

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INSTITUTO INTERUNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DE
RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y DESARROLLO TECNOLÓGICO



Desarrollo de nuevos nanodispositivos terapéuticos aplicados al tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos de senescencia

Tesis Doctoral

Presentada por:

Irene Galiana Guillem

Supervisada por:

Prof. Ramón Martínez Máñez
Dra. Mar Orzáez Calatayud

Valencia, Enero 2020

RAMÓN MARTÍNEZ MÁÑEZ, doctor en Química y Profesor en la Universitat Politècnica de València; MARÍA DEL MAR ORZÁEZ CALATAYUD, doctora en Biología; y JOSÉ RAMÓN MURGUÍA IBÁÑEZ, doctor en Biología y Profesor en la Universitat Politècnica de València.

CERTIFICAN:

Que el trabajo *“Desarrollo de nuevos nanodispositivos terapéuticos aplicados al tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos de senescencia”* ha sido desarrollado por Irene Galiana Guillem bajo su supervisión en el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universitat Politècnica de València y en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) – formando parte de la Unidad Mixta UPV-CIPF de Investigación en Mecanismos de Enfermedades y Nanomedicina – como proyecto de tesis con el fin de obtener el grado de Doctor en Biotecnología en la Universitat Politècnica de València.

Valencia, Enero 2020.

Prof. Ramón Martínez Máñez
Director

Dra. Mar Orzáez Calatayud
Directora

José Ramón Murguía Ibáñez
Tutor UPV

La mejor forma de borrar la enorme "C" – de cáncer – que planea sobre la sociedad es construyendo una "C" – de ciencia – aún más grande.

Fake it, fake it. Until you make it.

A mi familia.

“Un país sin investigación es un país sin desarrollo”
Margarita Salas- Severo Ochoa

*“La educación científica de los jóvenes es al menos tan importante,
quizá incluso más, que la propia investigación”.*
Glenn Theodore Seaborg

“Si supiese qué es lo que estoy haciendo, no lo llamaría investigación, ¿verdad?”.
Albert Einstein

“El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos son también útiles porque, bien analizados, pueden conducir al éxito. Y para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea...”
Alexander Fleming

Agradecimientos ●

Pues aquí estoy... Por fin, sentada delante de mi inseparable portátil para escribir el último (pero no por ello menos importante) apartado de este trabajo. Probablemente será el que más me cueste, porque resumir cuatro-cinco años de tesis (más otros cuatro de pertenecer al laboratorio) en unos cuantos párrafos es prácticamente misión imposible. Pero... Allá vamos.

Empezaré por agradecer a **Joserra** que me brindase la oportunidad de conocer, y finalmente llegar a formar parte, del que ha sido mi grupo durante tantos años. Yo estaba en crisis sin saber en qué laboratorio hacer mi Trabajo Fin de Carrera, y quién me iba a decir a mí que su pregunta de “¿te gusta la nanotecnología?” me iba a acabar llevando hasta donde he llegado hoy. Muchísimas gracias a ti **Ramón**, por abrirme las puertas de tu laboratorio, aun cuando yo todavía ni sabía lo que era la MCM. Gracias por todos estos años de dirección, de oportunidades, de reuniones, de congresos; también de momentos de agobio y de tensión...porque sin ellos seguramente no habría crecido como lo he hecho a nivel no solo profesional, sino también personal. Gracias por haberme asignado este proyecto y haberme permitido seguir en él a lo largo de todo el recorrido. Y muchas, muchas gracias a ti **Mar**. Porque a falta de un año para terminar mi beca llegué a tu laboratorio (casi desesperada, siendo sinceros), y no sólo me recibiste con los brazos abiertos, sino que me cogiste de la mano y me ayudaste a buscar una salida para terminar mi trabajo. Fueron muchas reuniones en tu despacho para ver cómo encarrilábamos el proyecto, y otras tantas horas después, de charlas en bancada y asentamientos en tu ordenador para sacar sentido a los resultados. Incluso he hecho que te volvieras a poner bata y guantes y entraras en campana para poder gestionar entre todas el *overbooking* de muestras ratoniles en los días de RIP. De verdad, mil gracias por todo lo que he aprendido en el lab i12, por tus ánimos, y por haber sido como una “mami” desde que llegué a tu grupo.

Es ahora cuando echo la vista atrás y me remonto a finales de 2012, cuando llegué al lab 2.09 y empecé mis andaduras en el mundo de las nanopartículas

de la mano de Núria. Tu vas ser la meua primera referència en el grup, qui em va ensenyar el món de la MCM i a aconseguir acabar sintetitzant jo també aquella "polseta" que veia guardada en vials en totes les vostres taules. Vam fer una bona simbiosis durant aquell any, per a mi de TFG i per a tu d'un capítol més de la teua tesis; sempre recordaré els moments més bio, en els que es giraven les tornes i jo em convertia en la teua mami per a ensenyar-te a manipular els bitxets, allà en el laboratori del "cubo" groc on algun dia que altre se'ns va fer de nit. Gràcies per les teues ensenyances i per haver sigut tan bona mestra i més tard companya, sempre amb bones paraules, disposta a ajudar i amb un somriure en la cara.

I com no, d'una mamà pato bote a l'altra mamà pato. A la meua súper Cris (Cris G., com et coneixem tots), la mami senescència. No sé si abans d'anar-te'n del grup vaig saber agrair-te el suficient tot el que em vas ensenyar i ajudar. Em deixares en herència el que ha sigut "el meu tema de tesis", el projecte que m'ha acompanyat durant tots estos anys i que acaba en este document. Crec que sols tu pots entendre la relació d'amor-odi que he acabat tenint amb la senescència. Mil gràcies, de veres, per haver-me acceptat com a "patito" i haver-me transmès tota la base de les nostres benvolgudes "nanopartícules GOS", per tots els moments viscuts al lab i fora del lab. Guarde amb moltíssim carinyo el viatge a Madrid per a fer arreplega de mostres al CNIO, fent que tots els del laboratori pensaren que vivien un *dejavú* perquè sempre ens veien sentades a la mateixa bancada pesant infiniiiiiiiites mostres d'òrgans. I com no, ni tu ni jo oblidarem mai les hores que vingueren després d'aquell viatge, processant tubets davant de l'ICP per a fer les ditxoses biodistribucions. No saps tot el que t'he tirat en falta des que acabares la teua tesis, la teua risa (sempre, sempre, sempre present), el teu optimisme, la teua dolçor, i la nostra cançoneta "qué pasará, qué misterio habrá" a l'esperar cada resultat. Part d'este treball es gràcies a tu, així que de nou... Millons de gràcies ("no te vayas, Cris!!").

Siguiendo en la línea de ayudas infinitas a lo largo de este recorrido, les toca el turno a los post-doc que siempre han estado para echar una mano y arrimar hombro en todo momento. Miles de gracias a ti, Andrea, mi "mami" química. Fuiste el flotador que me hizo poder volver a funcionar con las nano después de la crisis de producción cuando me quedé solita sin Cris. No sabes cómo agradecí tu vuelta al laboratorio, y cuantísimo aprendí contigo y con Bea sobre la parte más química de las nano (y de nuestro querido galactan). Conseguimos

optimizar la síntesis y que todo volviese a funcionar, y con ello nació una muy bonita relación que nos llevó hasta el mismísimo CNIO y a ti a la campana de cultivos. Guardo muy mucho las reuniones en la pecera, planificando experimentos, comentando y divagando sobre resultados; también la organización Bea-Andrea-Irene para ver cómo lo hacíamos para llegar a los plazos de entrega, aun siendo vacaciones y teniendo que ir porque “la fábrica de nanos” no podía parar. Y el viaje a Madrid en pack de 3, cada una con su misión, para conseguir sacar adelante el trabajo. Esos días en el CNIO, aparte de muy productivos, dejaron momentos memorables que no creo que podamos olvidar: vuestros “tía Irene, qué pesada eres, tanta “contaminación”, “contaminacióoon””; los madrugones de los días ratoniles, el momento “Camerún”, o tus caras con los olores biológicos/ratoniles. Por supuesto, millones de gracias también a ti, **María**. A ti no te podía calificar como “patito” cuando te enseñé a sintetizar “las nano de senescencia”, eras mi “cisne”. Te quedaste con la fábrica de nanos, y creo que no la pude dejar en mejores manos. Gracias a tu llegada pude emigrar al CIPF para intentar encarrilar mi tesis, y precisamente por el esfuerzo que sé que supone el hacerlas, valoré como si fueran oro los stocks que preparaste para los ensayos *in vivo*. Eres una gran profesional, siempre atenta a lo que necesitara e intentando tenerlo preparado lo antes posible; ha sido un placer haberte tenido como “proveedora” cuando yo ya no podía hacerme cargo de esa parte del trabajo.

Y de mi post-docs químicas, paso a mis post-docs bio: **Carmen** y **Danya** (mi “mamá pato brasileira”). Fueron muy pocos los meses que coincidimos, ya al final de mi camino experimental, pero fueron meses increíbles con vosotras. Carmen, la pura definición de energía-motivación-optimismo, la alegría del laboratorio desde que llegaba con su “Holiiiiiii!”. Me enseñaste muchísimo (“¿quién es tu peor enemigo en el western? ¡Las burbujas!”), pero sobre todo me diste un apoyo psicológico/moral infinito en momentos no demasiado buenos. Siempre preguntando cómo lo llevaba, sentándote conmigo para que te contara y para planificar ya no solo los ensayos, sino hasta el mismísimo esquema del futuro artículo/capítulo de tesis y mis planes post-tesiles. Cuánto (cuáaanto) te eché de menos cuando me dejaste solita en los días de hacer JC1... esos ensayos eternos ya nunca fueron lo mismo sin ti. De verdad que mil gracias, porque fuiste un “flotador anímico” más que importante cuando lo veía todo negro. Y cómo no, ¡mi Danya! Te encantó el concepto de “patito” y te encantó ser mi mami enseñándome a hacer los western (“rojo con rojo, negro con negro” – o

mejor dicho, “gojo con gojo” con tu acento que tanto nos gustaba). Tú también fuiste un apoyo muy importante esos meses que compartimos, a pesar de las diferencias de idioma que nunca fueron un problema porque aprendiste rapidísimo. Espero con muchísimas ganas que vuelvas a Valencia, sigo guardando la botella de vodka que me dejaste cuando te fuiste en mi cajón para cuando tuviese días malos (“patito, bebe”) y, sobre todo, el patito de goma firmado con el que me quedé. Hasta mi coche te tiene presente todos los días, con tu mono de Kipling “Copito” colgando del retrovisor. A las dos: os echo mucho de menos.

Por último, gracias **Félix** y **Mónica**, porque no podéis ser más eficientes y sois las grandes referencias a las que acudir en los respectivos laboratorios. Los dos siempre dispuestos a ayudar cuando ha sido necesario, a nivel de despacho, de gestiones, de burocracia o a nivel experimental. Os aprecio muchísimo a los dos y os admiro todavía más por vuestra enorme profesionalidad, sois dos grandísimos ejemplos a seguir.

Antes de pasar a quienes han sido mis compañeros (y amigos) todos estos años, no puedo olvidarme de **Manuel Serrano** y de **Dani**. Fue increíble poder pasar un tiempo en tu laboratorio Manolo, en el sentido literal de la palabra, porque no me podía creer estar de verdad en el grupo de uno de los nombres más reconocidos en el campo de la senescencia. Muchas gracias por recibirnos y por tu cercanía, por tener siempre la puerta de tu despacho abierta para nosotras; fue una experiencia estar allí a nivel personal y a nivel profesional. Y cómo no, Dani. Muchísimas gracias por todo, trabajar contigo (en la distancia, con correos o llamadas continuas; o en persona) me dio la oportunidad de aprender tanto y tan bien sobre la senescencia de la mano de un gran profesional. Eres el desorden con patas, nunca podré olvidar tus montones de libretas, tu bancada y tu colección de falcons ratoniles; pero no sabes cómo he alucinado contigo al ver cómo estaba todo en tu cabeza y cómo eras capaz de preparar las concentraciones de tratamiento sin rotular ningún eppendorf. Siempre lo diré, me quedo con la espinita de no haber podido hacer una estancia en tu nuevo grupo y haber podido trabajar (de nuevo) bajo tu supervisión. Te tengo como un gran referente y me ha encantado que hayas sido mi “post-doc senescencia” en este camino.

Y ahora sí, llega el turno de mis compañeros de batalla, de la que ha sido mi familia durante todos estos años de casi pasar más horas en la bancada que en casa. A vosotros: **Alba**, **Bea**, **Iris**, **Adrián** y **Luis**, porque hemos conseguido mantenernos aún en la distancia del destierro del 2.6. Han sido muchos momentos vividos (¡¡hasta bodas!!), sobre todo cuando estábamos un poquito hacinados y nos teníamos que querer todos mucho compartiendo mesas por parejas y haciendo turnos de trabajo, pero todavía compartíamos laboratorio. Las horas de l'esmorçar, de bajar al solet después de comer para hacernos el café, de escuchar a Bea hablar por teléfono y gritar por el laboratorio; de agachar la cabeza y ver a Luuuuu al otro lado de la bancada con su plaquita agitadora y sus viales dando vueltas, y de estar trabajando al son de la que hicisteis mi canción ("¡el caballito de palo, el caballito de palo, galactan galactan galactan galactan!"). Por cuestiones obvias de espacio cada uno tuvo que emigrar a nuevos lares, pero no por eso han faltado las tardes-noches de terraceo y alguna cena que otra. Adrián, al que "no queríamos al principio" pero que acabó ganándonos y se convirtió en nuestro modelo de revista. Luis, el que siempre será recordado, inevitablemente, por su "el micoplasma eeees..." culminando una gran noche de fiesta (y obviamente por su canción "Mi gran noche", que ya ha pasado a ser la nuestra). Iris, compañera eterna en la campana de citotóxicos (aun en días de fiesta) y en las noches de salir (sobre todo a la hora de ir al baño, sólo nosotras nos entendemos). Alba, que emigraste conmigo al Príncipe y hemos tenido que vivir esta última etapa (tanto tuya como mía) de experimental y de burocracia tesis siendo un poco un pack, sobre todo para hacer frente a los temidos experimentos in vivo que taaaanto esfuerzo nos han costado. Momentos de burka y animalario compartidos también con Bea, mi gran referencia química, compañera de baile y la loquita del grupo. Contigo han sido muchos los momentos compartidos, de risas (muchas) y hasta de lloros: momentos en el labo, en el CNIO (saliendo a medianoche de trabajar), paseos con nuestros "hijos" perrunos o bailes en cualquier pista de salsa-bachata. Has sido la parte más química de la senescencia, tú "la de las sondas" y yo "la de los nanos", y este trabajo que presento también ha sido en parte mérito tuyo. No me olvido de ti **Juanfran**, que aunque hayas sido una incorporación tardía has pasado a ser uno más de esta pequeña familia. Así que a los seis: por muchos más momentos juntos, aunque sean comidas/cenas como reuniones oficiales; porque gracias a vosotros este eterno camino que es "la tesis"

ha sido mucho (mucho) más llevadero y uno de los motivos por los que he seguido adelante con él.

Por supuesto, gracias también a todos mis otros **compañeros del 2.6**: a los que estaban al principio (los veteranos), a los de siempre (nuestra generación), y a las nuevas incorporaciones. Sois una larga lista (el historial de este grupo es lo que tiene), pero todos habéis hecho que de una forma u otra este recorrido haya valido la pena. Porque al final el buen ambiente en el trabajo, el llevarte bien con las personas a las que casi (o sin el casi) ves más que a tus padres, es lo que cuenta y lo que te hace mantenerte y seguir en los momentos de bajón y desmotivación, que no son pocos en este trabajo. Amelia, Àngela, Marta, Cris M., Lorena, Toni, Santi, Xente, Mónica, Bea de Luis, Tania, Eva, Borja, Lluís, Crist T., Mar, Carmen, Elena, Sameh, Ismael y el resto del "sector internacional"... la lista realmente es infinita, pero en general, gracias al 2.6.

Y cómo no, mis otros **compañeros**, o más bien **compañeras del CIPF**: Ale, Ara, Gema, Elena, Estefanía y las Paulas. Ale y Ara, mis herederas, mis chicas de senescencia: aquí os dejo el legado. Valéis un montón y me ha encantado compartir el final del camino con vosotras (incluyendo bancada (con Ale), escritorio (con Ara) y congresos por Barcelona). Mucho ánimo porque estoy segura de que dejo mi herencia en muy buenas manos y vais a sacar grandes trabajos. Gracias también a ti Ally, por la tremenda guerra que te dieron (y luego me dieron) los péptidos; y a ti Sonia, porque aunque fueras del labo vecino las horas infinitas (y los fines de semana) en el animalario nos acabaron uniendo (hasta el punto de reconocernos por los zapatos que dejábamos en vestuario o por el mini-hueco que deja el burka al descubierto). El manejo del IVIS y el saber sondar a los ratones para darles el tratamiento oral los he aprendido gracias a ti. Y enlazando con mis ratoncitas no puedo olvidarme de **Viviana**, nuestra vete del CIPF. Mil gracias por haberme guiado en mis primeros días por el animalario, por tu paciencia, por haber estado siempre disponible (incluidos fines de semana), y por las horas de intravenosas que nos hemos comido una al lado de la otra rodeadas de jaulas. Eres un amor de persona y ha sido un lujo tenerte como referencia en los experimentos *in vivo* (me consuela saber que no soy la única que habla con las cuquis). No me olvido tampoco del resto del equipo de animalario, Nerea y Amparo, otras dos grandes profesionales que han estado siempre al pie del cañón y han puesto las manos que hacían falta en los momentos delicados o de máximo trabajo. Siendo un tema tan controvertido

como lo es el de la experimentación con animales, da gusto saber que el centro cuenta con un equipo tan profesional con y para con ellos.

Por último, gracias a **Rubén Tisular** (te grabé con ese nombre en la agenda... y hasta día de hoy) y a mi patito **Regina**. A ti Rubén, porque aunque somos pésimos amigos incapaces de cuadrar horarios para vernos, conocerte en aquella optativa fue una de mis grandes ganancias de la carrera (a pesar de no entender, en aquel momento, qué hacía un ingeniero industrial en una asignatura más bien tirando a bio). Ese "bio" nos unió, y estoy muy orgullosa de dónde has llegado por puro empeño, ¡hasta te sacaste el "curso de ratones" y empezaste a trabajar con ellos antes que yo! Gracias por tus visitas al laboratorio, por algún que otro regalito de cumple sorpresa y, sobre todo, gracias porque seamos capaces de mantener el contacto aun sin vernos. Y a ti Regina, mi primera "niña de TFG" (mi patito), que se acabó convirtiendo más bien en las manos (y mente) que a Cris y a mí nos faltaban en el momento desborde total. Contigo completamos al que bautizamos como "Equipo Senescencia", y no sabes lo alto que dejaste el listón. Te lo dije en su día y hoy solo puedo sonreír al comprobar que tenía razón: vales millones y vas a llegar muy muy lejos, mi "pequeña enciclopedia con patas" (te echo de menos).

Evidentemente, y aunque esto se haga más largo que un día sin pan y me tildéis de pesada... no puede faltar la mención especial a **mi familia**. A mons pares i germana, perquè aguantar els meus agobios i moments d'estar insoportable ve de molt abans de començar amb la tesis i sempre heu estat al meu costat per a tot el que necessitara (encara que fora arrastrar-me, literalment, de l'escriptori i obligar-me a vore la tele per a que em despejara). Gràcies per preguntar-me a sovint per com anava la tesis i el treball (encara que mai m'haja agradat parlar molt sobre el tema, ja sabeu), i per ser un suport fundamental i uno dels meus majors pilars, sobretot des que vaig decidir "abandonar el niu" i mudar-me a la capí. Per supost als meus abuelos, als que estàn i als que ja no (però segueixen estant). Perquè una de les majors il·lusions que tinc és vore'ls sentats davant de mi a la sala on tinga lloc la defensa d'aquest treball, i donar-los un súper abraç quan haja acabat tot i estiguen els dos a llàgrima viva. Gràcies també a la resta de família (tíos i cosins), perquè encara que ens vejam menys des que ja no visc al poble, la família és la família i no deixeu de ser un gran suport per a mí.

También infinitas gracias a la que ha sido mi otra familia durante tantos años. A **Toni** y **Manoli**, a **Carlos** (Charlie), y a ti **Pablo**. Estoy segura de que sabéis lo que significáis para mí y espero que sepáis lo que os sigo queriendo y apreciando, me habéis regalado años increíbles que guardo para siempre. Toni, siempre cortándome jamón y llevándome a pasear en la barca. Manoli, mi CAMPEONA y casi mi segunda madre, eres una de las mujeres más fuertes que conozco y sé que tu sonrisa puede con todo (y más). Charlie, no puedo más que decir que eres único: las risas y todos los momentos contigo han sido durante todo este tiempo uno de mis mejores flotadores (como esos tan molones que te compras en verano). Y Pablo, a ti poco puedo decir que no sepas ya, pero evidentemente no podía terminar este camino sin agradecerte lo mucho que has tirado de mí todos estos años y lo mucho que hemos sido y vivido juntos. Este trabajo ha sido posible en muchos sentidos gracias a ti, y lleva en gran parte tu nombre, barbudo. Os quiero, “familia cuatro”.

Por último, pero no por ello menos importante, gracias a “mi familia del baile”, a la compañía Sonho Doçura. Porque nuestro primer año juntos fue increíble y un gran apoyo para gestionar mi estrés, gracias por preguntarme siempre por “mis ratones” y por conseguir arrancarme sonrisas con cada baile. A la kizomba le debo muchísimo, ya no solo por lo que significa para mí como baile y por lo que me hace sentir, sino porque ha traído a mi vida a quien, a día de hoy, es mi otra mitad y mi pilar fundamental.

Mi bicho, te convertiste en mi punto de inflexión y diste un vuelco a mi vida en el momento en que decidiste sacarme a bailar aquella noche en Maldiva. No puedo decirte más con menos: “Dos fechas, una canción”. Increíblemente hace ya dos años de eso, y digo increíble porque no entiendo cómo ha pasado tan rápido el tiempo siendo tanto lo que hemos vivido ya juntos. Eres mi sonrisa de a diario, el abrazo que me espera al llegar a casa por muy malo que haya sido el día, quien me hace sentir que todo va a ir bien y que juntos podemos. Ese dicho que dice que los polos opuestos se atraen no puede ser más cierto con nosotros, porque tú eres corazón y locura, y yo son cerebro y sensatez; pero juntos sumamos el todo. Gracias por haberme acompañado en este final de camino, incluso al laboratorio los fines de semana, y por haberte puesto hasta los guantes y limpiado tubos hasta aburrir (o lavado infinitos órganos ratoniles). Gracias por aguantarme, hasta cuando ni yo misma me aguanto (sobre todo en

esta última etapa); por tirar de mí, por decirme y asegurarme que yo puedo, por insistir infinito hasta conseguir hacerme reír. Gracias por traerme chuches y rosas, por abrazarme cuando estoy inmersa y con la cara casi pegada a la pantalla del ordenador, por hacerme levantar de la silla para robarme unos bailes que me hagan desconectar (y que me dan la vida) en nuestro pequeño salón. Gracias por regalarme lo que hemos construido juntos en tan poco tiempo, gracias por ser siempre tú. Gordo, Shira y mi rubito de ojos azules, mi pequeño hogar.

