

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO  
NATURAL**



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACION

# ***INTERNALIZACIÓN Y TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE COMO VEHÍCULO DE CRISPR EN LÍNEAS TUMORALES DE CÁNCER DE MAMA***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**ALUMNO:** Jorge González Garrido

**TUTORA:** Dra. María Adelaida García Gimeno

**TUTORA EXTERNA:** Dra. María del Mar Orzáez Calatayud

**TUTORA EXPERIMENTAL:** Gema Vivo Llorca

***Curso Académico:*** 2017-2018

**VALENCIA, 31 de julio de 2018**

**TÍTULO:** Internalización y toxicidad de nanopartículas de sílice como vehículo de CRISPR en líneas tumorales de cáncer de mama.

## RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más diagnosticado en mujeres y supone su segunda causa de mortalidad. Los tumores de mama triple negativo (TNBC) son aquellos que carecen de expresión para los tres marcadores empleados en diagnóstico: los niveles de expresión de los receptores endocrinos para estrógeno (ER) y progesterona (PgR) y la amplificación de HER2/Neu. Para este tipo tumoral no se dispone de tratamiento específico, por lo que las pacientes presentan una baja tasa de supervivencia. El tratamiento actual se basa en el uso de agentes quimioterapéuticos convencionales. Sin embargo, la resistencia a los fármacos supone un grave perjuicio en los pacientes con TNBC.

La evasión de la apoptosis es una de las características principales del cáncer. Uno de los mecanismos que permiten a la célula tumoral evadir la apoptosis es la alteración en la regulación de la familia de proteínas BCL-2. De hecho, algunos inhibidores de esta familia de proteínas se encuentran actualmente en ensayos clínicos para su uso en cáncer de mama. La molécula ABT-263, también conocida como navitoclax, es capaz de inhibir la interacción entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas pertenecientes a esta familia, induciendo muerte celular. No obstante, ya se ha demostrado que las células sometidas a tratamientos continuos con esta droga desarrollan resistencias ligadas a la sobreexpresión de la proteína Mcl-1, un miembro de la familia antiapoptótica con el que esta droga no interacciona. El sistema CRISPR/Cas9 es una técnica de edición génica basada en la rotura de la doble cadena de DNA, mediada por la nucleasa *Cas9*. La hipótesis de este trabajo sostiene que la edición génica de Mcl-1 permitirá la sensibilización de las células resistentes a navitoclax. Para la liberación conjunta del sistema CRIPR/Cas9 y la droga navitoclax se utilizarán nanopartículas de sílice mesoporosas. Las propiedades de estas nanopartículas explican su gran capacidad de carga y la posibilidad de ser dirigidas a los tejidos con interés terapéutico, evitando la liberación prematura del cargo. Además, su gran estabilidad las hace transportadores ideales para moléculas sensibles como el DNA.

Los principales objetivos de este trabajo son la evaluación de la biocompatibilidad y la internalización de las nanopartículas de sílice, como vehículo para el sistema CRISPR/Cas9, en líneas tumorales de cáncer de mama triple negativo.

## PALABRAS CLAVE

- Nanopartículas de sílice
- CRISPR
- Cáncer de mama
- Triple negativo

## SUMMARY

Breast cancer is the most diagnosed type of cancer in women and its second cause of mortality. Triple negative breast cancers (TNBC) lack the expression of the three markers used in diagnosis: the levels of expression of the endocrine receptors for estrogen (ER) and progesterone (PgR) and the amplification of HER2 / Neu. For this tumor type, no specific treatment is available, therefore, patients present a low survival rate. Current treatment is based on conventional chemotherapeutic agents. However, drug resistance is a serious detriment in TNBC patients.

Evasion of apoptosis is one of the hallmarks of cancer. One of the mechanisms that allow the tumor cell to evade apoptosis is the alteration in the regulation of the BCL-2 family of proteins. In fact, some inhibitors for such family are at present in clinical trials for its use in breast cancer. The molecule ABT-263, also known as navitoclax, can inhibit the interaction between the proapoptotic and antiapoptotic proteins belonging to this family, inducing cell death. Nevertheless, it has been shown that cells under frequent treatments with such drug develop resistances linked to the upregulation of Mcl-1 protein, one of the antiapoptotic members, unable to interact with the drug. CRISPR/Cas9 system is a genomic edition technique based on DNA double-stranded breaks, mediated by *Cas9* nuclease. The project hypothesis supports that genomic edition of Mcl-1 protein will allow the sensitization of the navitoclax resistant cells. For the combined release of both CRISPR/Cas9 system and navitoclax mesoporous silica nanoparticles would be used. The properties of such nanoparticles explain their high loading capacity and the possibility of being targeted to the tissues of therapeutic interest, while avoiding the premature cargo release. Moreover, its high stability makes them an excellent carrier for soft molecules, such as DNA.

The main objectives of this project are the assessment of the biocompatibility and internalization of the mesoporous silica nanoparticles, as CRISPR/Cas9 nanocarriers, in triple negative breast cancer.

## KEYWORDS

- Silica nanoparticles
- CRISPR
- Breast cancer
- Triple negative

**ALUMNO:** Jorge González Garrido

**LOCALIDAD Y FECHA:** Valencia, a 31 de julio de 2018

**TUTORA:** Dra. María Adelaida García Gimeno

**TUTORA EXTERNA:** Dra. María del Mar Orzáez Calatayud

**TUTORA EXPERIMENTAL:** Gema Vivo Llorca

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	Cáncer de mama	1
1.2	El rol de la familia de proteínas BCL-2 en la apoptosis	2
1.2.1	La familia de proteínas BCL-2	2
1.2.2	Navitoclax: mecanismo de acción y resistencia al fármaco	4
1.2.3	Inhibidor de Mcl-1: S63845	4
1.2.4	El sistema CRISPR/Cas9	5
1.2.5	CRISPR/Cas9 como técnica de edición genómica	7
1.2.6	CRISPR/Cas9 como herramienta contra el cáncer	9
1.3	Nanotecnología	10
1.3.1	Nanopartículas mesoporosas de sílice y sus propiedades	10
1.3.2	Nanopartículas con puerta molecular	11
1.3.3	Nanopartículas en el campo de la biomedicina	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1	Nanopartículas de CRISPR	14
3.2	Caracterización de la expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2	14
3.3	Evaluación de la toxicidad de las NPSMs funcionalizadas con PEI y conjugadas con el plásmido CRISPR/Cas9	15
3.3.1	Cultivo celular: condiciones de cultivo y mantenimiento	15
3.3.2	Ensayo de viabilidad celular	15
3.3.3	Análisis estadístico	15
3.4	Caracterización de la internalización de las nanopartículas con PEI y conjugadas con el plásmido CRISPR-Cas9	16
3.4.1	Citometría de flujo	16
3.4.2	Microscopía confocal	16
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b>	<b>17</b>
4.1	Caracterización de la expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2	17
4.2	Evaluación de biocompatibilidad de las NPSMs funcionalizadas con PEI y conjugadas con el plásmido CRISPR/Cas9	18

4.3	Caracterización de la internalización de las nanopartículas con PEI y conjugadas con el plásmido CRISPR/Cas9 .....	18
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>22</b>

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más diagnosticado en mujeres y supone su segunda causa de mortalidad (Chavez et al., 2011). Esta tasa de mortalidad se ha ido reduciendo en las últimas décadas debido a mejoras en el tratamiento, pero la tasa de morbilidad se mantiene alta. Por ejemplo, en 2012, se reportaron más de 1 millón de nuevos casos y 400.000 muertes asociadas a esta enfermedad (Liu et al., 2017). También puede ocurrir en hombres, con una tasa de incidencia mucho menor (Makki, 2015).

El cáncer de mama se clasifica a nivel clínico de acuerdo a los rasgos histológicos y las características moleculares de cada tumor (Makki, 2015). El segundo criterio se fundamenta en la evaluación de tres marcadores: los niveles de expresión de los receptores endocrinos para estrógeno (ER) y progesterona (PgR) y la amplificación de HER2/Neu (Chavez et al., 2011; Liu et al., 2017).

A partir de los resultados de estos marcadores, el cáncer de mama se divide en cuatro subtipos: 1- luminal A (ER+ o PgR+, HER2-), 2- luminal B (ER+ o PgR+, HER2+), 3- HER2 positivo, donde la proteína HER2 se encuentra sobreexpresada y 4- basal o triple negativo (ER-, PgR- y HER2-), que no expresa ninguno de estos marcadores (Liu et al., 2017).

La asignación a uno de estos subtipos conduce el tratamiento a terapias más específicas que la quimioterapia, considerada el tratamiento estándar, aprovechando que los mismos marcadores moleculares actúan como dianas terapéuticas (Bianchini et al., 2016). Este hecho permite que los subtipos luminales A y B puedan ser tratados con terapias endocrinas antiestrógenos, como el palbociclib, y que el tratamiento del subtipo HER2 positivo se base en agentes inhibidores de HER2/Neu, como el anticuerpo de ratón humanizado trastuzumab. Siguiendo este razonamiento, la carencia de marcadores en el cáncer de mama triple negativo limita el tratamiento a la quimioterapia (Chavez et al., 2011; Makki, 2015; Matutino, 2018). En concreto, la terapia actual supone tratar con un agente quimioterapéutico cada vez (quimioterapia secuencial) o con varios al mismo tiempo (quimioterapia concurrente) (Panayotopoulou et al., 2017).

Se ha determinado, con base en los estudios epidemiológicos, que el cáncer de mama triple negativo supone el 10-20% del total de casos de cáncer de mama (Chavez et al., 2011; Panayotopoulou et al., 2017). Este tipo se caracteriza por la gran capacidad de división celular y diseminación del tumor y una evolución desfavorable (Panayotopoulou et al., 2017). En este sentido, se produce una paradoja: este tipo de pacientes responde mejor a la quimioterapia, pero a la vez presenta mayor tasa de recurrencia que otros subtipos. Incluso con un tratamiento óptimo, menos del 30% de mujeres con metástasis supera los 5 años tras el diagnóstico y la tasa de supervivencia es muy baja (Bianchini et al., 2016).

