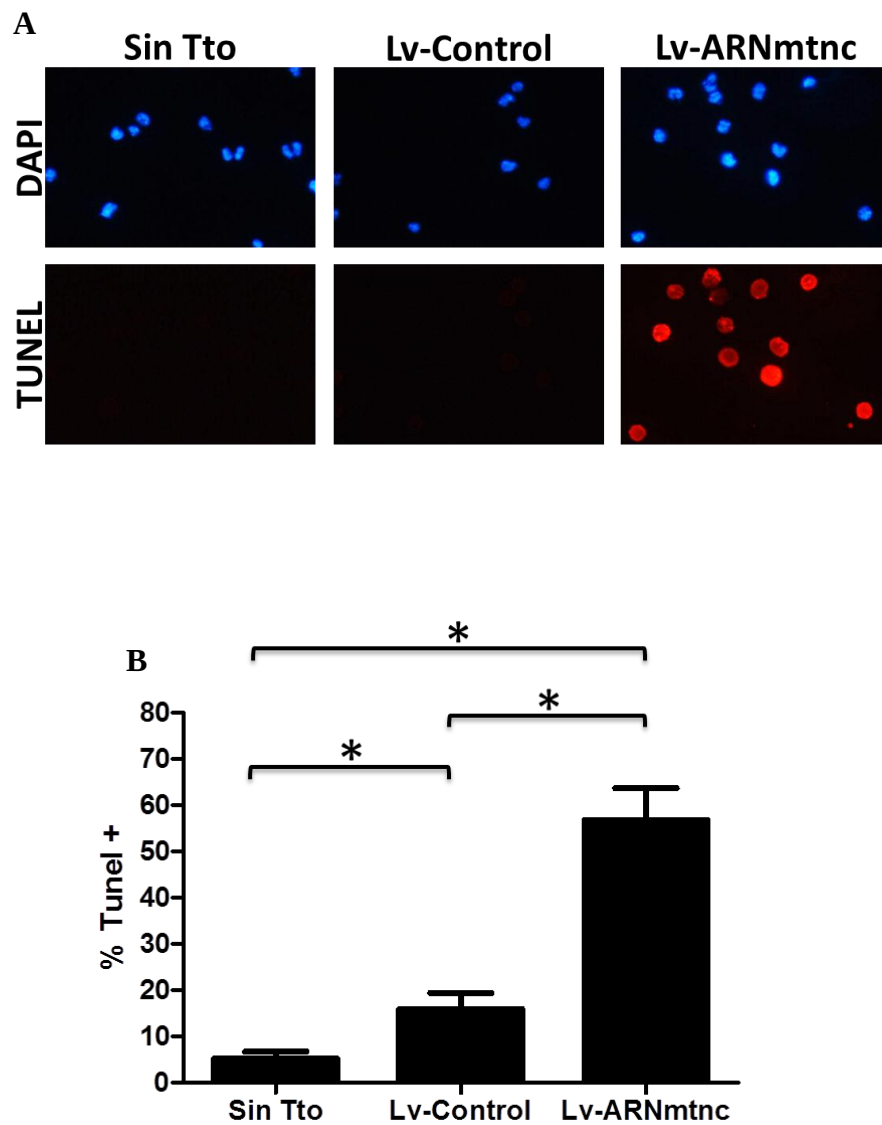


Figura 19: Muerte celular inducida por interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10. A) Fragmentación de ADN medido por la técnica de TUNEL mediante microscopia de fluorescencia. B) Cuantificación de la muerte celular mediante técnica de TUNEL. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=3). * $p < 0,05$.

1.8.2 Traslocación de Fosfatidilserina

La translocación de fosfatidilserina se evaluó como segundo parámetro de apoptosis. Cabe destacar que la técnica utilizada permite evaluar tanto apoptosis temprana (células solo anexina-v positivas) como apoptosis tardía (células anexina-v positivas y ioduro de propidio positivas) gracias a la utilización de ioduro de propidio y anexina. Los resultados indican que las células B16F10 transducidas con Lv-ARNmtnc presentan un 35% de células en apoptosis tardía en comparación con las células tratadas con Lv-Control o las células no tratadas. Además no se observó una gran cantidad de células en apoptosis temprana en los distintos grupos (Fig.20). Si bien la técnica nos permite diferenciar entre apoptosis temprano o tardía, el ensayo realizado no permite elaborar conclusiones ya que éste se realizó a un solo tiempo y por lo tanto no podemos saber ciertamente si las células que fueron transducidas pasaron por un estado de apoptosis temprana para después pasar a un estado de apoptosis tardía.

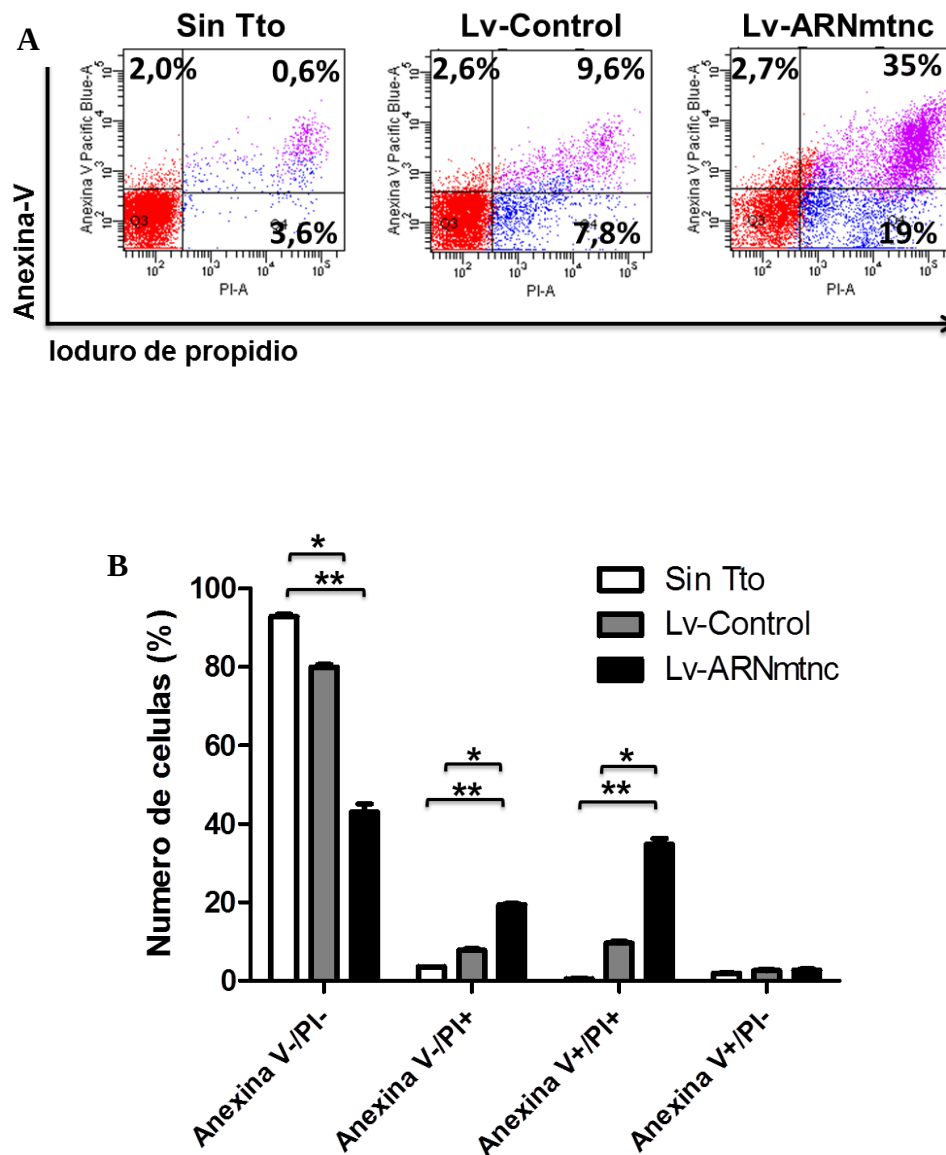


Figura 20: Muerte celular inducida por interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10. A) Traslocación de fosfatidilserina medido por la técnica de Anexina-V mediante citometría de flujo. B) Cuantificación muerte celular mediante técnica de Anexina-V. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=3). * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

2. Diseño y desarrollo de modelos animales tumorales, para su posterior desafío con las partículas lentivirales que expresan el shRNA contra el ARNmtn.

Si bien los ensayos realizados en células de forma *in vitro* nos permiten adquirir conocimientos importantes acerca de distintos procesos biológicos, los experimentos realizados en animales, más del 95% se llevan a cabo en ratones, siguen siendo esenciales para el entendimiento de los complejos procesos fundamentales que ocurren en los seres vivos⁵⁹. En las últimas décadas uno de los procesos a los cuales se les ha dedicado esfuerzo para su entendimiento es la biología del cáncer, donde ha habido un extraordinario incremento en nuestro conocimiento de los procesos moleculares que están involucrados en el desarrollo de este⁶⁰, y los modelos animales nos han proporcionado la capacidad de aprender sobre la biología del tumor, y descubrir mejores métodos para prevenir, diagnosticar y tratar el cáncer. Existen distintos modelos animales tumorales los cuales se pueden clasificar en dos grandes categorías; 1) animales donde los tumores se inducen por acción de agentes químicos, radiactivos, virales o bacterianos, o 2) por modificaciones genéticas (modelo autóctono tumoral), y animales en los cuales se trasplantan las células tumorales (modelo de trasplante tumoral)⁵⁹. Dentro de esta última categoría cabe destacar que el origen de la célula tumoral nos indica que tipo de animal utilizar, y a partir de esta premisa aparecen dos conceptos: 1) singeneicos, donde las células que se trasplantan son de la misma especie o cepa que la del hospedero, y 2) xenogeneicos, donde las células que se trasplantan son de una especie diferente al hospedero⁵⁹. Por ende si se quieren utilizar células tumorales humanas en los estudios se necesita utilizar un modelo animal xenogeneico, y para esto se necesitan animales inmunodeficientes los cuales previenen el rechazo de las células por el animal^{61, 62}. Por la dificultad de mantener este tipo de animales inmunodeficientes, ya que se necesitan salas especialmente equipadas para la mantención de estos, los modelos animales singeneicos nos proveen una herramienta más accesible para realizar estudios *in vivo* ya que se utilizan animales de vivienda habitual, y además existe una amplia gama de células tumorales para el uso en este tipo de animales⁵⁹. Otra ventaja de los modelos singeneicos es que el hospedero es un animal normal con un sistema inmunológico totalmente desarrollado y que por lo tanto lo hace más semejante al escenario presente en pacientes con cáncer. Dentro de estos modelos singeneicos uno de los que ha sido utilizado hace más de medio siglo es el modelo de melanoma murino B16F10 en ratones C57BL6, el cual nos provee un amplio grado de heterogeneidad con respecto a la tasa de crecimiento del tumor⁶³. Usualmente el trasplante de este tipo de células se realiza de forma subcutánea, simulando un modelo ortotópico, lo que nos permite realizar un seguimiento diario del crecimiento tumoral. Modelos

singeneicos permiten además realizar un modelo de metástasis pulmonar experimental por inyección de las células vía intravenosa.⁶³.

2.1. Establecimiento de modelo tumoral subcutáneo mediante células B16F10

Si bien en los últimos años ha habido un aumento del uso de modelos tumorales *in vivo* generados en el órgano de donde proviene la célula (modelo ortotópico), el modelo de generación de tumores subcutáneo es ampliamente utilizado por su ventaja en el seguimiento del crecimiento tumoral, y por ende nos permite la evaluación de terapias en muchos tipos celulares tumorales. La desventaja de este tipo de metodología es que el ensayo puede ser inapropiado para identificar agentes contra blancos celulares moleculares que son solamente expresados cuando el tumor reside en el órgano y no en la piel^{64, 65}. En el caso del modelo de melanoma el órgano en el cual reside el tumor es la piel, por lo que sería un modelo apropiado ya que se estaría formando el tumor en el microambiente propicio para célula. Esta metodología, creada por Fiedler y colaboradores es utilizada desde los años 70 para estudiar la patogénesis de la metástasis de células tumorales^{66, 67}, y sigue siendo usada para probar agentes terapéuticos como por ejemplo el trabajo de Yang y colaboradores publicados en el 2012 donde evalúa la eficiencia terapéutica de un tratamiento combinado de Interleukina 15 (IL-15) con el inductor de apoptosis Caspy2⁶⁸. Para el desarrollo de este modelo primero se evaluó si las células B16F10 tenían la capacidad de formar tumores subcutáneos en ratones C57BL6. Se siguió el protocolo descrito en Materiales y Métodos para la formación de tumores subcutáneos y se observó que al inyectar 10^6 células B16F10 se obtiene un tumor palpable entre los días 4 y 5, el cual posee las características típicas de un tumor subcutáneo del tipo melanoma B16F10, y que al día 7 aproximadamente, alcanza un volumen de $50-100 \text{ mm}^3$ el cual es adecuado y recomendado para el uso en evaluación de tratamientos. Este volumen tumoral se eligió para iniciar los tratamientos vía inyecciones intratumorales, lo cual permite introducir el volumen de la inyección del agente terapéutico dentro del tumor⁶⁹.