En definitiva, a todos y cada uno de vosotros:

Gracias por haber formado parte de este camino.

Resumen ●

La presente tesis doctoral, titulada “Desarrollo de nuevos nanodispositivos terapéuticos aplicados al tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos de senescencia”, está centrada en el diseño, preparación, caracterización y evaluación funcional (tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes modelos celulares y murinos) de un conjunto de nanomateriales híbridos orgánico-inorgánicos, basado en nanopartículas mesoporosas de sílice que llevan por cargo moléculas fluorescentes o terapéuticas y que están funcionalizadas con galacto-sacáridos. Estos galacto-sacáridos actúan como puerta molecular, y son los responsables de controlar la liberación de las moléculas encapsuladas de manera selectiva en células senescentes.

En el primer Capítulo, correspondiente a la Introducción, se presenta el escenario biológico sobre el cual se basa esta tesis, la senescencia. También se presentan los diferentes conceptos relacionados con la nanomedicina, los materiales mesoporosos, las puertas moleculares y la liberación controlada de fármacos, así como la interacción de las nanopartículas con las células y el organismo y su posible aplicación como terapia. A continuación, en el segundo Capítulo, se exponen los objetivos generales de la presente tesis doctoral así como los objetivos concretos que se abordarán en los diferentes Capítulos experimentales.

El tercer Capítulo recoge el proceso de síntesis y de caracterización estructural y funcional *in vitro* de las nanopartículas para liberación controlada en células senescentes. En este apartado se presenta el diseño del nanodispositivo y se describen los diferentes sólidos con los que se trabaja en el resto de Capítulos. La diferencia entre ellos radica en la carga encapsulada, puesto que se preparan nanopartículas cargadas con diferentes fluoróforos (para fines de detección) y nanopartículas cargadas con diferentes fármacos (para fines terapéuticos). En todos los casos el sistema está funcionalizado con un galacto-hexa-sacárido que actúa como puerta molecular. Se describen además las diferentes técnicas de caracterización estándar, como estudios de difracción de rayos X, microscopía de transmisión electrónica, etc.

Una vez caracterizados los diferentes sólidos, y habiéndose validado el correcto funcionamiento de la puerta molecular en presencia del estímulo de β -

galactosidasa, se procede a estudiar el comportamiento del sistema en modelos tanto celulares como murinos de diferentes enfermedades relacionadas con procesos de senescencia. Así pues, en el cuarto Capítulo se describe en primer lugar cómo el sistema cargado con el fluoróforo rodamina B es capaz de liberar preferencialmente su carga en células senescentes, tanto en cultivo celular como en modelo *in vivo* de ratón. A continuación se presenta un modelo de cáncer en el que el fármaco citotóxico encapsulado en las nanopartículas – concretamente la doxorubicina – llega a las células tumorales diana en las que previamente se ha inducido senescencia con palbociclib y contribuye a la regresión del tumor. También se describe la validación de estas nanopartículas citotóxicas en un modelo de fibrosis pulmonar, en el que se demuestra que el sistema llega y elimina selectivamente las células senescentes que se acumulan como consecuencia de la enfermedad, consiguiendo así restaurar la función pulmonar. En ambos modelos se demuestra además que la encapsulación consigue reducir los efectos secundarios de la doxorubicina, entre los que cabe destacar la cardiotoxicidad. Por tanto en este Capítulo no sólo se presenta una estrategia basada en nanoterapia que podría utilizarse como tratamiento para eliminar de manera selectiva células senescentes, sino que también se describe un sistema versátil que podría utilizarse para diagnóstico por imagen clínica encapsulando trazadores o agentes de contraste.

En base a los resultados obtenidos en los modelos de melanoma y de fibrosis pulmonar, en el quinto Capítulo se describe la combinación de senogénesis (inducción de senescencia con palbociclib) y senolisis dirigida mediante nanoformulación en un modelo ortotópico de cáncer de mama triple negativo. Las nanopartículas específicas para células senescentes están cargadas en este caso con el fármaco senolítico navitoclax, cuyo uso en clínica actualmente no está aprobado debido a los efectos secundarios que provoca en el organismo. En este trabajo se ha visto que el fármaco palbociclib es capaz de inducir senescencia en un modelo de cáncer de mama triple negativo y negativo para el receptor de andrógenos, un subgrupo para el que hasta ahora no se había descrito sensibilidad. La combinación de la inducción de senescencia con el posterior tratamiento con navitoclax encapsulado en el nanosistema ha demostrado mejorar la eficacia antitumoral, así como reducir las metástasis asociadas a este tipo de cáncer y disminuir la toxicidad sistémica vinculada al fármaco senolítico. El modelo de ratón con el que se ha trabajado es altamente agresivo y recapitula todas las características del cáncer de mama triple negativo humano, con lo cual

los resultados obtenidos son de particular relevancia en términos de translación a clínica.

Considerando que el fin último de este proyecto de tesis es el desarrollo de estrategias para eliminar células senescentes, en base a la química combinatoria en el sexto Capítulo se describe el cribado de una quimioteca de hexapéptidos para el descubrimiento de nuevos compuestos senolíticos. Como resultado del cribado se han identificado dos péptidos que han demostrado tener actividad senolítica *in vitro* en la línea celular de melanoma humano SK-MEL-103. El trabajo con los dos compuestos sigue en marcha y se sigue investigando su efecto en otros modelos celulares así como su diana de acción, puesto que el desarrollo de estos dos hexapéptidos prometedores podría llegar a permitir en un futuro la eliminación de células senescentes, tanto en procesos de enfermedad ligada a envejecimiento como en pacientes sometidos a tratamientos de quimioterapia que inducen senescencia.

Por último, en el séptimo Capítulo se resumen las conclusiones principales extraídas de los estudios con el conjunto de nanopartículas en los diferentes modelos tanto celulares como murinos, así como las conclusiones generales extraídas del desarrollo de esta tesis doctoral. En la actualidad y debido al envejecimiento poblacional, existe un gran interés económico por el desarrollo de nuevos fármacos que mejoren la calidad de vida en pacientes de edad avanzada o con patologías relacionadas con la edad, como es el cáncer. La conclusión principal de la tesis plantea que el desarrollo de nanomateriales mesoporosos de sílice para la liberación controlada de fármacos se presenta como una nueva estrategia con gran potencial en el campo de las enfermedades relacionadas con procesos de senescencia, y se espera que los resultados obtenidos sirvan de base para el diseño de nuevos nanomateriales inteligentes dirigidos tanto a la detección como al tratamiento de dichas enfermedades.

La present tesi doctoral, titulada “Desenvolupament de nous nanodispositius terapèutics aplicats al tractament de malalties relacionades amb processos de senescència”, es centra en el disseny, preparació, caracterització i avaluació funcional (tant *in vitro* com a *in vivo* en diferents models cel·lulars i murins) d’un conjunt de nanomaterials híbrids orgànic-inorgànics, basat en nanopartícules mesoporoses de sílice que porten per càrrega molècules fluorescents o terapèutiques i que estan funcionalitzades amb galacto-sacàrids. Estos galacto-sacàrids actuen com portes moleculars, i són els responsables de controlar la alliberació de les molècules encapsulades de manera selectiva en cèl·lules senescentes.

En el primer Capítol, corresponent a la Introducció, es presenta l’escenari biològic sobre el qual es basa aquesta tesi, la senescència. També es presenten els diferents conceptes relacionats amb la nanomedicina, els materials mesoporosos, les portes moleculars i la alliberació controlada de fàrmacs, així com la interacció de les nanopartícules amb les cèl·lules i l’organisme i la seua possible aplicació com a teràpia.

A continuació, en el segon Capítol, s’exposen els objectius generals de la present tesi doctoral així com els objectius concrets que s’abordaran en els diferents Capítols experimentals.

El tercer Capítol recull el procés de síntesis i de caracterització estructural i funcional *in vitro* de les nanopartícules per alliberació controlada en cèl·lules senescentes. En este apartat es presenta el disseny del nanodispositiu i es descriuen els diferents sòlids amb els que es treballa en la resta de Capítols. La diferència entre ells radica en la càrrega encapsulada, ja que es preparen nanopartícules carregades amb diferents fluoròfors (per a fins de detecció) i nanopartícules carregades amb diferents fàrmacs (per a fins terapèutics). En tots els casos el sistema està funcionalitzat amb un galacto-hexa-sacàrid que actua com a porta molecular. Es descriuen a més les diferents tècniques de caracterització estàndard, com estudis de difracció de raigs X, microscòpia de transmissió electrònica, etc.

Una vegada caracteritzats els diferents sòlids, i havent-se validat el correcte funcionament de la porta molecular en presència de l'estímul de β -galactosidasa, es procedeix a estudiar el comportament del sistema en models tant cel·lulars com murins de diferents malalties relacionades amb processos de senescència. Així doncs, en el quart Capítol es descriu en primer lloc com el sistema carregat amb el fluoròfor rodamina B es capaç d'alliberar de manera preferencial la seua càrrega en cèl·lules senescentes, tant en cultiu cel·lular com en model *in vivo* de ratolí. A continuació es presenta un model de càncer en el que el fàrmac citotòxic encapsulat en les nanopartícules – concretament la doxorubicina – arriba a les cèl·lules tumorals diana en les que prèviament s'ha induït senescència amb palbociclib i contribueix a la regressió del tumor. També es descriu la validació d'estes nanopartícules citotòxiques en un model de fibrosis pulmonar, en el que es demostra que el sistema arriba i elimina selectivament les cèl·lules senescentes que s'acumulen com a conseqüència de la malaltia, aconseguint així restaurar la funció pulmonar. En ambos models es demostra a més que la encapsulació aconsegueix reduir els efectes secundaris de la doxorubicina, entre els que cap destacar la cardiotoxicitat. Per tant en aquest Capítol no sols es presenta una estratègia basada en nanoteràpia que podria utilitzar-se com a tractament per a eliminar de manera selectiva cèl·lules senescentes, sino que també es descriu un sistema versàtil que podria utilitzar-se per a diagnòstic per imatge clínica encapsulant traçadors o agents de contrast.

En base als resultats obtinguts en els models de melanoma i de fibrosis pulmonar, en el quint Capítol es descriu la combinació de senogènesis (inducció de senescència amb palbociclib) i senolisis dirigida mitjançant nano-formulació en un model ortotòpic de càncer de mama triple negatiu. Les nanopartícules específiques per a cèl·lules senescentes estan carregades en este cas amb el fàrmac senolític navitoclax, l'ús del qual en clínica actualment no està aprovat degut als efectes secundaris que provoca en l'organisme. En aquest treball s'ha vist que el fàrmac palbociclib es capaç d'induir senescència en un model de càncer de mama triple negatiu i negatiu per al receptor d'andrògens, un subgrup per al qual fins ara no s'havia descrit sensibilitat. La combinació de la inducció de senescència amb el posterior tractament amb navitoclax encapsulat en el nanosistema ha demostrat millorar la eficàcia antitumoral, així com reduir les metàstasis associades a aquest tipus de càncer i disminuir la toxicitat sistèmica vinculada al fàrmac senolític. El model de ratolí amb el que s'ha treballat és altament agressiu i recapitula totes les característiques del càncer de mama triple negatiu humà, per

tant els resultats obtinguts són de particular rellevància en termes de translació a clínica.

Considerant que el fi últim d'este projecte de tesi es el desenvolupament d'estratègies per a eliminar cèl·lules senescentes, en base a la química combinatòria en el sext Capítol es descriu el garbellat d'una quimioteca d'hexapèptids per al descobriment de nous compostos senolítics. Com a resultat del garbellat s'han identificat dos pèptids que han demostrat tindre activitat senolítica *in vitro* en la línia cel·lular de melanoma humà SK-MEL-103. El treball amb els dos compostos segueix en marxa i es continua investigant el seu efecte en altres models cel·lulars així com la seua diana d'acció, ja que el desenvolupament d'estos dos hexapèptids prometedors podria arribar a permetre en un futur la eliminació de cèl·lules senescentes, tant en processos de malaltia lligada a envelliment com en pacients sotmesos a tractaments de quimioteràpia que indueixen senescència.

Per últim, en el Capítol set es resumeixen les conclusions principals que s'extrauen dels estudis amb el conjunt de nanopartícules en els diferents models tant cel·lulars com murins, així com les conclusions generals extretes del desenvolupament d'aquesta tesi doctoral. En l'actualitat i degut al envelliment poblacional, existeix un gran interès econòmic per el desenvolupament de nous fàrmacs que milloren la qualitat de vida en pacients d'edat avançada o amb patologies relacionades amb l'edat, com és el càncer. La conclusió principal de la tesi planteja que el desenvolupament de materials mesoporosos de sílice per a la alliberació controlada de fàrmacs es presenta com una nova estratègia amb gran potencial en el camp de les malalties relacionades amb processos de senescència, i s'espera que els resultats obtinguts servisquen de base per al disseny de nous nanomaterials intel·ligents dirigits tant a la detecció com al tractament de dites malalties.

Abstract ●

This PhD thesis, entitled “Design and developing of new therapeutic nanodevices for the treatment of diseases related to senescence processes”, is focused on the design, preparation, characterization and functional evaluation (both *in vitro* and *in vivo*, in different cellular and murine models) of a set of hybrid organic-inorganic nanomaterials, based on mesoporous silica nanoparticles loaded with fluorescent or therapeutic molecules and functionalized with galacto-saccharides. These galacto-saccharides act as molecular gates, and control the encapsulated cargo release selectively in senescent cells.

The first Chapter, corresponding to a general Introduction, includes an overview of the biologic scenario in which this thesis is based on: senescence. Also the different concepts related to nanomedicine, mesoporous materials, molecular gates and drug controlled released are presented, as well as the biologic nanoparticles interaction with cells and organism and their possible therapeutic application.

Next, in the second Chapter, the general objectives of this PhD thesis and the specific objectives that will be addressed in the following experimental Chapters are presented.

The third Chapter recapitulates the synthesis process and the nanoparticles structural and *in vitro* functional characterization for controlled released in senescent cells. In this section the design of the nanodevice is presented, and the different solids that will be studied in the following Chapters are described. These solids differentiate from each other in the encapsulated cargo, as some nanoparticles are loaded with different fluorophores (for detection) and others are loaded with different therapeutic drugs. In all cases the system is functionalized with galacto-hexa-saccharides acting as molecular gates. As well in this Chapter several standard characterization techniques are described, such as X ray diffraction, electronic transmission microscopy, etc.

After the full characterization of the nanoparticles set, and once the correct behaviour of the molecular gate has been already validated in presence of the external stimuli of β -galactosidase, the next step consists of the study of the nanosystem in both cellular and murine models of different senescence-related

diseases. Therefore, the fourth Chapter describes how nanoparticles loaded with the fluorophore rhodamine B are able to preferentially release their cargo in senescent cells, in cell cultures and also in *in vivo* mouse model. Then a cancer model is presented, in which the cytotoxic drug encapsulated in the nanoparticles – specifically, doxorubicin – gets the targeted tumoral cells in which previously senescence has been induced by palbociclib, and contributes to tumour regression. This cytotoxic nanoparticles validation is also described in a pulmonary fibrosis model, where nanoparticles get and selectively eliminate senescent cells that are accumulated as consequence of the disease, achieving a pulmonary function recovery. Moreover, in both models it is also demonstrated that the encapsulation can reduce doxorubicin secondary effects such as cardiotoxicity. In this Chapter not only a nanotherapy-based strategy that could be used as treatment to selectively eliminate senescent cells is presented, but also a versatile system that could be used for clinic image diagnosis by contrast agents' encapsulation is described.

Based on the obtained results in melanoma and pulmonary fibrosis models, the fifth Chapter presents the combination of senogenesis (senescence induction by palbociclib) and targeted nano-formulated senolysis in an orthotopic triple negative breast cancer model. Senescence-specific nanoparticles are loaded in this case with the senolytic drug navitoclax, which clinical used is not approved because of the systemic toxicity that causes in the organism. In this work it has been demonstrated that palbociclib is able to induce senescence in a triple negative breast cancer model also negative for the androgen receptor, a new subgroup that had not been previously described as sensitive to this drug. The combination of senescence induction and subsequent encapsulated navitoclax treatment shows an improved antitumoral efficacy, as well as a metastasis reduction and a diminished systemic toxicity related to the senolytic drug. The mouse model that has been used is highly aggressive and faithfully recapitulates all the human triple negative breast cancer characteristics, so the obtained results are of particular relevance in terms of clinical translation.

Considering that the main aim of this thesis project is the development of new strategies for senescent cells elimination, and basing on combinatory chemistry, the sixth Chapter focuses on the screening of a hexapeptides library for new senolytic compounds discovery. The screening has led to the identification of two peptides with *in vitro* senolytic activity in the human melanoma cell line SK-MEL-103. Studies with both compounds are still on-going, in order to investigate their

effect in other cellular models and their molecular target. This two promising hexapeptides may allow the future elimination of senescent cells in age-related diseases, or in patients that have been treated with senescence-inducing chemotherapy.

Finally, the principal conclusions from the studies with this set of nanoparticles in the different cellular and murine models, as well as the general conclusions from this PhD thesis, are presented in Chapter seven. Today, and because of population aging, there is a big economical interest in developing new drugs for aged patients or patients with age-related diseases, such as cancer. The main conclusion proposes that the development of mesoporous silica nanoparticles for controlled drug release applications can be a new high potential strategy in the field of senescence-related diseases, and it is expected that the obtained results could be the basis for the design of new smart nanomaterials targeting both detection and treatment of this diseases.

Publicaciones ●

Los resultados de esta tesis y de otras colaboraciones han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas en el campo de la senescencia:

- **I. Galiana**, M. Alfonso, A. Bernardos, B. Lozano-Torres, M. Sancho, V. Bisbal, M. Serrano, R. Martínez-Mañez, M. Orzáez. Pre-clinical antitumor efficacy of combined senescence-inducing chemotherapy with targeted nanotherapeutic senolysis. *Submitted*, **2019**.
- D. Muñoz-Espín, M. Rovira, **I. Galiana**, C. Giménez, B. Lozano-Torres, M. Paez-Ribes, S. Llanos, S. Chaib, M. Muñoz-Martín, *et al.* A versatile drug delivery system targeting senescent cells. *EMBO Mol Med*, **2018**.
- B. Lozano-Torres, **I. Galiana**, M. Rovira, E. Garrido, S. Chaib, A. Bernardos, D. Muñoz-Espín, M. Serrano, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón. An OFF-ON two-photon fluorescent probe for tracking cell senescence *in vivo*. *J Am Chem Soc*, **2017**.

A su vez, la participación en los diferentes proyectos relacionados con la senescencia a lo largo de estos años ha dado lugar a las siguientes patentes de invención:

- Compuesto para la detección de células senescentes y uso del mismo. J.F. Blandez Barradas, **I. Galiana**, A. García, B. Lozano-Torres, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón. Nº de solicitud: P201930893. Fecha de registro: 10/10/2019.
- Therapeutic Nanoparticles. A. Bernardos, **I. Galiana**, B. Lozano-Torres, R. Martínez- Mañez, F. Sancenón. Nº de solicitud: EP17382901.1. Fecha de registro: 22/12/2017.