Algunas de las causas que explican estos datos es la falta de dianas terapéuticas y la resistencia a fármacos tras el tratamiento primario. Para la primera causa, existen investigaciones acerca de una posible terapia anti-andrógena y de posibles inhibidores de diversas proteínas (PARP, PI3K, MEK) y células madre tumorales (Bianchini et al., 2016; Panayotopoulou et al., 2017). Como soluciones a la resistencia, se plantea el uso de inhibidores de proteínas asociadas o las nanopartículas como sistema de entrega de (bio)moléculas (Jena et al., 2013; Tse et al., 2008).

## 1.2 El rol de la familia de proteínas BCL-2 en la apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada fundamental para eliminar de células innecesarias o potencialmente peligrosas. La evasión de este proceso, considerada una de las características del cáncer, es esencial para el desarrollo y expansión de los tumores y es la base de la resistencia a los tratamientos contra el cáncer (Kotschy et al., 2016; Tse et al., 2008).

Uno de los mecanismos que permiten a la célula tumoral evadir la apoptosis es la alteración en la regulación de la familia de proteínas BCL-2 (Tse et al., 2008).

### 1.2.1 La familia de proteínas BCL-2

La apoptosis mitocondrial es uno de los procesos más comunes de muerte celular programada a lo largo del ciclo vital de los mamíferos (Zheng et al., 2018). Este proceso está regulado por la familia de proteínas BCL-2, las cuales constituyen una red compleja de interacciones que determina la integridad de la membrana mitocondrial externa (Chipuk et al., 2010).

La vía de apoptosis mitocondrial se inicia con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa permitiendo la difusión de proteínas solubles, como el citocromo *c*, desde el espacio intermembrana al citosol. El citocromo *c* se une al Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica 1), permitiendo su oligomerización y la formación del apoptosoma. Este complejo multiproteico sirve de plataforma para la activación de la caspasa-9, que a su vez activa las caspasas efectoras 3 y 7 (**Figura 1A**) (Chipuk et al., 2010).

La familia BCL-2 agrupa a un conjunto de proteínas que, de acuerdo con su rol en la apoptosis, se clasifican en antiapoptóticas y proapoptóticas. Por un lado, las proteínas antiapoptóticas promueven la integridad de la membrana mitocondrial externa, inhibiendo directamente las proapoptóticas. Se caracterizan por la presencia en su estructura de cuatro dominios BH (*Bcl-2 homology*) y se localizan en el citosol, en la membrana mitocondrial y en la membrana del retículo endoplasmático. Las principales proteínas de este grupo son Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), A1 (*Bcl-2-related protein A1*), Bcl-X<sub>L</sub> (*B-cell lymphoma-extra large*), Bcl-w (*Bcl-2-like protein 2*) y Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia 1*) (**Figura 1B**) (Chipuk et al., 2010).

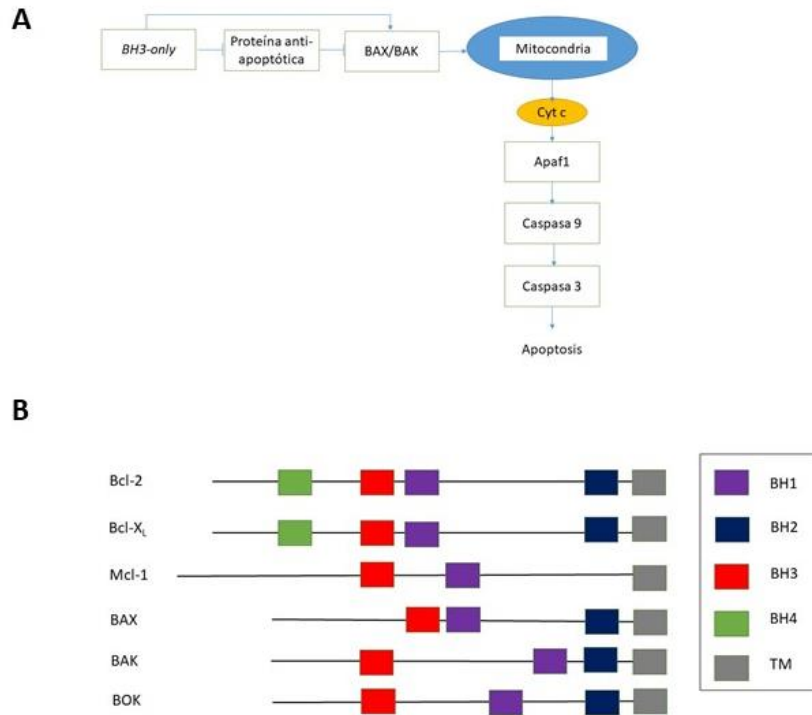
Por otro lado, las interacciones entre los miembros proapoptóticos, divididos en proteínas efectoras y *BH3-only*, determinan la permeabilización de la membrana y la apoptosis.

Dentro de las efectoras, se encuentran las proteínas BAK (*Bcl-2 antagonist killer 1*) y BAX (*Bcl-2 associated x protein*), en cuya estructura se encuentra un dominio BH4 conservado. Ambas son responsables de la formación de poros en la membrana, mediante su homooligomerización, causando su permeabilización. La proteína BOK (*Bcl-2-related ovarian killer*) también se clasifica como efectora, por su aparente relación con BAX y BAK, aunque parece actuar por un mecanismo distinto del que se tiene escasa evidencia (**Figura 1B**) (Chipuk et al., 2010).

Las proteínas *BH3-only* se clasifican en sensibilizadoras, cuando interactúan sólo con las antiapoptóticas, o en activadoras, si también se unen a las efectoras anteriormente mencionadas. Como ejemplos de activadoras, se encuentran BAD (*Bcl-2 antagonist of cell death*), BID (*Bcl-2 interacting domain death agonist*) y BIM (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*), capaces de inducir la permeabilización de la membrana (Chipuk et al., 2010).

La regulación de las interacciones entre ambos tipos determina la supervivencia o la muerte de la célula (Chipuk et al., 2010). En una célula tumoral, se altera el equilibrio entre los miembros de la familia: mientras la expresión de los proapoptóticos se inhibe o disminuye, las proteínas antiapoptóticas se

sobreexpresan (Zheng et al., 2018). Puesto que las células tumorales se vuelven “adictas” a esta sobreexpresión para sobrevivir, se deduce que la inhibición de ésta podría inducir apoptosis (Del Gaizo Moore & Letai, 2013). La aplicación de este conocimiento ha permitido sintetizar diversos inhibidores de algunos miembros antiapoptóticos, como la molécula ABT-263 o navitoclax (Chipuk et al., 2010).

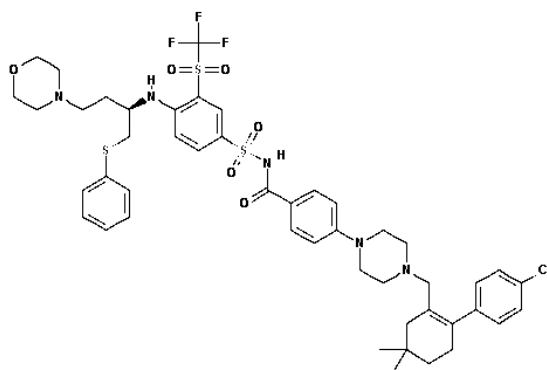


**Figura 1. Vía de apoptosis mitocondrial regulada por la familia de proteínas BCL2 (A) y dominios de los miembros estudiados en este trabajo (B).** Se puede observar que todos los miembros estudiados conservan el dominio BH3 (rojo), BH1 (morado) y TM (gris). Modificados a partir de ‘The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation’ (Birkinshaw, y Czabotar, 2017) (A) y ‘BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis’ (Gross et al., 1999).



### 1.2.2 Navitoclax: mecanismo de acción y resistencia al fármaco

La molécula ABT-263, o navitoclax, es un mimético de las proteínas *BH3-only* que inhibe selectivamente las proteínas Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2 y Bcl-w (**Figura 2**). El navitoclax actúa evitando el secuestro y la neutralización de las proteínas proapoptóticas por parte de las anteriores, desplazando el equilibrio hacia la muerte celular programada (Campbell et al., 2018; Inoue-Yamauchi et al., 2017; Tse et al., 2008).



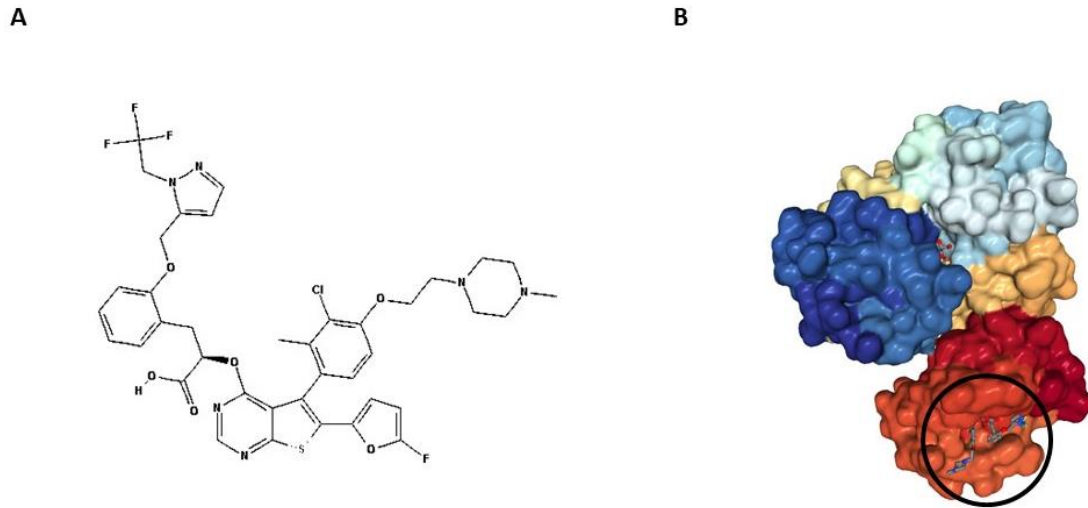
**Figura 2.** Estructura de la molécula navitoclax. Extraído de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Navitoclax>.