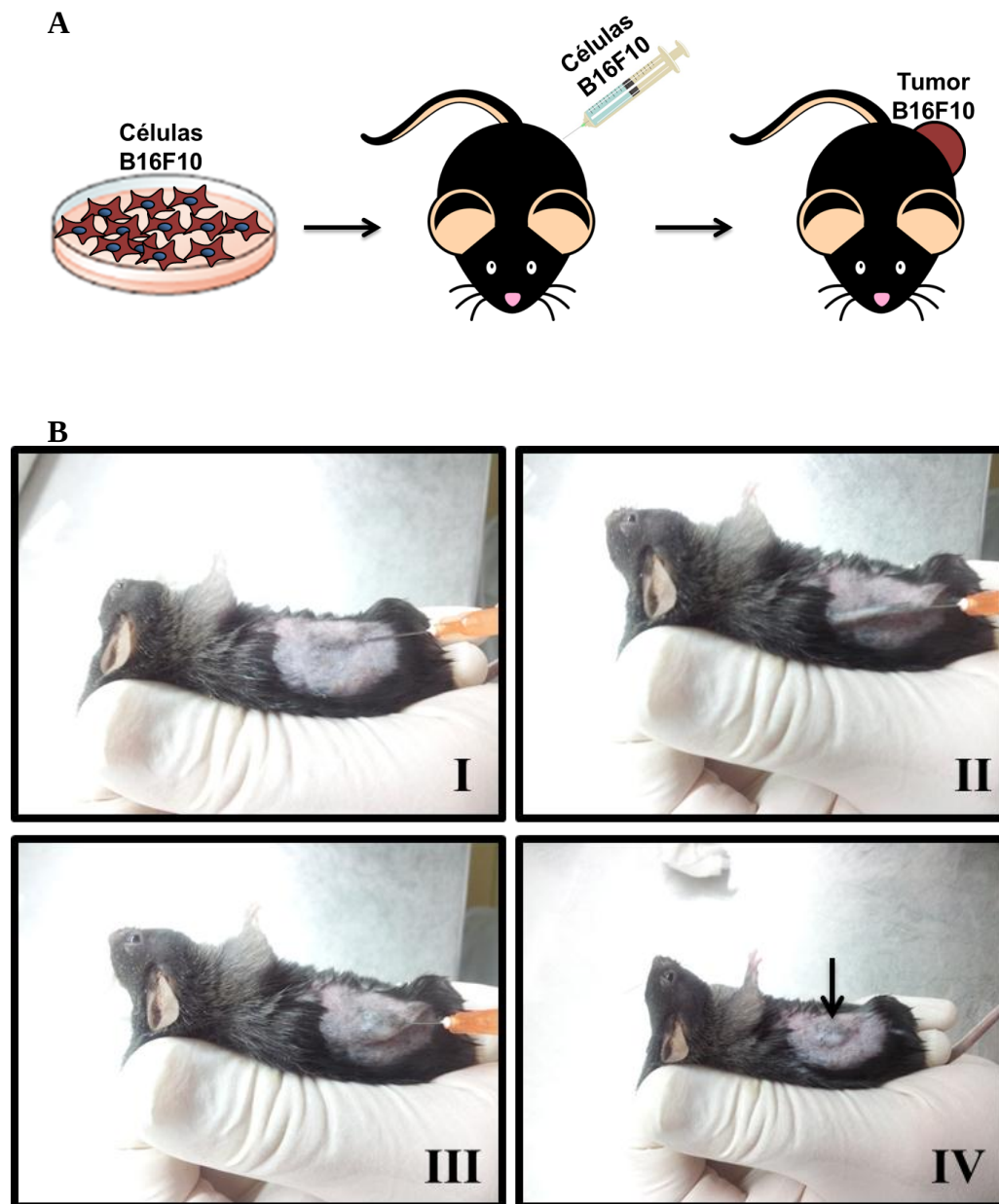


Figura 21: Procedimiento experimental del modelo subcutáneo. A) Esquema modelo subcutáneo. B) Etapas del procedimiento experimental: I-II) Inyección intradérmica de células B16F10, III) Inoculación células B16F10, IV) pápula células tumorales, la flecha muestra el levantamiento de la piel provocado por la inyección de 10^6 células B16F10 en 100 μ l de PBS.

2.2. Establecimiento de modelo tumoral metastásico B16F10

Una de las propiedades que poseen las células cancerígenas es desprenderse del tumor primario y propagarse, generalmente por vía sanguínea o linfática, hacia otros órganos⁷⁰. Este proceso se denomina metástasis y es la principal razón de la alta mortalidad del cáncer⁷¹. Por lo tanto es de suma importancia para el estudio de nuevos tratamientos antitumorales el uso de modelos animales del tipo metastásico. Uno de los sistemas más usado para estudiar las propiedades metastásicas del cáncer son las variantes de células de melanoma B16, y una de las cuales es B16F10, que al ser inyectadas por vía intravenosa en ratones C57BL6 posee la capacidad de alojarse en los pulmones y generar colonias de tumores con una alta sobrevida *in vivo* y un alto potencial de crecimiento⁶⁶. Debido a que las células se alojan en los pulmones, el término metástasis pulmonar es ampliamente utilizado. Otra propiedad interesante de las células B16F10 es que poseen una alta expresión de melanina, un pigmento de color negro que es sintetizado para evitar los efectos deletéreos de la radiación UV^{72,73}, y que permite que el foco metastásico en el pulmón tenga un color negro, permitiendo que los nódulos tumorales pueden ser visualizados y contados fácilmente después de un blanqueamiento de los pulmones extraídos⁷⁴. Un ejemplo del uso del sistema de metástasis B16F10 en la evaluación de tratamientos antitumorales son los estudios realizados por Teng y colaboradores en donde observan que la combinación de anticuerpos monoclonales Anti-IL-23 y IL-2, u otras terapias con anticuerpos, disminuye la metástasis pulmonar experimental⁷⁵.

Por todo lo mencionado anteriormente, y al igual que con el modelo subcutáneo, el modelo de metástasis pulmonar fue elegido como un buen sistema para evaluar la interferencia de los ARNm *in vivo*.

Para implementar el modelo y corroborar la capacidad de las células B16F10 de formar focos metastásicos pulmonares se siguió el protocolo descrito en Materiales y Métodos inyectando 4×10^5 células B16F10 por la vena caudal⁷⁶. Ya que no se puede realizar un seguimiento a la formación de tumores en el pulmón, se evaluó el día óptimo de sacrificio del ratón para el conteo de las metástasis pulmonares. Al analizar ratones sacrificados a distintos días post inyección de las células tumorales se pudo observar que los ratones sacrificados el día 14 post inyección de células presentaban el número óptimo de focos recomendados (menor a 250 focos)⁷⁴.

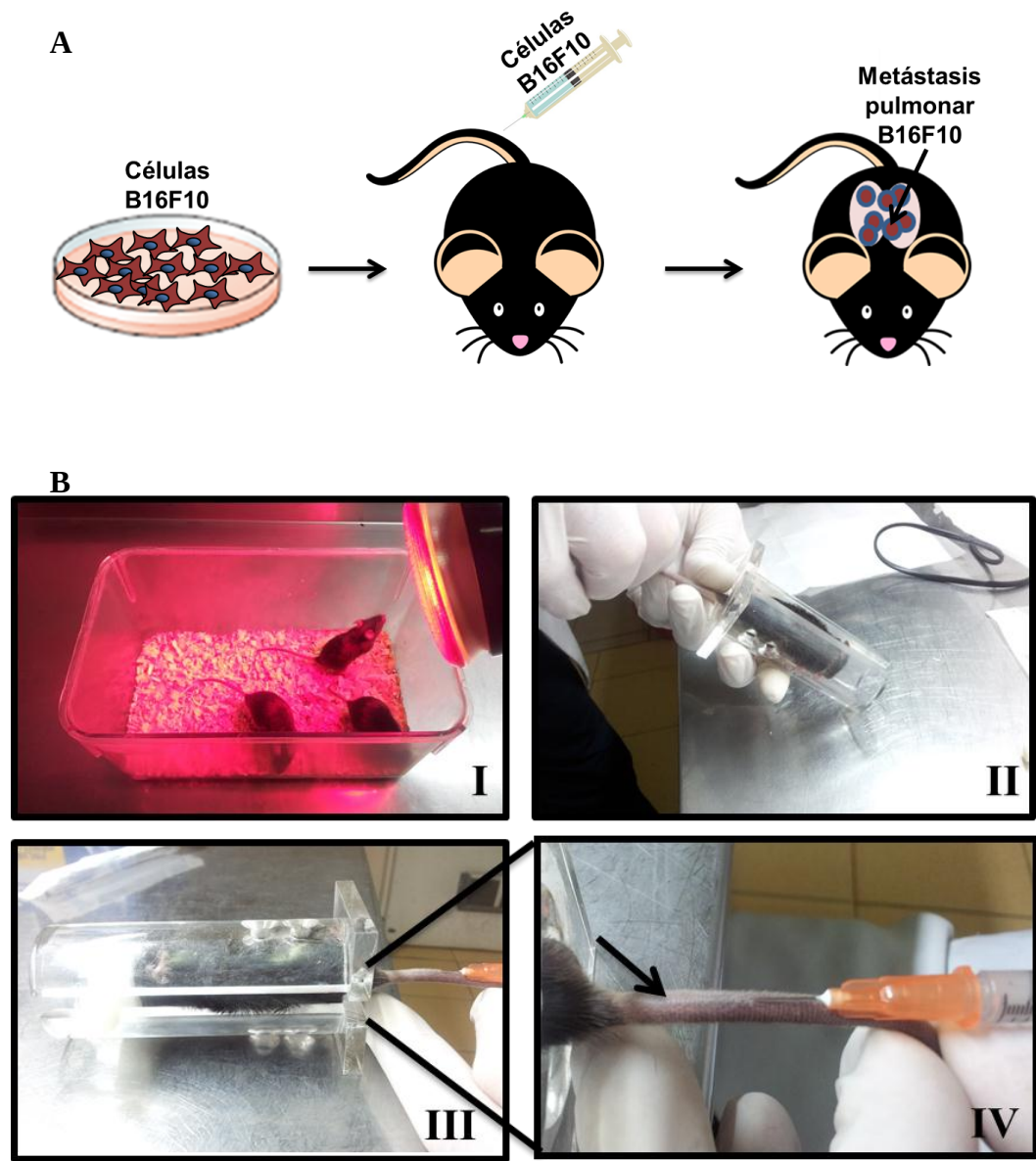


Figura 22: Procedimiento experimental del modelo de metástasis pulmonar. A) Esquema modelo del metástasis pulmonar. B) Etapas procedimiento experimental: I) Dilatación vena caudal, II-III) inmovilización ratón, IV) Inyección intravenosa células B16F10, la flecha muestra la vena donde se realiza la inyección de 4×10^5 células B16F10 en 200 μ l de PBS.

3. Evaluación del efecto del shRNA dirigidos contra el ARNmtnc, mediado por partículas lentivirales, en un modelo tumoral animal.

3.1. Modelo Subcutáneo

3.1.1. Evaluación de la infección de las partículas lentivirales en células B16F10 *in vivo*.

Como se mencionó anteriormente los ensayos realizados en células de forma *in vitro* nos permiten adquirir conocimientos importantes acerca de la biología de células B16F10, pero el comportamiento de estas puede variar en condiciones *in vivo* ya que deben interaccionar con otros tipos celulares y establecerse en otro microambiente totalmente diferente a las condiciones evaluadas *in vitro*. Si bien los resultados anteriores mostraron la capacidad de las partículas lentivirales de transducir las células B16F10, estos ensayos fueron realizados *in vitro*, por lo tanto es necesario evaluar si las partículas lentivirales tienen realmente la capacidad de infectar las células de melanoma murino B16F10 en condiciones *in vivo*. Para esto se utilizaron ratones C57BL6 a los cuales se les indujo un tumor subcutáneo con células B16F10, y una vez que el tumor alcanzó el volumen apropiado (50 a 100 mm³) se le inyectó intra-tumoralmente partículas lentivirales que codifican EGFP. Al cabo de 72 horas post-inyección de las partículas lentivirales se analizaron cortes frescos del tumor mediante microscopia de fluorescencia. Al analizar el tejido tumoral se pudo comprobar la presencia de fluorescencia verde (EGFP) en estos cortes en comparación con el tejido tumoral control, el cual no fue infectado con partículas lentivirales que codifican EGFP, (Fig 23). Este resultado nos indica que las partículas lentivirales infectaron las células B16F10 *in vivo*, las cuales a su vez expresaron EGFP.

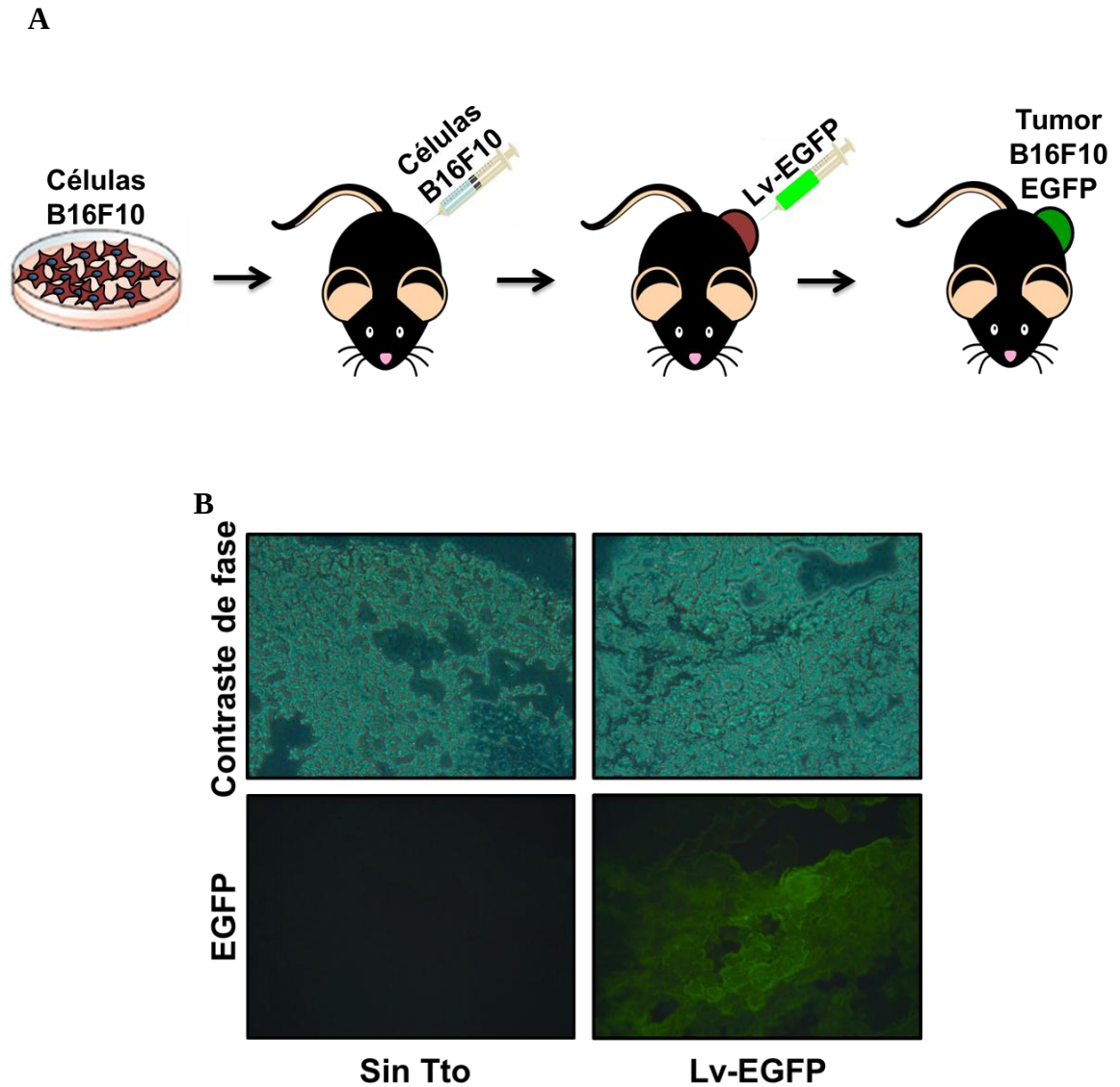


Figura 23: Partículas lentivirales son capaces de infectar células B16F10 *in vivo*. A) Esquema infección intratumoral PLv. B) Corte fresco de tumor subcutáneo de células B16F10 tratado intra-tumoralmente con Lv-EGFP o sin tratamiento (Sin Tto). La expresión de EGFP en los cortes de tumor fue observada mediante microscopía de fluorescencia.