- Therapeutic Derivatives. A. Bernardos, B. Díaz de Greñu, **I. Galiana**, B. Lozano-Torres, R. Martínez-Mañez, J. R. Murguía, F. Sancenón. Nº de solicitud: PCT/IB2017/000222. Fecha de registro: 10/02/2017.
- Péptidos senolíticos y su diana terapéutica ACAD10. **I. Galiana**, A. Estepa, M. Sancho, A. Bernardos, J.R. Murguía, R. Martínez-Mañez, M. Orzáez. *En trámites.*

Abreviaturas ●

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Análisis elemental
AEC	Célula epitelial alveolar
APTES	3-ainopropiltriétosisilano
AR	Receptor de andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	Colección americana de cultivos tipo
ATP	Adenosin trifosfato
BET	Método Brunauer-Emmet-Teller
β-Gal	β-galactosidasa
BJH	Método Barrett-Joyner-Halenda
CDK	Kinasa dependiente de ciclina
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CTLA-4	Antígeno 4 de los linfocitos T
D	Dasatinib
DDD	Dispositivos mecánicos de liberación de fármacos (<i>implanted drug delivery device</i>)
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
DRX	Difracción de rayos X
Dox	Doxorrubicina
ELVIS	<i>Extravasation via leaky vasculature followed by inflammatory cell sequestration</i>
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EPR	Efecto de permeabilidad y retención aumentada
ER	Receptor de estrógeno
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

Gal	Galactan (galacto-hexa-sacárido)
GOS	Galacto-oligo-sacárido
GRAS	Generalmente reconocida como segura
GSH	Glutati3n
Her2	Receptor del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano 2
ICG	Verde de indocianina
ICP-MS	Espectroscopía de masas acoplada inductivamente a plasma
IL	Interleukina
i.p.	Vía intraperitoneal
IPF	Fibrosis pulmonar idiopática
i.v.	Vía intravenosa
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
MCM	<i>Mobile crystalline material</i>
MiDAS	Senescencia asociada a disfunción mitocondrial
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
MSNs	Materiales mesoporosos de sílice / Nanopartículas mesoporosas de sílice
NaOH	Hidróxido de sodio
Nav	Navitoclax
NIR	Infrarrojo cercano
nm	Nanómetro
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NP	Nanopartícula
OIS	Senescencia inducida por oncogén
Palbo	Palbociclib
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldéido
PFS	Supervivencia libre de progresión
PR	Receptor de progesterona

Q	Quercetina
Rb	Proteína de retinoblastoma
Rho	Rodamina B
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA-βGal	β-galactosidasa asociada a senescencia
SAHF	Focis nucleares de heterocromatina asociados a senescencia
SASP	Fenotipo hipersecretor asociado a senescencia
SD	Desviación estándar
SEM	Error estándar de la media
SER	Sistema retículo-endotelial
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
TC	Tomografía computarizada
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
TEOS	Tetraetilortosilicato
TGA	Análisis termogravimétrico
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIS	Senescencia inducida terapéuticamente
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
UV-vis	Ultravioleta-visible
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

Tabla de contenidos ●

CAPÍTULO I ● Introducción General	1
1 Senescencia celular	3
1.1. Modelos de senescencia utilizados en investigación	5
1.2. El fenotipo senescente	6
2 Senescencia en fisiología y patología	9
3 Terapias anti- y terapias pro- senescencia	11
3.1. Palbociclib (pro-) y navitoclax (anti-)	14
4 Nanotecnología y medicina	18
4.1. El campo de la nanomedicina	20
4.2. Nanofármacos: clasificación	21
4.3. Nanofármacos aprobados por la FDA y en ensayos clínicos	24
5 La química supramolecular de los materiales híbridos orgánico - inorgánicos	26
5.1. Reconocimiento molecular y auto-ensamblaje molecular	29
6 Materiales mesoporosos como soportes inorgánicos	30
6.1. Síntesis de materiales mesoporosos de sílice	32
6.2. Funcionalización de materiales mesoporosos de sílice	34
6.3. Técnicas de caracterización de materiales mesoporosos de sílice	37
7 MSNs como sistemas estímulo-respuesta. Concepto de puerta molecular	40
7.1. Sistemas estímulo-respuesta. Concepto de puerta molecular	40
8 Nanopartículas mesoporosas como sistemas de liberación de fármacos	44
8.1. Liberación de compuestos activos: estímulos externos y estímulos internos	46
8.2. <i>Targeting</i> y entrada en la célula de las nanopartículas mesoporosas	51
8.3. Biocompatibilidad, biodistribución, biodegradabilidad y excreción de las nanopartículas mesoporosas	56
CAPÍTULO II ● Objetivos	63

CAPÍTULO III • Síntesis y caracterización <i>in vitro</i> de nanopartículas Gal·NP para liberación controlada en células senescentes	67
Resumen del capítulo	69
1 Introducción	71
2 Objetivos	74
3 Resultados y discusión	74
Diseño del sistema	74
Síntesis de los materiales	76
Caracterización estructural de los materiales	77
Caracterización funcional de los materiales: ensayos de liberación <i>in vitro</i>	84
4 Conclusión	86
5 Sección experimental. Material y métodos	87
CAPÍTULO IV • Evaluación del <i>targeting</i> y la liberación controlada de las nanopartículas en modelos de melanoma y fibrosis pulmonar	93
Resumen del capítulo	95
1 Introducción	97
2 Objetivos	105
3 Resultados y discusión	106
Validación de la liberación específica del cargo de las Gal·NPs en modelos celulares de senescencia	106
Las nanopartículas Gal·NP(Rho) liberan el fluoróforo encapsulado en un modelo <i>in vivo</i> de xenoinjerto con tratamiento de quimioterapia	109
Las nanopartículas Gal·NP(Rho) liberan el fluoróforo encapsulado en un modelo <i>in vivo</i> de fibrosis pulmonar	112
Validación de la actividad terapéutica de las nanopartículas Gal·NP cargadas con un fármaco citotóxico en modelos celulares	115
Validación de la actividad terapéutica de las nanopartículas Gal·NP(Dox) en un modelo <i>in vivo</i> de melanoma	119
Actividad terapéutica de las nanopartículas Gal·NP(Dox) en un modelo <i>in vivo</i> de fibrosis pulmonar	122
4 Conclusión	125
5 Sección experimental. Material y métodos	127

CAPÍTULO V • Combinación nanoterapéutica de senogénesis (palbociclib) y senolisis (navitoclax) en un modelo ortotópico triple negativo de cáncer de mama	135
Resumen del capítulo	137
1 Introducción	139
2 Objetivos	144
3 Resultados y discusión	145
Palbociclib induce senescencia en células 4T1 de cáncer de mama triple negativo	145
Senolisis en células 4T1 senescentes de cáncer de mama	148
Gal·NP liberan selectivamente su carga en células 4T1 tratadas con palbociclib y mejoran la IC ₅₀ del navitoclax en células senescentes	152
Imagen <i>in vivo</i> y tratamiento de xenoinjertos 4T1 de cáncer de mama triple negativo	155
4 Conclusión	164
5 Sección experimental. Material y métodos	166
CAPÍTULO VI • Identificación de nuevos compuestos senolíticos	173
Resumen del capítulo	175
1 Introducción	177
Química combinatoria	179
Quimiotecas	181
Síntesis y deconvolución de quimiotecas solubles	183
2 Objetivos	185
3 Resultados y discusión	185
Quimioteca de hexapéptidos y diseño del ensayo de rastreo posicional	185
Cribado de la quimioteca	190
Ensayos de validación de la actividad senolítica de H8 y H14	194
4 Conclusión	197
5 Sección experimental. Material y métodos	198
CAPÍTULO VII • Conclusiones	201

Capítulo I •

Introducción general

1 | Senescencia celular

La senescencia celular se define como un estado estable de arresto del ciclo celular en respuesta a diferentes estímulos, en el que las células detienen su proliferación y adquieren un fenotipo alterado.¹ El concepto fue descrito formalmente en 1961 por Hayflick y Moorhead en fibroblastos diploides humanos cultivados *in vitro*, quienes demostraron que las células normales tienen una capacidad limitada de división como consecuencia del acortamiento de los telómeros tras sucesivas replicaciones.² Este fenómeno hoy en día se conoce como **senescencia replicativa**, si bien hay otros muchos estímulos de estrés que pueden disparar la respuesta de senescencia celular.^{1,3}

El número de estímulos que inducen senescencia, así como los mecanismos implicados, pueden variar en función del tipo celular y de las condiciones de inducción. Los diferentes estímulos desencadenan una serie de respuestas que se agrupan en la activación de distintas rutas moleculares, que en la mayoría de los casos convergen en la activación del supresor tumoral p53 y provocan la sobreexpresión de los inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (CDK) p16, p15, p21 y p27. La inhibición de estos complejos CDK-ciclina resulta en el arresto de la proliferación celular, como consecuencia de la hipo-fosforilación de la **proteína de retinoblastoma** (Rb) que se une e inhibe al factor de transcripción E2F, evitando la progresión del ciclo (**Figura 1**).³

La senescencia celular se ha relacionado con condiciones fisiológicas normales pero también patológicas: por un lado promueve la remodelación tisular durante el desarrollo o tras daño en el tejido, pero por otro también contribuye al declive del potencial regenerativo y funcional de los tejidos, a la inflamación y a la tumorigénesis en organismos envejecidos (**Figura 2**). Esta dualidad se conoce como **pleiotropía antagonista**, de manera que en condiciones fisiológicas o en ciertas patologías la senescencia puede actuar como mecanismo de defensa para detener la progresión de la enfermedad, mientras que en otras puede contribuir a su desarrollo.³

¹ HERNANDEZ-SEGURA A., NEHME J., DEMARIA M. *Hallmarks of cellular senescence*. Trends Cell Biol. **2018**, 28(6): 436 – 53.

² HAYFLICK L., MOORHEAD P.S. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res. **1961**, 1: 585 – 621.

³ MUÑOZ-ESPÍN D., SERRANO M. *Cellular senescence: from physiology to pathology*. Nat Rev Mol Cell Biol. **2014**, 15(7): 482 – 96.

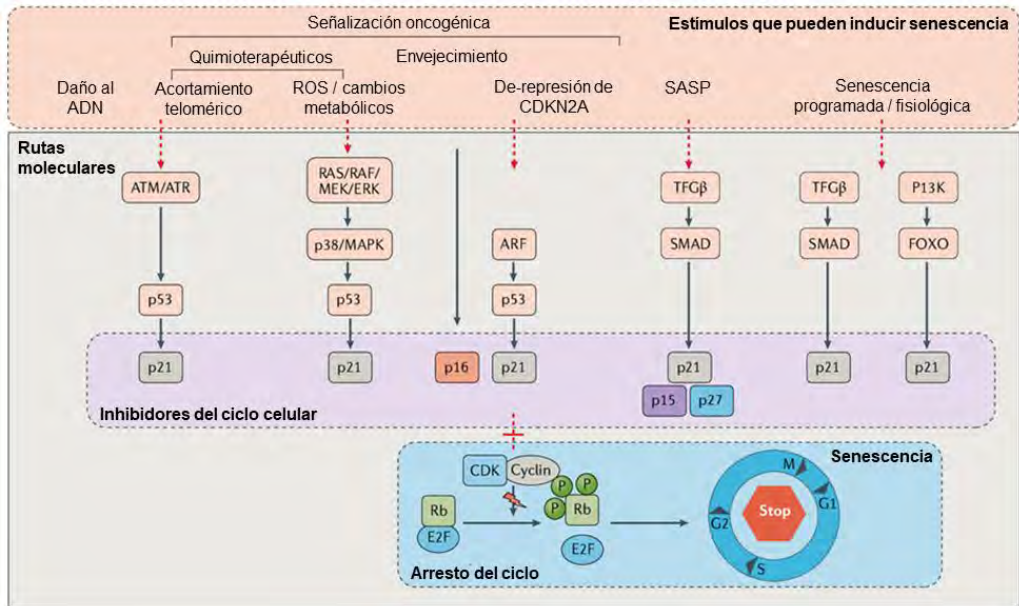


Figura 1. Inducción de senescencia y rutas moleculares implicadas en el arresto del ciclo celular. Son varios los estímulos que pueden disparar distintas rutas de señalización que convergen en la sobreexpresión de inhibidores del ciclo celular, como p21 y p16Ink4a. Estos inhibidores impiden que los complejos CDK-ciclina fosforilen a la proteína del retinoblastoma, de manera que el factor de transcripción E2F no se libera y la célula no entra en ciclo. Adaptado a partir de *Nat Rev Chem*. 2019, 3: 426 – 441. © 2019 Springer Nature Limited.

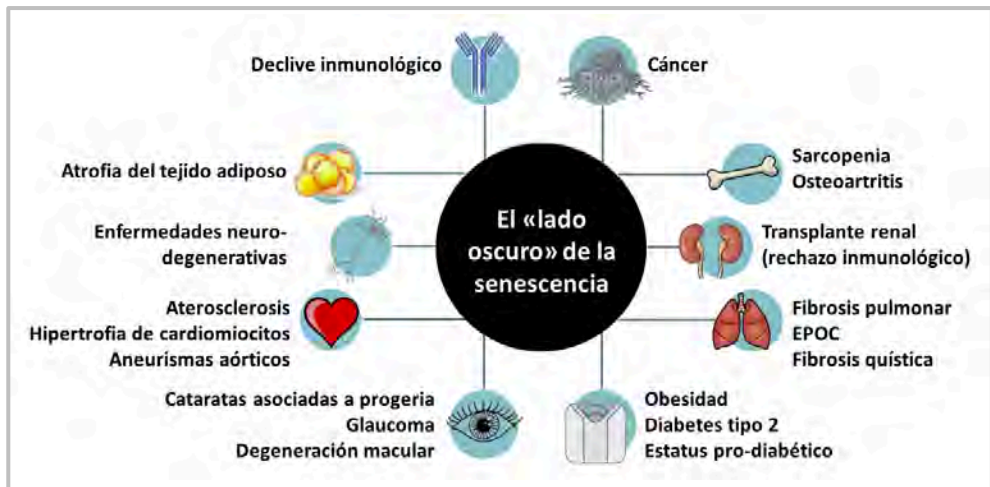


Figura 2. El “lado oscuro” de la senescencia. Adaptado a partir de *Pharmacol Ther*. 2019, 193: 31 – 49. Creative Commons license, Open Acces.

1.1. Modelos de senescencia utilizados en investigación

Se pueden distinguir, de acuerdo a su origen, distintos “tipos de senescencia”:¹

- Senescencia replicativa: hace referencia a la bajada del potencial de proliferación que ocurre en la célula después de múltiples divisiones, y que finalmente da lugar al arresto irreversible del ciclo celular.
- Senescencia inducida por daño al ADN: un daño irreparable en el ADN puede conducir tanto a un estado de senescencia como a apoptosis, en función de la magnitud del daño. *In vitro* se utilizan distintos agentes para inducir daño en el ADN, como radiación (ionizante o ultravioleta) o fármacos.
- Senescencia inducida por oncogén (OIS): se produce por activación de oncogenes como Ras o BRAF, o por la inactivación de supresores tumorales como PTEN.
- Senescencia inducida por estrés oxidativo: tanto productos oxidativos derivados del metabolismo celular como agentes oxidantes (como el agua oxigenada) pueden inducir senescencia. Este estrés oxidativo no sólo produce daño en el ADN, sino que también puede afectar a otros componentes o procesos celulares.
- Senescencia inducida terapéuticamente (TIS): son muchos los fármacos anticancerígenos que pueden inducir senescencia. Entre ellos los hay que producen un daño en el ADN (como la bleomicina o la doxorubicina), mientras que otros actúan a través de diferentes mecanismos como la inhibición de CDKs (por ejemplo, abemaciclib o palbociclib).
- Senescencia asociada a disfunción mitocondrial (MiDAS): el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) es bastante característico de este tipo de senescencia, que se ha descrito recientemente y surge como consecuencia de inducir la pérdida de mitocondrias.
- Senescencia inducida epigenéticamente: concretamente, por agentes inhibidores de ADN metilasas (como la 5-aza-2'-deoxicitidina) o por histona deacetilasas (como butirato de sodio).
- Senescencia paracrina: senescencia inducida por el SASP producido por otra célula senescente vecina.

1.2. El fenotipo senescente

La senescencia celular en cultivo *in vitro* suele ir acompañada de una serie de cambios morfológicos. Sin embargo, *in vivo* las células conservan una morfología normal en el marco de la arquitectura del tejido en el que se encuentren.

A pesar de la variedad en las causas que pueden inducir senescencia, existen una serie de características fenotípicas y biomarcadores moleculares que – usados en combinación – se han aceptado como comunes para definir el estado senescente tanto en células en cultivo como en tejidos (Figura 3). El conocimiento de todas estas características fenotípicas de las células senescentes es imprescindible para su detección y para el desarrollo de nuevas terapias. Entre estas características se encuentran el aumento del tamaño celular, el arresto de la división celular y una actividad secretora especializada conocida como **fenotipo secretor asociado a senescencia** (SASP). Este fenotipo senescente normalmente viene acompañado de un aumento de la secreción de factores pro-inflamatorios y remodeladores de tejido (TGF- β , NF- κ B, IL-1a, IL-6, IL-8, quimiocinas, metaloproteinasas...), la inducción de genes anti-apoptóticos, un metabolismo activo pero alterado y estrés de retículo endoplasmático.³

Otras características del fenotipo senescente incluyen: la expresión nuclear de inhibidores del ciclo celular y supresores tumorales (p15, p16, p21, p27, p53, Rb hipo-fosforilada), la ausencia de marcadores proliferativos (como Ki67), la expresión de marcadores de daño al ADN y la presencia de *focis* nucleares de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF).⁴ Recientemente, también la acumulación de lipofuscina se ha establecido como un *hallmark* de las células senescentes.^{5,6,7}

⁴ a) MYRIANTHOPOULOS V., EVANGELOU K., VASILEIOU P.V.S *et al.* *Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy.* Pharmacol Ther. **2019**, 193: 31 – 49. b) LOZANO-TORRES B., ESTEPA-FERNÁNDEZ A., ROVIRA M., ORZÁEZ M., *et al.* *The chemistry of senescence.* Nature Reviews Chemistry. **2019**, 3: 426 – 441.

⁵ CHILDS B.G., GLUSCEVIC M., BAKER D.J., LABERGE R.M., MARQUESS D., DANANBERG J., *et al.* *Senescent cells: An emerging target for diseases of ageing.* Nat Rev Drug Discov. **2017**, 16(10): 718 – 35.

⁶ RODIER F., CAMPISI J. *Four faces of cellular senescence.* J Cell Biol. **2011**, 192(4): 547 – 56.

⁷ HE S., SHARPLESS N.E. *Senescence in health and disease.* Cell. **2017**, 169(6): 1000 – 1011.

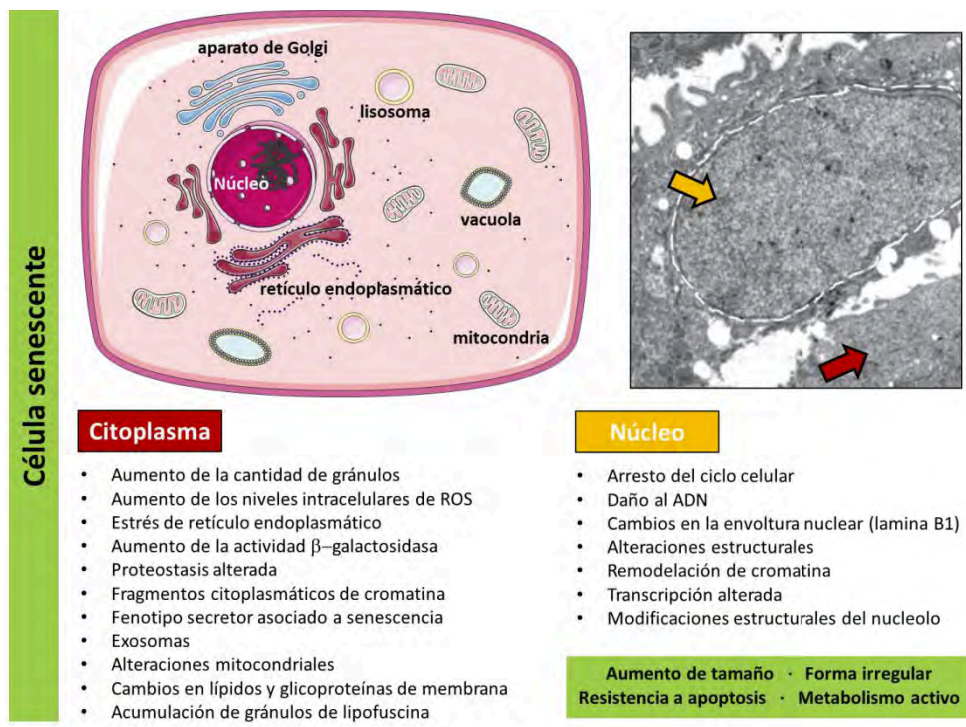


Figura 3. Detalle de las principales características de las células senescentes especificadas según el compartimento celular. Adaptado a partir de *Pharmacol Ther.* 2019, 193: 31 – 49. Creative Commons license, Open Acces.

Como consecuencia de los cambios en estas rutas de señalización las células senescentes muestran una serie de cambios estructurales, entre los que se incluyen una morfología plana, vacuolizada y de mayor tamaño, una composición alterada de la membrana plasmática, la acumulación de lisosomas y mitocondrias y cambios estructurales a nivel nuclear (en ocasiones se trata de células multinucleadas) (Figura 3).^{1,4}

Finalmente, uno de los marcadores de senescencia de mayor relevancia y más ampliamente utilizado es la actividad aumentada de la enzima β -galactosidasa lisosomal, conocida como actividad **β -galactosidasa asociada a senescencia**, (SA- β Gal). Dicho incremento de actividad es consecuencia del elevado contenido lisosomal presente en células senescentes y va a ser clave en el desarrollo del presente proyecto de tesis.³ De hecho, el ensayo más utilizado para la determinación de senescencia es la detección histoquímica de actividad SA- β Gal a pH 6, cuyas bases se detallan a continuación.

❖ Tinción de actividad β -galactosidasa

Las células senescentes se caracterizan por un arresto del ciclo celular irreversible en G1 y son resistentes a la proliferación mediada por mitógenos, por lo que no sintetizan ADN. Sin embargo, esta característica no puede emplearse para su detección, pues también está presente en otras células del organismo (como las células quiescentes o las diferenciadas de manera terminal). El rasgo fenotípico que distingue a las células senescentes de estas otras células que tampoco se dividen, y que ha sido extensamente empleado para su detección desde que fue descrito en 1995, es la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia.^{8,9} Esta actividad se debe a un incremento en la masa lisosomal de las células senescentes, que posibilita la actividad de dicho enzima a un pH sub-óptimo de 6 en lugar de pH 4-4.5, al que suele funcionar normalmente de manera óptima.¹⁰

El ensayo de tinción de actividad SA- β Gal se basa en la hidrólisis del sustrato permeable X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) por parte del enzima β -galactosidasa en condiciones de pH 6, liberándose un compuesto azulado que precipita y es detectable a simple vista. El sustrato X-Gal está compuesto por una molécula de galactosa, reconocida por la enzima β -galactosidasa, unida a 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol. Este último compuesto, al ser liberado por hidrólisis, se oxida y dimeriza de manera espontánea formando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo (tal y como se observa en la [Figura 4](#)), un sólido insoluble de color azul que tiñe las células senescentes.

La clave del ensayo reside en el pH 6, que permite que a pesar de que todas las células presenten actividad β -galactosidasa, sólo las senescentes muestren actividad a este pH sub-óptimo debido al alto contenido de la enzima que presentan.

⁸ DIMRI G. P., LEE X., BASILE G., ACOSTA M., SCOTT G., ROSKELLEY C. et al. *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. **1995**, 92: 9363–9367.

⁹ ITAHANA K., ITAHANA Y. & DIMRI G. P. *Colorimetric detection of senescence-associated (beta) galactosidase*. Methods Mol Biol. **2013**, 965: 143-156.

¹⁰ a) KURZ D. J., DECARY S., HONG Y. & ERUSALIMSKY J. D. *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. J Cell Sci. **2000**, 113: 3613–3622. b) LEE B.Y., HAN J.A., IM J.S., MORRONE A., JOHUNG K., et al. *Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase*. Aging Cell. **2006**, 5: 187 – 195.

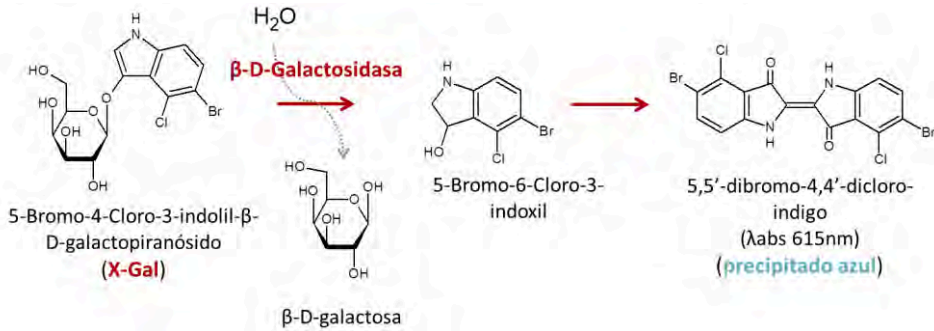


Figura 4. Reacción de hidrólisis de X-Gal por la enzima β -galactosidasa y liberación de un compuesto azulado.