Uno de los inconvenientes del navitoclax es su falta de interacción con la proteína Mcl-1, esencial para el crecimiento y la supervivencia de diversos tumores, entre los que se encuentra el cáncer de mama triple negativo (Campbell et al., 2018; Kotschy et al., 2016). De hecho, los niveles de esta proteína sirven de indicador para estimar la evolución clínica del tumor. Un estudio reciente ha sugerido que la sobreexpresión de Mcl-1 podría ser innata, pero no puede descartarse que aparezcan como respuesta a un primer tratamiento con navitoclax (Campbell et al., 2018). En relación con esto, los análisis de expresión genética han demostrado que el grado de resistencia es proporcional a los niveles de expresión de Mcl-1 (Tse et al., 2008; Williams et al., 2018).

En este contexto, las terapias que bloqueen la actividad de Mcl-1 o reduzcan su expresión podrían combinarse con el tratamiento de navitoclax para inducir apoptosis y evitar la resistencia ocasionada por Mcl-1. Para bloquear su función se ha desarrollado el inhibidor selectivo S63845 (Inoue-Yamauchi et al., 2017; Kotschy et al., 2016). Nuestra propuesta para reducir su expresión consiste en el empleo de nanopartículas transportadoras del sistema CRISPR/Cas9 con el fin de evitar la expresión de la proteína Mcl-1 y sensibilizar a las células tumorales a navitoclax.

### 1.2.3 Inhibidor de Mcl-1: S63845

La molécula S63845 es un mimético de las proteínas *BH3 only*, que inhibe selectivamente la proteína Mcl-1, bloqueando su unión con los miembros proapoptóticos BAX y BAK (**Figura 3**) (Kotschy et al., 2016). Ensayos realizados en ratones demuestran que el tratamiento con el inhibidor S63845 no afecta a la viabilidad de los tejidos normales en las mismas dosis que son letales para las células tumorales (Kotschy et al., 2016). Aunque hasta la fecha no se ha realizado ningún ensayo clínico, se espera que se desarrollen en los próximos años.

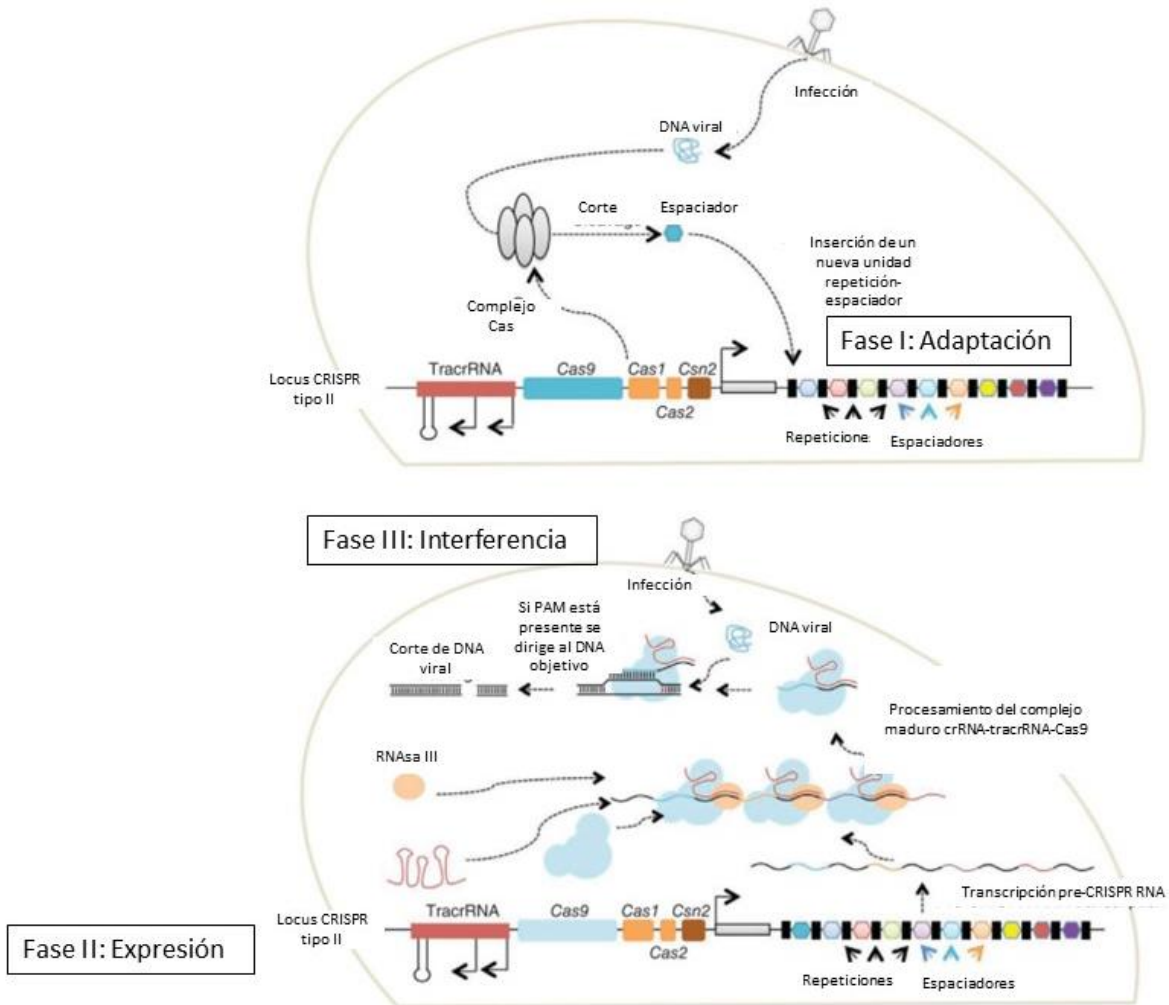


**Figura 3. Estructura del inhibidor S63845 (A) e interacción de la molécula con la proteína Mcl-1 (B).** Este mimético bloquea la unión de Mcl-1 con los miembros proapoptóticos BAX y BAK, ocupando el surco de unión del dominio BH3. Imágenes extraídas de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122197581> (A) y <http://www.rcsb.org/3d-view/5LOF> CRISPR/Cas9.

#### 1.2.4 El sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 (*clustered regulary interspaced short palindromic repeat*) pertenece a los mecanismos de inmunidad adaptativa de las bacterias y consiste en el empleo de nucleasas guiadas por RNA para escindir elementos genéticos exógenos (Ran et al., 2013).

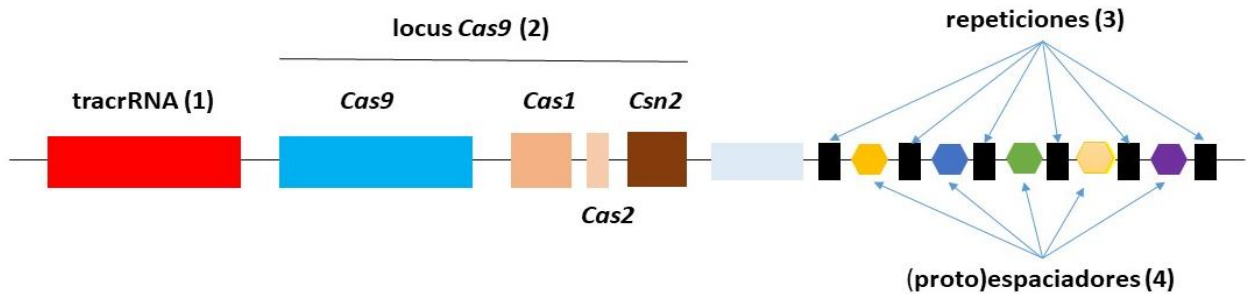
CRISPR/Cas está formado por dos componentes: el *locus* CRISPR y los genes asociados a CRISPR (*Cas*) (Ran et al., 2013). El *locus* CRISPR son secuencias agrupadas y variables de DNA repetitivo que se encuentran separadas por secuencias no repetitivas, denominadas espaciadores. Estas secuencias no repetitivas son, en su origen, material genético procedente de bacteriófagos u otros elementos genéticos móviles. Cada uno de estos espaciadores se encuentra asociado a un motivo adyacente (PAM), crítico para su funcionamiento (Adli, 2018; Ran et al., 2013) (**Figura 5**, aplicada al sistema CRISPR/Cas9). El mecanismo de inmunidad involucra tres fases: adaptación, expresión e interferencia. En la primera, tras la invasión del DNA exógeno, el sistema de adaptación selecciona los protoespaciadores y los incluye en el *locus* CRISPR, donde pasan a llamarse espaciadores. En la fase de expresión, el *locus* se transcribe como RNA CRISPR inmaduro (pre-crRNA), que posteriormente se procesa a crRNA maduro. Cada una de estas unidades contiene una secuencia guía de 20 nt, que guía la nucleasa a la secuencia objetivo mediante complementariedad de bases, y una repetición directa incompleta. Por último, en la fase de interferencia, la nucleasa identifica y corta la secuencia complementaria al espaciador. De este modo, los microorganismos pueden protegerse de la presencia de elementos genéticos exógenos (**Figura 4**) (Khan et al., 2018; Ran et al., 2013; Vivo Llorca, Gema, 2017).



**Figura 4. Mecanismo del CRISPR/Cas9.** En la fase de adaptación, el sistema selecciona los protoespaciadores y los incluye en el array CRISPR, como espaciadores, tras la infección. Posteriormente, en la fase de expresión, se transcribe como RNA CRISPR inmaduro (pre-crRNA), que se procesa como crRNA maduro. Por último, en la fase de interferencia, la nucleasa identifica y escinde la secuencia complementaria al espaciador. Extraído de 'Cas9 as a versatile tool for engineering biology' (Mali et al., 2013).