3.1.2. Evaluación de la expresión de los distintos ARNmtnc en células transducidas con partículas lentivirales *in vivo*.

Al igual que en condiciones *in vitro*, se evaluó si la interferencia mediada por lentivirus dirigidos contra los ARNmtnc disminuye la expresión de estos en condiciones *in vivo*. Se utilizó el modelo de tumores subcutáneos de células B16F10 inyectadas intratumoralmente con Lv-Control, o Lv-ARNmtnc, o se dejaron sin tratamiento (Sin Tto). Posterior a la quinta inyección intratumoral, se recuperan los tumores mediante cirugía y se extrajo el ARN total de cada muestra. Los niveles de los ARNmtnc se midieron mediante la técnica de RT-PCR utilizando las condiciones descritas en los ensayos *in vitro*.

ARN mitocondrial no codificantes Sentido (ARNmtnc-S)

Al analizar la expresión relativa del ARNmtnc-S en los tumores subcutáneos tratados con Lv-ARNmtnc se observó una disminución de aproximadamente un 45% los niveles del transcrito, pero esta disminución no fue significativa si la comparamos a los ratones tratados con Lv-Control. Esta diferencia si se hace significativa si comparamos los ratones tratados con Lv-ARNmtnc con los sin tratar la cual es de aproximadamente un 80 % (Fig. 24).

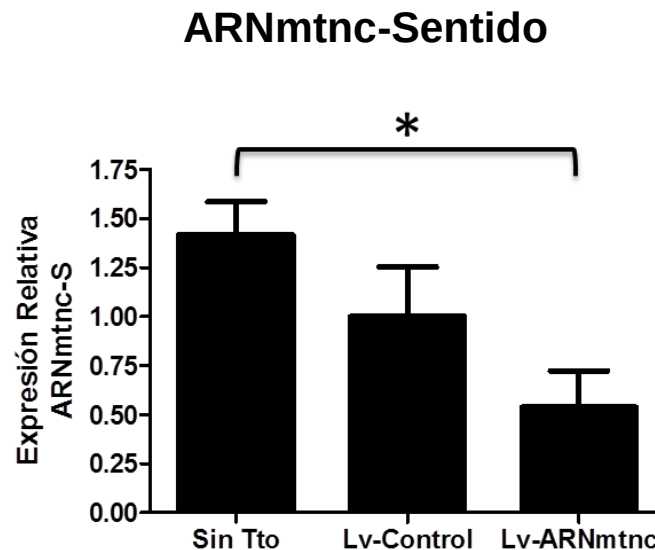


Figura 24: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Sentido, medido por RT-PCR. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=5). * $p < 0,05$. Como referencia se utilizó el ARNm de GAPDH.

ARN mitocondrial no codificantes Antisentido 1 (ARNmtnc-AS1)

Los niveles del ARNmtnc-AS1 disminuyeron significativamente en un 50 % en los tumores de ratones tratados intra-tumoralmente con Lv-ARNmtnc en comparación a los ratones sin tratar. La misma diferencia se observa al comparar los ratones tratados con Lv-ARNmtnc versus los ratones tratados con Lv-Control, pero esta diferencia no es significativa estadísticamente (Fig.25).

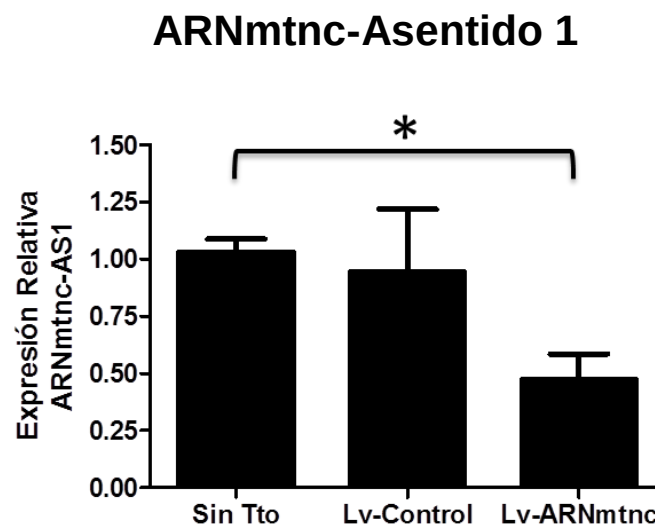


Figura 25: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Antisentido 1, medido por RT-PCR. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=5). * $p < 0,05$. Como referencia se utilizó el ARNm de GAPDH.

ARN mitocondrial no codificantes Antisentido 2 (ARNmtnc-AS2)

En el caso del ARNmtnc-AS2 los ratones tratados de manera intra-tumoral con Lv-ARNmtnc presentan una disminución significativa de un 60% en los niveles de expresión en comparación con los grupos tratados con Lv-Control, y un 80% con el grupo sin tratar (Fig.26).

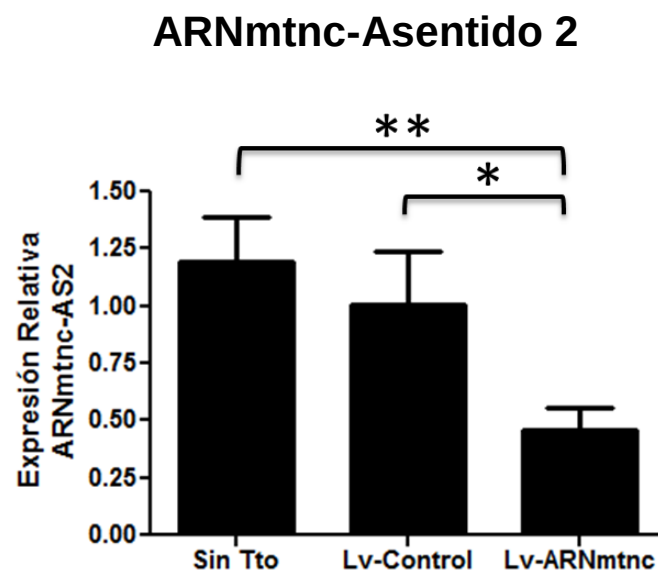


Figura 26: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Antisentido 2, medido por RT-PCR. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=5). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Como referencia se utilizó el ARNm de GAPDH.

ARN mitocondrial no codificantes Antisentido 3 (ARNmtnc-AS3)

La interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en los tumores subcutáneos generados con células B16F10 disminuyeron significativamente en un 70% los niveles de ARNmtnc-AS3 en comparación tanto con los grupos de ratones tratados con Lv-Control como los ratones sin tratar (Fig. 27).

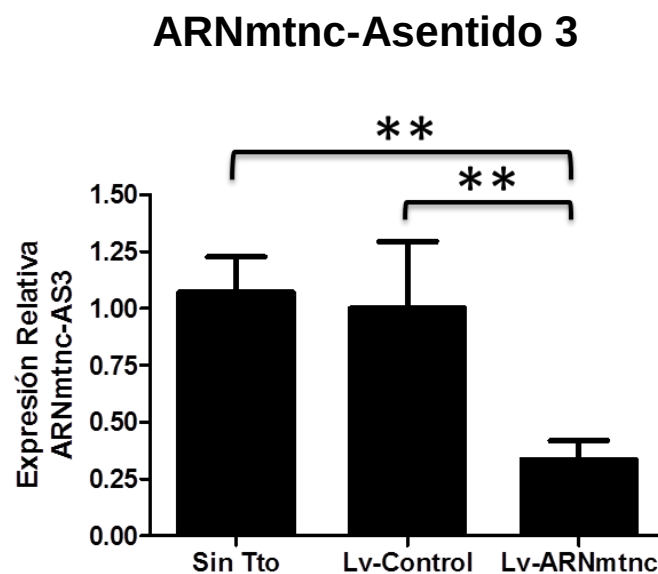


Figura 27: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en células B16F10 en los niveles de expresión relativa del ARNmtnc-Antisentido 3, medido por RT-PCR. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=5). ** $p < 0,01$. Como referencia se utilizó el ARNm de GAPDH.

3.1.3. Determinación del crecimiento tumoral

Para evaluar si la interferencia de los ARNm_{tnc} mediada por lentivirus tiene efectos sobre el crecimiento tumoral ratones fueron inyectados en forma subcutánea con 10^6 células B16F10. A los días 7, 9, 11, 13 y 15 se realizó un tratamiento intratumoral con Lv-Control, Lv-ARN_{tnc}, o con salino. El crecimiento del volumen tumoral de ratones se midió día por medio. Como se observa en la Figura 28, se pudo apreciar una disminución del crecimiento tumoral en los ratones tratados con Lv-ARN_{tnc} en comparación con los grupos controles, la cual fue significativa desde el día 9 post-inyección de las células en adelante. Además se observó una disminución significativa del crecimiento tumoral del grupo Lv-Control con respecto al grupo Sin Tto en los días 15 y 17 post-inyección de las células.

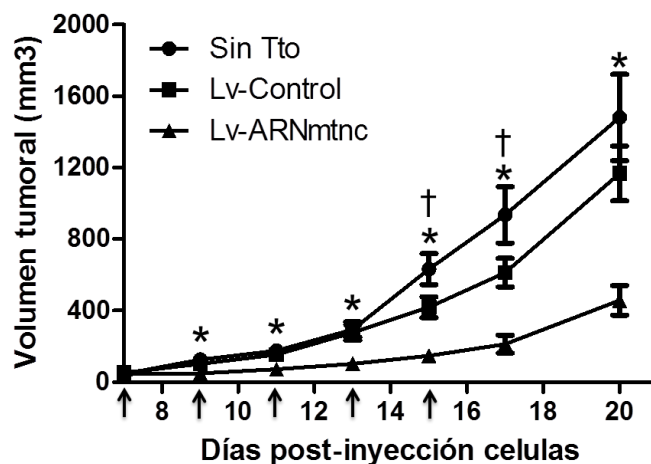


Figura 28: Efecto de la interferencia de los ARNm_{tnc} mediada por lentivirus en el crecimiento de tumores subcutáneos de células B16F10. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=6). * $p < 0,05$ Sin Tto, Lv-Control vs Lv-ARN_{tnc}, † $p < 0,05$ Sin Tto vs Lv-Control. Sin Tto = Sin tratamiento.

3.1.4. Determinación del peso tumoral

Además de evaluar el crecimiento tumoral se determinó el peso tumoral de los distintos grupos al día 15 post inyección de las células y se pudo observar una disminución significativa del peso tumoral en el grupo tratado con Lv-ARNmtnc en comparación con el grupo Lv-Control y al grupo Sin Tto. Cabe destacar que también se observó una disminución del peso tumoral en el grupo Lv-Control en relación al grupo Sin Tto (Fig. 29).

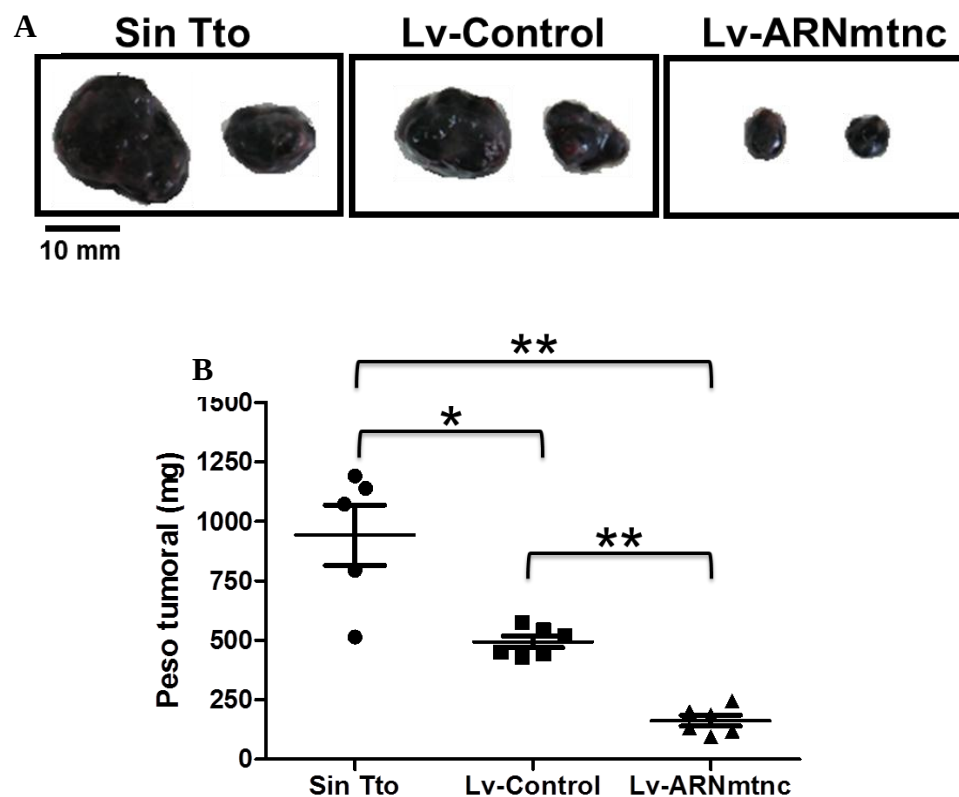


Figura 29: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en el peso de tumores subcutáneos de células B16F10. A) Imagen representativa tumores subcutáneos de los distintos grupos. B) Medición peso tumoral distintos grupos. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=6). * p<0,05, ** p<0,01.

3.2. Modelo Metastásico

3.2.1. Determinación de número de focos metastásicos en pulmón

Como se menciono anteriormente gracias a la proteína melanina expresada por las células de melanoma B16F10 se puede evaluar el número de focos metastásicos en los pulmones por conteo de estos. Al realizar el análisis se pudo observar una disminución significativa de los focos metastásicos pulmonares en los ratones tratados con Lv-ARNmtnc (~100 focos por pulmón) en relación tanto al grupo Lv-Control (~250 focos) como a los ratones no tratados (~300 focos) (Fig.30).