2 | Senescencia en fisiología y en patología

El objetivo general de la senescencia es la eliminación de células no deseadas en el organismo. En condiciones fisiológicas, juega un papel clave en la respuesta ante daño o estrés y en la reparación y remodelación tisular (procesos de cicatrización o *wound healing*). Su papel fisiológico en el desarrollo del embrión está bien establecido, participando en la formación de varias estructuras anatómicas transitorias durante el proceso de organogénesis y regulando la proporción de diferentes tipos celulares (siendo un mecanismo complementario a la apoptosis). Así, por ejemplo, se detectan células senescentes en el mesonefros o en el saco endolinfático del oído interno.^{3,11} La senescencia también ocurre en tejidos adultos sanos, siendo mecanismo de maduración de megacariocitos y sincitiotrofoblastos de la placenta y actuando como sistema de protección del organismo.

En este sentido, ante la existencia de daño celular las células pueden iniciar un programa de senescencia que activa una secuencia de procesos que involucran al sistema inmune y que finalizan en la eliminación de células senescentes y la regeneración tisular. Sin embargo, este proceso fisiológico puede verse alterado, particularmente en tejidos envejecidos en los que el sistema inmune deja de funcionar correctamente. En esta situación las células senescentes no se eliminan de forma eficiente y su acumulación, lejos de favorecer la regeneración, puede agravar la disfunción tisular y contribuir al desarrollo de numerosas

¹¹ STORER M., MAS A., ROBERT-MORENO A., PECORARO M., ORTELLS M.C., DI GIACOMO V., *et al.* *Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning.* Cell. **2013**, 155(5): 1119 – 1130.

enfermedades.^{3,5,6,12,13} De hecho, aunque el SASP en condiciones normales contribuye a la eliminación de células pre-malignas, refuerza el estado de senescencia y colabora en la remodelación y reparación de los tejidos, en condiciones patológicas puede contribuir por ejemplo a la progresión tumoral al estimular la aparición de fenotipos asociados a células tumorales agresivas, proporcionando así un nicho ideal para la proliferación de células cancerígenas o contribuyendo a la transición epitelio-mesenquimal.^{1,5,8}

La acumulación de células senescentes contribuye también a establecer una inflamación crónica no resuelta que aparece debido a la continua secreción de citoquinas pro-inflamatorias como parte del SASP, siendo esta condición (acuñada en inglés como ***inflamm-aging***) una característica generalizada de la mayoría de enfermedades relacionadas con el envejecimiento.¹⁴

Por lo tanto, pese a que el propósito biológico general de la senescencia es la eliminación de células no deseadas, lo cual es particularmente relevante en cáncer y envejecimiento (**Figura 5**, panel superior),³ ante daños persistentes o en tejidos envejecidos este proceso beneficioso se puede corromper; de forma que la eliminación de células senescentes deja de ser eficiente y da pie a su acumulación, normalmente asociada con inflamación crónica y fibrosis (**Figura 5**, panel inferior).

¹² MCHUGH D., GIL J. *Senescence and aging : Causes , consequences , and therapeutic avenues*. J Cell Biol. **2018**, 217(1): 1 – 13.

¹³ SCHOSSERER M., GRILLARI J., BREITENBACH M. *The dual role of cellular senescence in developing tumors and their response to cancer therapy*. Front Oncol. **2017**, 7(278).

¹⁴ FRANCESCHI C., *et al*. *Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence*. Ann NY Acad Sci. **2000**, 908: 244 – 254.

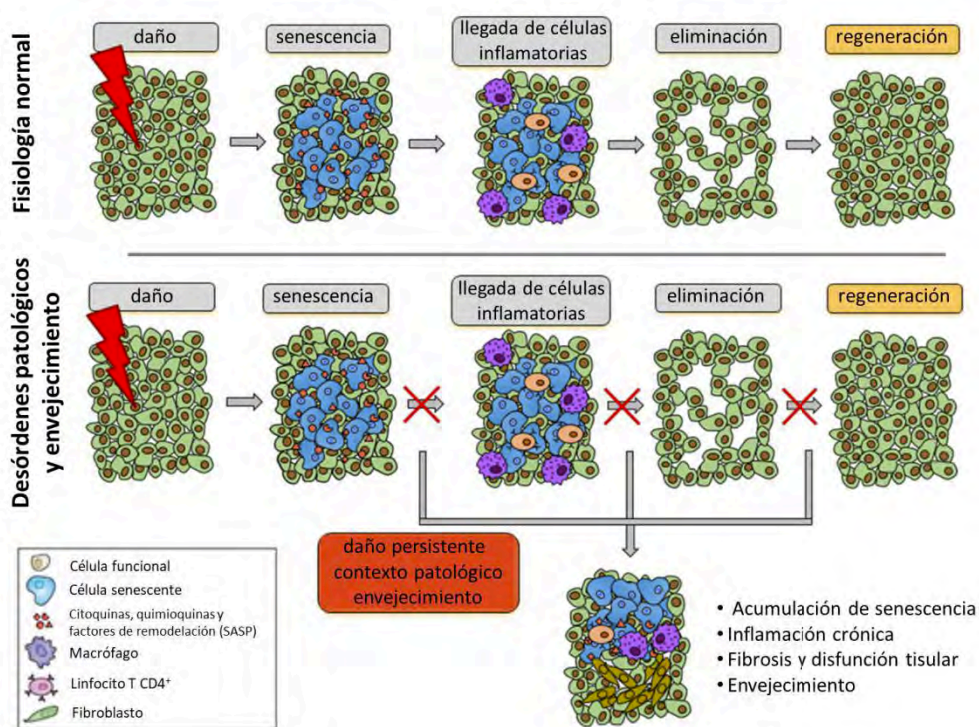


Figura 5. Modelo propuesto del papel que juega la senescencia en condiciones fisiológicas y patológicas. Adaptado a partir de *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014, 15(7): 482 – 96. Copyright © 2014, Springer Nature.

3 | Terapias anti- y terapias pro- senescencia

La población mundial está envejeciendo rápidamente, aumentando con ello la vulnerabilidad ante la aparición de patologías crónicas. Vivir hasta edades avanzadas ha pasado a suponer un reto importante en cuanto al desarrollo de estrategias farmacológicas que puedan hacer frente a su tratamiento. De hecho, el envejecimiento es el factor de riesgo en cabeza en las patologías más prevalentes, incluyendo enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas.¹⁵ Sin embargo el envejecimiento es heterogéneo, y se requiere investigación para elucidar las rutas moleculares y celulares comunes que lo dirigen. Entre ellas, uno de los factores emergentes es la acumulación de células senescentes en los tejidos.

¹⁵ LÓPEZ-OTÍN C., BLASCO M.A., PARTRIDGE L., SERRANO M., KROEMER G. *The hallmarks of aging.* Cell. 2013, 153(6): 1194 – 1217.

Como se ha dicho, existe una amplia evidencia experimental que demuestra que las células senescentes pueden jugar un doble rol. Si bien la senescencia durante el desarrollo o la senescencia aguda que se da en el organismo adulto asegura el correcto desarrollo y homeostasis de órganos y tejidos, es la senescencia crónica la que se relaciona con la edad y la que supone el desarrollo y la progresión de enfermedades relacionadas con el proceso de envejecimiento.

En 1997, gracias a los estudios de Serrano *et al*, se descubrió que la senescencia celular se podía inducir “prematuramente” mediante la expresión del oncogen Ras, lo que sugería que podía estar ligada con el cáncer.¹⁶ Años más tarde, en 2005, se identificaron células senescentes en lesiones pre-malignas pero no en lesiones más avanzadas, corroborando esto que la senescencia inducida por oncogén podía ser un mecanismo de supresión tumoral.¹⁷ Fue sin embargo el estudio publicado en 2011 por el grupo de van Deursen el que tuvo gran impacto sobre el campo de la senescencia, puesto que demostraba que la eliminación de células senescentes podía favorecer la desaparición de enfermedades relacionadas con la edad. De hecho, el grupo diseñó un modelo de ratón (INK-ATTAC) para validar el papel causal de la senescencia en innumerables enfermedades. Con su trabajo no sólo quedó expuesto el inesperado potencial de la eliminación selectiva de dichas células, beneficioso para el tratamiento de enfermedades tan diversas como cáncer, aterosclerosis, osteoartritis o glaucoma; sino que también quedaba patente que la eliminación de células senescentes podía mejorar la esperanza de vida.¹⁸

Concretamente en el cáncer, una de las enfermedades más graves relacionadas con la edad y que va a tener un papel protagonista en el desarrollo de este proyecto de tesis, la senescencia actúa de manera dual: en estadios tempranos la inducción de células senescentes tiene un papel de **supresión tumoral**, al frenar la proliferación de las células cancerosas y favorecer su eliminación por el sistema inmune; pero en estadios más avanzados la senescencia puede favorecer la **progresión del tumor** a través del fenotipo hipersecretor SASP. Además, aunque la senescencia se ha considerado siempre como un arresto irreversible y permanente del ciclo celular, nuevos estudios (todavía controvertidos) sugieren que, bajo ciertas condiciones, las células senescentes pueden escapar de esta condición y volver a entrar en ciclo, adquiriendo de esta forma carácter agresivo.^{4,19,20,21}

¹⁶ SERRANO M., *et al*. *Oncogenic Ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. *Cell*. **1997**, 88: 593 – 602.

¹⁷ NARITA M., LOWE S.W. *Senescence comes of age*. *Nat Med*. **2005**, 11: 920 – 922.

¹⁸ BAKER D.J. *et al*. *Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders*. *Nature*. **2011**, 479: 232 – 236.

¹⁹ GALANOS, P., PAPPAS, G., POLYZOS, A., KOTSINAS, A., SVOLAKI, I., GIAKOUMAKIS, N. N., *et al*. *Mutational signatures reveal the role ofRAD52 in p53-independent p21-driven genomic instability*. *Genome Biology*. **2018**, 19(37).

Así pues, la senescencia celular emerge como un arma de doble filo, en la que **terapias pro-senescentes** ayudan a combatir enfermedades, pero deben ir combinadas con posteriores **tratamientos anti-senescencia**. Como en el caso del cáncer, en ocasiones la senescencia puede frenar el desarrollo de la patología y se presenta como un desenlace deseable en el tratamiento de la enfermedad; pero la acumulación de células senescentes puede suponer también el origen de muchas patologías. En este contexto se propone el uso de terapias complementarias, que bien eliminen o al menos inhiban el fenotipo secretor de las células senescentes (**Figura 6**).



Figura 6. Terapia combinada para el tratamiento del tumor: inducción de senescencia en células tumorales (terapia pro-senescencia) seguida de tratamiento para eliminar las células tumorales senescentes inducidas (terapia anti-senescencia).

Durante los últimos años se han desarrollado varios fármacos capaces de inducir o reforzar el estado de senescencia, entre los que se incluyen inhibidores de la actividad telomerasa, reactivadores de genes supresores tumorales o moduladores de CDKs.^{22,23} De hecho, los inhibidores de CDK4/6 abemaciclib,²⁴ palbociclib²⁵ y ribociclib²⁶ se han aprobado recientemente por la *Food and Drug*

²⁰ GALANOS, P., VOUGAS, K., WALTER, D., POLYZOS, A., MAYA-MENDOZA, A., HAAGENSEN, E. J., et al. *Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing*. *Nature Cell Biology*. **2016**, 18: 777 – 789.

²¹ KOMSELI, E. S., PATERAS, I. S., KREJSGAARD, T., STAWISKI, K., RIZOU, S. V., POLYZOS, A., et al. *A prototypical non-malignant epithelial model to study genome dynamics and concurrently monitor micro-RNAs and proteins in situ during oncogene-induced senescence*. *BMC Genomics*. **2018**, 19(37).

²² ACOSTA J.C., GIL J. *Senescence: A new weapon for cancer therapy*. *Trends Cell Biol*. **2012**, 22(4): 211 – 219.

²³ SIEBEN C.J., STURMLECHNER I., VAN DE SLUIS B., VAN DEURSEN J.M. *Two-step senescence-focused cancer therapies*. *Trends Cell Biol*. **2018**, 28(9): 723 – 737.

²⁴ GOLDMAN J.W., SHI P., RECK M., PAZ-ARES L., KOUSTENIS A., HURT K.C. *Treatment rationale and study design for the JUNIPER study: A randomized Phase III study of Abemaciclib with best supportive care versus Erlotinib with best supportive care in patients with stage IV non-small-cell lung cancer with a detectable KRAS mutati*. *Clin Lung Cancer*. **2016**, 17(1): 80 – 84.

²⁵ FINN R.S., DERING J., CONKLIN D., KALOUS O., COHEN D.J., DESAI A.J., et al. *PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro*. *Breast Cancer Res*. **2009**, 11(5): 1 – 13.

Administration (FDA) para el tratamiento de cáncer de mama metastásico y receptor de estrógeno (ER) positivo en combinación con terapia endocrina, mostrando los mejores resultados obtenidos hasta la fecha de supervivencia libre de progresión (PFS; por sus siglas en inglés *progression-free survival*).^{27,28}

Por otro lado, tanto la detección como la eliminación de células senescentes se han convertido en un objetivo esencial en el campo de la investigación biomédica, siendo el principal fin el desarrollo de terapias anti-senescencia. Hasta la fecha, son dos las principales categorías de fármacos anti-senescencia que se han introducido en investigación básica y clínica: la primera incluye compuestos que son capaces de eliminar de manera específica células senescentes, llamados fármacos **senocídicos** o **senolíticos**; y la segunda incluye a los compuestos **senomórficos**, fármacos que suprimen los marcadores moleculares de senescencia o el SASP, sin inducir la muerte celular.⁴

En el siguiente apartado se detalla el mecanismo molecular y las aplicaciones actuales del palbociclib y del navitoclax, dos fármacos pro- y anti- senescencia respectivamente, que van a tener un papel fundamental en este trabajo.

3.1. Palbociclib (pro-) y navitoclax (anti-)

El palbociclib es un inhibidor oral altamente específico capaz de bloquear la actividad de las quinasas CDK4/CDK6 dependientes de ciclina D1, impidiendo de esta manera que la célula pueda iniciar el ciclo de división celular (**Figura 7**).^{25,29}

Finn y colaboradores estudiaron profundamente el potencial del palbociclib frente a distintos sub-tipos de cáncer de mama, resultando ser las líneas celulares ER positivas con carácter luminal su mejor diana.²⁵ En base a los resultados pre-clínicos derivados de terapias endocrinas combinadas con el tratamiento con palbociclib,²⁵ y después de varios ensayos clínicos (PALOMA-1, PALOMA-2, PALOMA-3)^{#1} este fármaco se administra actualmente como terapia en combinación con letrozol o fulvestrant para el tratamiento de pacientes de cáncer de mama avanzado de tipo ER+/Her2-.

²⁶ GEOERGER B., BOURDEAUT F., DUBOIS S.G., FISCHER M., GELLER J.I., GOTTARDO N.G., *et al.* A phase I study of the CDK4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) in pediatric patients with malignant rhabdoid tumors, neuroblastoma, and other solid tumors. *Clin Cancer Res.* **2017**, 23(10): 2433 – 2441.

²⁷ KWAPISZ D. *Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib.* *Breast Cancer Res Treat.* **2017**, 166(1): 41 – 54.

²⁸ PERNAS S., TOLANEY S.M., WINER E.P., GOEL S. *CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions.* *Ther Adv Med Oncol.* **2018**, 10: 1 – 15.

²⁹ FRY D.W., HARVEY P.J., KELLER P.R., ELLIOTT W.L., MEADE M., TRACHET E., *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther.* **2004**, 3(11): 1427 – 1438.

Nota #1. Un primer estudio aleatorio fase I/II (PALOMA-1) comparaba la actividad de palbociclib más letrozol versus sólo letrozol, y la notable mejora de la supervivencia libre de progresión que se obtuvo con la terapia combinada dio lugar a un ensayo faso III (PALOMA-2). Este segundo ensayo confirmó el elevado potencial, la eficacia y la seguridad de combinar palbociclib y letrozol como tratamiento inicial en pacientes post-menopáusicas avanzadas ER+/Her2-. En aquellas pacientes que presentaban progresión tumoral tras haber sido sometidas previamente a terapia endocrina, un ensayo PALOMA-3 mostró mejoras en cuanto a supervivencia libre de progresión al combinar palbociclib con fulvestrant, respecto al tratamiento únicamente con éste último fármaco.^{30,31,32,33,34,35}

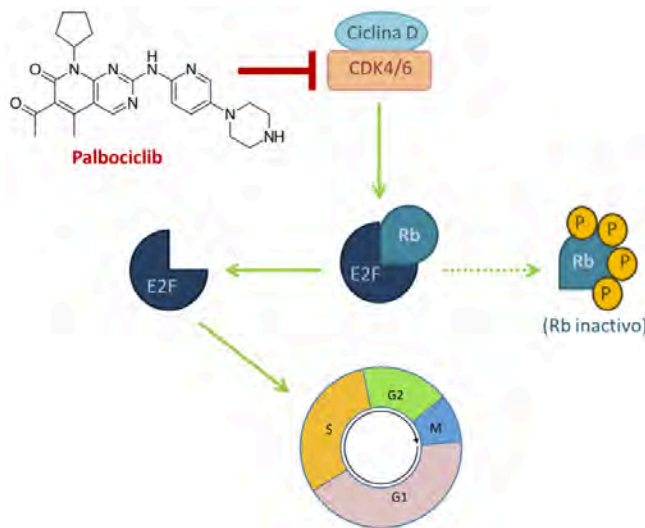


Figura 7. Mecanismo de actuación del fármaco palbociclib. En la fase G1 del ciclo celular las células deben pasar un punto de *checkpoint* para poder completar el ciclo y dividirse. El complejo de kinasas CDK4/CDK6 junto con la ciclina D es quien lleva a cabo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb), la cual permite que la célula supere ese *checkpoint* y entre en división. El palbociclib inhibe la acción de CDK4/6, con lo cual el complejo CDK4/6 – ciclina D no puede llevar a cabo su función de fosforilación y la célula no puede proseguir el ciclo.

- ³⁰ BEAVER J.A., AMIRI-KORDESTANI L., CHARLAB R., CHEN W., PALMBY T., TILLEY A., *et al.* FDA approval: Palbociclib for the treatment of postmenopausal patients with estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* **2015**, 21(21): 4760 – 4766.
- ³¹ FINN R., CROWN J., LANG I., BOER K. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2. *Lancet Oncology.* **2015**, 16(1): 25 – 35.
- ³² CHIU J.W., KWOK G., YAU T., LEUNG R. Editorial to “Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer”. *Transl Cancer Res.* **2017**, 6(S2): S376 – S379.
- ³³ TRAINA T., CADOO K., GUCALP A. Palbociclib: an evidence-based review of its potential in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther.* **2014**, 6: 123.
- ³⁴ TURNER N.C., RO J., ANDRÉ F., LOI S., VERMA S., IWATA H., *et al.* Palbociclib in hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* **2015**, 373(3): 209 – 219.
- ³⁵ CRISTOFANILLI M., TURNER N.C., BONDARENKO I., RO J., IM S.A., MASUDA N., *et al.* Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **2016**, 17(4): 425 – 439.

Por otro lado, cabe mencionar que la supervivencia de las células senescentes se fundamenta, en muchos casos, en la existencia de niveles elevados de los miembros anti-apoptóticos de la familia de proteínas BCL-2. Esta familia agrupa a dos grandes categorías de proteínas: las anti- (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1) y las pro- (Bax, Bak, Bim, Bid, Puma, Bad, Noxa, Bik, Bmf, Hrk) apoptóticas. En general, es el equilibrio entre las proteínas de ambas categorías el que determina si la célula vive o muere por apoptosis, a través de la llamada vía intrínseca o vía mitocondrial. Una vez activada, la vía mitocondrial de apoptosis resulta en la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, por sus siglas en inglés *mitochondrial outer membrane permeabilization*), que provoca la liberación de factores pro-apoptóticos y normalmente supone un punto de no retorno hacia el “desmantelamiento” de la célula (Figura 8, panel superior).³⁶

Tal y como describe Letai en su trabajo, “la permeabilización de la membrana externa mitocondrial podría considerarse como un precipicio. Consideramos que aquellas células que se encuentran cerca del borde del precipicio están muy “preparadas” (o “primadas”) para sufrir apoptosis, mientras que aquellas células más alejadas del borde estarían relativamente “no preparadas” (Figura 8, panel inferior).^{37,38}

En este sentido, las células senescentes se han catalogado como resistentes a la muerte por apoptosis, por lo que su supervivencia depende en gran medida de los niveles de proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2. Así pues, son células que van a ser hipersensibles a la apoptosis inducida por compuestos inhibidores de las defensas anti-apoptóticas de dicha familia.^{39,40,41,42}

³⁶ CHEN J., JIN S., ABRAHAM V., HUAN X., et al. *The Bcl-2/Bcl-XL/Bcl-w inhibitor, navitoclax, enhances the activity of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo.* Mol. Cancer Ther. **2011**, 10(12): 2340 – 2349.

³⁷ POTTER D.S., LETAI A. To prime, or not to prime: That is the question. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2016, LXXXI:030841.

³⁸ SAROSIEK K.A., NI CHONGHAILE T., LETAI A. Mitochondria: Gatekeepers of response to chemotherapy. Trends Cell Biol. 2013, 23(12): 612 – 619.

³⁹ BAAR M.P., BRANDT R.M.C., PUTAVET D.A., KLEIN J.D.D., DERKS K.W.J., BOURGEOIS B.R.M., et al. *Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging.* Cell. **2017**, 169(1): 132 – 147.

⁴⁰ ZHU Y., TCHKONIA T., FUHRMANN-STROISSNIGG H., et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. Aging Cell. 2016, 15(3): 428 – 435.

⁴¹ WANG E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress Bcl-2 is involved. Cancer Res. 1995, 55(112): 2284 – 2292.

⁴² ZHU Y., TCHKONIA T., PIRTSKHALAVA T., GOWER A.C., et al. The Achilles’ hell of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. Aging Cell. 2015: 644 – 658.