De acuerdo con la estructura de los genes *Cas*, se han clasificado los distintos sistemas CRISPR descubiertos hasta la fecha. De este modo, se distingue entre la clase 1, que contiene los subtipos I y III, comunes en arquea, y la clase 2, que incluye los subtipos II, IV, V y VI (Adli, 2018). El más conocido y usado en ingeniería genética es el tipo II, conocido como sistema CRISPR/Cas9 (Ran et al., 2013).

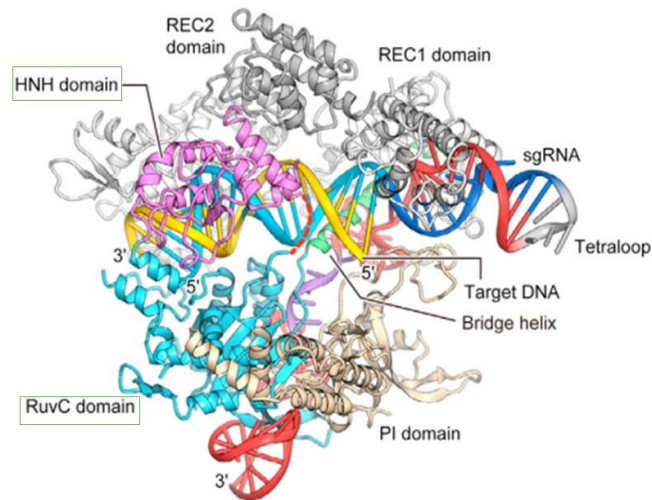
## 1.2.5 CRISPR/Cas9 como técnica de edición genómica



**Figura 5. Estructura del sistema CRISPR/Cas9.** Este sistema se encuentra definido por los siguientes componentes: el crRNA trans-activador auxiliar (tracrRNA) (1), el locus de la nucleasa Cas9 (2) y el array CRISPR. El array se encuentra conformado por secuencias de DNA repetitivo (3) interespaciadas por secuencias no repetitivas, los espaciadores (4), que proceden de material genético exógeno. Modificado a partir de 'Cas9 as a versatile tool for engineering biology' (Mali et al., 2013).

El sistema CRISPR/Cas9 tipo II, derivado de *Streptococcus pyogenes*, se compone de la nucleasa Cas9, el precursor de crRNA (pre-crRNA), que contiene los espaciadores interespaciados por repeticiones idénticas, y un crRNA trans-activador auxiliar (tracrRNA), necesario para procesar el crRNA en pequeños fragmentos de crRNA (Figura 3) maduros interferentes (Figura 5) (Cong et al., 2013).

Las secuencias crRNA y tracrRNA son necesarias para la formación del complejo CRISPR/Cas9. Una vez el sistema llega a su secuencia objetivo, la nucleasa Cas9 dirigida por el RNA guía provoca la rotura en la doble cadena, lo que lleva al elemento genético invasor hasta la muerte. La nucleasa Cas9 lleva a cabo un corte específico mediante los dominios catalíticos conservados HNH y RuvC (Figura 6) (Adli, 2018; Ran et al., 2013).



**Figura 6. Estructura de la proteína Cas9.** Esta proteína es la encargada de producir la rotura de doble cadena realizando un corte específico mediante los dominios catalíticos conservados HNH y RuvC, destacados con un recuadro verde. Modificado a partir de 'Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA' (Nishimasu et al., 2014).

En las aplicaciones de ingeniería genética el sistema CRISPR/Cas9 también puede ser guiado mediante una única secuencia, el híbrido crRNA:tracrRNA, conocido como RNA guía (sgRNA), complementario a la secuencia a editar. La modificación del sgRNA permite redireccionar el complejo Cas9 a cualquier sitio de interés (Ran et al., 2013). El único requisito del sistema es tener una secuencia PAM 5'-NGG (Adli, 2018).

Además, existen distintas versiones de la endonucleasa Cas9 con sus dominios catalíticos mutados que amplían las aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9. Estos dominios pueden ser modificados para producir nicasas: nucleasas con uno de los dominios inactivos, o *dCas9*: ambos dominios inactivados (Ran et al., 2013). Así se consiguen endonucleasas más específicas, en el caso de las nicasas, e incluso proteínas Cas9 capaces de actuar como factores de transcripción o factores modificadores de la epigenética (Perez-Pinera et al., 2013; Ran et al., 2013).

La utilización del sistema CRISPR/Cas9 como herramienta en aplicaciones de ingeniería genética en células eucariotas puede dar lugar a dos posibles tipos de reparación del DNA, dependiendo de la presencia o ausencia del molde de reparación. En su presencia, se produce la reparación homóloga de alta fidelidad, que permite, entre otras aplicaciones, introducir una mutación deseada en un gen diana o insertar un gen exógeno; en caso contrario, se produce la reparación no homóloga, mucho menos precisa, que produce alteraciones en forma de inserciones y deleciones (mutaciones InDel), siendo adecuada para la producción de mutaciones *knock-out* (Ran et al., 2013).

En comparación con otros sistemas basados en nucleasas, como los ZFN (*zinc finger nucleases*) o TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*), el sistema CRISPR presenta tres potenciales beneficios. En primer lugar, CRISPR/Cas9 es más sencillo de personalizar puesto que no requiere más que la modificación de una secuencia de sgRNA. Como contraste, los TALEN requieren de la construcción de dos nuevos genes y los ZFN poseen un diseño complejo. En segundo lugar, el corte es mucho más específico que en otros sistemas, siempre entre las bases 17 y 18 de la secuencia objetivo, a 3 pares de bases del PAM. En este

sentido, el uso de nicasas o *dCas9* permite incrementar aún más la especificidad, evitando mutaciones en regiones fuera de la diana que se desea editar (*off-target*). En tercer lugar, es el único sistema basado en nucleasas conocido que puede ser multiplexado, esto es, es posible dirigirse a diversos *loci* simultáneamente, usando una librería de sgRNA (Ran et al., 2013).

Los beneficios antes comentados, unidos a la alta eficiencia del sistema, son clave en el éxito del CRISPR/Cas9. Su descubrimiento ha dado paso a una multitud de potenciales aplicaciones en el campo de la biotecnología y de la medicina (Chen & Zhang, 2018).

Algunas de estas aplicaciones son el modelado y la terapia del cáncer, desórdenes genéticos como la distrofia muscular o la betatalasemia, enfermedades virales como el virus del papiloma humana (HPV) o el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), desórdenes neurológicos como la enfermedad de Huntington o la esquizofrenia, alergias y enfermedades inmunológicas o antimicrobianas. También se puede emplear para producir una deriva genética como medida indirecta para, por ejemplo, reducir la incidencia de la malaria (Khan et al., 2018).

### 1.2.6 CRISPR/Cas9 como herramienta contra el cáncer

Anteriormente se ha comentado que la resistencia a fármacos es una de las causas que explican las altas tasas de recurrencia y mortalidad del cáncer de mama triple negativo. Actualmente, para minimizar este problema suelen combinarse diversos fármacos, a pesar de que el efecto sinérgico sea difícil de predecir. Esto hace necesaria la búsqueda de alternativas y mejoras en la terapia contra el cáncer. Diversas investigaciones centran sus esfuerzos en mejorar la especificidad de los agentes quimioterápicos o en bloquear los factores responsables de la resistencia, de modo que el fármaco pueda ser reutilizado sin complicaciones (Chen & Zhang, 2018). Una posible estrategia consiste en la manipulación genética de oncogenes, responsables de proliferación y la estimulación de la señalización, bien actuando sobre las formas mutadas más activas del oncogén, bien interfiriendo en las rutas de señalización (Chen & Zhang, 2018).

Por otro lado, se pueden sensibilizar las células tumorales frente a quimioterapia afectando a procesos celulares involucrados en el proceso de resistencia mediante la edición de los genes relacionados con la misma (Chen & Zhang, 2018). El problema de la entrega específica del sistema CRISPR/Cas9 a la célula diana.

Debido al gran tamaño de la proteína Cas9, cuyo peso molecular aparente es 162 kDa, es técnicamente complicado que el sistema se internalice de forma específica y eficiente en los entes biológicos de interés. El uso de vectores virales, unos de los vehículos más ampliamente empleados por su baja inmunogenicidad, pone de relieve tal complejidad (Adli, 2018). A esto hay que añadir el riesgo de bioseguridad o la dificultad de transfección de ciertos tejidos y células (Chen & Zhang, 2018).

Posibles soluciones son el uso de vectores no virales, como la electroporación, la inyección, las nanopartículas o la combinación de varios de estos métodos (Chen & Zhang, 2018). En la siguiente sección se explicará la adecuación de las nanopartículas de sílice mesoporosas, que se enmarca en estos vectores no virales, como vehículo del sistema CRISPR/Cas9.

### 1.3 Nanotecnología

La nanotecnología es un campo interdisciplinar que incluye la investigación y el desarrollo tecnológico a escala atómica, molecular y macromolecular. Su objetivo es comprender, crear y aplicar estructuras cuyo rango de tamaño se encuentra entre 1 a 100 nm (Boulaiz et al., 2011; McNeil, 2005).

A esta escala, las fuerzas fisicoquímicas que actúan sobre las partículas son distintas que las que se aplican a macroescala. En este rango de tamaños, los materiales adquieren nuevas propiedades y se comportan de otro modo a causa del considerable incremento en la relación superficie-volumen (Stander & Theodore, 2011)

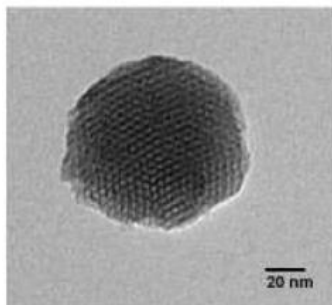
La nanotecnología puede ser empleada en diferentes sectores de la ciencia, entre ellos, los sistemas de almacenamiento electrónicos, la biotecnología o la medicina. Este último caso, da lugar al campo de la *nanomedicina*, la cual es considerada una versión más precisa de la medicina molecular. La nanotecnología se aplica en diversas áreas de la medicina como el *screening*, diagnóstico y tratamientos de enfermedades (Boulaiz et al., 2011).