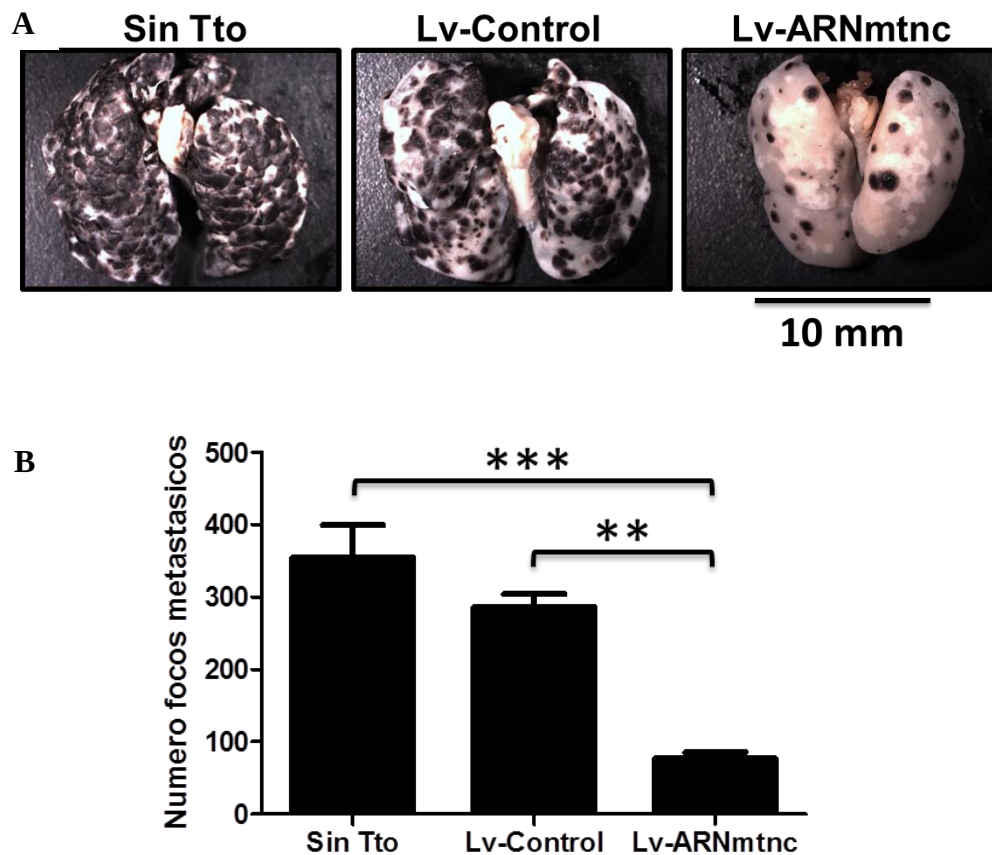


Figura 30: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en el número de focos metastásicos de ratones con metástasis pulmonar de células B16F10. A) Imagen representativa pulmones con metástasis pulmonar en los distintos grupos. B) Cuantificación de focos metastásicos por pulmón. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=8). *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$.

3.2.2. Determinación de peso pulmonar

Otra forma de cuantificar el modelo metastásico en el pulmón es comparar el aumento de peso del órgano. Al comparar el peso pulmonar de los distintos grupos se observó un aumento significativo en el peso del pulmón de los grupos controles en comparación con el grupo tratado con Lv-ARNmtnc (Fig.31). Cabe destacar que los grupos tratados también presentan un aumento significativo del peso pulmonar al ser comparado con el peso pulmonar de ratones sanos (sin inducción de metástasis pulmonar).

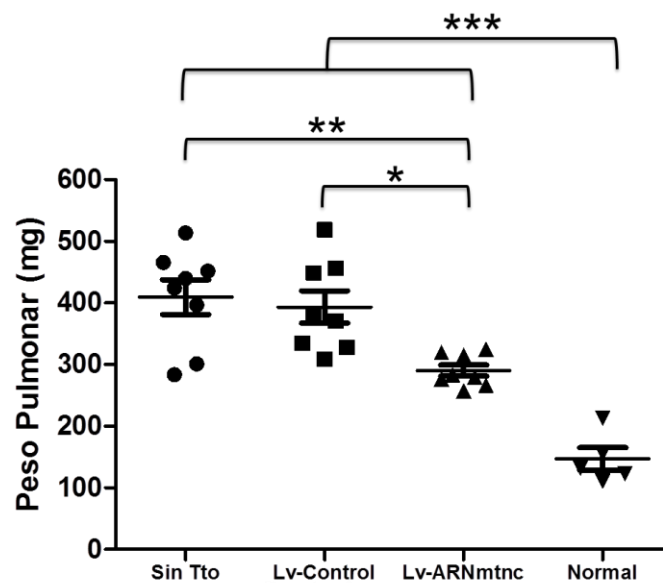


Figura 31: Efecto de la interferencia de los ARNs mitocondriales no codificantes mediada por lentivirus en el peso pulmonar de ratones con metástasis pulmonar de células B16F10. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. (n=8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.2.3. Histología del tejido pulmonar.

Fue de interés analizar a los 14 días post inyección de las células tumorales la estructura interna del pulmón mediante tinciones con hematoxilina-eosina de cortes de tejido pulmonar de los distintos grupos tratados. En la Figura 30 se observa que los grupos tratados con Lv-ARNmtnc presentan una estructura interna similar en el tejido pulmonar comparado con pulmones de ratones sanos, en cambio los pulmones de los grupos tanto Lv-Control como Sin Tto muestran una estructura más compacta con presencia evidente de focos metastásicos como lo muestran las flechas (Fig. 32).

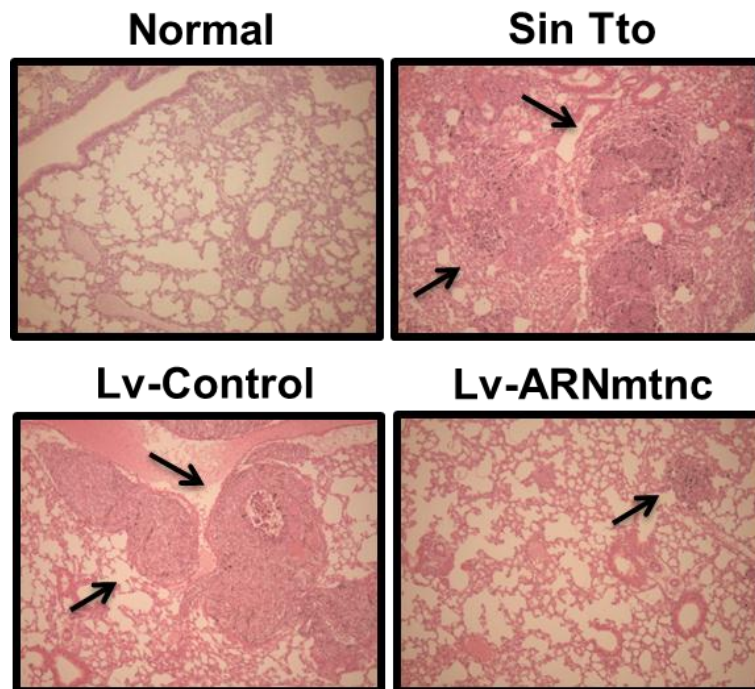


Figura 32: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en la estructura interna de pulmones de ratones con metástasis pulmonar de células B16F10.

3.2.5. Sobrevida

También fue de interés evaluar la sobrevida de los ratones de los distintos grupos. Los resultados indican un aumento significativo de 10 días en la sobrevida ($p=0,031$) de los ratones tratados con Lv-ARNmtnc en comparación a los grupos controles (Fig. 33).

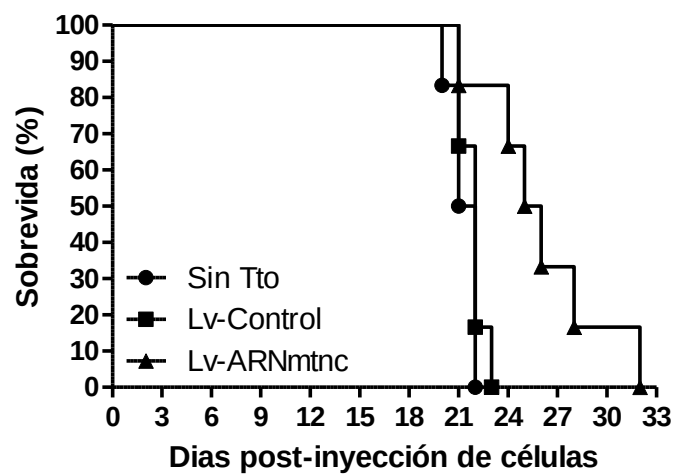


Figura 33: Efecto de la interferencia de los ARNmtnc mediada por lentivirus en la sobrevida de ratones con metástasis pulmonar de células B16F10. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM. ($n=6$). * $p<0,05$.

VI. DISCUSIÓN

Los principales resultados obtenidos en este estudio se pueden resumir de la siguiente manera: 1) Partículas lentivirales desde un MOI de 50 transducen aproximadamente un 50% de células B16F10 *in vitro*. 2) Interferencia dirigida contra los ARNm_{tnc} mediada por partículas lentivirales en células B16F10 *in vitro* disminuyen la expresión de los ARNm_{tnc} induciendo apoptosis evidenciada mediante fragmentación del ADN y translocación de fosfatidilserina. 3) Interferencia dirigida contra los ARNm_{tnc} mediada por partículas lentivirales en modelos animales de tumores subcutáneos disminuyen la expresión de los ARNm_{tnc}, disminuyen el peso de tumores subcutáneos, y disminuyen el crecimiento tumoral de tumores subcutáneos de células B16F10. 4) Interferencia dirigida contra los ARNm_{tnc} mediada por partículas lentivirales en modelos animales de metástasis pulmonar disminuyen los focos metastásicos pulmonares, disminuyen el peso pulmonar, y aumentan la supervivencia de ratones con metástasis pulmonar.

En las páginas siguientes discutiremos los hallazgos encontrados en este estudio, contrastándolos con la información disponible en la literatura cuando corresponda, a la vez que se analizará las principales fortalezas y debilidades de la aproximación metodológica utilizada.

1. Partículas lentivirales

Como ya se mencionó anteriormente, la utilización de partículas lentivirales ha aumentado significativamente en los últimos años gracias a las propiedades, tanto del punto de vista de la gran cantidad de células que son capaces de transducir, como la posibilidad de su utilización *in vivo*. Al analizar el primer punto nosotros observamos que si bien las partículas lentivirales son capaces de transducir una variedad de células, ya sean de ratón como de humano, estas células presentan diferentes índices de transducción al ser desafiadas con un mismo índice de multiplicidad de infección. Este fenómeno se puede deber a la repulsión de cargas que se podrían generar, entre la célula y la partícula viral, debido al ácido siálico que posea la membrana^{49, 77}. El ácido siálico es un monosacárido ácido el cual es un importante componente de las glicoproteínas que componen la membrana plasmática y las regiones ricas en ácido siálico contribuyen a generar un campo de carga negativa en la superficie de la célula⁷⁸. Por ende, si una célula posee más ácido siálico en su membrana esta tendría una capacidad mayor de repeler la partícula lentiviral y así afectar la transducción de esta. Por ejemplo células tumorales metastásicas expresan a menudo una densidad más alta de glicoproteínas ricas en ácido siálico, lo que ayuda a la célula a entrar al torrente sanguíneo⁷⁹. Si observamos nuestros resultados dentro de las células que fueron transducidas las células que

mostraron menos transducción fueron aquellas del tipo tumoral tales como las DU145, H441, y B16F10, lo cual esta de acuerdo con la hipótesis de la repulsión provocada por el ácido siálico.

Dentro de los estudios que se realizaron en esta tesis se utilizó la línea celular de melanoma B16F10, la cual posee la ventaja de ser una línea celular tumoral de ratones C57BL6 y por ende se pueden utilizar para realizar modelos animales sin la necesidad de recurrir a ratones inmunológicamente deprimidos. Al transducir esta línea celular B16F10 a distintos MOI se pudo observar un bajo nivel de transducción posiblemente debido a lo que se discutió anteriormente, sin embargo además se observó que al aumentar el MOI, de 50 hacia arriba, las células alcanzan a un máximo de transducción, aproximadamente un 55%, y presentan efectos citotóxicos a partir de un MOI de 200 o superior (datos no mostrados). En este fenómeno también podría estar involucrado la repulsión de cargas provocada por el ácido siálico, pero ahora provenientes de la alta concentración de partículas lentivirales utilizadas. Ensayos de transducción realizados con polibreno, polímero catiónico usado para incrementar la eficiencia de infección de ciertos retrovirus en cultivo celular neutralizando las cargas entre los viriones y el ácido siálico de la superficie celular, mostraron un aumento en los índices de transducción de células B16F10 en comparación a células en las cuales no se utilizó polibreno (datos no mostrados), de acuerdo con la hipótesis de la participación del ácido siálico en la transducción de las células B16F10. A pesar de la mejora observada en los niveles de transducción al utilizar polibreno, se decidió no usarlo en los experimentos de medición de muerte celular ya que posee características citotóxicas y por lo tanto podría dar falsos positivos en los ensayos.