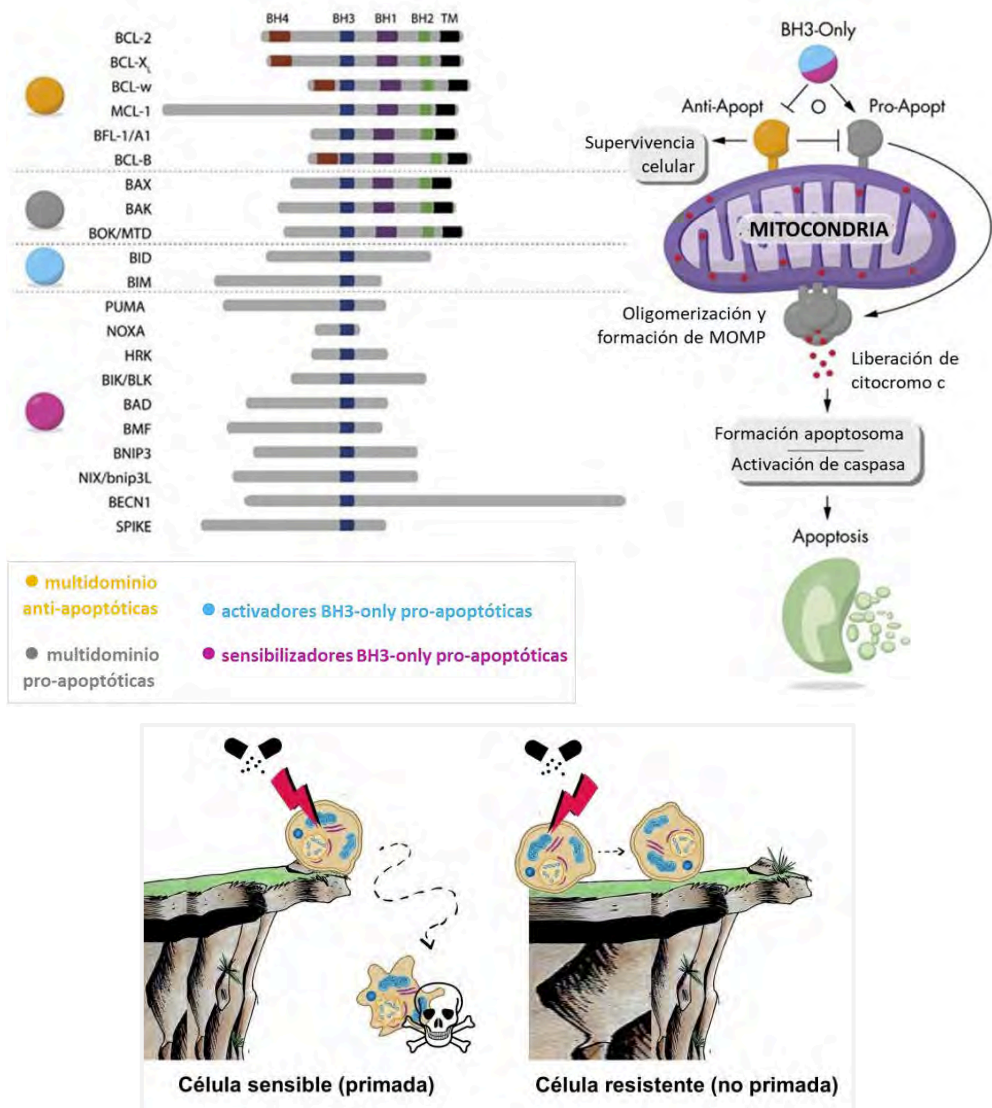


Figura 8. Proteínas pro- y anti-apoptóticas pertenecientes a la familia BCL-2 (superior, izquierda). Representación de la vía intrínseca de la apoptosis (superior derecha). En respuesta ante señales de estrés, las interacciones entre los distintos miembros de la familia BCL-2 en la membrana externa mitocondrial determinan si la célula va a sobrevivir o si los miembros pro-apoptóticos van a oligomerizar y dar lugar a MOMP, con la subsiguiente liberación de factores (citocromo c) y muerte celular por apoptosis. Abajo, representación gráfica del concepto de “priming” mitocondrial. Adaptado a partir de *Cell Death & Differentiation*. 2017, 24: 1348–1358. Copyright © 2017, Springer Nature.

El navitoclax es un compuesto senolítico también conocido como ABT-263. Se trata de un fármaco oral perteneciente al grupo de inhibidores de proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2, concretamente con elevada afinidad ($< 1\text{nmol/L}$) por Bcl-2, Bcl-XL y Bcl-w. Si bien se hablará más en detalle sobre él en el Capítulo V cabe destacar que, a pesar de su excelente capacidad de inhibición de esta familia de proteínas, su uso clínico está limitado y actualmente no está aprobado por la FDA, puesto que provoca un efecto grave de trombocitopenia como consecuencia de la inhibición de Bcl-XL.^{47,48}

Considerando los posibles efectos secundarios asociados a fármacos pro- y anti-senescencia, y la implicación de la senescencia en el desarrollo de patologías graves como el cáncer, resulta necesario desarrollar nuevas estrategias que permitan lograr una terapia dirigida específicamente a eliminar células senescentes, sin generar efectos perjudiciales en el resto del organismo. Es en este punto donde la nanotecnología y la nanomedicina pueden aportar soluciones que cumplan estos requerimientos.

4 | Nanotecnología y medicina

El conocimiento científico a lo largo de milenios se ha generado a partir del estudio de las cosas a nivel macroscópico, progresando posteriormente en el estudio y comprensión de sus sub-componentes hasta los máximos niveles de detalle. En el campo de la biología se ha seguido también un camino reduccionista, empezando con el estudio empírico de objetos y organismos en su totalidad – incluyendo al ser humano. A lo largo de los años los estudios continuaron hacia niveles de menor escala, como órganos, tejidos, células y finalmente moléculas (incluyendo ADN y ARN, la base molecular de la vida en forma de código genético). En este contexto, a la era contemporánea de la medicina frecuentemente se la hace llamar la “era molecular”, habiéndose convertido la biología molecular en la base de muchas investigaciones. Habiendo pues alcanzado un “plateau molecular”, la cuestión evidente era hacia dónde se dirigiría en el futuro el campo de las biociencias. Dos son las direcciones de estudio actual que dependen en gran medida de los descubrimientos basados en la biología molecular: la biología de sistemas y la nanotecnología.

⁴⁷ CHANG J., WANG Y., SHAO L., LABERGE R-M., DEMARIA M., CAMPISI J., et al. Clearance of senescent cells by ATB263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* 2015, 22(1): 78 – 83.

⁴⁸ KILE B.T. The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol.* 2014, 165(2): 217 – 226.

El prefijo “nano” hace referencia a una billonésima, de forma que aplicado en la escala métrica de medidas lineales, un **nanómetro** (nm) es la billonésima parte de un metro (10^{-9} m).⁴⁹ Teniendo esto en cuenta, la ciencia nanométrica (o nanociencia) estudia los fenómenos, las propiedades y las respuestas de los materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, comprendiendo por lo general tamaños inferiores a $0.1\mu\text{m}$ ($1\text{-}100\text{nm}$). La nanotecnología se define por tanto como la ciencia e ingeniería que participa en el diseño, la manipulación, la producción y la aplicación controlando forma, tamaño y funcionalidad de estructuras, dispositivos y sistemas del orden de como máximo 100nm .

Es importante tener en cuenta que la nanotecnología no es por sí misma una disciplina emergente, sino que es el conjunto de diferentes ciencias tradicionales (como química, física, ciencia de los materiales y biología) que se unen para desarrollar estas nuevas tecnologías.^{50,51} En la **Figura 9** se pueden ver objetos y unidades vivas cuyo tamaño comprende la nanoescala, así como también se muestran para poder comparar otras estructuras biológicas u organismos de mayor orden, cuyos tamaños comprenden la micro- y la macroescala.

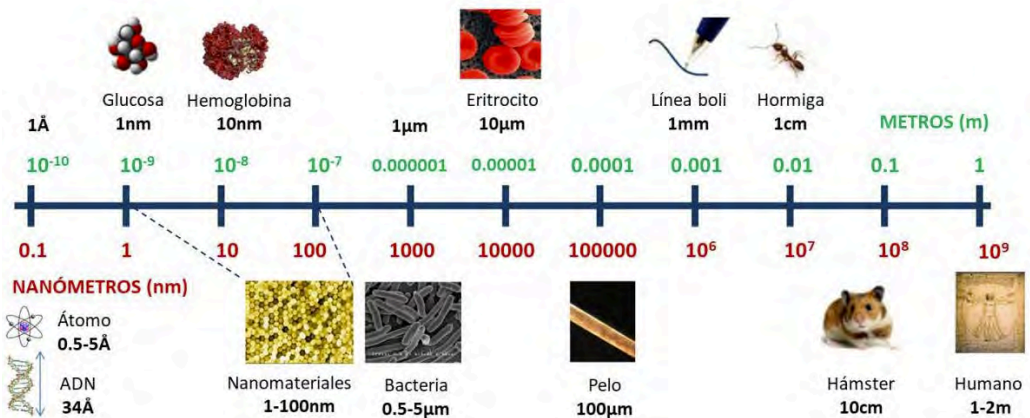


Figura 9. Objetos y organismos vivos cuyos tamaños comprenden la nanoescala, así como estructuras biológicas y organismos de mayor orden de tamaño.

⁴⁹ THRALL J.H. *Nanotechnology and medicine*. Radiology. **2004**, 230(2): 315 – 318.

⁵⁰ LOGOTHETIDIS S. *Nanotechnology in medicine: the medicine of tomorrow and nanomedicine*. Hippokratia. **2006**, 10(1): 7 – 21.

⁵¹ SAINI R., SAINI S., SHARMA S. *Nanotechnology: the future medicine*. J Cutan Aesthet Surg. **2010**, 3(1): 32 – 33.

La nanotecnología ofrece la posibilidad de mejorar productos ya existentes y de crear nuevos productos de características y funciones totalmente nuevas con enorme potencial en numerosas aplicaciones, y son muchas las razones por las cuales los científicos de muchas áreas (no sólo biología, sino también física, química, ingeniería, materiales...) se han interesado en comprender y trabajar en la escala nanométrica.

De hecho, la nanotecnología tiene un gran impacto positivo en el campo de la salud humana. Si nos centramos en el campo de la biología, los sistemas biológicos están compuestos por “bloques” nanométricos: la anchura de una molécula de ADN es de aproximadamente 2.5nm, las dimensiones de la mayoría de las proteínas están en el rango de 1 a 15 o 20nm, y la anchura de las membranas celulares es de 6-10nm. Además, muchos de los procesos relevantes que tienen lugar en los organismos vivos ocurren básicamente a escala nanométrica. Es decir, la mayor parte de la investigación en biología molecular ocurre en el rango nanométrico. Gracias a la nanotecnología todas estas unidades biológicas se pueden conocer y estudiar mejor, de manera que se pueden guiar o dirigir según intereses.^{49,50}

4.1. El campo de la nanomedicina

La convergencia de los avances nanotecnológicos recientes con la biología moderna y la medicina ha dado lugar a una nueva área de investigación: la nanomedicina. La nanomedicina se podría definir como una rama de la nanotecnología altamente específica a escala molecular con propósitos terapéuticos y de diagnóstico cuyas aplicaciones se centrarían en varias áreas, entre las que estarían:

- Diagnóstico, imagen y monitorización.
- Diseño de prótesis y biomateriales de mayor durabilidad y mejores propiedades (ingeniería tisular).
- Terapias dirigidas en ámbitos como cardiología y cáncer.
- Desarrollo de sistemas de liberación selectiva de fármacos (nanodispositivos).
- Desarrollo de “nanorobots” (por ejemplo el “respirocito” – un eritrocito mecánico; o el “microbívoro – un leucocito artificial).
- Medicina regenerativa.
- (...)

Poder miniaturizar hasta la escala nanométrica tanto productos como procesos biomédicos puede llegar a ser esencial en la era post-genómica. Los dispositivos nanométricos pueden ser de entre 100 y 10.000 veces más pequeños que las células humanas, pero similares en tamaño a biomoléculas grandes como enzimas y receptores. Los sistemas nanométricos pueden entrar fácilmente en la mayoría de las células, y aquellos más pequeños de 20nm pueden incluso atravesar los vasos sanguíneos y circular por todo el organismo.

El objetivo de la nanomedicina se centra pues en mejorar la salud del paciente mejorando la eficacia y la seguridad de los nanosistemas y nanodispositivos, esperándose poder obtener diagnósticos tempranos, implantes con propiedades mejoradas, tratamientos frente al cáncer y tratamientos mínimamente invasivos para enfermedades cardíacas o diabetes.⁵⁰ Si bien ya hay más de 50 nanofármacos aprobados por la FDA,⁵² sí que es cierto que la entrada de las nanomedicinas en la práctica clínica será gradual y tomará su tiempo debido a la regulación que las respalda y a la necesidad de conocer los efectos sistémicos de su administración. Sin embargo, en los próximos años la nanotecnología jugará un papel clave en la medicina del mañana, proporcionando grandes oportunidades para la detección temprana de enfermedades y el desarrollo de procedimientos de diagnóstico y terapéuticos.

4.2. Nanofármacos: clasificación

La mayor parte de las patologías se tratan administrando medicamentos. Algunos de ellos son pequeñas moléculas químicas, mientras que otros son moléculas biológicas. Sin embargo, la administración sistémica de fármacos puede generar efectos secundarios, por lo que la industria farmacéutica (y los pacientes) buscan conseguir mejoras en la misma – sobre todo en el caso de los fármacos inyectables.

Una de las posibilidades de dichas mejoras, que se ha estudiado durante años, es la encapsulación de los compuestos en “transportadores”, si bien la nanotecnología ofrece medios para poder dirigir las terapias directa y selectivamente a las células o tejidos dañados (con aplicaciones, por ejemplo, en cáncer o inflamación). El comportamiento de los nanomateriales utilizados en administración *in vivo* debería, eso sí, primero comprobarse en cuanto a términos de biocompatibilidad y biodegradabilidad.

⁵² BOBO D., ROBINSON K.J., *et al.* *Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date.* *Pharm Res.* **2016**, 33: 2373 – 2387.

Los nanofármacos se pueden dividir en distintas categorías, en función de cómo vayan a funcionar (**Figura 10**):⁵³

- ❖ Así pues, por un lado estarían los **sistemas nanoparticulados de transporte de fármacos**, categoría en la cual se engloban el DoxilTM, el AbraxaneTM o los Lipidots[®] (ya comercializados).

Estos sistemas vectorizan los principios activos, protegiéndolos, dirigiéndolos y reduciendo sus efectos tóxicos asociados, y se clasifican según generación:

- Vectores de primera generación: nanoesferas y nanocápsulas.
 - Vectores de segunda generación: nanopartículas recubiertas con polímeros hidrofílicos como el politetilenglicol (PEG).
 - Vectores de tercera generación: todavía en desarrollo, combinan un núcleo biodegradable y un recubrimiento polimérico con ligandos de membrana.
- ❖ Por otro lado estarían los nanotransportadores que funcionan por **targeting pasivo**, es decir, se basan en un proceso pasivo conocido como “**efecto de permeabilidad y retención aumentada**” (EPR). Por su tamaño y propiedades de superficie, algunas nanopartículas pueden escapar del torrente sanguíneo y llegar a tejido. Los tumores por su parte presentan gran acumulación de vasos y tienen un drenaje linfático pobre, lo cual también consigue que las nanopartículas se acumulen y concentren el fármaco citotóxico.⁵⁴

Otra estrategia de transporte pasivo ha sido el uso de células mieloides – como los macrófagos – las cuales absorben nanopartículas y las concentran en el sitio de tratamiento, actuando a modo de caballo de Troya.^{55,56}

- ❖ En contrapartida están los nanofármacos que se basan en el **targeting activo**, que son capaces de llegar de forma dirigida a los sitios diana basándose en moléculas que se expresen en su superficie.⁵⁷ El sistema funcionaría anclando las moléculas que van a ser reconocidas por receptores específicos en la superficie de las nanopartículas, dirigiéndose así el sistema específicamente a aquellas células o tejidos que sobre-expresen dichos receptores.

⁵³ BOISSEAU P., LOUBATON B. *Nanomedicine, nanotechnology in medicine (Nanoscience and nanotechnologies: hopes and concerns)*. C R Physique. **2011**: 620 – 636.

⁵⁴ a) VALLET-REGÍ M., COLILLA M., IZQUIERDO-BARBA I., MANZANO M. *Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: Current insights*. *Molecules*. **2018**, 23(1): 1 – 19. b) SU Y.L., HU S.H. *Functional nanoparticles for tumor penetration of therapeutics*. *Pharmaceutics*. **2018**, 10(4): 1 – 21. c) GIMÉNEZ C., DE LA TORRE C., GORBE M., AZNAR E., SANCENÓN F., MURGUÍA J.R., et al. *Gated mesoporous silica nanoparticles for the controlled delivery of drugs in cancer cells*. *Langmuir*. **2015**, 31(12): 3753 – 3762.

⁵⁵ NAKAYAMA M. *Macrophage recognition of crystals and nanoparticles*. *Frontiers in immunology*. **2018**, 9.

⁵⁶ DALZON B., GUIDETTI M., TESTEMALE D., et al. *Utility of macrophages in an antitumor strategy based on the vectorization of iron oxide nanoparticles*. *Nanoscale*. **2019**, 11: 9341.

⁵⁷ BAZAK R., HOURI M., EL ACHY S., KAMEL S., REFAAT T. *Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature*. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2015**, 141: 769.

- ❖ Una alternativa son los nanofármacos que “**destruyen desde el interior**”, como serían los “nanoshells”: compuestos de nanopartículas de oro o nanopartículas magnéticas. En este caso, estos dispositivos son capaces de destruir físicamente (térmicamente) tumores desde su interior, ya que pueden absorber luz o campos magnéticos y generar calor, logrando una muerte celular por hipertermia.⁵⁸
- ❖ Están también los **dispositivos mecánicos de liberación de fármacos**, los llamados DDD (*implanted drug delivery devices*). Se trata de sistemas que se pueden implantar en el organismo (inclusive el cerebro) para conseguir una dosificación exacta del compuesto terapéutico, los cuales cuentan con bombas y dosificadores que permiten controlar los perfiles de liberación.⁵⁹ Un ejemplo sería el dispositivo Nanopump™ (Debiotech).
- ❖ Finalmente estarían los **nanofármacos teragnósticos**, que combinan diagnóstico y tratamiento gracias a la capacidad de algunas nanopartículas para encapsular agentes de contraste y compuestos farmacológicos.

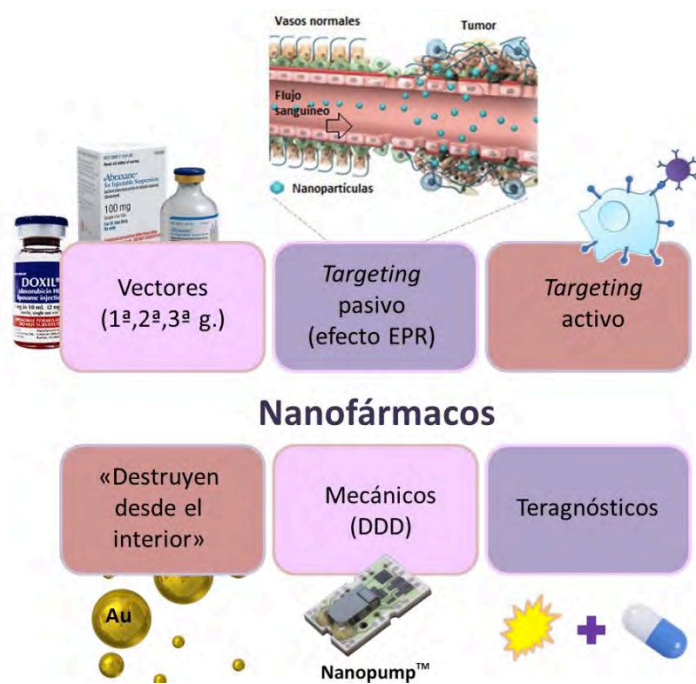


Figura 10. Nanofármacos: clasificación.

⁵⁸ BARDHAN R., LAL S., SOSHI A., HALAS N.J. *Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment cancer*. Acc Chem Res. **2011**, 44(10): 936 – 946.

⁵⁹ LAVAN D.A., MCGUIRE T., LANGER R. *Small-scale systems for in vivo drug delivery*. Nature Biotechnology. **2003**, 21: 1184 – 1191.

En resumen, la nanomedicina ha desarrollado sistemas muy variados de nanopartículas y estructuras como sistemas de carga y liberación de fármacos, así como dispositivos para el diagnóstico de enfermedades. Todos estos sistemas citados se basan principalmente en liposomas, polímeros terapéuticos (micelas poliméricas, dendrímeros, conjugados polímero-proteína o polímero-fármaco), nanocristales o nanopartículas sólidas, si bien se trata de un campo en continua expansión en el que se desarrollan nuevos transportadores continuamente.

4.3. Nanofármacos aprobados por la FDA y en ensayos clínicos

La FDA, perteneciente al gobierno de Estados Unidos, es el organismo que regula las autorizaciones de acceso al mercado de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos; de manera que, al igual que ocurre con los fármacos y dispositivos tradicionales, las nanomedicinas también están sujetas a su procedimiento habitual de validación tanto pre-clínica como clínica. En concreto, el campo de la nanomedicina está presenciando una rápida evolución; por ejemplo en sólo tres años (2013-2016) el número de ensayos clínicos relacionados con componentes nanoparticulados se triplicó. Sin embargo, para lograr la aprobación por la FDA, cada vez es más importante tener el máximo conocimiento sobre los parámetros físico-químicos del material y de la reproducibilidad y escalabilidad del proceso de su proceso de fabricación.

Correspondiendo a una recopilación realizada en 2016, la **Figura 11** muestra que, desde mediados de los años 90, se han aprobado por periodo de 5 años aproximadamente una media de 13 nanofármacos para aplicaciones clínicas específicas. Esto incluye la aprobación tanto de nuevos materiales (51 productos únicos) como el uso de materiales ya aprobados previamente pero destinados para nuevas indicaciones clínicas (p.e. el Abraxane® está aprobado para varias especificaciones). El número de aceptaciones por parte de la FDA tuvo un pico de aumento en el periodo 2001-2005, con una caída posterior alrededor de 2008 – tendencia que posiblemente esté relacionada con las limitaciones en financiación asociadas a la crisis financiera mundial que estalló ese año.

La mayor parte de estos nanofármacos aprobados por la FDA se agrupan en las categorías de partículas poliméricas, liposómicas o de tipo nanocristal, si bien es cierto que la tendencia evoluciona hacia el desarrollo de materiales más complejos agrupados en otras categorías. En este sentido, y en términos de categoría de los materiales que se encuentran en ensayo clínico (alrededor de unos 77), son sobre todo partículas basadas en micelas y proteínas o partículas metálicas e inorgánicas las que se encuentran en el proceso de desarrollo.