Dentro de la nanomedicina, una de las áreas más importantes e investigadas es la síntesis de nanovehículos capaces de transportar moléculas con un propósito terapéutico (Boulaiz et al., 2011). Este esfuerzo ha cristalizado en la obtención de un rango amplio de nanopartículas, orgánicas e inorgánicas con este fin (Anna Watermann & Juergen Brieger, 2017). Con respecto al grupo de nanopartículas orgánicas, un subconjunto representativo incluye los liposomas, las micelas, los dendrímeros y las nanopartículas basadas en ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA (Anna Watermann & Juergen Brieger, 2017).

En relación con las nanopartículas inorgánicas, algunos ejemplos son las nanopartículas de oro, los nanotubos de carbono, las partículas de óxido de hierro, los *quantum dots* o las nanopartículas de sílice mesoporosas (NPSMs) (Anna Watermann & Juergen Brieger, 2017). En este trabajo, las NPSMs han sido seleccionadas como nanovehículos para el transporte del sistema CRISPR/Cas9.

#### 1.3.1 Nanopartículas mesoporosas de sílice y sus propiedades

Las nanopartículas mesoporosas de sílice (NPSMs) son estructuras hexagonales o cúbicas formadas por materiales con poros muy pequeños y uniformes, similar a un tamiz, entre 2 y 10 nm (**Figura 7**) (Mehmood et al., 2017).

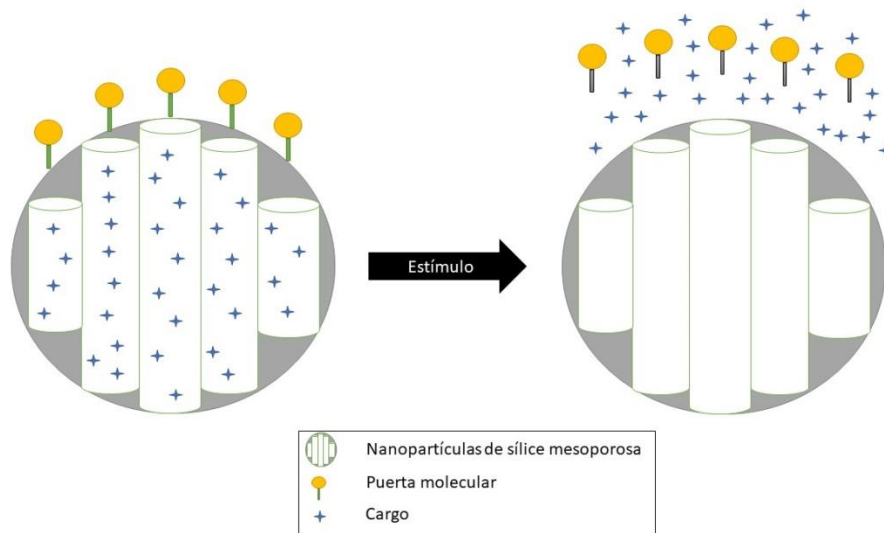


**Figura 7.** Imagen de microscopía electrónica de una nanopartícula mesoporosa de sílice MCM-41. Extraído del trabajo de fin de máster 'Puesta a punto de un sistema de nanopartículas de sílice mesoporosa para edición génica basado en la tecnología CRISPR/Cas9' de Gema Vivo Llorca (2017).

Las propiedades de estas nanopartículas explican su adecuación como sistema de entrega de fármacos, diagnóstico y biosensores. Las propiedades más relevantes de las nanopartículas son el orden interno de sus mesoporos, que presentan una relación área-volumen alta, su tamaño y forma, su maleabilidad y robustez y la fácil modificación de sus superficies (interna y externa). Además, son bien tolerados *in vivo* e *in vitro*, sin causar citotoxicidad, y poseen una buena hemocompatibilidad (Mehmood et al., 2017; Vallet-Regí et al., 2017).

Una de las peculiaridades de las nanopartículas es su tendencia a acumularse en los tumores a través de un mecanismo conocido como permeación y retención aumentada (efecto “EPR”). Esta tendencia se debe a la peculiar vascularización de los tumores (REF). No obstante, debido a la heterogeneidad tumoral, es necesario que estas partículas sean capaces de discriminar entre células tumorales y no tumorales, lo cual puede conseguirse con biomoléculas, como proteínas o anticuerpos, que dirijan las nanopartículas a las células tumorales (Vallet-Regí et al., 2017).

### 1.3.2 Nanopartículas con puerta molecular



**Figura 8. Esquema de la estructura y el funcionamiento de una nanopartícula de sílice mesoporosa MCM-41 con puerta molecular.** Se representa un soporte inorgánico cargado con una molécula de interés (fármaco, fluoróforos, materiales de contraste, etc.) y funcionalizado con una molécula que ejerce como puerta molecular (anticuerpos, DNA, RNA, etc.). Un estímulo externo predefinido (pH, temperatura, campo magnético, etc.) favorece la liberación de la carga en el órgano, tejido o tipo celular de interés a través de cambios conformacionales en la puerta molecular. Figura modificada a partir de ‘Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights’ (Vallet-Regí et al., 2017).

Para dirigir el fármaco al tejido enfermo, se funcionaliza la superficie externa de estas nanopartículas con moléculas capaces de interactuar únicamente con los receptores sobreexpresados en las células tumorales, discriminando de este modo entre células sanas y enfermas (Vallet-Regí et al., 2017).

Para evitar la liberación prematura de la carga es posible bloquear los poros de las nanopartículas con puertas moleculares, que bloqueen la salida del fármaco, hasta que reciba el estímulo correspondiente. Estos estímulos pueden ser internos y externos. Los estímulos internos incluyen cambios en el pH, reacciones redox, cambios de polaridad o presencia de ciertas moléculas, mientras que en los externos se encuentran campos magnéticos, ultrasonidos, luz o temperatura (**Figura 8**) (Pascual et al., 2017; Vallet-Regí et al., 2017).



Los materiales empleados en la síntesis de las puertas moleculares pueden ser compuestos inorgánicos: partículas de oro u óxido de hierro; polímeros: por ejemplo el polietilenglicol (PEG) y macromoléculas: péptidos y proteínas, anticuerpos, DNA o aptámeros, oligonucleótidos sintéticos de DNA o RNA con alta afinidad al objetivo (Anna Watermann & Juergen Brieger, 2017; Pascual et al., 2017; Vallet-Regí et al., 2017).

### 1.3.3 Nanopartículas en el campo de la biomedicina

Las nanopartículas suponen una gran mejora respecto a la medicina convencional. A continuación, se enumeran algunos de sus beneficios:

En primer lugar, su reducido tamaño les permite una interacción más precisa con las células (Vallet-Regí et al., 2017).

En segundo lugar, la liberación controlada de fármacos encapsulados en las nanopartículas permite evitar niveles tóxicos de fármaco libre en los fluidos biológicos. En este sentido, la formulación encapsulada permite mantener unos niveles óptimos de fármaco en la diana a tratar, aumentando así la eficacia del tratamiento y reduciendo los efectos adversos. Esto es especialmente importante a la hora de considerar compuestos quimioterapéuticos contra el cáncer (Vallet-Regí et al., 2017).

En tercer lugar, las nanopartículas con puerta molecular consiguen que la entrega sea en el momento y lugar adecuados, al depender de la presencia de un estímulo predefinido. De esta manera impiden la liberación prematura de la carga, protegiéndola del ambiente externo y permitiendo el transporte de moléculas sensibles, como el RNA y las proteínas (Vallet-Regí et al., 2017). Esta razón explica que éste sea el vehículo para portar el CRISPR/Cas9 a las células resistentes a quimioterapia.

En cuarto lugar, su gran capacidad de carga posibilita el diseño de terapias combinadas si se incluyen dos o más fármacos en la misma nanopartícula. También permite la observación a tiempo real de un posible tratamiento cuando uno de los compuestos transportados por la nanopartícula es un agente de contraste (Vallet-Regí et al., 2017).

## 2 OBJETIVOS

Resultados anteriores del grupo de investigación han demostrado que las nanopartículas de sílice mesoporosas (NPSMs) funcionalizadas con PEI y revestidas con el sistema CRISPR/Cas9 son capaces de actuar como sistemas eficientes de transfección para edición génica de la proteína fluorescente verde (GFP) en líneas celulares humanas.

Asimismo, resultados previos han demostrado que el co-tratamiento con navitoclax y el inhibidor S63845 consiguen revertir la resistencia al primero de los fármacos en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

Basándose en estos resultados, se ha planteado emplear este tipo de partículas para la edición de genes de resistencia a navitoclax en cáncer de mama triple negativo, dirigiendo el sistema CRISPR/Cas9 al gen codificante de la proteína Mcl-1. En este trabajo se abordan los primeros objetivos de esta investigación, los cuales se detallan a continuación:

Objetivo 1: Caracterización de la expresión de las proteínas de la familia BCL-2 en las líneas celulares humana de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 sensible (MDA-MB-231-S) y resistente (MDA-MB-231-R) a navitoclax.

Objetivo 2: Evaluación de la toxicidad de las NPSMs funcionalizadas con PEI y el plásmido CRISPR/Cas9 (NPSMs-PEI-CRISPR/Cas9) en MDA-MB-231-S y MDA-MB-231-R.