2. Interferencia de los ARNm^{mtnc}

2.1 Efecto de la interferencia de los ARNm^{mtnc} *in vitro*

Si bien se utilizaron partículas lentivirales para realizar los experimentos que componen esta tesis, este sistema solo se utilizó como una herramienta de entrega de un transgen específico que provocaría eventualmente el efecto a estudiar. En este caso la partícula lentiviral posee la información genética para que la célula transducida por el virus codifique un shRNA dirigido contra los ARNm^{mtnc}, el cual a través del mecanismo de ARN de interferencia provoca la degradación de éste. El modo de acción de los shRNAs está mediado en una primera etapa por el procesamiento por la enzima RNAsaIII DICER para la generación de siRNAs de doble hebra^{27, 80}, y posteriormente una segunda etapa en donde el siRNA se asocia al complejo denominado RISC, donde finaliza el proceso con la degradación del ARNm blanco⁸¹. Los siRNAs fueron las primeras moléculas identificadas que actúan en el mecanismo de ARNi^{82, 83}, y estudios realizado por Siolas y colaboradores demostraron que los siRNAs

provenientes del procesamiento de shRNAs por DICER son más eficientemente incorporados en el complejo RISC en comparación a siRNAs que no provienen del procesamiento de DICER (siRNAs sintéticos por ejemplo)⁸⁴. A diferencia de los estudios realizados por Burzio y colaboradores (manuscrito en preparación) en donde utilizaron monohebras de ODNs sintéticos, los cuales pueden ir dirigidos específicamente al ARNmtnc-S o a los ARNmtnc-AS, el uso de shRNA, como se mencionó anteriormente, genera un siRNA con dos hebras donde una de ellas es la que se utiliza para el reconocimiento del ARNm blanco y su posterior degradación⁸⁵. En el caso de los ARNmtnc, a causa de la complementariedad de secuencia que entre ellos, ambas hebras generadas a partir del siRNA sirven como guías para la degradación de los ARNmtnc, donde una reconocería el ARNmtnc-S y la otra reconocería los ARNmtnc-AS, por lo que ambas hebras podrían tener actividad, lo que concuerda con la literatura⁸⁶. Ahora bien, para que ambas hebras puedan reconocer su blanco deben tener la posibilidad de ser cargadas en el complejo RISC. En un principio se presumía que ambas hebras del duplex siRNA se cargaban con la misma eficacia en RISC, por lo que en nuestro caso existiría la posibilidad de degradar tanto el ARNmtnc-S como los AS con la misma eficiencia, pero se ha demostrado que existen distintas variables las que determinarían cual de las dos hebras será cargada por el complejo⁸⁷. Una clave determinante para que una de las hebras del siRNA sea incorporada en RISC es la baja estabilidad interna del extremo 5' de la hebra complementaria al ARNm blanco provocado por el bajo contenido de G/C de este extremo^{86, 88}. Según esta premisa al realizar el cálculo de la estabilidad interna de ambas hebras de nuestro siRNA dirigido contra el ARNmtnc podemos observar que las dos hebras presentan una estabilidad y un contenido de GC similar, no permitiéndonos predecir cual de las dos hebras estaría cargándose en el complejo RISC, por lo que se necesitan evaluar experimentalmente la baja de ambos blancos. La detección de la degradación del ARN blanco mediante la técnica de RT-PCR es utilizada para ver los efectos del ARNi. Nuestros resultados muestran que la interferencia mediada por los shRNAs dirigidos contra los ARNmtnc degrada tanto el ARNmtnc-S como los ARNmtnc-AS, quedando en evidencia que posiblemente ambas hebras provenientes del siRNA estarían siendo incorporadas en RISC y por ende estarían siendo activas. En el caso que solo una de las hebras provenientes del siRNA fuese funcional nuestros resultados se podrían explicar por la posible generación de fragmentos de doble hebra de ARN similares a siRNAs provenientes de la región doble hebra del ARNmtnc degradado, los cuales serían utilizados por la maquinaria de DICER y RISC para degradar las secuencias complementarias que podrían ser tanto los ARNmtnc-S como los ARNmtnc-AS.

Una de las observaciones realizadas posterior a la degradación de los ARNmtnc mediada por partículas lentivirales está asociada directamente con un incremento significativo de la muerte celular, la cual fue evaluada mediante parámetros clásicos de apoptosis como la fragmentación del ADN y traslocación

de fosfatidilserina. Estos resultados fueron consistentes con los resultados obtenidos anteriormente por Burzio y colaboradores (manuscrito en preparación) en donde observaron la activación de la vía intrínseca de la apoptosis al interferir los ARNm^{nc}-AS con ODNs en distintas líneas de células tumorales, lo que podría sugerir un rol anti-apoptótico del ARNm^{nc}-AS regulando la expresión de genes involucrados en apoptosis. Por ejemplo existen evidencias de ARN^{nc} que tendrían actividad anti-apoptótica, tal como LincRNA (del inglés *Long intergenic non coding RNA*), un ARN^{nc} involucrado en eritropoyesis, y el cual reprime la expresión de Pycard, un gen pro-apoptótico, y al inhibir LincRNA mediante shRNAs se gatilla la apoptosis⁸⁹. Si bien se observa esta relación entre la inhibición de los ARNm^{nc}-AS y activación de la apoptosis en células tumorales, no se observa el mismo fenómeno al utilizar células normales en proliferación, en donde los niveles de ARNm^{nc}-AS son mas elevados que en células tumorales. Esta sobre-expresión del transcrito AS en células normales en proliferación, en comparación a las células tumorales, permitieron plantear la hipótesis de que los ARNm^{nc}-AS podrían estar controlando la proliferación de células normales actuando como supresor de tumores²³. Esta hipótesis es apoyada por estudios que han demostrado que alteraciones en la expresión de ARN^{nc}, tales como miRNAs o LncRNAs, podrían estar promoviendo la formación de tumores por la modulación de genes involucrados en proliferación celular^{90, 91}. Un ejemplo de esto son los resultados reportados por Wang y colaboradores donde observaron que la expresión LncRNA MEG3, un supresor de tumores que juega un rol en el control de la proliferación celular a través de su interacción con p53, se encuentra disminuida en tejido tumoral de cerebro en comparación a tejido normal adyacente, y esta disminución en la expresión de MEG3 contribuye al crecimiento tumoral de gliomas^{92, 93}. Ambas evidencias observadas tanto en nuestros experimentos como en los realizados por Burzio y colaboradores (manuscrito en preparación) sugieren un posible rol dual para los ARNm^{nc}-AS, donde su alta expresión, en células normales en proliferación, les permitiría controlar tanto la proliferación celular como la apoptosis. En cambio al disminuir su expresión en células tumorales se perdería solo el rol de control de la proliferación celular, pero los niveles del transcrito serian suficientes para seguir controlando la apoptosis celular.

3. Efecto de la interferencia de los ARNm^{nc} *in vivo*

Si bien los estudios *in vitro* nos aportan evidencias de que la interferencia de los ARNm^{nc} gatillan apoptosis de las células tumorales nosotros quisimos evaluar su efecto en modelos tumorales *in vivo*. Al analizar los primeros estudios en donde utilizaban lentivirus para realizar la transferencia de algún gen para el tratamiento contra el cáncer observamos que estos no fueron satisfactorios, en gran medida a la baja tasa de transducción del tumor, pero estudios posteriores

demostraron que los lentivirus pseudotipificados con la glicoproteína VSV-G si son capaces de transducir eficientemente células tumorales *in vivo*, y que además tienen una capacidad de transducción mayor que los adenovirus⁹⁴. Al comenzar nuestros estudios no existían reportes de si partículas lentivirales eran capaces de transducir las células de melanoma B16F10 *in vivo*, por lo tanto lo primero fue evaluar si los lentivirus desarrollados en este trabajo tenían la capacidad de infectarlas. Para esto se utilizó el modelo de tumor subcutáneo B16F10, por su accesibilidad para la administración intra-tumoral, y partículas lentivirales que contienen el gen de EGFP. Al analizar cortes frescos de los tumores subcutáneos se observó la expresión de EGFP en las células tumorales transducidas, lo que indica que la capacidad de las partículas lentivirales de infectar las células tumorales *in vivo*, pero más importante aún, al utilizar lentivirus que le permiten a la célula la formación de shRNAs dirigidos contra los ARNm^{tnc} se observa, mediante RT-PCR, una disminución de los transcritos en el tejido tumoral, lo que nos demuestra la eficacia del uso de partículas lentivirales para mediar la interferencia de nuestros blancos en el modelo tumoral *in vivo* de células B16F10. Ahora bien, como se mencionó anteriormente, tanto en los estudios realizados por Burzio y colaboradores como en los nuestros, la interferencia de los ARNm^{tnc} induce apoptosis de células tumorales *in vitro*. Este efecto podría verse reflejado en un sistema *in vivo*, por lo que se planteó que la interferencia de los ARNm^{tnc} mediada por lentivirus en un modelo animal tumoral podría mediar un significativo efecto anti-tumoral, el cual se vería reflejado por la disminución del desarrollo del tumor. En los ratones con tumores B16F10 subcutáneos, los cuales fueron tratados intra-tumoralmente con las Lv-ARNm^{tnc}, se pudo observar una disminución del crecimiento tumoral en comparación a sus respectivos controles, apoyando así nuestra hipótesis del efecto anti-tumoral de la interferencia de los ARNm^{tnc}. Al analizar la curva de crecimiento tumoral se pudo observar un control del crecimiento del tumor aproximadamente hasta el día 17 post-inyección de las células, comenzando a aumentar el tamaño del tumor posterior a este día, y alcanzando los mismos niveles de tamaño que los grupos control pero más tardíamente (datos no mostrados). Esto se puede deber a que el tratamiento con las PLv se realizó solo hasta el día 15 post-inyección de las células y por ende se mantuvo controlado el crecimiento tumoral entre esos días. Además cabe destacar que no hubo regresión completa del tumor ya que probablemente el tratamiento no alcanzó todas las zonas del tumor y por ende esas zonas remanentes que no fueron tratadas siguieron su crecimiento normal en el transcurso del ensayo. Otra observación realizada fue la disminución significativa del crecimiento tumoral del grupo Lv-Control con respecto al grupo Sin Tto en los días 15 y 17 post-inyección de las células, esta pequeña disminución se podría explicar por el pequeño porcentaje de muerte celular inducido por la transducción del Lv-Control observada en los ensayos *in vitro*. Existen evidencias que demuestran una competencia por la salida desde el núcleo hacia el citosol a través de la exportina 5 entre los shRNAs y los

miRNAs, y si existe un desbalance favorable hacia la salida de los shRNAs la célula podría generar toxicidad celular y por ende gatillar su apoptosis⁹⁵. Este efecto podría estar pasando en las células tratadas con el Lv-Control, donde las células que gatillarían su apoptosis pueden haber sido transducidas por un gran cantidad de virus y por ende haber producido altos niveles de shRNA induciendo así su muerte, y este mismo efecto puede estar sucediendo en los experimentos *in vivo* produciendo una disminución del crecimiento tumoral de los ratones tratados con Lv-Control. Otra posible causa de la disminución del crecimiento tumoral en los ratones tratados con Lv-Control puede ser un efecto directo de la partícula lentiviral sobre el crecimiento celular. Resultados preliminares de esta tesis mostraron una disminución de la proliferación en células tratadas con Lv-EGFP en comparación a células sin tratar, esta disminución en la proliferación podría ser la causa de la disminución del crecimiento tumoral *in vivo*.

Por último se evaluó el efecto de la interferencia de los ARNm tnc mediada por lentivirus en un modelo de metástasis pulmonar generado por inyección intravenosa de las células B16F10. A diferencia del modelo subcutáneo en donde se tiene la accesibilidad a la inyección intra-tumoral, el modelo de metástasis pulmonar no posee esta característica por lo que la administración de lentivirus se debe realizar de distintas maneras. Una de las formas de entrega del lentivirus en el pulmón es a través de una administración intranasal (in), la cual es una vía de administración que no necesita entrenamiento por lo que es fácil de montar dentro del laboratorio. La desventaja que nos ofrece es la pérdida de grandes cantidades de virus los cuales quedan tanto en las fosas nasales como en el esófago por ejemplo⁹⁶. Otra forma de administración que provee una entrega directa del lentivirus en el pulmón es la administración intratraqueal (it), la cual nos permitiría una gran llegada de este hacia los focos metastásicos pulmonares⁹⁶. Dentro de esta tesis se planteó el uso de este método y se logro montar la metodología, pero la desventaja con que nos enfrentamos fue la dificultad de entregar continuos tratamientos en días consecutivos sin afectar la vía aérea del ratón lo que nos provoco mortalidad de estos. Por lo tanto se prefirió la inyección del virus por vía intravenosa (iv), que si bien permite la distribución de este en distintos órganos, esta descrito que un porcentaje de las partículas lentivirales inyectadas llegan al pulmón⁹⁷. Los resultados obtenidos utilizando el modelo animal de metástasis pulmonar nos revelaron el mismo efecto antitumoral que se observó en el modelo tumoral subcutáneo, observándose una disminución tanto del peso pulmonar como de los focos metastásicos pulmonares en los ratones tratados con el Lv-ARNmtnc en comparación a los grupos controles. Al realizar análisis histológicos mediante tinción con H-E se pudo observar que la estructura interna que presentaban los pulmones tratados con los Lv-ARNmtnc era similar a la estructura interna de un pulmón de un ratón sano, aunque igual se detectaba la presencia de pequeños focos metastásicos en el tejido. Todos estos eventos fueron directamente relacionados con un aumento de la sobrevivencia de los

ratones tratados con Lv-ARNmtnc, los cuales vivieron aproximadamente 10 días más que los ratones controles.

Todos nuestros datos en conjunto sugieren que la entrega de interferentes dirigidos contra los ARNmtnc representan una promisorio estrategia hacia el desarrollo de una potencial terapia contra el cáncer.

VII. CONCLUSIONES

A modo de conclusión, los principales efectos que tuvo la interferencia mediada por partículas lentivirales de los ARNm_{tn} tanto de forma *in vitro* como *in vivo* pueden resumirse de la siguiente manera: A nivel *in vitro*: 1) Las células de melanoma B16F10 fueron transducidas por partículas lentivirales pseudotipificadas en un porcentaje importante para poder realizar ensayos que dieran cuenta del efecto del transgen incorporado a la célula mediante esta metodología; 2) disminuyó significativamente la expresión de los ARNm_{tn} en las células transducidas con los Lv-ARNm_{tn} 48 horas post-transducción; 3) se gatilla la apoptosis de las células B16F10 post-transducción con Lv-ARNm_{tn}. A nivel *in vivo*: 1) Las PLv son capaces de transducir células de melanoma B16F10; 2) La expresión de los ARNm_{tn} disminuyó significativamente en los tumores subcutáneos tratados con Lv-ARNm_{tn}; 3) El tratamiento intratumoral con Lv-ARNm_{tn} de tumores subcutáneos entre los días 7-15 post-inyección de las células disminuyó de forma significativa el crecimiento tumoral (medido por volumen tumoral y peso tumoral) ; 4) La administración intravenosa entre los días 4-13 de LV-ARNm_{tn} a los ratones que se les indujo metástasis pulmonar disminuyó el número de focos metastásicos, y esta disminución de la metástasis fue asociada a un aumento en la sobrevida de los ratones tratados con Lv-ARNm_{tn}.