En cuanto a cifras, el número de nanomedicinas que han conseguido la aprobación para emprender ensayos clínicos ha aumentado remarcablemente desde 2007, alcanzando su máximo (según los datos recogidos en el estudio al que se está haciendo referencia) en los años 2014-2015.⁵²

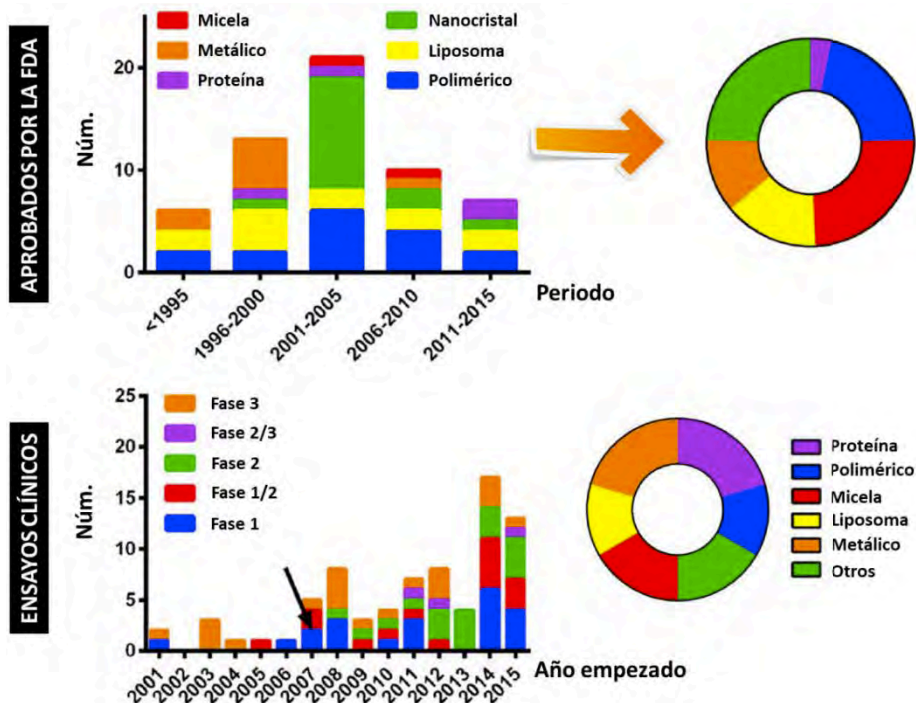


Figura 11. Tendencias en el desarrollo de nanofármacos. En el panel superior se representa: a la izquierda, los nanofármacos aprobados por la FDA estratificados según categoría y periodo; a la derecha, los nanofármacos aprobados por la FDA estratificados por categoría y a nivel global. En el panel inferior se representa: a la izquierda, los ensayos clínicos identificados en clinicaltrials.gov entre 2001 y 2015, indicando la flecha la fecha aproximada en que la ley de Estados Unidos (FDAAA 801) obligó a reportar dichos los ensayos a la base de datos de la FDA; a la derecha, los nanofármacos que se encuentran en ensayo clínico, estratificados por categoría a nivel global. Adaptado a partir de *Pharm. Res.* 2016, 33: 2373 – 2387. Copyright © 2016, Springer Science Business Media New York.

Haciendo referencia a los materiales mesoporosos de sílice como nuevos nanofármacos – puesto que es el caso que nos va a ocupar en la presente tesis – la FDA considera la sílice como “generalmente reconocida como segura” (o **GRAS**, por sus siglas derivadas de *generally recognized as safe*), y aunque su uso sí que está aprobado en cosméticos y como aditivo alimentario, en el campo de la nanomedicina todavía no se han completado ensayos clínicos que involucren nanopartículas mesoporosas de sílice como tal. En los últimos años sí que se han

iniciado algunos ensayos clínicos que involucran los términos “silica”, “nano” y “particle” (como se puede observar en la [Figura 12](#)), estando algunos de ellos completados y otros en fase de reclutamiento.

Status	Study Title	Conditions	Phase	NCT Number	Study Start	Study Completion
Recruiting	Targeted Silica Nanoparticles for Real-Time Image-Guided Intraoperative Mapping of Nodal Metastases	<ul style="list-style-type: none"> • Head and Neck Melanoma • Breast Cancer • Colorectal Cancer 	Phase 1 Phase 2	NCT02106598	April 3, 2014	April 2020
Completed Has Results	Plasmonic Nanophothermal Therapy of Atherosclerosis	<ul style="list-style-type: none"> • Stable Angina • Heart Failure • Atherosclerosis • Multivessel Coronary Artery Disease 	Not Applicable	NCT01270139	April 1, 2007	August 1, 2016
Terminated	Plasmonic Photothermal and Stem Cell Therapy of Atherosclerosis Versus Stenting	<ul style="list-style-type: none"> • Coronary Artery Disease • Atherosclerosis 	Phase 1	NCT01436123	December 2010	October 2012
Recruiting	Evaluation of Nano-crystalline Hydroxyapatite Silica Gel in Management of Periodontal Intraony Defects	<ul style="list-style-type: none"> • Chronic Periodontitis 	Not Applicable	NCT02507596	April 2015	December 2019

Figura 12. Resultados obtenidos en ClinicalTrials.gov a fecha 10/19/2019 y con las palabras de búsqueda “silica”, “nano” y “particle”.

5 | La química supramolecular de los materiales híbridos orgánico-inorgánicos

Para poder entender los principios en los que se fundamentan los sistemas orgánico-inorgánicos utilizados en el presente proyecto de tesis, antes de introducir los materiales mesoporosos como nanosoportes para aplicaciones avanzadas cabe hablar sobre los conceptos de química supramolecular, reconocimiento molecular y auto-ensamblaje molecular, en los cuales se basa el funcionamiento de dichos sistemas.

El desarrollo de **materiales híbridos orgánico-inorgánicos** surgió con la necesidad de crear aplicaciones difíciles de conseguir utilizando componentes convencionales, por lo cual se empezó a combinar la funcionalidad de los materiales con conceptos de química supramolecular: estas aplicaciones se podrían conseguir mediante el anclaje de unidades moleculares funcionales en la superficie de los sólidos. Los soportes inorgánicos normalmente no desempeñan ninguna función. Por el contrario, las moléculas orgánicas pueden tener diferentes

funcionalidades, aunque si se encuentran en un estado “desordenado” puede que no las desempeñen como deberían. Es por eso que a finales de la década de los 80 emergió el mundo de los materiales híbridos orgánicos – inorgánicos, y con él la producción de sistemas nanoscópicos con nuevas propiedades y funciones.

Aunque la idea de combinar materiales inorgánicos con moléculas orgánicas funcionales puede parecer sencilla, llevarla a cabo supone una serie de retos a tener en cuenta. Los materiales híbridos “inteligentes” no se pueden obtener simplemente “colocando” moléculas orgánicas en un soporte inorgánico como si de un *puzzle* se tratase, sino que las funciones orgánicas en los soportes inorgánicos deben estar organizadas y orquestadas para poder llevar a cabo su acción; lo cual normalmente supone desarrollar una química sofisticada y establecer una estructura y unos patrones determinados del soporte inorgánico, todo ello en la dimensión molecular. Es entonces cuando entran en juego los conceptos de la química supramolecular y las herramientas de la nanotecnología.⁶⁰

Las moléculas se crean a partir de las uniones covalentes entre átomos. Sin embargo, a pesar de que una molécula está formada por multitud de átomos, se comporta como una entidad individual. Sería fácil pensar que las propiedades de estos materiales estuviesen directamente relacionados con las propiedades de las moléculas individuales que los forman, pero esto no es así. Es aquí donde surge la **química supramolecular**, también conocida como “la química Lego” (**Figura 13**), que se encarga de las súper-moléculas.^{61,62}

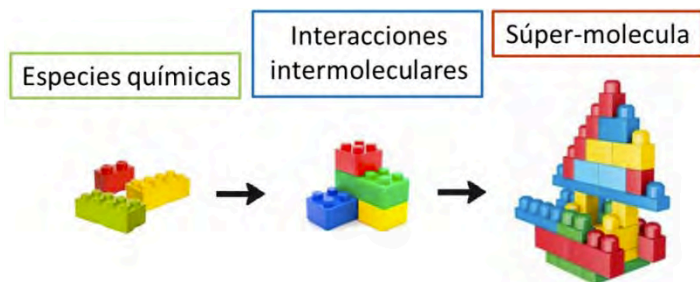


Figura 13. Representación gráfica de lo que sería una súper-molécula.

⁶⁰ RURACK K., MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. *The supramolecular chemistry of organic-inorganic hybrid materials*. WILEY, 2010.

⁶¹ ARIGA K., KUNITAKE T. *Supramolecular chemistry – fundamentals and applications*. Springer, 2006.

⁶² STEED J.W., TURNER D.R., WALLACE K.J. *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*. WILEY, 2007.

La química supramolecular normalmente se define como “la química más allá de la molécula”. Si bien ésta es una expresión un tanto extraña, para comprender los conceptos de súper-molécula o de química supramolecular se puede recurrir a una analogía de la vida cotidiana: muchos deportes se basan en equipos de jugadores, y uno de los principales objetivos en estos deportes es organizar al equipo de manera que la actuación de todo el conjunto sea mucho mejor que la suma de participaciones de cada miembro por sí mismo. O lo que es lo mismo, “el todo es más que la suma de las partes”.⁶¹

Este concepto también se puede aplicar a una súper-molécula. Según el Dr. Lehn, quien acuñó el término en 1978, una **súper-molécula** sería una entidad organizada y compleja creada a partir de la asociación de dos o más especies químicas unidas mediante **fuerzas intermoleculares débiles** (Figura 13): interacciones electroestáticas, puentes de hidrógeno, coordinación metal-ligando, interacciones π - π , fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas. Estas estructuras supramoleculares, con propiedades y funciones nuevas – y normalmente mejores – serían el resultado no sólo de la suma de estas interacciones sino también de la cooperación entre ellas.^{61,62}

Así pues, y como se representa gráficamente en la Figura 14, la química molecular estaría relacionada con el estudio de las moléculas y las estructuras moleculares originadas a partir de la formación de uniones covalentes entre átomos; mientras que la química supramolecular se centraría en el estudio de los ensamblajes moleculares que se originan a partir de las interacciones entre diferentes moléculas a través de fuerzas intermoleculares no covalentes. En términos equivalentes, las moléculas serían como personas, y la química supramolecular se encargaría del estudio de las relaciones entre ellas (estudio de la sociedad).⁶¹

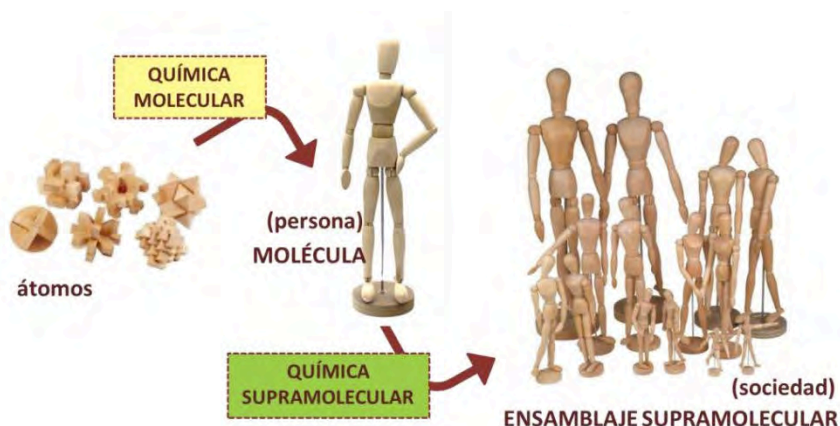


Figura 14. Explicación gráfica de los ámbitos que abarcan la química molecular y la química supramolecular.

5.1. Reconocimiento molecular y auto-ensamblaje molecular

La química supramolecular se puede dividir en dos grandes categorías: el reconocimiento molecular (o química del anfitrión-huésped) y el auto-ensamblaje molecular.

El **reconocimiento molecular** hace referencia a la química asociada con el reconocimiento de una molécula por parte de otra, es decir, se basa en la unión específica de una molécula “anfitrión” a una molécula complementaria “huésped” para formar el complejo anfitrión-huésped. Tanto el anfitrión como el huésped deben tener puntos de unión con complementariedad espacial y electrónica para poder formar la súper-molécula. Normalmente la definición de qué especie es el huésped y qué especie es el anfitrión es arbitraria, si bien en éste campo el huésped suele ser la molécula más grande que puede envolver a la otra (como una enzima o un compuesto sintético cíclico, con una cavidad o hueco). El anfitrión puede ser un catión monoatómico, un anión inorgánico simple o una molécula más sofisticada, con una forma o tamaño geométrico complementario al huésped (receptor). El principio en el que se basa el reconocimiento molecular es el de la llave y el cerrojo, en el que un huésped es capaz de discriminar entre diferentes anfitriones (Figura 15).^{62,63}

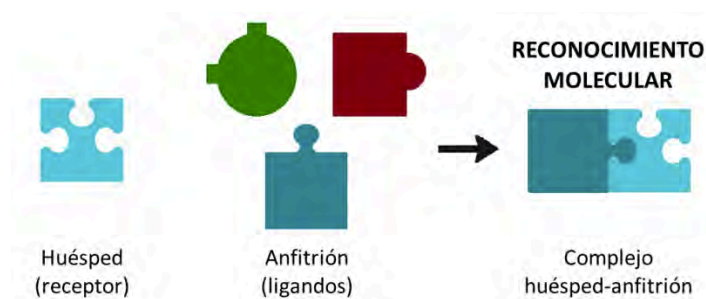


Figura 15. Representación del principio de la llave y del cerrojo, por el que se rige el reconocimiento molecular.

Por otra parte, el **auto-ensamblaje molecular** se puede definir como el proceso en el cual las moléculas adoptan espontáneamente una disposición definida debido a sus propiedades químicas (sin la guía o dirección de una fuente externa, más allá de un ambiente adecuado), y se ensamblan mediante interacciones no covalentes. El auto-ensamblaje también permite la formación de estructuras mayores como micelas, membranas, vesículas o cristales líquidos y, de hecho, es una herramienta recurrente en nanotecnología para la fabricación de nanomateriales. Cuenta con la ventaja de que la nano-estructura se forma a partir

⁶³ ATWOOD J.L., STEED J.W. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry* 1, 2. New York: Taylor & Francis Group, LLC; 2004-2005.

del ensamblaje directo y espontáneo de las moléculas participantes (con lo cual se evita el uso de equipamiento sofisticado y de pasos de manipulación a nivel atómico), además de que la estructura que se forma es termodinámicamente la más estable.

Esta tesis está relacionada con éstas dos áreas de la química supramolecular. Por un lado se desarrollan materiales basados en nanopartículas mesoporosas de sílice cuya superficie se funcionaliza con moléculas orgánicas para obtener sistemas de apertura controlada para la liberación de fármacos, proceso que recae en el principio del auto-ensamblaje. Por otro lado los procesos biológicos ocurren con frecuencia mediante el reconocimiento molecular en el que el diseño de los materiales nanoscópicos se basa: por ejemplo, la relación entre una enzima y su sitio de corte.⁶²

6 | Materiales mesoporosos como soportes inorgánicos

Según la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), los materiales porosos se pueden clasificar – según tamaño de poro – en tres categorías: microporosos, con poros inferiores a 2nm; mesoporosos, con poros entre 2 y 50nm; y macroporosos, con poros superiores a 50nm.^{64,65} En concreto, y sobre todo debido a su elevada superficie interna, los materiales micro- y mesoporosos han atraído considerable atención para el desarrollo de aplicaciones de catálisis,⁶⁶ adsorción de gases y compuestos,⁶⁷ detección química/bioquímica,⁶⁸ inmovilización de enzimas,⁶⁹ regeneración tisular biomédica⁷⁰ y liberación de fármacos.⁷¹

Las propiedades de estos materiales y, por tanto, su idoneidad para desarrollar diferentes aplicaciones, depende en gran parte de las características del sistema

⁶⁴ ZHAO X. S. *Novel porous materials for emerging applications*. *J Mater Chem*. **2006**, 16: 623-625.

⁶⁵ IUPAC, *Pure appl Chem*. **1972**, 31: 578.

⁶⁶ PEREGO C., MILLINI R. *Porous materials in catalysis: challenges for mesoporous materials*. *Chem Soc Rev*. **2013**, 42: 3956.

⁶⁷ THOMAS K.M. *Hydrogen adsorption and storage on porous materials*. *Catal Today*. **2007**, 120: 389 – 398.

⁶⁸ KILIAN K.A., BOECKING T., GAUS K., GAL M., GOODING J.J. *Peptide-modified optical filters for detecting protease activity*. *ACS Nano*. **2007**, 1: 355.

⁶⁹ ISPAS C., SOKOLOV I., ANDREESCU S. *Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications*. *Anal Bioanal Chem*. **2009**, 393: 543 – 554.

⁷⁰ VALLET-REGI M., COLILLA M., IZQUIERDO-BARBA I.J. *Bioactive mesoporous silicas as controlled delivery systems: application in bone tissue regeneration*. *J Biomed Nanotechnol*. **2008**, 4: 1 – 15.

⁷¹ SLOWING I.I., TREWYN B.G., GIRI S., LIN V.S.Y. *Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications*. *Adv Funct Mater*. **2007**, 17: 1225 – 1236.

poroso. Uno de los ejemplos más conocidos son las zeolitas, materiales microporosos de aluminosilicato ampliamente utilizados como tamices en la industria petroquímica. Sin embargo, el poro de las zeolitas suele estar entre 3 y 15Å, lo cual hace que no sean materiales apropiados para ciertas aplicaciones. Esto hizo que el interés de la investigación de las principales industrias petrolíferas se dirigiera hacia la ciencia de los materiales, para explorar la posibilidad de preparar nuevos sólidos con tamaños de poro más expandidos.

En este contexto, en 1992 un grupo de la compañía *Mobil Oil Company* presentó el desarrollo y la patente de una nueva familia de materiales mesoporosos, basados en sílice y conocida como **M41S**.^{72,73} Este tipo de materiales se caracteriza por una serie de propiedades que los hacen idóneos para múltiples aplicaciones como las anteriormente citadas, entre las que están:⁷⁴

- Elevada superficie específica (500-1000 m²g⁻¹).
- Elevado volumen específico (>1 cm³g⁻¹), además de gran porosidad y capacidad de carga.
- Tamaño modificable de poro, con una distribución uniforme de entre 2 y 10nm.
- Buena estabilidad química y térmica y fácil manejo.
- Síntesis fácil y con precursores económicos, que son lo suficientemente simples como para poder escalar la producción.
- Fácilmente modificables en cuanto a posible control de tamaño, poro y morfología según los parámetros de síntesis.
- Dos superficies funcionalizables (interna y externa) mediante química de trialcóxidosilanos.
- No tóxicos y biocompatibles con el organismo humano.

Originariamente, la familia M41S agrupa tres tipos de posibles estructuras fácilmente identificables mediante difracción de rayos X y conocidas como MCM (*Mobile Crystalline Material*), cuya obtención depende de las condiciones de pH, concentración y temperatura durante el proceso de síntesis: **MCM-41** (fase hexagonal), **MCM-48** (fase cúbica) y **MCM-50** (fase laminar) (**Figura 16**).^{75,76}

⁷² KRESGE C.T., LEONOWICZ M.E., ROTH W.J., VARTULI J.C., BECK J.S. *Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism*. Nature. **1992**, 359: 710.

⁷³ BECK J.S., VARTULI J.C., ROTH W.J., LEONOWICZ M.E., KRESGE C.T., SCHMITT K.D., *et al.* *A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates*. J Am Chem Soc. **1992**, 114: 10834 – 10843.

⁷⁴ LINÁS M., SÁNCHEZ-GARCÍA D. *Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina*. Afinidad. **2014**, 71(565).

⁷⁵ KRESGE C.T., ROTH W.J. *The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective*. Chem Soc Rev. **2013**, 42: 3663 – 3670.

⁷⁶ HOFFMAN F., CORNELIUS M., MORELL J., FRÖBA M. *Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials*. Angew Chem Int Ed. **2006**, 45: 3216 – 3251.

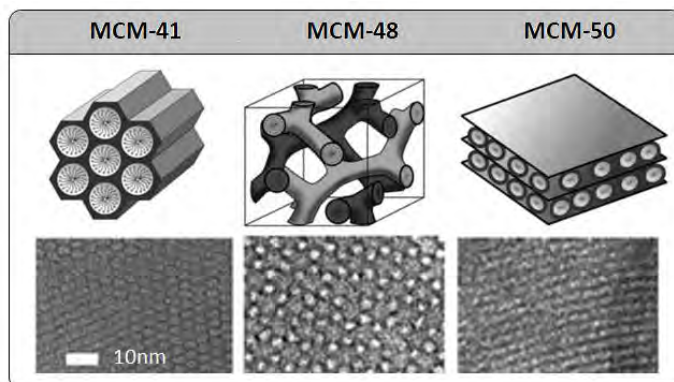


Figura 16. La familia M41S de materiales mesoporosos de sílice. Se representan las estructuras 3D con las imágenes correspondientes de microscopía de transmisión electrónica de la red porosa. Adaptado a partir de *Angew Chem Int Ed.* 2006, 45, 3216 – 3251 (Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim) y *Chem Soc Rev.* 2013, 42: 3663 – 3670.

Desde que surgieron, los materiales mesoporosos de sílice (MSNs) se han usado ampliamente como soportes inorgánicos para el desarrollo de materiales híbridos nanoscópicos, y tienen especial utilidad en aplicaciones de liberación de fármacos. De estas fases, la más estudiada y utilizada gracias a la relativa simplicidad de su síntesis y su estructura tipo “panal de abejas” es la MCM-41.

6.1. Síntesis de materiales mesoporosos de sílice

En general, la síntesis de los materiales mesoporosos se basa en el uso de un **molde** o *template* que actúa como agente director de la estructura al formar micelas en solución acuosa, y de un **precursor polimérico** que se organiza alrededor del molde y (al polimerizar) da lugar a la estructura rígida final. En otras palabras, el proceso que tiene lugar es la condensación del precursor de sílice en presencia de un surfactante catiónico en un medio básico. Se considera un proceso sol-gel, en cuanto a que supone la conversión de monómeros en solución (sol) en una red sólida integrada (gel), similar al método que describió Stöber en 1968 para obtener nanopartículas de sílice pero llevado a cabo en este caso en presencia de surfactantes.