Objetivo 3: Caracterización de la internalización de NPSMs-RhB-PEI-CRISPR/Cas9 en MDA-MB-231-S y MDA-MB-231-R.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Nanopartículas de CRISPR

En este trabajo se han utilizado las nanopartículas que se resumen en la tabla siguiente (**Tabla 1**):

Tabla 1. Nanopartículas utilizadas en el trabajo. (EN la tabla falta una columna de nombre)

Nomenclatura	Tipo de nanopartícula	Cargo	Puerta molecular
NP-CRISPR	MCM-41	Vacía	PEI-CRISPR
NP-RhB-CRISPR	MCM-41	Rodamina	PEI-CRISPR

#### 3.2 Caracterización de la expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2

El extracto de proteínas de las líneas celulares MDA-MB-231-S y MDA-MB-231-R se realizó empleando tampón de lisis compuesto por Tris-EDTA (1 mM a pH 8.0), EGTA, SDS e inhibidores de proteasas (PMSF, leupeptina y pepstatina) a 1 µg/ml (*Sigma Biochemicals*). Los lisados de proteína se centrifugaron 10 minutos a 14000 rpm y los sobrenadantes se mantuvieron congelados a -20°C.

La concentración de las proteínas se cuantificó mediante el método BCA (siglas) utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay Kit (*Thermo Fisher Scientific*) y un espectrofotómetro para medir la absorbancia a 562 nm (*Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader* de Perkin Elmer).

Los extractos de proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% a 130V durante 1,30 horas y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 400 mA, a 4°C durante y 3 horas, usando el *Trans-Blot Turbo Transfer System* de *BioRad*. Tras la transferencia, cada membrana fue teñida con Rojo *Ponceau* para observar las proteínas y lavada 3 veces con buffer de TBS-T (121 g de Tris base y 90 g de NaCl, pH 7.5, al que se le añade Tween-20 al 0.1%) en agitación durante 10 minutos.

A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas de membrana incubando con solución de bloqueo, leche desnatada al 5% en solución salina tamponada con Tris-Tween 20 al 0.01% (TBS-T), en agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Seguidamente, las membranas se hibridaron con los anticuerpos primarios diluidos en leche al 5% a 4°C en agitación durante toda la noche. Los anticuerpos primarios, todos de conejo y en dilución 1:1000, fueron anti-Bcl-2 (#2872), anti-Bcl-X<sub>L</sub> (#2762), anti-Mcl1 (#4572), anti-BAK (#3814), anti-BAX (#2722) (*Cell Signaling*) y anti-BOK (ab186745) (*Abcam*). A continuación, las membranas se lavaron con TBS-T durante 10 minutos en agitación. Se incubaron con el anticuerpo secundario, anti-conejo (A4914) a una dilución 1:3000 (*Sigma*) a temperatura ambiente durante 1 hora.

Por último, las membranas se volvieron a lavar con TBS-T y se revelaron empleando los agentes quimioluminiscentes ECL (*Thermo Fisher*) y el detector *Amersham Imager 600* de *GE Healthcare*. Esta caracterización fue llevada a cabo por triplicado.

La cuantificación de los niveles de proteína se realizó con el software de análisis de imagen ImageJ. Se calculó la relación entre la intensidad de la banda de la muestra y la tubulina. A partir de estos valores, se normalizó respecto al nivel de proteína de la línea MDA-MB-231-S, en el que se establece que la expresión es igual a 1. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.3 Evaluación de la toxicidad de las NPSMs funcionalizadas con PEI y conjugadas con el plásmido CRISPR/Cas9

#### 3.3.1 Cultivo celular: condiciones de cultivo y mantenimiento

La línea celular MDA-MB-231 resistente (MDA-MB-231-R) a navitoclax se obtuvo en el laboratorio a partir de MDA-MB-231 cultivadas y mantenidas con navitoclax a 2,5  $\mu$ M.

Las células crecieron y se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich), en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, siendo tripsinizadas, utilizando tripsina-EDTA 0.05% (1X) (Thermo Fisher), 2 veces por semanas. Se mantuvieron condiciones estériles en una cabina de flujo laminar (*Telstar Life Science Solutions*) para su manipulación.

#### 3.3.2 Ensayo de viabilidad celular

Antes de proceder a los ensayos de internalización y edición génica fue necesario optimizar la concentración a la que se iban a realizar los tratamientos con las nanopartículas. Para ello, se evaluó viabilidad celular a las 48 y 72 horas post-tratamiento en las líneas celulares MDA-MB-231-S y MDA-MB-231-R. Las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de siembra de 10.000 células/pocillo. Después de 24 horas en incubación en DMEM con 10% de SFB, se aplicó un tratamiento en Opti-MEM a concentraciones crecientes de nanopartículas de CRISPR (NP-CRISPR) (10, 25, 50 y 100  $\mu$ g/ $\mu$ l) y dos relaciones másicas de nanopartícula:plásmido (12,5:1 y 25:1). Como controles, se emplearon células tratadas con el vehículo. Una vez pasadas durante 4 horas, el medio fue reemplazado por DMEM con SFB al 10% y las células se dejaron crecer durante 48 y 72 horas.

Transcurrido este tiempo, la viabilidad celular fue evaluada empleando el reactivo WST-1 de *Roche* o el MTS de *Promega*. Ambos reactivos se basan en la transformación del reactivo, mediante las enzimas deshidrogenasas mitocondriales, a unos productos coloreados, conocidos como formazán, cuya absorbancia se puede detectar por un espectrofotómetro (*Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader* de Perkin Elmer). Por un lado, el reactivo WST-1 se convierte en un formazán rojo cuya absorbancia se mide a 440 a 440 nm. Por otro lado, el MTS se transforma en un formazán morado, con ayuda del intermediario PMS, siendo su absorbancia medida a 490-500 nm. Los valores de absorbancia son directamente proporcionales al valor de viabilidad celular: a mayor coloración, mayor viabilidad. Los resultados obtenidos se normalizaron respecto al control (células no tratadas), en el que se considera que la viabilidad celular es del 100%. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

#### 3.3.3 Análisis estadístico

A partir de los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos, se calculó la media y desviación estándar de cada tratamiento y los controles. Las diferencias entre el control y los tratamientos se compararon mediante métodos no paramétricos, realizando un análisis ANOVA de un factor (one-way ANOVA) y el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos y las representaciones gráficas se realizaron empleando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$  indican diferencias estadísticamente significativas.

### 3.4 Caracterización de la internalización de las nanopartículas con PEI y conjugadas con el plásmido CRISPR-Cas9

#### 3.4.1 Citometría de flujo

Las líneas celulares MDA-MB-231-S y MDA-MB-231-R se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de siembra de 40.000 células/pocillo, permitiendo su adherencia durante 24 horas. Posteriormente, fueron tratadas con nanopartículas marcadas covalentemente con rodamina-B-isotiocianato (NP-RhB-CRISPR) a una concentración de 25 µg/ml y una relación molar nanopartícula:plásmido de 12,5:1. Para la observación de la cinética de internalización, se tripsinizaron las células a diferentes tiempos: 30 minutos, 90 minutos y 24 horas, tras el tratamiento con las nanopartículas. Tras la tripsinización, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en 200 µl de PBS-Hoescht 33342 (dilución 1:200), para detectar los núcleos celulares. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (*Cytoflex S*) y los datos procesados con el programa CytExpert Software, analizando el porcentaje de células que habían internalizado rodamina para cada tiempo.

#### 3.4.2 Microscopía confocal

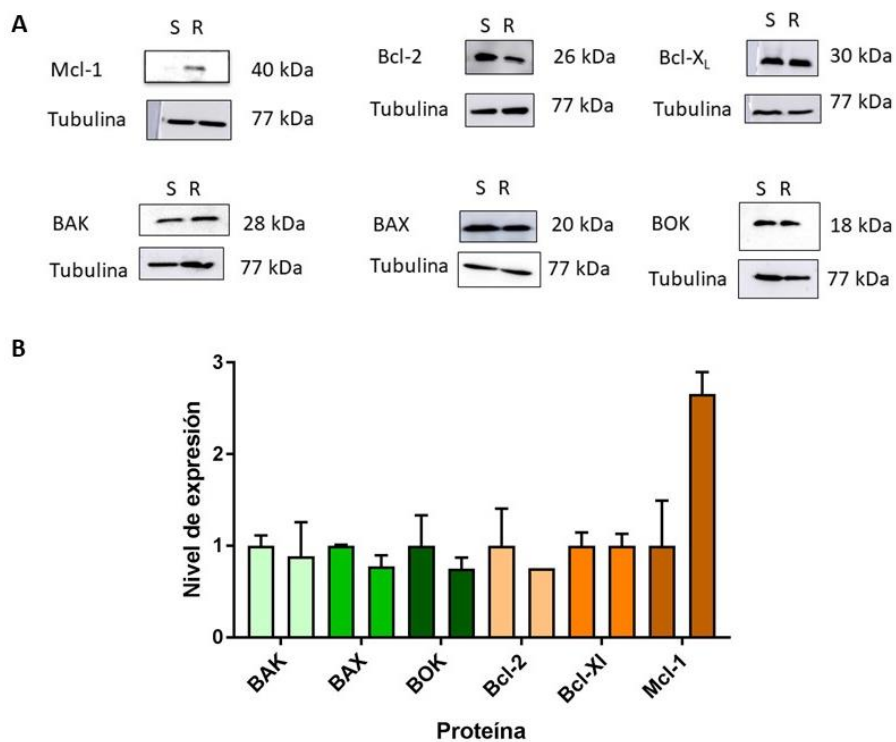
Las células de MDA-MB-231 sensibles y resistentes a navitoclax fueron sembradas en cubreobjetos a una densidad de 400.000 células/pocillo, dejándolas crecer durante 24h. A continuación, las células se incubaron durante 4 horas con NP-RhB-CRISPR a la concentración de 25 µg/ml y a una relación nanopartícula:plásmido 12,5:1 en OptiMEM. El medio se reemplazó por DMEM-SBF al 10% transcurridas las 4 horas de incubación y las células se observaron mediante microscopía de confocal (*Leica TCS SP8 HyVolution II*) 24h tras el tratamiento. Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 y las membranas celulares con Wheat Germ Agglutinin, ambos a 1 µg/ml.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.1 Caracterización de la expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2

Los resultados del *Western Blot* (**Figura 9A**) comparan la expresión de las proteínas entre las líneas celulares MDA-MB-231-S y MDA-MB-231-R. Como se puede observar, ambas líneas son equivalentes en la expresión de todas las proteínas de la familia BCL2, a excepción del Mcl-1, donde se advierte una sobreexpresión en la línea resistente. Estos resultados vienen apoyados por los resultados obtenidos al comparar los niveles de expresión de dichas proteínas en células sensibles y resistentes (**Figura 9B**), donde la proteína Mcl-1 en MDA-MB-231-R presenta una expresión significativamente mayor que en MDA-MB-231-S.