Estos estudios son uno de los primeros reportes donde se observa un efecto de la interferencia de los ARNm_{tn} sobre células tumorales de forma *in vivo*, y estos sumados a los hallazgos realizados por el grupo liderado por el Dr. Luis O. Burzio nos dan una potencial herramienta para seguir investigando el rol de estos ARNm_{tn} dentro de la biología del cáncer y así permitir el futuro desarrollo de una posible terapia anti-tumoral.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*; 1410(2):103-23 (1999).
2. Scheffler IE. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion*; 1(1):3-31 (2001).
3. Passarella S, Atlante A, Valenti D, de Bari L. The role of mitochondrial transport in energy metabolism. *Mitochondrion*; 2(5):319-43 (2003).
4. Holden MJ CM. The mitochondrial outer membrane channel, VDAC, is modulated by a soluble protein *FEBS Lett*; 241:105–109 (1988).
5. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*; 88(2):611-38 (2008).
6. Nass S, Nass MM. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *J Cell Biol*; 19:613-29 (1963).
7. Nass MM, Nass S. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol*; 19:593-611 (1963).
8. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*; 290(5806):457-65 (1981).
9. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation. *J Biol Chem*; 268(22):16083-6 (1993).
10. Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain*; 127(Pt 10):2153-72 (2004).
11. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*; 112(4):481-90 (2003).
12. Pozzan T, Magalhaes P, Rizzuto R. The comeback of mitochondria to calcium signalling. *Cell Calcium*; 28(5-6):279-83 (2000).
13. Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol*; 226(2):274-86 (2012).
14. Brown WM, George M, Jr., Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 76(4):1967-71 (1979).
15. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*; 331(6158):717-9 (1988).
16. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*; 123(3191):309-14 (1956).
17. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*; 25(34):4647-62 (2006).
18. Villegas J, Zarraga AM, Muller I, Montecinos L, Werner E, Brito M, et al. A novel chimeric mitochondrial RNA localized in the nucleus of mouse sperm. *DNA Cell Biol*; 19(9):579-88 (2000).

19. Villegas J, Burzio V, Villota C, Landerer E, Martinez R, Santander M, et al. Expression of a novel non-coding mitochondrial RNA in human proliferating cells. *Nucleic Acids Res*; 35(21):7336-47 (2007).
20. Villegas J, Araya P, Bustos-Obregon E, Burzio LO. Localization of the 16S mitochondrial rRNA in the nucleus of mammalian spermatogenic cells. *Mol Hum Reprod*; 8(11):977-83 (2002).
21. Villegas J, Muller I, Arredondo J, Pinto R, Burzio LO. A putative RNA editing from U to C in a mouse mitochondrial transcript. *Nucleic Acids Res*; 30(9):1895-901 (2002).
22. Eddy SR. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet*; 2(12):919-29 (2001).
23. Burzio VA, Villota C, Villegas J, Landerer E, Boccardo E, Villa LL, et al. Expression of a family of noncoding mitochondrial RNAs distinguishes normal from cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106(23):9430-4 (2009).
24. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*; 260(5547):170-3 (1976).
25. Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta*; 1489(1):31-44 (1999).
26. Dean NM, Bennett CF. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene*; 22(56):9087-96 (2003).
27. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 391(6669):806-11 (1998).
28. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*; 457(7228):396-404 (2009).
29. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*; 9(3):347-51 (2003).
30. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*; 457(7228):426-33 (2009).
31. Wu GY, Wu CH. Delivery systems for gene therapy. *Biotherapy*; 3(1):87-95 (1991).
32. Chisholm EJ, Vassaux G, Martin-Duque P, Chevre R, Lambert O, Pitard B, et al. Cancer-specific transgene expression mediated by systemic injection of nanoparticles. *Cancer Res*; 69(6):2655-62 (2009).
33. Nakanishi M. New strategy in gene transfection by cationic transfection lipids with a cationic cholesterol. *Curr Med Chem*; 10(14):1289-96 (2003).
34. Honma K, Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Yamamoto H, Hirai K, et al. Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions. *Biochem Biophys Res Commun*; 289(5):1075-81(2001).

35. Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, et al. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*; 32(13):e109 (2004).
36. Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev*; 61(9):732-45 (2009).
37. Devroe E, Silver PA. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol*; 2:15 (2002).
38. Barton GM, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99(23):14943-5 (2002).
39. Matta H, Hozayev B, Tomar R, Chugh P, Chaudhary PM. Use of lentiviral vectors for delivery of small interfering RNA. *Cancer Biol Ther*; 2(2):206-10 (2003).
40. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93(21):11382-8 (1996).
41. Rutz S, Scheffold A. Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems. *Arthritis Res Ther*; 6(2):78-85 (2004).
42. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90(17):8033-7 (1993).
43. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*; 272(5259):263-7 (1996).
44. Yee JK, Miyanochara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC, Friedmann T. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91(20):9564-8 (1994).
45. Aiken C. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol*; 71(8):5871-7 (1997).
46. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol*; 15(9):871-5 (1997).
47. Matrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther*; 18(3):477-90 (2010).
48. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*; 8(3):173-84 (2007).

49. Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J*; 86(2):1234-42 (2004).
50. Sato A, Ohtsuki M, Hata M, Kobayashi E, Murakami T. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol*; 176(12):7686-94 (2006).
51. Kayaga J, Souberbielle BE, Sheikh N, Morrow WJ, Scott-Taylor T, Vile R, et al. Anti-tumour activity against B16-F10 melanoma with a GM-CSF secreting allogeneic tumour cell vaccine. *Gene Ther*; 6(8):1475-81 (1999).
52. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*; 119(3):493-501 (1992).
53. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*; 84(5):1415-20 (1994).
54. Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*; 33(3):401-6 (2003).
55. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*; 411(6836):494-8 (2001).
56. Couto LB, High KA. Viral vector-mediated RNA interference. *Curr Opin Pharmacol*; 10(5):534-42 (2010).
57. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*; 44(5):619-26 (2008).
58. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, et al. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol*; 21(1):165-70 (2002).
59. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer*; 102(11):1555-77 (2010).
60. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*; 100(1):57-70 (2000).
61. Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Humanized SCID mouse models for biomedical research. *Curr Top Microbiol Immunol*; 324:25-51 (2008).
62. Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc*; 2(2):247-50 (2007).
63. Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Kacprzak G, Adamiak J, Kolodziej J, et al. A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly

- metastatic B16 mouse melanoma. *Anticancer Res*;30(12):4799-803 (2010).
64. Kerbel RS, Cornil I, Theodorescu D. Importance of orthotopic transplantation procedures in assessing the effects of transfected genes on human tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*; 10(3):201-15 (1991).
 65. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev*; 17(3):279-84 (1998).
 66. Fidler IJ, Nicolson GL. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J Natl Cancer Inst*; 57(5):1199-202 (1976).
 67. Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res*; 35(1):218-24 (1975).
 68. Yang Y, Zhang XM, Zhang N, Cheng L, Li C, Zhang S, et al. IL15 combined with Caspy2 provides enhanced therapeutic efficiency against murine malignant neoplasm growth and metastasis. *Cancer Gene Ther*; 9(7):460-7 (2012).
 69. McCray AN, Ugen KE, Muthumani K, Kim JJ, Weiner DB, Heller R. Complete regression of established subcutaneous B16 murine melanoma tumors after delivery of an HIV-1 Vpr-expressing plasmid by in vivo electroporation. *Mol Ther*; 14(5):647-55 (2006).
 70. Fidler IJ. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol*; 242(118):148-9 (1973).
 71. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*; 70(14):5649-69 (2010).
 72. Agar N, Young AR. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutat Res*; 571(1-2):121-32 (2005).
 73. McGinness J, Proctor P. The importance of the fact that melanin is black. *J Theor Biol*; 39(3):677-8 (1973).
 74. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol*; Chapter 20:Unit 20 1 (2001).
 75. Teng MW, von Scheidt B, Duret H, Towne JE, Smyth MJ. Anti-IL-23 monoclonal antibody synergizes in combination with targeted therapies or IL-2 to suppress tumor growth and metastases. *Cancer Res*; 71(6):2077-86 (2012).
 76. Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, et al. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med*; 14(11):1256-63 (2008).
 77. Wallach DF, Kamat VB. The contribution of sialic acid to the surface change of fragments of plasma membrane and endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*; 30(3):660-3 (1966).

78. Shimamura M, Shibuya N, Ito M, Yamagata T. Repulsive contribution of surface sialic acid residues to cell adhesion to substratum. *Biochem Mol Biol Int*; 33(5):871-8 (1994).
79. Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*; 5(7):526-42 (2005).
80. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*; 409(6818):363-6 (2001).
81. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*; 15(2):188-200 (2001).
82. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*; 286(5441):950-2 (1999).
83. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*; 404(6775):293-6 (2000).
84. Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, et al. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol*; 23(2):227-31 (2005).
85. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*; 110(5):563-74 (2002).
86. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*; 115(2):199-208 (2003).
87. Pekarik V. Design of shRNAs for RNAi-A lesson from pre-miRNA processing: possible clinical applications. *Brain Res Bull*; 68(1-2):115-20 (2005).
88. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*; 115(2):209-16 (2003).
89. Hu W, Yuan B, Flygare J, Lodish HF. Long noncoding RNA-mediated anti-apoptotic activity in murine erythroid terminal differentiation. *Genes Dev*; 25(24):2573-8 (2011).
90. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer*; 43(10):1529-44 (2007).
91. Nie L, Wu HJ, Hsu JM, Chang SS, Labaff AM, Li CW, et al. Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. *Am J Transl Res*; 4 (2):127-50 (2012).
92. Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E. MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *Int J Cancer*; 129(4):773-9 (2011).
93. Wang P, Ren Z, Sun P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation. *J Cell Biochem*; 113(6):1868-74 (2012).

94. Pellinen R, Hakkarainen T, Wahlfors T, Tulimaki K, Ketola A, Tenhunen A, et al. Cancer cells as targets for lentivirus-mediated gene transfer and gene therapy. *Int J Oncol*; 25(6):1753-62 (2004).
95. McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Monteys AM, Martins I, et al. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105(15):5868-73 (2008).
96. DuPage M, Dooley AL, Jacks T. Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nat Protoc*; 4(7):1064-72 (2009).
97. Pan D, Gunther R, Duan W, Wendell S, Kaemmerer W, Kafri T, et al. Biodistribution and toxicity studies of VSVG-pseudotyped lentiviral vector after intravenous administration in mice with the observation of in vivo transduction of bone marrow. *Mol Ther*; 6(1):19-29 (2002).

IX. ANEXOS.

Secuencia nucleotídica ARN mitocondrial no codificante Sentido (ARNmtnc-S)

El ARNmtnc-S está compuesto por el ARNr 16S y un invertido repetido de 732 nt el cual forma una doble hebra con parte del ARNr 16S, y una asa de 120 nt.

```
TTTTTGGTAAACAGGCGGGGTTCTTGTTTGCCGAGTTCCTTTTATCTTTTTGGATCTTT
CCTTTAGGCATTCCGGTGTTGGGTAAACAGAGAAGTTATAGGTGGATTATTTATAGTGT
GATTATTGCCTATAGTCTGATTAACATAACAATGGTTATCCGAGTTGTTATACGCGTATG
TCTGGAGAATTGGAATTCTTGTTACTCATACTAACAGTGTTGCATCTATAAAGTTATAG
ATTAACCCAATTTTAAGTTTAGGAAGTTGGTGTAATTATGGAATTAATTGAAATTTTA
TGTTGAGCTTGAACGCTTTCTTTATTGGTGGCTGCTTTTAGGCCTACAATGGTTAAAAG
CTGTTTTGTAAATTATTCATTAATAAGGTTTTTCCGTTCCAGAAGAGCTGTCCCTCT
TTTGGCTATAATCTAACTTACTTTTTGATTTTGTTGTTTTTTTAGCAAGTTTAAAATT
GAACTTAAATTCATTTTTTGGGTAACCAGCTATCACCAAGCTCGTTAGGCTTTTGACCT
CTACCTAAAATCTTCTCACTATTTTGCCACATAGACGAGTTGATTCATAAAATTGTTT
TTAGGTAGCTCGTTTGGTTTCGGGGTTTCTAGCTGTAATTCTTTTAGTTAGAAGTTTTC
TAGTTAGTTCATTATGCAAAAGGTACAAGTTTAATCTTTGCTTGTTCTTACTTTTAAT
TAGTCTTTCATCTTTCCCTTGCGGCACTAATCCTAGCCCTAGCCCTACACAAATATAAT
TATACTATTATATAAATCAAAACATTTATCCTACTAAAAGTATTGGAGAAAGAAATTTCG
TACATCTAGGAGCTATAGAACTAGTACCGCAAGGGAAAGATGAAAGACTAATTAAAAGT
AAGAACAAGCAAAGATTAAACCTTGTACCTTTTGCATAATGAACTAACTAGAAAACCTTC
TAACTAAAAGAATTACAGCTAGAAACCCGAAACCAAACGAGCTACCTAAAACAATTT
TATGAATCAACTCGTCTATGTGGCAAAATAGTGAGAAGATTTTLAGGTAGAGGTCAAAA
GCCTAACGAGCTTGGTGATAGCTGGTTACCCAAAAAATGAATTTAAGTTCAATTTTAAA
CTTGCTAAAAAAACAACAAAATCAAAAAGTAAGTTTAGATTATAGCCAAAAGAGGGACA
GCTCTTCTGGAACGGAAAAAACCTTTAATAGTGAATAATTAACAAAACAGCTTTTAACC
ATTGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCAATAAAGAAAGCGTTCAAGCTCAACATAAAATTTTC
AATTAATTCCATAATTTACACCAACTTCCTAACTTAAAATTGGGTTAATCTATAACTT
TATAGATGCAACACTGTTAGTATGAGTAACAAGAATTCCAATTCTCCAGACATACGCGT
ATAACAACCTCGGATAACCATTTGTTAGTTAATCAGACTATAGGCAATAATCACACTATAA
ATAATCCACCTATAACTTCTCTGTTAACCCAACACCGGAATGCCTAAAGGAAAGATCCA
AAAAGATAAAAGGAACTCGGCAAACAAGAACCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCACCTC
TAGCATTACAAGTATTAGAGGCACTGCCTGCCCAGTGACTAAAGTTTAACGGCCGCGGT
ATCCTGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCTTAAATAGGGACTAGCATGAAC
GGCTAAACGAGGGTCCAAGTGTCTCTTATCTTTAATCAGTGAAATTGACCTTTTCAGTGA
AGAGGCTGAAATATAATAATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTAAATTATATAACTT
ATCTATTTAATTTATTAAACCTAATGGCCCAAAAACCTATAGTATAAGTTTGAAATTTTCG
GTTGGGGTGACCTCGGAGAATAAAAAATCCTCCGAATGATTATAACCTAGACTTACAAG
TCAAAGTAAAATCAACATATCTTATTGACCCAGATATATTTTGATCAACGGACCAAGTT
ACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTATTTAAGAGTTTCATATCGACAATTAGGGTTTACG
ACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGTAGAAGCTATTAATGGTTCGTTTGTT
```

CAACGATTAAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGCAATCCAGGTCGGTTTCTA
TCTATTTACGATTTCTCCCAGTACGAAAGGACAAGAGAAATAGAGCCACCTTACAAATA
AGCGCTCTCAACTTAATTTATGAATAAAATCTAAATAAAATATATACGTACACCC

Secuencia nucleotidica ARN mitocondrial no codificante Antisentido 1 (ARNmtnc-AS1)

El ARNmtnc-AS1 está constituido por la secuencia complementaria al ARNr16S y un invertido repetido de 196 nt lo que permite la generación de una asa de 461 nt.

```
ACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCTTAATTAGGGACTAGCATGAACGGCTAA
ACGAGGGTCCAACGTCTCTTATCTTTAATCAGTGAAATTGACCTTTCAGTGAAGAGGC
TGAAATATAATAATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTAAATTATATAACTTATCTAT
TTAATTTATTAAACCTAATAACCTTCTCTAGGTTAGAGGGTGTACGTATATATTTTATT
TAGATTTTATTCATAAATTAAGTTGAGAGCGCTTATTTGTAAGGTGGCTCTATTTCTCT
TGTCCTTTCGTACTGGGAGAAATCGTAAATAGATAGAAACCGACCTGGATTGCTCCGGT
CTGAACCTCAGATCACGTAGGACTTTAATCGTTGAACAAACGAACCATTAATAGCTTCTA
CACCATTGGGATGTCCTGATCCAACATCGAGGTCGTAAACCCTAATTGTCGATATGAAC
TCTTAAATAGGATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTAACTTGGTCCGTTGATCAAAATATAT
CTGGGTCAATAAGATATGTTGATTTTACTTTGACTTGTAAGTCTAGGTTATAATCATTC
GGAGGATTTTTTATTCTCCGAGGTCACCCCAACCGAAATTTCAAACCTTATACTATAGTT
TTTGGGCCATTAGGTTTAAATAAATTAATAAGATAAGTTATATAATTTAAGCTCCATAGG
GTCTTCTCGTCTTATTATTATATTTTACGCTCTTCACTGAAAGGTCAATTTCACTGATT
AAAGATAAGAGACAGTTGGACCCTCGTTTAGCCGTTTCATGCTAGTCCCTAATTAAGGAA
CAAGTGATTATGCTACCTTTGCACGGTCAGGATACCGCGGCCGTTAACTTTAGTCACT
GGGCAGGCAGTGCCTCTAATACTTGTAATGCTAGAGGTGATGTTTTTGGTAAACAGGCG
GGGTTCTTGTTTGCCGAGTTCCTTTTATCTTTTTTGGATCTTTCCTTTAGGCATTCCGGT
GTTGGGTTAACAGAGAAGTTATAGGTGGATTATTTATAGTGTGATTATTGCCTATAGTC
TGATTAACTAACAATGGTTATCCGAGTTGTTATACGCGTATGCCTGGAGAATTGGAATT
CTTGTTACTCATACTAACAGTGTGTCATCTATAAAGTTATAGATTAACCCAATTTTAAG
TTTAGGAAGTTGGTGTAAATTATGGAATTAATTGAAATTTTATGTTGAGCTTGAACGCT
TTCTTTTATTGGTGGCTGCTTTTAGGCCTACAATGGTTAAAAGCTGTTTTGTTAATTATT
CACTATTAAAGGTTTTTTCCGTTCCAGAAGAGCTGTCCCTCTTTTGGCTATAATCTAAA
CTTACTTTTTTGATTTTGTGTTTTTTTTAGCAAGTTTAAAATTGAACTTAAATTCATTTT
TTGGGTAACCAGCTATCACCAAGCTCGTTAGGCTTTTTCACCTCTACCTAAAAATCTTCT
CACTATTTTGCCACATAGACGAGTTGATTCATAAAATTGTTTTTGGTAGCTCGTTTGG
TTTCGGGGTTTCTAGCTGTAATTCTTTTAGTTAGAAGTTTTCTAGTTAGTTTCATTATGC
AAAAGGTACAAGGTTTAATCTTTGCTTGTTCTTACTTTTAATTAGTCTTTCATCTTTCC
CTTGCGGTACTAGTTCTATAGCTCCTAGATGTACGAATTTCTTTCTCCAATACTTTTAG
TAGGATAAATGTTTTGATTTATATAATAGTATAATTATATTTGTGTAGGGCTAGGGCTA
GGATTAGT
```

Secuencia nucleotidica ARN mitocondrial no codificante Antisentido 2 (ARNmtnc-AS2)

El ARNmtnc-AS2 presenta un invertido repetido de 278 nt que forma una doble hebra con la secuencia complementaria al ARNr 16S y una asa de 374 nt.

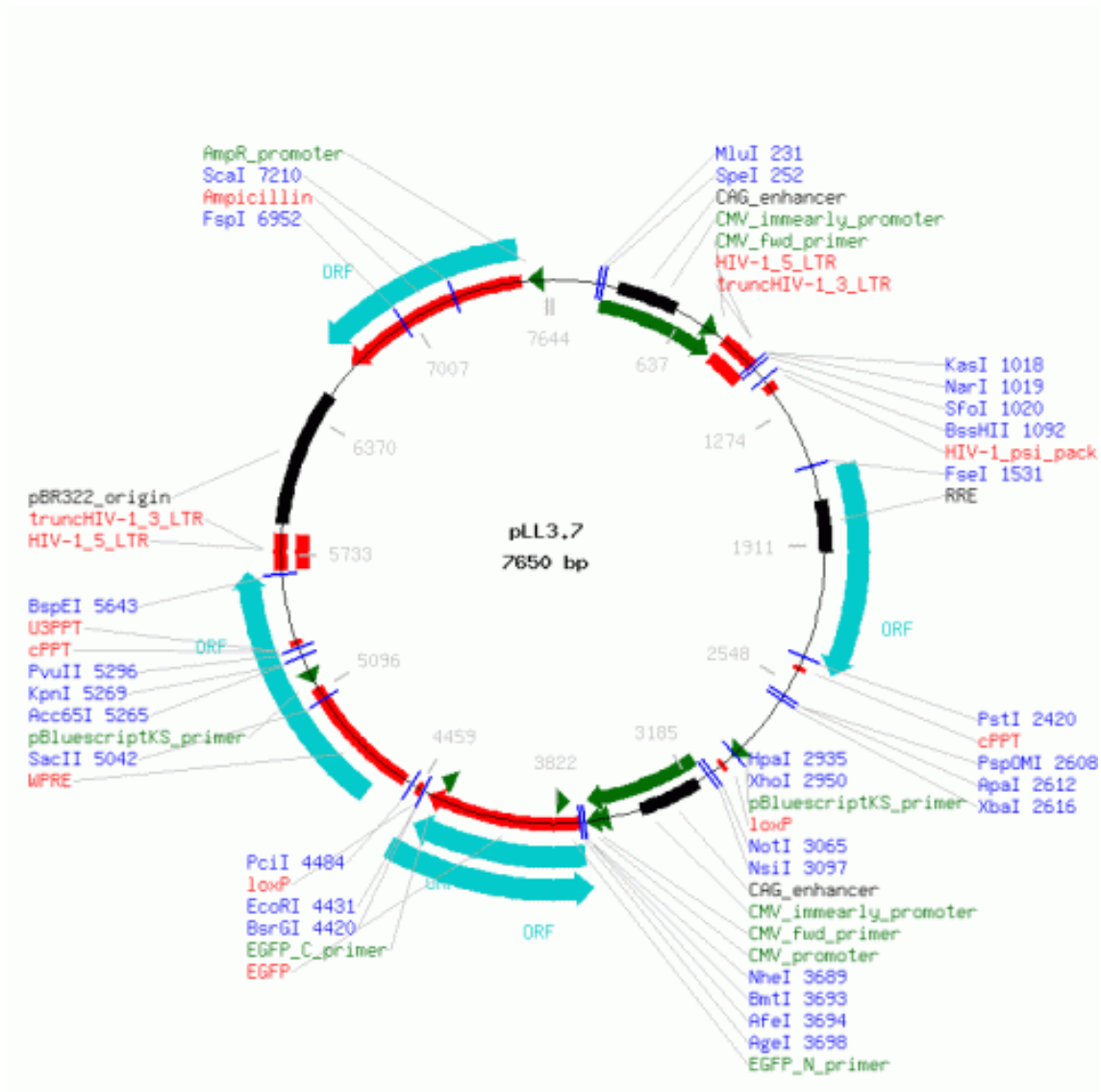
```
ACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCCCTTAATTAGGGACTAGCATGAACGGCTAA
ACGAGGGTCCAACTGTCTCTTATCTTTAATCAGTGAAATTGACCTTTCAGTGAAGAGGC
TGAAATATAATAATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTAAATTATATAACTTATCTAT
TTAATTTTATTAAACCTAATGGCCCAAAAACCTATAGTATAAGTTTGAAATTTTCGGTTGGG
GTGACCTCGGAGAATAAAAAATCCTCCGAATGATTATAACCTTCTCTAGGTTAGAGGGT
GTACGTATATATTTTATTTAGATTTTATTCATAAATTAAGTTGAGAGCGCTTATTTGTA
AGGTGGCTCTATTTCTCTTGTCCTTTCGTACTGGGAGAAATCGTAAATAGATAGAAACC
GACCTGGATTGCTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAGGACTTTAATCGTTGAACAAACG
AACCATTAATAGCTTCTACACCATTTGGGATGTCCTGATCCAACATCGAGGTCGTAAACC
CTAATTGTCGATATGAACTCTTAAATAGGATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTAACTTGGT
CCGTTGATCAAAAATATATCTGGGTCAATAAGATATGTTGATTTTACTTTGACTTGTAAG
TCTAGGTTATAATCATTTCGGAGGATTTTTTATTCTCCGAGGTCACCCCAACCGAAATTT
CAAACCTTATACTATAGTTTTTGGGCCATTAGGTTTAATAAATTAATAGATAAGTTATA
TAATTTAAGCTCCATAGGGTCTTCTCGTCTTATTATTATATTTTCAGCCTCTTCACTGAA
AGGTCAATTTCACTGATTAAAGATAAGAGACAGTTGGACCCTCGTTTAGCCGTTTCATGC
TAGTCCCTAATTAAGGAACAAGTGATTATGCTACCTTTGCACGGTCAGGATACCGCGGC
CGTTAAACTTTAGTCACTGGGCAGGCAGTGCCTCTAATACTTGTAATGCTAGAGGTGAT
GTTTTTGGTAAACAGGCGGGGTTCTTGTTTGCCGAGTTCCTTTTATCTTTTTTGGATCTT
TCCTTTAGGCATTCCGGTGTTGGGTAAACAGAGAAGTTATAGGTGGATTATTTATAGTG
TGATTATTGCCTATAGTCTGATTAACATAAATGGTTATCCGAGTTGTTATACGCGTAT
GCCTGGAGAATTGGAATTCTTGTTACTCATACTAACAGTGTTGCATCTATAAAGTTATA
GATTAACCCAATTTTAAGTTTAGGAAGTTGGTGTAATTATGGAATTAATTGAAATTTT
ATGTTGAGCTTGAACGCTTTCTTTATTGGTGGCTGCTTTTAGGCCTACAATGGTTAAAA
GCTGTTTTGTAAATTATTCACTATTAAAGGTTTTTCCGTTCCAGAAGAGCTGTCCTC
TTTTGGCTATAATCTAACTTACTTTTTGATTTTGTTGTTTTTTTAGCAAGTTTAAAT
TGAACCTAAATTCATTTTTTGGGTAAACCAGCTATCACCAAGCTCGTTAGGCTTTTCACC
TCTACCTAAAAATCTTCTCACTATTTTGCCACATAGACGAGTTGATTCATAAAATTGTT
TTTAGGTAGCTCGTTTGTTTCGGGGTTTCTAGCTGTAATTCTTTTAGTTAGAAGTTTT
CTAGTTAGTTCATTATGCAAAAGGTACAAGGTTAATCTTTGCTTGTTCTTACTTTTAA
TTAGTCTTTTCATCTTTCCCTTGCGGTACTAGTTCATAGCTCCTAGATGTACGAATTTT
TTTCTCCAATACTTTTAGTAGGATAAATGTTTTGATTTATATAATAGTATAATTATATT
TGTGTAGGGCTAGGGCTAGGATTAGT
```

Secuencia nucleotidica ARN mitocondrial no codificante Antisentido 3 (ARNmtnc-AS3)

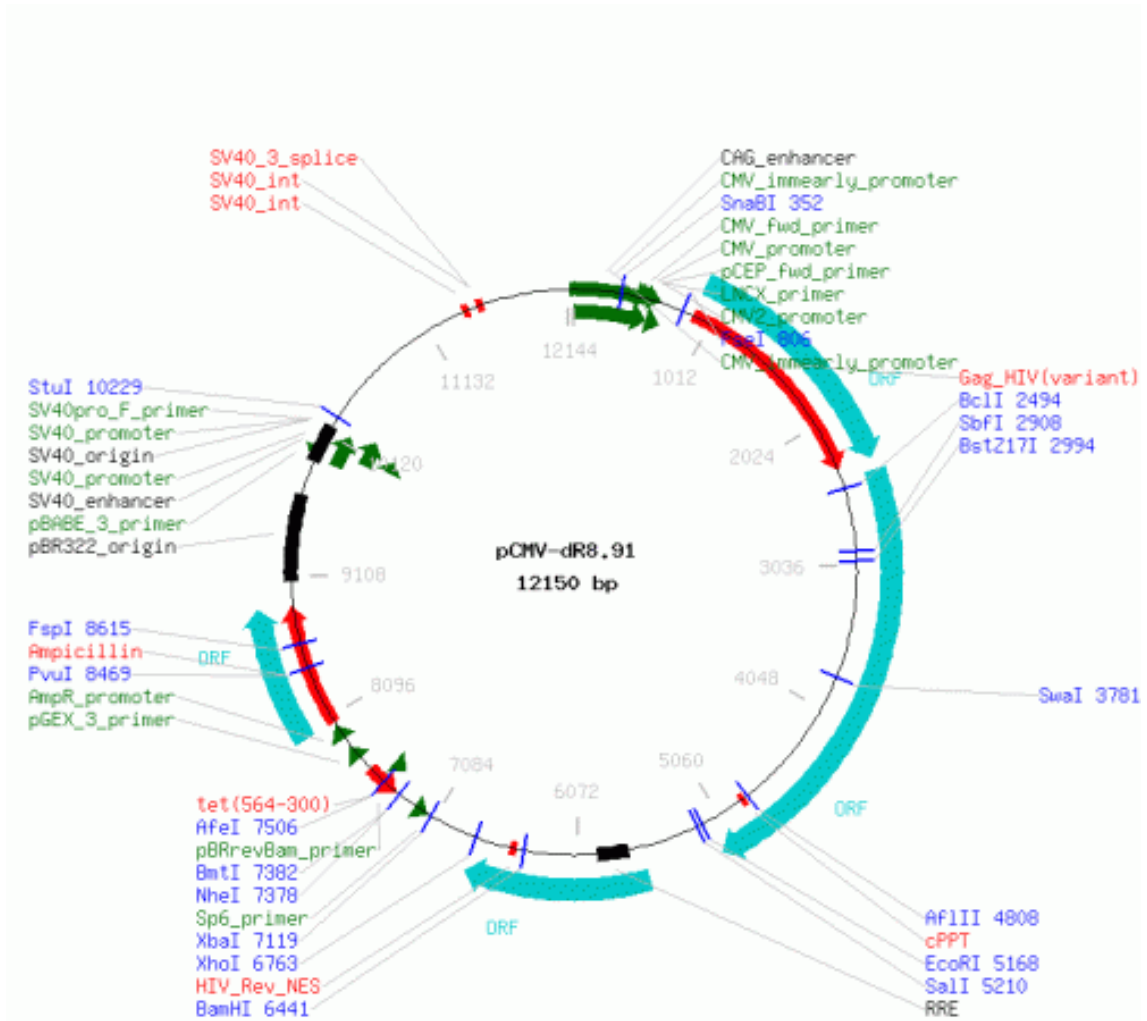
El ARNmtnc-AS3 esta formada principalmente por la secuencia complementaria del ARNr 16S, un invertido repetido de 635 nt, y una pequeña asa de 20 nt.

ACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCTTAATTAGGGACTAGCATGAACGGCTAA
ACGAGGGTCCAACGTCTCTTATCTTTAATCAGTGAAATTGACCTTTCAGTGAAGAGGC
TGAAATATAATAAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTAAATTATATACTTATCTAT
TTAATTTATTAAACCTAATGGCCCAAAAACCTATAGTATAAGTTTGAAATTTTCGGTTGGG
GTGACCTCGGAGAATAAAAAATCCTCCGAATGATTATAACCTAGACTTACAAGTCAAAG
TAAATCAACATATCTTATTGACCCAGATATATTTTGATCAACGGACCAAGTTACCCTA
GGGATAACAGCGCAATCCTATTTAAGAGTTCATATCGACAATTAGGGTTTACGACCTCG
ATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGTAGAAGCTATTAATGGTTCGTTTGTTCACGA
TTAAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGCAATCCAGGTCGGTTTCTATCTATT
TACGATTTCTCCCAGTACGAAAGGACAAGAGAAATAGAGCCACCTTACAAATAAGCGCT
CTCAACTTAATTTATGAATAAAATCTAAATAAAATATATACGTACAACCTTCTCTAGGT
TAGAGGGTGTACGTATATATTTTATTTAGATTTTATTTCATAAATTAAGTTGAGAGCGCT
TATTTGTAAGGTGGCTCTATTTCTCTTGTCTTTCGTAAGGAGAAATCGTAAATAGA
TAGAAACCGACCTGGATTGCTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAGGACTTTAATCGTTG
AACAAACGAACCATTAATAGCTTCTACACCATTTGGGATGTCCTGATCCAACATCGAGGT
CGTAAACCCTAATTGTCGATATGAACTCTTAAATAGGATTGCGCTGTTATCCCTAGGGT
AACTTGGTCCGTTGATCAAAATATATCTGGGTCAATAAGATATGTTGATTTTACTTTGA
CTTGTAAGTCTAGGTTATAATCATTCGGAGGATTTTTTTATTCTCCGAGGTCACCCCAAC
CGAAATTTCAAACCTTATACTATAGTTTTTGGGCCATTAGGTTTAATAAATTAAATAGAT
AAGTTATATAATTTAAGCTCCATAGGGTCTTCTCGTCTTATTATTATATTTTCAGCCTCT
TCACTGAAAGGTCAATTTCACTGATTAAAGATAAGAGACAGTTGGACCTTCGTTTAGCC
GTTTCATGCTAGTCCCTAATTAAGGAACAAGTGATTATGCTACCTTTGCACGGTCAGGAT
ACCGCGGCCGTTAAACTTTAGTCACTGGGCAGGCAGTGCCTCTAATACTTGTAATGCTA
GAGGTGATGTTTTTGGTAAACAGGCGGGTCTTGTGTTGCCGAGTTCCTTTTATCTTTT
TGGATCTTTCCTTTAGGCATTCCGGTGTGGGTAAACAGAGAAGTTATAGGTGGATTAT
TTATAGTGTGATTATTGCCTATAGTCTGATTAACTAACAATGGTTATCCGAGTTGTTAT
ACGCGTATGCCTGGAGAATTGGAATTCTTGTTACTCATACTAACAGTGTTGCATCTATA
AAGTTATAGATTAACCCAATTTTAAGTTTAGGAAGTTGGTGTAAATTATGGAATTAATT
GAAATTTTATGTTGAGCTTGAACGCTTTCTTTATTGGTGGCTGCTTTTAGGCCTACAAT
GGTTAAAAGCTGTTTTGTTAATTATTCATTTAAAGGTTTTTTCCGTTCCAGAAGAGC
TGTCCCTCTTTTGGCTATAATCTAACTTACTTTTTGATTTTGTGTTTTTTTAGCAAG
TTTAAAATTGAACCTAAATTCATTTTTTGGGTAAACAGCTATCACCAAGCTCGTTAGGC
TTTTCACTCTACCTAAAAATCTTCTCACTATTTTGCCACATAGACGAGTTGATTTCATA
AAATTGTTTTTAGGTAGCTCGTTTGGTTTCGGGGTTTCTAGCTGTAATCTTTTAGTTA
GAAGTTTTCTAGTTAGTTCATTATGCAAAAGGTACAAGTTTAATCTTTGCTTGTTCTT
ACTTTTAATTAGTCTTTCATCTTTCCTTGCGGTACTAGTTCTATAGCTCCTAGATGTA
CGAATTTCTTTCTCCAATACTTTTAGTAGGATAAATGTTTTGATTTATATAATAGTATA
ATTATATTTGTGTAGGGCTAGGGCTAGGATTAGT

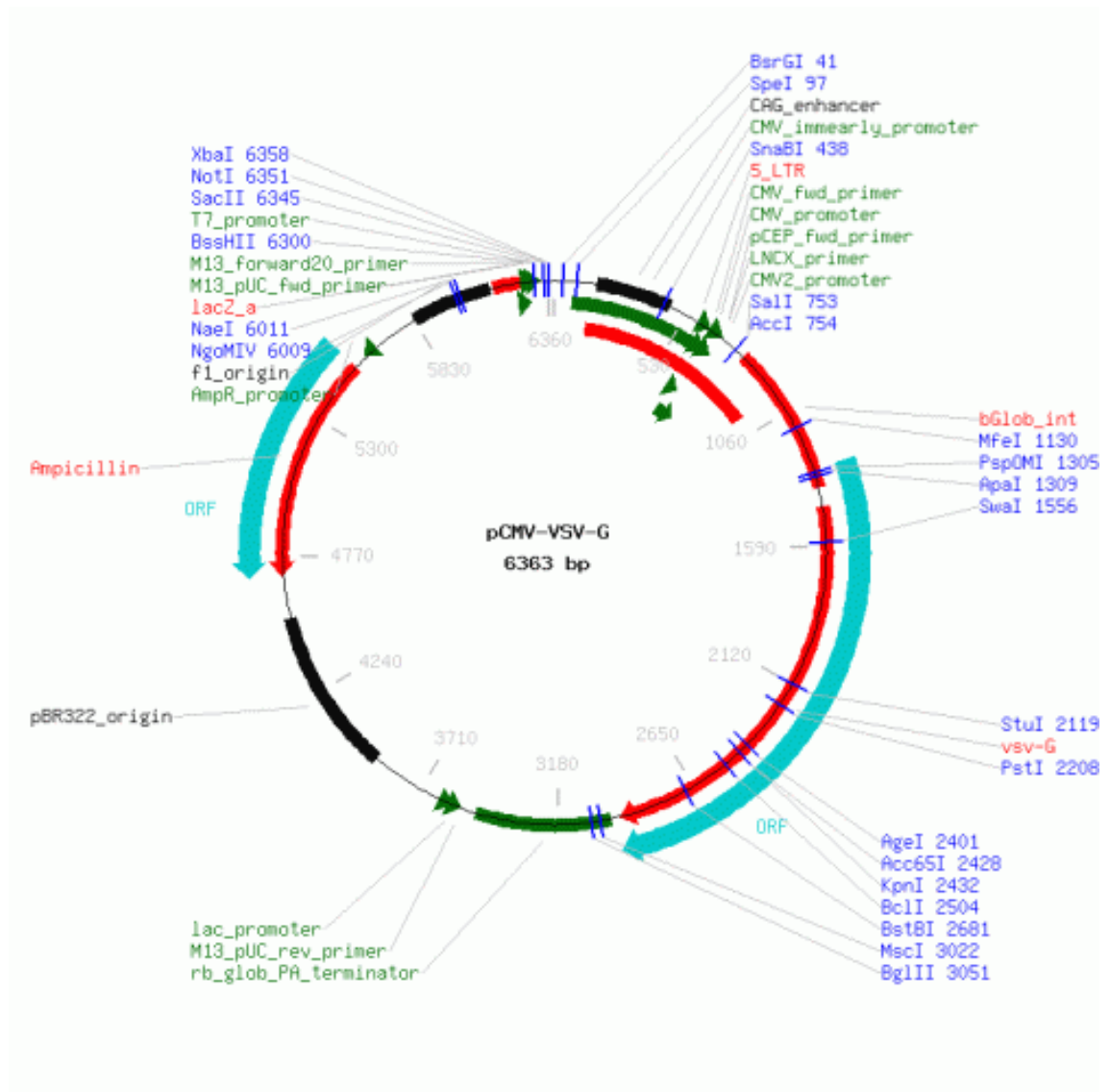
Mapa de la estructura del plasmidio pLL3.7



Mapa de la estructura del plasmidio pCMV-dR8.91



Mapa de la estructura del plasmidio pCMV-VSV-G



X. Productividad científica en el periodo de tesis.

Presentaciones a congresos

Nacionales

Manuel Varas, Alvaro Lladser, Nicole Farfán, Pablo D.T. Valenzuela, Luis O. Burzio. **A lentivirus encoding RNAi targeting a non-coding mitochondrial RNA inhibits melanoma tumor growth and metastasis in a mouse model *in vivo***. XXV Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology. Puerto Varas, Chile. Noviembre 2011.

Manuel Varas, Alvaro Lladser, Nicole Farfán, Pablo D.T. Valenzuela, Luis O. Burzio. **A lentivirus-encoding RNAi targeting a non-coding mitochondrial RNA inhibits melanoma tumor growth and metastasis in a mouse model *in vivo***. Internacional Meeting Science and Friendship VII. Santiago, Chile. Octubre 2011.

Nicole Rojas-Colonelli, Jonathan Roco, Andrés Herrada, Octavio Aravena, **Manuel Varas**, Alvaro Lladser. **Developing an RNAi-Based Genetic Adjuvant Silencing STAT3 that Counteracts Tumor- Associated Tolerance**. XXV Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology. Puerto Varas, Chile. Noviembre 2011.

Nicole Rojas-Colonelli, Jonathan Roco, Andrés Herrada, Octavio Aravena, **Manuel Varas**, Alvaro Lladser. **Developing an RNAi-Based Genetic Adjuvant Silencing STAT3 that Counteracts Tumor- Associated Tolerance**. Internacional Meeting Science and Friendship VII. Santiago, Chile. Octubre 2011.

America Campos, **Manuel Varas**, Luis O. Burzio, Claudio Villota. **Regulation of non-coding mitochondrial RNA by a High Risk Human Papilloma Virus (HPV) protein**. XXXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Valdivia, Chile. Septiembre 2011.

Manuel Varas, Pablo D.T. Valenzuela, Luis O. Burzio. **A lentivirus encoding RNAi targeting a non-coding mitochondrial RNA inhibits melanoma tumor growth and metastasis in a mouse model *in vivo***. XXIV Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology. Pucon, Chile. Noviembre 2010.

Manuel Varas, Pablo D.T. Valenzuela, Luis O. Burzio. **Lentivirus-encoding shRNA interference targeting a noncoding mitochondrial RNA induce death in cancer cell *in vitro***. Internacional Meeting Science and Friendship VI. Santiago, Chile. Noviembre 2010.

America Campos, **Manuel Varas**, Luis O. Burzio, Claudio Villota. **ARNs mitocondriales: Un nuevo blanco de oncoproteínas del virus del papiloma humano**. XXXIII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Chillan, Chile. Septiembre-Octubre 2010.

Manuel Varas, Pablo D.T. Valenzuela, Luis O. Burzio. **Lentivirus mediated shRNA interference targeting noncoding mitochondrial RNA induce death cell in tumor cell**. Internacional Meeting Science and Friendship V. Santiago, Chile. Octubre 2009.

Internacionales

Manuel Varas, Alvaro Lladser, Nicole Farfan, Pablo D.T. Valenzuela, Luis O. Burzio. **A lentivirus-encoding shRNA targeting a noncoding mitochondrial RNA inhibits melanoma tumor growth and metastasis in a mouse model *in vivo***. AACR-NCI-EORTC Internacional Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics. San Francisco, CA. Noviembre 2011.

Claudio Villota, America Campos, **Manuel Varas**, Enrique Boccardo, Luisa Villa, Luis O. Burzio. **Modulation of mitochondrial ncRNA expression by HPV proteins**. 27 International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. Berlin, Alemania. Septiembre 2011.

Publicaciones en preparación

- **Manuel Varas**, Alvaro Lladser, Nicole Farfán, Pablo D.T. Valenzuela and Luis O. Burzio: **A lentivirus encoding shRNA targeting a mitochondrial ncRNAs inhibits melanoma tumor growth and metastasis in a mouse model *in vivo***.

Publicaciones aceptadas

- Claudio Villota, America Campos, Soledad Vidaurre, Luciana Oliveira-Cruz, Enrique Boccardo, Verónica A. Burzio, **Manuel Varas**, Jaime Villegas, Luisa L. Villa, Pablo Valenzuela, Miguel Socías, Sally Roberts and Luis O. Burzio: **Expression of mitochondrial ncRNAs is modulated by high risk HPV oncogenes**. J. Bio. Chem. 15;287 (25), 2012 Jun.