El papel que desempeñan las moléculas de surfactante es actuar como plantilla o estructura directora formando súper-micelas (micelas individuales que se auto-ensamblan en una estructura supramolecular), sobre las cuales se condensan las moléculas precursoras. La estructura de súper-micelas que se forme dependerá de las condiciones en que tenga lugar la síntesis, como la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la naturaleza y concentración del surfactante. En general, a temperaturas moderadas, las micelas cilíndricas se agrupan formando

primeramente una fase hexagonal, que evoluciona hacia una fase cúbica y posteriormente a una estructura laminar a medida que la concentración de surfactante aumenta. Una vez las súper-micelas se han formado es cuando se añade el precursor de sílice a la solución de reacción. En este paso las moléculas del precursor silíceo se hidrolizan y forman **grupos silanol** (Si-OH), que polimerizan mediante condensación y crean una red de enlaces Si-O-Si (**Figura 17**).

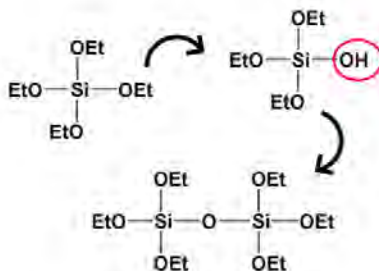


Figura 17. Esquema de la polimerización del TEOS.

En este punto, la presencia de las súper-micelas es crucial para que se produzca el ensamblaje de la sílice a su alrededor, formándose así los poros. Son las cargas positivas del surfactante catiónico las que atraen las cargas negativas de las especies de sílice, que se concentran alrededor de las micelas y forman una estructura de sílice tubular. Las nanopartículas van aumentando de tamaño a medida que condensa el precursor de sílice, hasta que la carga neta negativa es tan elevada que dejan de crecer. Todo este proceso se puede seguir visualmente, puesto que cuando empiezan a formarse las nanopartículas de sílice la solución adquiere una turbidez blanca fácilmente detectable. Una vez terminado el proceso de síntesis, el surfactante se elimina mediante un proceso de extracción bajo reflujo en medio ácido o bien mediante un proceso de calcinación (calentando el sólido obtenido en un horno mufla a temperaturas elevadas durante varias horas).⁷⁴

En el caso de las nanopartículas de tipo MCM-41 de 100nm, en las que se basará esta tesis, el procedimiento estándar de síntesis consiste en mezclar un precursor de sílice – generalmente **tetraetilortosilicato, TEOS** – con un surfactante catiónico, siendo el más utilizado el **bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)**. La reacción tiene lugar a 80°C y pH básico durante 2 horas, tiempo tras el cual el sólido formado se recupera mediante centrifugación o filtración (**Figura 18**).⁷⁷

⁷⁷ LI Z., BARNES J.C., BOSOY A., STODDART J.F., ZINK J.I. *Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications*. Chem Soc Rev. **2012**, 41: 2590 – 2605.

El soporte mesoporoso final MCM-41 presenta una estructura de canales cilíndricos unidireccionales de aproximadamente 2.5nm de diámetro, organizados hexagonalmente.

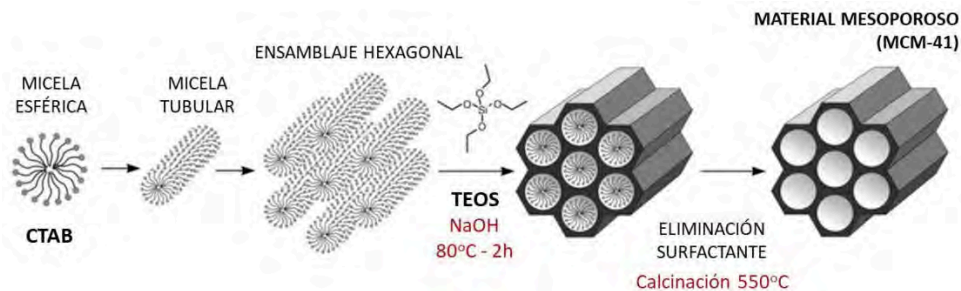


Figura 18. Esquema del procedimiento de síntesis de nanopartículas mesoporosas de sílice de tipo MCM-41. Adaptado a partir de *Angew Chem Int Ed.* 2006, 45, 3216 – 3251. Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Todas estas condiciones y reactivos determinan las características de la estructura porosa (el tipo de mesoestructura, el diámetro y volumen de los poros, el grosor de la pared) y la morfología macroscópica, con lo cual jugando con ellas se pueden obtener fácilmente nano- o micropartículas de diferentes tamaños y diámetros de poro.

6.2. Funcionalización de materiales mesoporosos de sílice

El proceso de funcionalización se entiende como la incorporación de grupos orgánicos en la superficie de estos materiales mesoporosos de sílice, dando lugar a los mencionados materiales híbridos orgánico-inorgánicos. Gracias a la funcionalización (que puede producirse en la superficie de la matriz inorgánica, o bien formar parte de las paredes de sílice o quedar en el interior de los poros) se puede combinar la variedad funcional de la química orgánica con las ventajas de un soporte inorgánico mecánica y térmicamente estable y de gran superficie.

Son dos las principales estrategias que se pueden llevar a cabo para funcionalizar materiales mesoporosos de sílice: el injerto o *grafting*, y la co-condensación. Sea cual sea el procedimiento que se lleve a cabo, el grupo orgánico incorporado puede tener una función por sí mismo (como aumentar la hidrofobicidad/hidofilicidad de la superficie, estabilizarla...) o puede utilizarse como grupo reactivo para unir nuevas moléculas mediante enlaces covalentes o interacciones electroestáticas.^{76,78,79,80}

⁷⁸ VINU A., HOSSAIN K.Z., ARIGA K. *Recent advances in functionalization of mesoporous silica.* J Nanosci Nanotechnol. 2005, 5(3): 347 – 371.

- **Injerto o *grafting***: es la modificación post-síntesis de la superficie del soporte inorgánico de sílice. Con este método primero se sintetiza el material mesoporoso, y en un segundo paso se lleva a cabo la funcionalización con los grupos orgánicos seleccionados (**Figura 19**). Esta estrategia aprovecha la elevada concentración de defectos estructurales en la superficie de los materiales mesoporosos en forma de grupos silanol (Si-OH), que actúan como puntos de anclaje para la modificación orgánica. Si el grupo H del silanol se sustituye por una especie química capaz de unir un grupo radical R de forma covalente al átomo de oxígeno, se puede obtener una familia de materiales con diferente composición química del fragmento R. La metodología más común para funcionalizar estos soportes se basa en la reacción de los grupos silanol con derivados de trialcoxilano, cuya estructura es $(R'O)_3\text{-Si-R}$ (donde R es un grupo orgánico).

Esta estrategia cuenta con la ventaja de que la estructura original del soporte mesoporoso se mantiene tras el paso de funcionalización, además de que la matriz inorgánica se puede obtener fácilmente mediante procedimientos estándar en grandes cantidades para posteriormente llevar a cabo su modificación con los grupos de interés. También es posible conseguir una funcionalización regio-selectiva, anclando grupos orgánicos diferentes en la superficie interna y externa. Esto se puede llevar a cabo funcionalizando primero el material mesoporoso tal y como se obtiene de la síntesis (es decir, con los poros todavía con las moléculas de surfactante), de forma que los grupos orgánicos se anclarán en la superficie externa. Una vez el surfactante se elimina por extracción, el soporte se puede volver a funcionalizar con un derivado diferente que se anclará en la superficie interna de los poros.

⁷⁹ JUAN F., RUIZ-HITZKY E. *Selective functionalization of mesoporous silica*. Adv Mater. **2000**, 12: 430.

⁸⁰ HOFFMANN F., FRÖBA M. *The supramolecular chemistry of organic-inorganic hybrid materials, Chapter 3: Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials*. Wiley & Sons, Inc., **2010**.

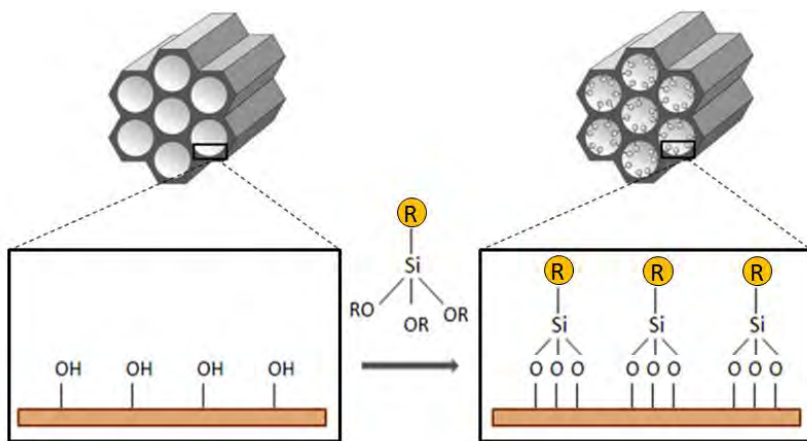


Figura 19. Funcionalización de MSNs mediante procedimiento de grafting con organosilanoles de tipo $(R'O)3-Si-R$, siendo R un grupo funcional. Adaptado a partir de *Angew Chem Int Ed.* 2006, 45, 3216 – 3251. Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- Co-condensación:** es la condensación simultánea (en presencia del agente director de estructura) de los precursores de sílice y los derivados funcionales de interés, que tiene lugar durante el propio proceso de síntesis (Figura 20). Esta estrategia, llevada a cabo en un solo paso, normalmente permite la distribución homogénea de las moléculas orgánicas por todo el soporte mesoporoso, tanto en su superficie externa como en las paredes y canales. En este caso, la eliminación del surfactante de los poros se debe llevar a cabo mediante extracción, puesto que la calcinación podría afectar a los grupos orgánicos funcionales. Hay que tener además en cuenta que, si el contenido de derivados funcionales es demasiado elevado en la reacción, puede impedir que se forme la estructura mesoporosa. Puesto que la presencia de los grupos funcionales en las paredes del material puede influenciar el mecanismo de interacción con el surfactante, esta estrategia de funcionalización se debe optimizar para cada caso en particular.

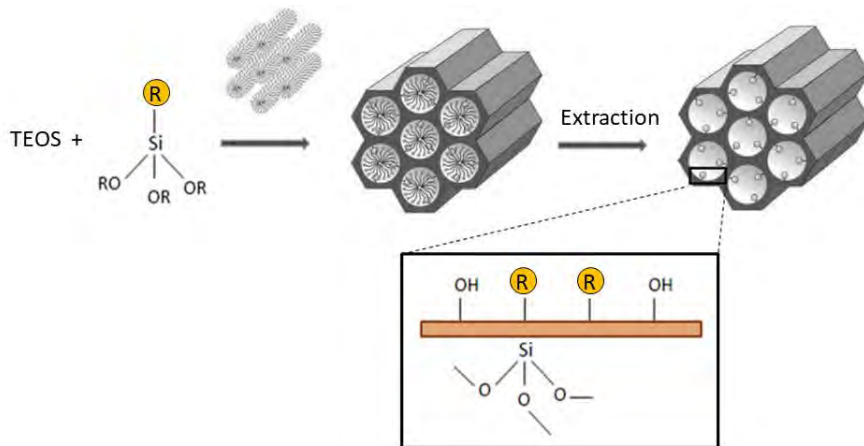


Figura 20. Funcionalización de MSNs mediante procedimiento de co-condensación con organosilanos de tipo $(R'O)_3Si-R$, siendo R un grupo funcional. Adaptado a partir de *Angew Chem Int Ed.* 2006, 45, 3216 – 3251. Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

6.3. Técnicas de caracterización de materiales mesoporosos de sílice

Una vez se ha obtenido el material híbrido orgánico-inorgánico tras la síntesis del soporte de sílice y el proceso de funcionalización, se deben llevar a cabo una serie de técnicas de caracterización para verificar ciertos aspectos del proceso.⁷⁴ Entre ellos, es importante determinar la integridad de la estructura mesoporosa tras el proceso de carga de los poros y de funcionalización, así como la cantidad de materia orgánica que compone el material final y el diámetro y la morfología en caso de tratarse de nanopartículas.

Para verificar que se ha conseguido la estructura mesoporosa del material, y que ésta se ha preservado tras los proceso de carga y de funcionalización, son muy útiles las técnicas de **difracción de rayos x en polvo (DRX)** y de **microscopía de transmisión electrónica (TEM)**.

La DRX es una técnica no destructiva que permite estudiar a escala atómica la estructura interna mesoporosa de los materiales, puesto que los difractogramas dan información sobre la periodicidad y el orden interno de las nanopartículas. Los materiales mesoporosos son materiales amorfos, con lo cual no presentan planos atómicos periódicos; sin embargo la técnica es útil para estudiar el orden de la estructura porosa. Así pues, el difractograma muestra picos característicos que aparecen a bajos ángulos (debido a que la distancia entre los planos de poros es grande en el caso de los materiales mesoporosos). Mediante esta técnica se puede claramente distinguir entre los distintos tipos de materiales mesoporosos, esto es, MCM-41, MCM-48 y MCM-50 según su estructura hexagonal, cúbica o laminar. Por ejemplo, el patrón de DRX típico de las nanopartículas mesoporosas

de tipo MCM-41 (**Figura 21**, arriba) muestra un pico principal característico entre 2 y 2.5 grados θ , indexado como pico de Bragg (100); y otros tres picos secundarios a mayores ángulos, indexados como (110), (200) y (210). Si el mismo patrón de difracción se mantiene entre el sólido inicial y el sólido híbrido final, la técnica confirma que la estructura mesoporosa del material se mantiene tras el proceso de funcionalización.

El TEM también es práctico para evaluar la formación de una determinada fase hexagonal, cúbica, laminar del material mesoporoso, ya que permite visualizar directamente su estructura y tamaño y determinar si la muestra es morfológicamente homogénea. En el caso de las nanopartículas mesoporosas, esta técnica permite observar los poros y su periodicidad: cuando los poros de la nanopartícula se encuentran perpendiculares al plano de observación, éstos se muestran como canales; mientras que si los poros están en el mismo plano aparecen como círculos periódicos. Un ejemplo de imágenes de TEM de nanopartículas MCM-41 se muestra en la **Figura 21** (centro). En relación al tamaño de partícula también se puede utilizar la técnica conocida como **DLS (dynamic light scattering)**, que además puede determinar la carga en la superficie del material midiendo el llamado potencial zeta.

Para demostrar la efectividad de los procesos de carga y funcionalización, la técnica que se suele utilizar es la de **adsorción y desorción de nitrógeno (porosimetría)**. Las isothermas de adsorción-desorción representan la cantidad de nitrógeno adsorbido por gramo de material en función de la presión relativa (**Figura 21**, abajo). Cuando el soporte mesoporoso está vacío, la cantidad de nitrógeno adsorbido en el interior de los poros es elevada; si los poros están ocupados por la carga – o no se han formado correctamente – la cantidad de nitrógeno adsorbido es significativamente inferior. Así pues, en base a esto esta técnica permite determinar la superficie específica del material, y este valor proporciona información cuando se compara entre la nanopartícula calcinada (con una elevada superficie) y la nanopartícula cargada y funcionalizada (con una superficie muy baja). Esta diferencia es un indicativo del llenado de los poros y del subsiguiente anclaje de las moléculas orgánicas en la superficie externa. Además las porosimetrías también proporcionan información sobre el diámetro y el volumen específico de los poros. Existe una correlación entre la forma de la isoterma y la estructura del material; en el caso de los materiales mesoporosos las isothermas típicas de adsorción-desorción de N_2 son de tipo IV y V.⁸¹ El área de superficie específica se suele calcular con el método de Brunauer-Emmet-Teller

⁸¹ SING K.S.W., EVERETT D.H., HAUL R.A.W., MOSCOU L., *et al.* Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure & Appl Chem.* **1985**, 57: 603.

(BET)⁸², y para determinar la distribución de tamaño de poro se aplica el método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH).⁸³

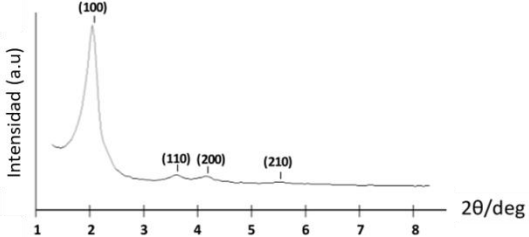
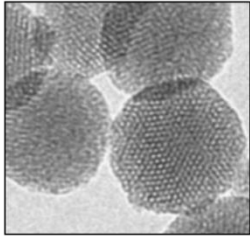
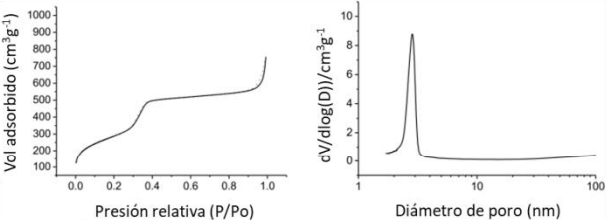
	<p style="text-align: center;">RAYOS X</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Orden de la mesoestructura <input type="checkbox"/> Tamaño de poro
	<p style="text-align: center;">TEM</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Morfología de partícula <input type="checkbox"/> Estructura mesoporosa <input type="checkbox"/> Tamaño de poro
	<p style="text-align: center;">ADSORCIÓN DE N₂</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Área de superficie <input type="checkbox"/> Volumen de poro <input type="checkbox"/> Diámetro de poro <input type="checkbox"/> Forma de poro

Figura 21. Tabla resumen de las principales técnicas de caracterización de los materiales mesoporosos. A la derecha se indica la principal información que se puede obtener a partir de cada una de ellas.

Por último, hay varias técnicas que se pueden utilizar para evaluar cualitativa y/o cuantitativamente la funcionalización con moléculas orgánicas. El **análisis elemental (AE)** se basa en la combustión de una pequeña cantidad de muestra y proporciona información sobre el porcentaje en peso de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, de manera que estos datos se pueden relacionar con la cantidad de moléculas orgánicas funcionales presentes en el material. Por otro lado el **análisis termogravimétrico (TGA)** registra la pérdida en peso del material en función de la temperatura, con lo cual permite calcular el porcentaje total de

⁸² BRUNAUER S., EMMETT P.H., TELLER T. *Adsorption of gases in multimolecular layers*. J Am Chem Soc. **1938**, 60: 309.

⁸³ BARRETT E.P., JOYNER L.G., HALENDA P.P. *The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms*. J Am Chem Soc. **1951**, 73: 373.

materia orgánica en el sólido. No hay que olvidar otras dos técnicas generales muy útiles a la hora de trabajar con materiales mesoporosos: la **espectroscopía UV-visible** y la **espectroscopía de fluorescencia**, mediante las cuales se puede monitorizar la liberación de los compuestos fluorescentes o colorantes cargados en las nanopartículas.

7| MSNs como sistemas estímulo-respuesta. Concepto de puerta molecular

Los materiales híbridos mesoporosos de sílice combinan las ventajas del soporte inorgánico (estructura tridimensional con elevada porosidad homogénea, gran área de superficie y elevado volumen de poro que garantiza una gran capacidad de carga, diámetro de poro regulable y estabilidad química y térmica) con la posibilidad de incorporar grupos orgánicos mediante los procesos de funcionalización, con el fin de obtener materiales complejos con funcionalidades específicas. Gracias a eso estos materiales se están aplicando cada vez en más campos científicos, utilizándose así para catálisis,⁸⁴ liberación controlada de especies químicas,⁸⁵ sensores químicos y bioquímicos⁸⁶ y aplicaciones ambientales.⁸⁷ Concretamente, este proyecto de tesis está directamente relacionado con el diseño, síntesis y aplicación de nanopartículas mesoporosas de tipo MCM-41 para la liberación controlada de fármacos, de la cual se habla en el siguiente apartado.

7.1. Sistemas estímulo-respuesta. Concepto de puerta molecular

Con la aparición de los nanodispositivos híbridos funcionales un concepto que entra en juego es el del diseño de **sistemas estímulo-respuesta**, también conocidos en inglés como **gated materials**. Estos materiales “cerrados” tienen el objetivo de controlar la liberación de los compuestos químicos encapsulados en el

⁸⁴ PARK S.E., JEONG E.Y. *Heterogeneous catalysis with organic-inorganic hybrid materials in bridging heterogeneous and homogeneous catalysis: concepts, strategies and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany. **2014**.

⁸⁵ a) ROSENHOLM J.M., PEUHU E., BATE-EYA L.T, *et al.* *Cancer-cell-specific induction of apoptosis using mesoporous silica nanoparticles as drug-delivery vectors*. *Small*. **2010**, 6: 1234. b) LIONG M., LU J., KOVOCHICH M., XIA T., *et al.* *Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery*. *ACS Nano*. **2008**, 2: 889.

⁸⁶ MELDE B.J., JOHNSON B.J., CHARLES P.T. *Mesoporous Silicate Materials in Sensing*. *Sensors*. **2008**, 8: 5202 – 5228.

⁸⁷ COLL C., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., MARCOS M.D., SANCENÓN F. *et al.* *Efficient Removal of anionic surfactants using mesoporous functionalised hybrid materials*. *Eur JInorgChem*. **2009**, 25: 3770.

interior de sus poros en respuesta a un determinado estímulo externo o molécula diana, pudiendo así transportar la carga a localizaciones específicas y liberarla “bajo voluntad”.^{85,88,89}

Así pues, el segundo concepto que entra en acción es el de **puerta molecular**. Un material con puerta molecular se puede definir como un sistema híbrido en el que el transporte de masa se inicia gracias a un estímulo externo que controla el estado de la puerta (cerrada o abierta).⁹⁰ Estos materiales están formados por dos sub-unidades: por un lado el soporte mesoporoso, y por otro ciertas entidades supramoleculares ancladas sobre su superficie externa. El soporte mesoporoso actúa como un nanocontenedor, reteniendo las moléculas en su interior; mientras que las entidades supramoleculares actúan como “puertas” que pueden estar abiertas o cerradas según la presencia o no de determinado un estímulo, controlando así la liberación de la carga del interior de los poros (**Figura 22**).

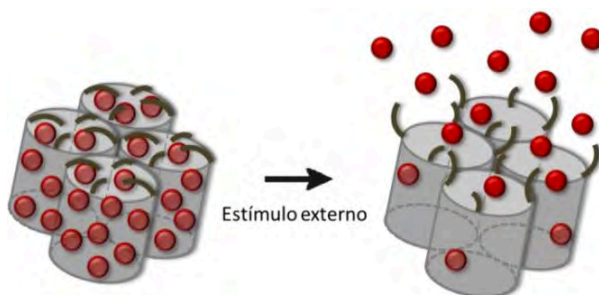


Figura 22. Representación esquemática del mecanismo de funcionamiento de una puerta molecular.