Ambas observaciones confirman la hipótesis de partida, esto es, la sobreexpresión de Mcl-1 confiere resistencia a navitoclax. Por tanto, se espera que la reducción en su expresión, mediante edición génica con el sistema CRISPR/Cas9 permita revertir esta resistencia, sensibilizando la línea celular MDA-MB-231 al tratamiento.

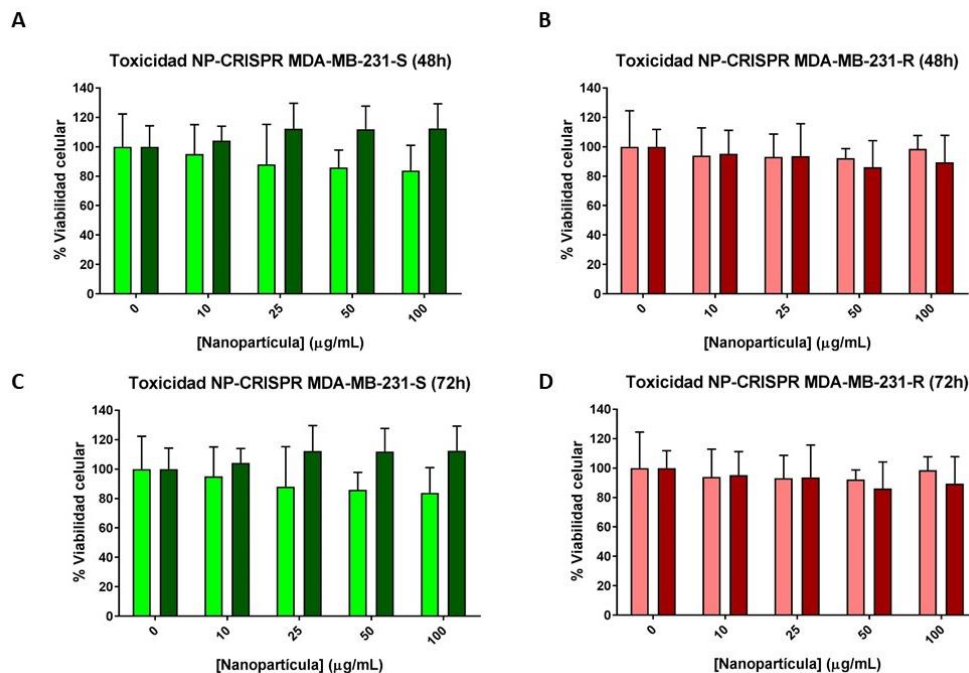


**Figura 9.** La línea celular MDA-MB-231 resistente a navitoclax sobreexpresa la proteína Mcl-1 como mecanismo de resistencia al fármaco. Análisis por Western Blot de la expresión de las proteínas de la familia BCL2. Se muestran resultados representativos de la expresión de las proteínas. Se evaluó por triplicado en ambas líneas celulares MDA-MB-231 sensible(S) y resistente (R) a navitoclax (N=3) (A). Cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas de la familia BCL2; se representan los niveles de expresión respecto a la línea celular MDA-MB-231-S (media  $\pm$  desviación estándar). Todas las medidas se realizaron por triplicado (N=3) (B).

## 4.2 Evaluación de biocompatibilidad de las NPSMs funcionalizadas con PEI y conjugadas con el plásmido CRISPR/Cas9

Con el objetivo de seleccionar la concentración de trabajo más adecuada para los ensayos de edición génica y sensibilización a navitoclax, se evaluó su toxicidad en las líneas celulares MDA-MB-231 resistente y sensible a navitoclax. De acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de NP-CRISPR (0, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y relaciones másicas nanopartícula:plásmido fijas (12,5:1 y 25:1). La toxicidad de las nanopartículas fue evaluada a las 48 y 72 horas.

Como se observa en la **figura 10**, ninguno de los tratamientos supone una reducción significativa de la viabilidad celular con respecto al control no tratado, tanto a las 48 (A) como a las 72 horas (B), es decir, las NP-CRISPR son un sistema biocompatible para la línea celular MDA-MB-231. No obstante, para los sucesivos ensayos de caracterización de las nanopartículas se seleccionó la concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , debido a que una mayor concentración supone un incremento en la agregación del material y por consiguiente una reducción en la internalización de este.

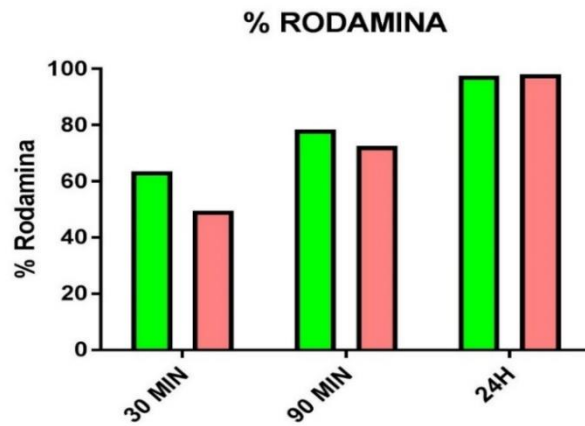


**Figura 10.** Viabilidad celular evaluada en la línea celular MDA-MB-231-S y MDA-MB-231-R a las 48 horas (A, B) y 72 horas (C, D). Las células se trataron con las NP-CRISPR a las concentraciones de 0, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y a las relaciones NP:plásmido 12,5:1 y 25:1. Se representa el porcentaje de celular vivas respecto al control no tratado (media  $\pm$  desviación estándar). Todas las medidas se realizaron por triplicado (N=3). Las células sensibles y resistentes a 12,5:1 se representan de color verde claro y rojo claro; a 25:1, de verde oscuro y rojo oscuro, respectivamente, en ambos casos.

## 4.3 Caracterización de la internalización de las nanopartículas con PEI y conjugadas con el plásmido CRISPR/Cas9

Para la caracterización de la internalización de las NP-RhB-CRISPR en las líneas celulares MDA-MB-231-S y MDA-MB-231-R se realizaron ensayos de citometría de flujo y microscopia de confocal. Mediante el primero de los métodos se cuantificó el porcentaje de células que internalizaron las nanopartículas a los 30 minutos, 90 minutos y 24 horas tras el tratamiento (figura 5). De esta manera, se constató que a

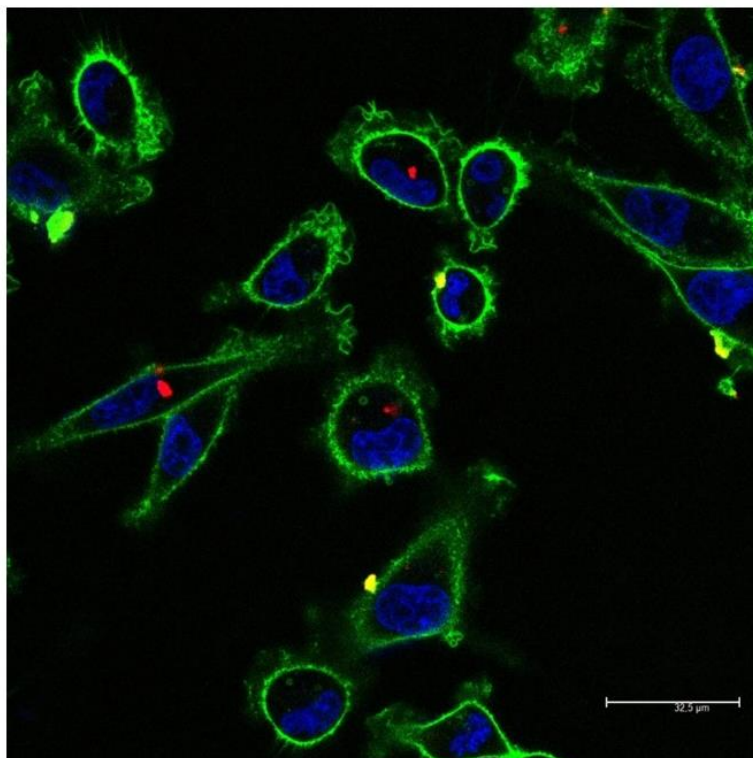
tiempos cortos entorno al 60-70% de las células habían internalizado las nanopartículas, siendo positivas para rodamina. A las 24 horas se observó cómo el 100% del cultivo había internalizado las NP-RhB-CRISPR.



*Figura 11. Estudios de internalización en MDA-MB-231-S (verde claro) y MDA-MB-231-R (rojo claro) evaluados por citometría de flujo. Las células se incubaron distintos tiempos (30, 90 minutos y 24 horas) con NP-Rhb-CRISPR a la concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a la relación NP:plásmido 12,5:1 evaluados por citometría de flujo.*

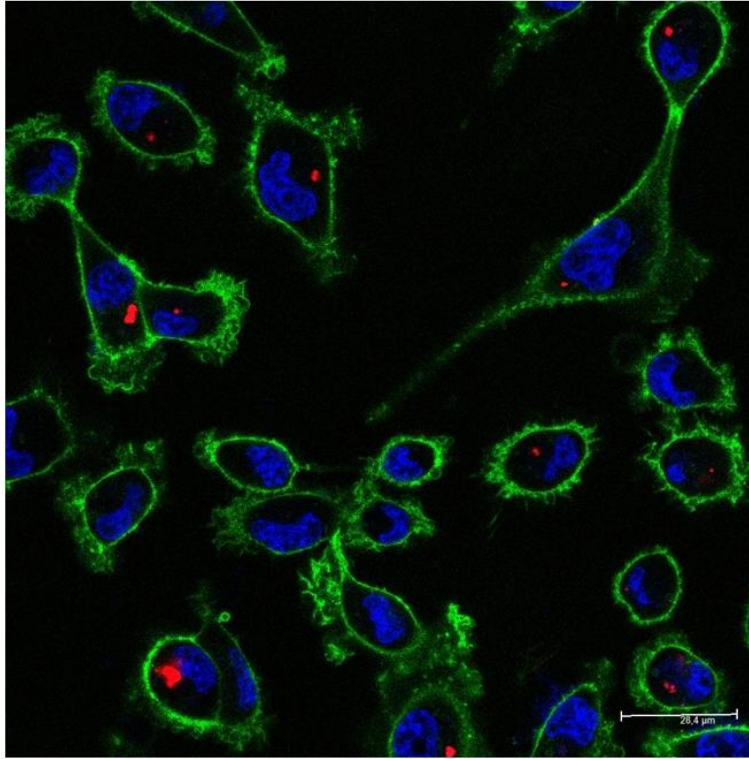
Estos resultados se confirmaron mediante microscopia de confocal. En la figura 6A y 6B se visualiza la internalización de las NP-Rhb-CRISPR en las líneas celulares MDA-MB-231 sensibles y resistentes a las 24 horas tras el tratamiento. Ambas líneas celulares mostraron niveles similares de internalización de rodamina.

A





B



**Figura 12. Estudios de internalización en MDA-MB-231-S y MDA-MB-231-R evaluados por microscopia de confocal.** Las células se incubaron 4 horas con las NP-RhB-CRISPR a 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , a una relación NP:plasmido 12,5:1 y se observaron 24 horas después. El proceso se monitorizó con rodamina B fluorescente (rojo) en presencia del marcador de membrana Wheat Germ Agglutinin (verde) y la sonda de DNA Hoechst 33342 (azul). Las células que presentan fluorescencia roja en su interior indican que la internalización de las nanopartículas se ha producido.

Con estos experimentos se demuestra que la internalización de las nanopartículas se produce adecuadamente en ambas líneas celulares y que la resistencia adquirida en MDA-MB-231 no afecta al proceso endocítico por el que tiene lugar la internalización. Así pues, las nanopartículas mesoporosas de sílice pueden ser consideradas un vehículo apropiado para el plásmido CRISPR/Cas9 en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

## 5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En este trabajo se han llevado a cabo los primeros ensayos con un nanodispositivo basado en nanopartículas de sílice mesoporosa capaz de actuar como agente de transfección no viral en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. Los resultados han demostrado que las nanopartículas funcionalizadas con el plásmido de CRISPR son biocompatibles en el tipo celular MDA-MB-231 y se internalizan adecuadamente en las líneas sensibles y resistentes a navitoclax. Por tanto, dicho sistema de nanopartículas puede ser considerado como una opción viable para el diseño de nanodispositivos más complejos multifuncionales capaces de co-transportar el sistema CRISPR/Cas9 dirigido a genes de resistencia a fármacos, como Mcl-1, y fármacos encapsulados, como el navitoclax, para la eliminación de las células tumorales una vez revertida la resistencia, mediante edición génica.

Como perspectivas futuras de este proyecto se pretende sintetizar y evaluar la actividad de las nanopartículas multifuncionales cargadas con navitoclax y funcionalizadas con el plásmido CRISPR/Cas9 dirigido a la proteína Mcl-1. Como objetivo principal se perseguirá la sensibilización de la línea celular de cáncer de mama triple negativo resistente a navitoclax frente a dicho fármaco y la eliminación de las células tumorales mediante la acción combinada del sistema de CRISPR/Cas9 y el navitoclax.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
- Anna Watermann, & Juergen Brieger. (2017). Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles in Cancer. *Nanomaterials*, 7(7), 189. <https://doi.org/10.3390/nano7070189>
- AS Rose, AR Bradley, Y Valasatava, JM Duarte, A Prlić and PW Rose. *Web-based molecular graphics for large complexes*. ACM Proceedings of the 21st International Conference on Web3D Technology (Web3D '16): 185-186, 2016. <https://doi.org/10.1145/2945292.2945324>
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(11), 674-690. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>
- Birkinshaw, R. W., & Czabotar, P. E. (2017). The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 72, 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.04.001>
- Boulaiz, H., Alvarez, P. J., Ramirez, A., Marchal, J. A., Prados, J., Rodríguez-Serrano, F., ... Aranega, A. (2011). Nanomedicine: Application Areas and Development Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3303-3321. <https://doi.org/10.3390/ijms12053303>
- Campbell, K. J., Dhayade, S., Ferrari, N., Sims, A. H., Johnson, E., Mason, S. M., ... Blyth, K. (2018). MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer. *Cell Death & Disease*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0035-2>
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2011). Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, 32(1-2), 35-48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- Chen, Y., & Zhang, Y. (2018). Application of the CRISPR/Cas9 System to Drug Resistance in Breast Cancer. *Advanced Science*, 5(6), 1700964. <https://doi.org/10.1002/advs.201700964>
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*, 37(3), 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.025>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Del Gaizo Moore, V., & Letai, A. (2013). BH3 profiling – Measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions. *Cancer Letters*, 332(2), 202-205. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.021>
- Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 13(15), 1899-1911. <https://doi.org/10.1101/gad.13.15.1899>

- Inoue-Yamauchi, A., Jeng, P. S., Kim, K., Chen, H.-C., Han, S., Ganesan, Y. T., ... Cheng, E. H. (2017). Targeting the differential addiction to anti-apoptotic BCL-2 family for cancer therapy. *Nature Communications*, 8, 16078. <https://doi.org/10.1038/ncomms16078>
- Jena, M., Mishra, S., Jena, S., & Mishra, S. (2013). Nanotechnology- future prospect in recent medicine: a review. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 353. <https://doi.org/10.5455/2319-2003.ijbcp20130802>
- Khan, S., Mahmood, M. S., Rahman, S. ur, Zafar, H., Habibullah, S., khan, Z., & Ahmad, A. (2018). CRISPR/Cas9: the Jedi against the dark empire of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0425-5>
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., Le Toumelin-Braizat, G., ... Geneste, O. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature*, 538(7626), 477-482. <https://doi.org/10.1038/nature19830>
- Liu, M., Yu, X., Chen, Z., Yang, T., Yang, D., Liu, Q., ... He, N. (2017). Aptamer selection and applications for breast cancer diagnostics and therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0311-4>
- Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 8, CPath.S31563. <https://doi.org/10.4137/CPath.S31563>
- Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*, 10(10), 957-963. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2649>
- Matutino, A. (2018). Hormone receptor–positive, HER2-negative metastatic breast cancer: redrawing the lines. *Current Oncology*, 25, 11.
- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(3), 585-594. <https://doi.org/10.1189/jlb.0205074>
- Mehmood, A., Ghafar, H., Yaqoob, S., Gohar, U. F., & Ahmad, B. (2017). Mesoporous Silica Nanoparticles: A Review. *Journal of Developing Drugs*, 06(02). <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000174>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=122197581, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122197581> (accessed July 30, 2018).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=24978538, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24978538> (accessed July 30, 2018).
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., ... Nureki, O. (2014). Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Panayotopoulou, E. G., Müller, A.-K., Börries, M., Busch, H., Hu, G., & Lev, S. (2017). Targeting of apoptotic pathways by SMAC or BH3 mimetics distinctly sensitizes paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 8(28). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15125>

- Pascual, L., Cerqueira-Coutinho, C., García-Fernández, A., de Luis, B., Bernardes, E. S., Albernaz, M. S., ... Sancenón, F. (2017). MUC1 aptamer-capped mesoporous silica nanoparticles for controlled drug delivery and radio-imaging applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *13*(8), 2495-2505. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.006>
- Perez-Pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, C. M., Adler, A. F., Kabadi, A. M., Polstein, L. R., ... Gersbach, C. A. (2013). RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9–based transcription factors. *Nature Methods*, *10*(10), 973-976. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2600>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, *8*(11), 2281-2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Stander, L., & Theodore, L. (2011). Environmental Implications of Nanotechnology—An Update. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *8*(2), 470-479. <https://doi.org/10.3390/ijerph8020470>
- Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., ... Elmore, S. W. (2008). ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Research*, *68*(9), 3421-3428. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5836>
- Vallet-Regí, M., Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., & Manzano, M. (2017a). Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights. *Molecules*, *23*(1), 47. <https://doi.org/10.3390/molecules23010047>
- Vallet-Regí, M., Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., & Manzano, M. (2017b). Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights. *Molecules*, *23*(1), 47. <https://doi.org/10.3390/molecules23010047>
- Vivo Llorca, Gema. (2017). *Puesta a punto de un sistema de nanopartículas de sílice mesoporosa para edición génica basado en la tecnología CRISPR/Cas9* (Trabajo Final de Máster). Universidad Politécnica de Valencia.
- Williams, M. M., Lee, L., Werfel, T., Joly, M. M. M., Hicks, D. J., Rahman, B., ... Cook, R. S. (2018). Intrinsic apoptotic pathway activation increases response to anti-estrogens in luminal breast cancers. *Cell Death & Disease*, *9*(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0072-x>
- Zheng, J. H., Grace, C. R., Guibao, C. D., McNamara, D. E., Llambi, F., Wang, Y.-M., ... Moldoveanu, T. (2018). Intrinsic Instability of BOK Enables Membrane Permeabilization in Apoptosis. *Cell Reports*, *23*(7), 2083-2094.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.060>