El primer ejemplo de material con puerta molecular lo reportó Fujiwara y sus colaboradores en 2003,⁹¹ y desde entonces han sido muchos los ejemplos de sistemas nanoscópicos con puerta que se han descrito basados en soportes mesoporosos híbridos:

⁸⁸ a) AZNAR E., OROVAL M., PASCUAL L., MURGUÍA J.R., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., SANCENÓN F. *Gated materials for on-command release of guest molecules*. Chem Rev. **2016**, 116: 561 – 718. b) COLL C., BERNARDOS A., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., SANCENÓN F. *Gated silica mesoporous supports for controlled release and signalling applications*. Acc Chem Res. **2013**, 46: 339 – 349.

⁸⁹ COTÍ K.K., BELOWICH M.E., LIONG M., *et al.* *Mechanised nanoparticles for drug delivery*. Nanoscale. **2009**, 1: 16.

⁹⁰ DESCALZO A.B., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., SANCENÓN F., HOFFMANN K., RURACK K. *The supramolecular chemistry of organic-inorganic hybrid materials*. Angew Chem Int Ed. **2006**, 45: 5924.

⁹¹ a) MAL N.K., FUJIWARA M., TANAKA Y. *Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica*. Nature. **2003**, 421, 350. b) MAL N.K., FUJIWARA M., TANAKA Y., TAGUCHI T., MATSUKATA M. *Photo-switched storage and release of guest molecules in the pore void of coumarin-modified MCM-41*. Chem Mater. **2003**, 15: 3385.

- Como puertas moleculares para bloquear la salida de los poros de los soportes mesoporosos se han utilizado nanopartículas inorgánicas,⁹² polímeros⁹³ y ensamblajes supramoleculares de mayor tamaño.^{94,95}
- Por otra parte, son distintos estímulos los que se han utilizado para disparar la apertura de los poros y la liberación de las moléculas encapsuladas en los soportes, como pH,⁹⁶ luz,⁹⁷ temperatura,⁹⁸ potencial redox⁹⁹ o la presencia de determinadas moléculas diana.¹⁰⁰

⁹² a) LAI C.Y., TREWYN B.G., JEFTINIJA D.M., JEFTINIJA K., et al. *A Mesoporous Silica Nanosphere-Based Carrier System with Chemically Removable CdS Nanoparticle Caps for Stimuli-Responsive Controlled Release of Neurotransmitters and Drug Molecules*. *J Am Chem Soc.* **2003**, 125: 4451. b) GIRI S., TREWYN B.G., STELLMAKER M.P., LIN V.S.Y. *Stimuli-responsive controlled-release delivery system based on mesoporous silica nanorods capped with magnetic nanoparticles*. *Angew Chem Int Ed.* **2005**, 44: 5038. c) AZNAR E., MARCOS M.D., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., SANCENÓN F., et al. *pH- and photo-switched release of guest molecules from mesoporous silica supports*. *J Am Chem Soc.* **2009**, 131: 6833. d) VIVERO-ESCOTO J.L., SLOWING I.I., WU C., LIN V.S.Y. *Photoinduced intracellular controlled release drug delivery in human cells by gold-capped mesoporous silica nanosphere*. *J Am Chem Soc.* **2009**, 131: 3462.

⁹³ a) LIU R., ZHAO X., WU T., FENG P.Y. *Bioinspired Surface Immobilization of Hyaluronic Acid on Monodisperse Magnetite Nanocrystals for Targeted Cancer Imaging*. *J Am Chem Soc.* **2008**, 130: 14418. b) ZHU C.L., SONG X.Y., ZHOU W.H., YANG H.H., WANG X.R. *An efficient cell-targeting and intracellular controlled-release drug delivery system based on MSN-PEM-aptamer conjugates*. *J Mater Chem.* **2009**, 19: 7765.

⁹⁴ a) NGUYEN T.D., LIU Y., SAHA S., LEUNG K.C.F., STODDART J.F., ZINK J.I. *Design and Optimization of Molecular Nanovalves Based on Redox-Switchable Bistable Rotaxanes*. *J Am Chem Soc.* **2007**, 129: 626. b) LIU R., ZHANG Y., FENG P.Y. *Multiresponsive Supramolecular Nanogated Ensembles*. *J Am Chem Soc.* **2009**, 131: 15128.

⁹⁵ AZNAR E., OROVAL M., PASCUAL L., et al. *Gated Materials for On-Command Release of Guest Molecules*. *Chem Rev.* **2016**, 116: 561 – 718.

⁹⁶ a) CASASÚS R., MARCOS M.D., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., ROS-LIS J.V., et al. *Toward the Development of Ionically Controlled Nanoscopic Molecular Gates*. *J Am Chem Soc.* **2004**, 126: 8612. b) CAUDA V., ARGYO C., SCHLOSSBAUER A., BEIN T.J. *Controlling the delivery kinetics from colloidal mesoporous silica nanoparticles with pH-sensitive gates*. *J Mater Chem.* **2010**, 20: 4305. c) ANGELOS S., YANG Y.W., PATEL K. STODDART J.F., ZINK J.I. *pH-responsive supramolecular nanovalves based on cucurbit[6]uril pseudorotaxanes*. *Angew Chem Int Ed.* **2008**, 47: 2222. d) POPAT A., LIU J., LU G.Q., QIAO S.Z. *A pH-responsive drug delivery system based on chitosan coated mesoporous silica nanoparticles*. *J Mater Chem.* **2012**, 22: 11173.

⁹⁷ a) JOHANSSON E., CHOI E., ANGELOS S., LIONG M., ZINK J.I. *Light-activated functional mesostructured silica*. *Sol-Gel Sci Technol.* **2008**, 46: 313. b) SUN Y.L., YANG B.J., et al. *Cucurbit[7]uril Pseudorotaxane-Based Photoresponsive Supramolecular Nanovalve*. *Chem Eur J.* **2012**, 18: 9212. c) LAI J., MU X., XU Y., et al. *Light-responsive nanogated ensemble based on polymer grafted mesoporous silica hybrid nanoparticles*. *Chem Commun.* **2010**, 46: 7370.

⁹⁸ a) MORTERA R., VIVER-ESCOTO J., SLOWING I.I., et al. *Cell-induced intracellular controlled release of membrane impermeable cysteine from a mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system*. *Chem Commun.* **2009**, 22: 3219. b) LIU R., ZHAO X., WU T., FENG P. *Tunable Redox-Responsive Hybrid Nanogated Ensembles*. *J Am Chem Soc.* **2008**, 130: 14418.

⁹⁹ a) LIU C., GUO J., YANG W., et al. *Magnetic mesoporous silica microspheres with thermo-sensitive polymer shell for controlled drug release*. *J Mat Chem.* **2009**, 19: 4764. b) THOMAS C.R., FERRIS D.P., LEE J.H., et al. *Noninvasive remote-controlled release of drug molecules in vitro using magnetic actuation of mechanized nanoparticles*. *J Am Chem Soc.* **2010**, 132: 10623.

¹⁰⁰ a) SCHULZ A., WOOLLEY R., TABARIN T., MCDONAGH C. *Dextran-coated silica nanoparticles for calcium-sensing*. *Analyst.* **2011**, 136: 1722. b) CANDEL I., BERNARDOS A., CLIMENT E., et al. *Selective opening of nanoscopic capped mesoporous inorganic materials with nerve agent simulants; an application to design chromo-fluorogenic probes*. *Chem Commun.* **2011**, 47: 8313. c) OROVAL M., CLIMENT E., COLL C., et al. *An aptamer-gated silica mesoporous material for thrombin detection*. *Chem Commun.* **2013**, 49: 5480.

Además en los últimos años la incorporación de **biomoléculas** en el diseño de estos sistemas nanoscópicos basados en estímulo-respuesta ha ganado mucho interés.¹⁰¹ Algunas biomoléculas, especialmente enzimas,¹⁰² se han utilizado como estímulo para provocar la apertura de la puerta molecular. Otras biomoléculas como sacáridos,¹⁰³ péptidos,¹⁰⁴ ADN¹⁰⁵ o aptámeros¹⁰⁶ se han utilizado como supramoléculas para bloquear la salida de los poros.

Con todos estos materiales se han desarrollado aplicaciones para la detección/reconocimiento de determinadas especies¹⁰⁷ o para la liberación controlada de compuestos químicos, lo cual tiene gran potencial en el campo de la biomedicina.

En cuanto al primer caso de **detección/reconocimiento**, por ejemplo, los materiales MSNs se pueden utilizar como transportadores cargados con un colorante o compuesto fluoróforo y funcionalizados con moléculas diseñadas para abrirse y liberar la carga únicamente en presencia de un determinado analito.

Pero, sin duda, el potencial de los materiales estímulo-respuesta que tiene mayor interés en este proyecto de tesis es su aplicación en el campo de la nanomedicina como sistemas de **liberación controlada de fármacos**. En este caso, el soporte mesoporoso puede retener y proteger fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos durante su transporte, resolviendo así problemas de poca solubilidad o estabilidad de algunos de dichos fármacos; así como también evitando sus posibles efectos secundarios. Además, la funcionalización de la superficie del soporte mesoporoso con moléculas específicas permite que estos nanodispositivos puedan llegar de manera selectiva a determinados tipos celulares o tejidos, gracias al reconocimiento de la diana para la cual están diseñados (es decir, el material se funcionalizaría con biomoléculas cuyos receptores estuviesen sobre-expresados en las células o tejidos de interés). Una

¹⁰¹ LLOPIS-LORENTE A., LOZANO-TORRES B., BERNARDOS A., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., SANCENÓN F. *Mesoporous Silica Materials for Controlled Delivery based on Enzymes*. *J Mater Chem B*. **2017**, 5: 3069 – 3083.

¹⁰² PATEL K., ANGELOS S., DICHTEL W.R., *et al.* *Enzyme-Responsive Snap-Top Covered Silica Nanocontainers*. *J Am Chem Soc*. **2008**, 130: 2382. b) PARK C., KIM H., KIM S., KIM C. *Enzyme Responsive Nanocontainers with Cyclodextrin Gatekeepers and Synergistic Effects in Release of Guests*. *J Am Chem Soc*. **2009**, 131: 16614.

¹⁰³ BERNARDOS A., MONDRAGÓN L., AZNAR E., *et al.* *Enzyme-Responsive Intracellular Controlled Release Using Nanometric Silica Mesoporous Supports Capped with "Saccharides"*. *ACS Nano*. **2010**, 4: 6353.

¹⁰⁴ a) PORTA F., LAMERS G.E.M., ZINK J.I., KROS A. *Peptide modified mesoporous silica nanocontainers*. *Chem Chem Phys*. **2011**, 13: 9982. b) COLL C., MONDRAGÓN L., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., *et al.* *Enzyme-mediated controlled release systems by anchoring peptide sequences on mesoporous silica supports*. *Angew Chem Int Ed*. **2011**, 50: 2138.

¹⁰⁵ ZHANG Y., YUAN Q., CHEN T., *et al.* *DNA-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles as an Ion-Responsive Release System to Determine the Presence of Mercury in Aqueous Solutions*. *Anal Chem*. **2012**, 84: 1956.

¹⁰⁶ ÖZALP V.C., SCHÄFER T. *Aptamer-Based Switchable Nanovalves for Stimuli-Responsive Drug Delivery*. *Chem Eur J*. **2011**, 17: 9893.

¹⁰⁷ SANCENÓN F., PASCUAL L., OROVAL M., AZNAR E., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R. *Gated Silica Mesoporous Materials in Sensing Applications*. *ChemistryOpen*. **2015**, 4: 418 – 437.

representación gráfica de los componentes que integrarían estos dispositivos mesoporosos se representa en la **Figura 23**.

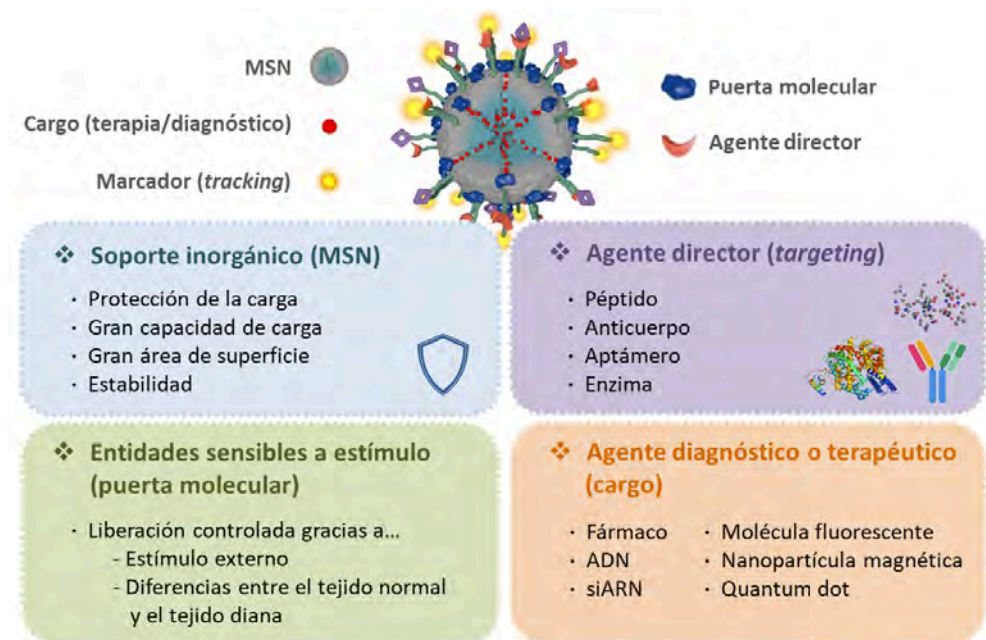


Figura 23. Representación esquemática de los componentes que forman parte de un sistema multifuncional estímulo-respuesta para aplicaciones biomédicas. Adaptado a partir de Chem. Mater. 2014, 26, 435. Copyright © 2013 American Chemical Society.

8 | Nanopartículas mesoporosas como sistemas de liberación de fármacos

Los nanomateriales funcionales tienen el potencial de mejorar notablemente la eficacia de las aproximaciones terapéuticas, por lo que durante las dos últimas décadas se han desarrollado una gran cantidad de sistemas de liberación controlada de fármacos. La ventaja de estos dispositivos reside en la posibilidad de diseñar sistemas inteligentes capaces de controlar la **cantidad**, el **tiempo** exacto y el **sitio** específico en que se libera el fármaco encapsulado, lo cual evita los problemas derivados del uso de ciertos medicamentos, como por ejemplo:

- Baja selectividad, lo que se traduce en efectos secundarios no deseados (como resistencias o afectación de tejidos sanos).
- Necesidad de utilizar altas dosis, o de tomar dosis frecuentemente.

- Baja solubilidad.
- Estabilidad limitada.
- Metabolización rápida y excreción del fármaco del organismo.

La encapsulación de estos fármacos (es decir, la nanoformulación) aporta un gran número de ventajas respecto al uso de fármacos en formulación libre, puesto que:

- Se consigue mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de las moléculas terapéuticas.
- Se aumenta su solubilidad y su biodisponibilidad.
- Se consigue un efecto terapéutico más inmediato reduciendo los efectos secundarios.

Así pues, el objetivo principal de la liberación controlada es simple: **conseguir la cantidad correcta del agente activo, en el momento adecuado y en el lugar preciso**. En el caso ideal, el propósito sería conseguir la existencia de una concentración uniforme de fármaco, utilizando dosis más pequeñas y logrando la ausencia de efectos secundarios.

Aunque las nanopartículas mesoporosas de sílice se desarrollaron inicialmente para catálisis, rápidamente se descubrió su potencial para otras muchas aplicaciones como sondas de imagen, sensores, materiales ópticos, fotocatalisis, pilas de combustible o sistemas eléctricos. Sin embargo, las MSNs han revolucionado el campo de los sistemas de liberación controlada de fármacos, ya que sus numerosas ventajas – además de su baja toxicidad – hacen de ellas plataformas ideales para el diseño de nanosistemas multifuncionales.

Fue en 2001 cuando Vallet-Regí y co-autores introdujeron por primera vez las nanopartículas mesoporosas de tipo MCM-41 como sistema de liberación de fármacos (concretamente, ibuprofeno, aunque en estos primeros ejemplos los sistemas no tenían puertas moleculares),¹⁰⁸ y desde entonces se han dedicado muchos esfuerzos en el diseño de MSNs versátiles para tratar diferentes patologías, con especial énfasis en el tratamiento del cáncer. De hecho, los sistemas multifuncionales resultantes pueden combinar la liberación de fármacos, el diagnóstico de enfermedades y aplicaciones de imagen molecular, con lo cual se espera de ellos que jueguen un papel fundamental en el campo de la teranóstica (terapia + diagnóstico).¹⁰⁹

¹⁰⁸ VALLET-REGÍ M., RÁMILA A., DEL REAL R.P., PÉREZ-PARIENTE J. *A new property of MCM-41: drug delivery system*. Chem Mater. **2001**, 13: 308 – 311.

¹⁰⁹ XIE J., LEE S., CHEN X. *Nanoparticle-based theranostic agents*. Adv Drug Deliv Rev. **2010**, 62: 1064.

8.1. Liberación de compuestos activos: estímulos externos y estímulos internos

Una de las mayores ventajas de las MSNs como sistema de liberación de fármacos es la posibilidad de diseñar nanodispositivos con “liberación cero” bloqueando la salida de los poros mediante puertas moleculares.

El comportamiento abierto/cerrado de la puerta se puede conseguir mediante la hidrólisis o ruptura de la misma al estar presente un determinado estímulo, que puede ser externo, como un campo magnético, ultrasonidos o luz, o interno, como el pH, el potencial redox o la presencia de determinadas enzimas (Figura 24). Los estímulos externos suelen ser los que el médico o especialista puede aplicar, mientras que los internos suelen ser características moleculares o ambientales de la patología a tratar.



Figura 24. Representación esquemática de los distintos tipos de estímulo – tanto externos (en rojo) como internos (en amarillo) – que pueden provocar la apertura de la puerta molecular y la liberación de la carga encapsulada en el nanodispositivo.

○ ESTÍMULOS INTERNOS

Gracias al conocimiento que se tiene de los procesos bioquímicos y metabólicos que intervienen en las distintas patologías se han podido diseñar nanosistemas de liberación de fármacos sensibles a estímulos endógenos, como variaciones de pH, elevadas concentraciones de glutatión, sobreexpresión de determinadas enzimas o presencia de ciertas moléculas. En general estos sistemas suelen incorporar uno o dos elementos, que podrían ser conectores y/o “agentes tapón”. Los conectores

pueden romperse, degradarse o sufrir un cambio conformacional en presencia de determinados estímulos; los “agentes tapón” pueden ser nanopartículas inorgánicas, polímeros o macromoléculas que bloquean los mesoporos y dificultan la salida de la carga encapsulada.¹¹⁰

Los estímulos internos surgen a partir de las diferencias microambientales entre tejido normal y tejido diana, de forma que cambios endógenos en el pH o el potencial redox, la reacción con ciertas moléculas o un nivel elevado de ciertas enzimas pueden disparar la liberación de especies de los nanodispositivos. Este mecanismo de apertura permite diseñar bajo demanda sistemas capaces de reconocer su microambiente y reaccionar de forma dinámica, mimetizando la capacidad de respuesta de los organismos vivos.¹¹¹

A continuación se comentan un poco más en detalle los principales tipos de estímulos internos:

- pH: las variaciones en el pH se han aprovechado para liberar fármacos en órganos específicos (como el tracto gastrointestinal o la vagina) o en compartimentos intracelulares (como endosomas o lisosomas). También se han utilizado para liberar los compuestos cuando los cambios ambientales están asociados con situaciones patológicas, como isquemia, inflamación o infección. Para estos sistemas se pueden utilizar como puertas por ejemplo polímeros (poliácidos o polibases) con grupos ionizables que sufren cambios conformacionales o de solubilidad en respuesta a una variación de pH. Una de las principales aplicaciones del pH como estímulo externo sería el desarrollo de sistemas para el tratamiento de tumores, los cuales se basan en la sutil diferencia de pH existente entre tejidos sanos (aprox. pH 7.4) y el microambiente extracelular de los tumores sólidos (pH 6.4-7.2). Otro ejemplo de aplicación sería la diferencia de pH existente entre el ambiente extracelular (pH 7) y los endosomas/lisosomas (pH 5), siendo una herramienta útil para liberar selectivamente agentes terapéuticos de forma directa en el interior celular.
- Potencial redox: la presencia de agentes reductores en el interior celular permite la liberación controlada de moléculas a nivel intracelular. De hecho, se ha relacionado directamente una elevación en la concentración de especies redox activas con algunas enfermedades, como el cáncer. Durante la última década se han descrito múltiples nanodispositivos basados en materiales mesoporosos que contienen puertas redox-activas. Estas se clasifican fundamentalmente en dos grupos: (i) sistemas basados en la reducción y consecuente ruptura de puentes disulfuro – que unían la puerta molecular con

¹¹⁰ VALLET-REGÍ M., COLILLA M., IZQUIERDO-BARBA I., MANZANO M. *Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: current insights*. *Molecules*. **2018**, 23(47).

¹¹¹ MURA S., NICOLAS J., COUVREUR P. *Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery*. *Nature Materials*. **2013**, 12: 991 – 1003.

el soporte mesoporoso y que se rompen rápidamente en presencia de glutatión (GSH); (ii) sistemas en los que la oxidación/reducción de las moléculas actuando como puerta induce cierto movimiento de las mismas y permite la apertura de los poros. En el caso de los puentes disulfuro, la liberación de fármacos en el citosol se puede conseguir gracias a las diferencias de concentración de GSH entre los compartimentos extracelulares (aprox. 2-10 μ M) e intracelulares (aprox. 2-10mM), o entre tejidos tumorales y tejidos sanos.

- Presencia de ciertas moléculas/biomoléculas: de entre las distintas posibilidades, algunas de las moléculas más comúnmente utilizadas para el desarrollo de materiales híbridos son las enzimas.¹⁰¹ En concreto, la posibilidad de diseñar sistemas avanzados utilizando secuencias sintetizadas a medida (sensibles a ser degradadas de manera específica por determinados enzimas) como puerta molecular tiene gran potencial. Por ejemplo, en algunas condiciones patológicas como cáncer o inflamación se produce la sobreexpresión / expresión alterada de determinadas enzimas intra- o extracelulares, como proteasas, peptidasas, fosfolipasas o glicosidasas. Estos perfiles de expresión alterados se pueden aprovechar para conseguir la liberación y la acumulación de los compuestos terapéuticos en la diana biológica deseada.

Un ejemplo gráfico de estos tres posibles estímulos internos y de sus mecanismos de acción se recoge en la **Figura 25**.

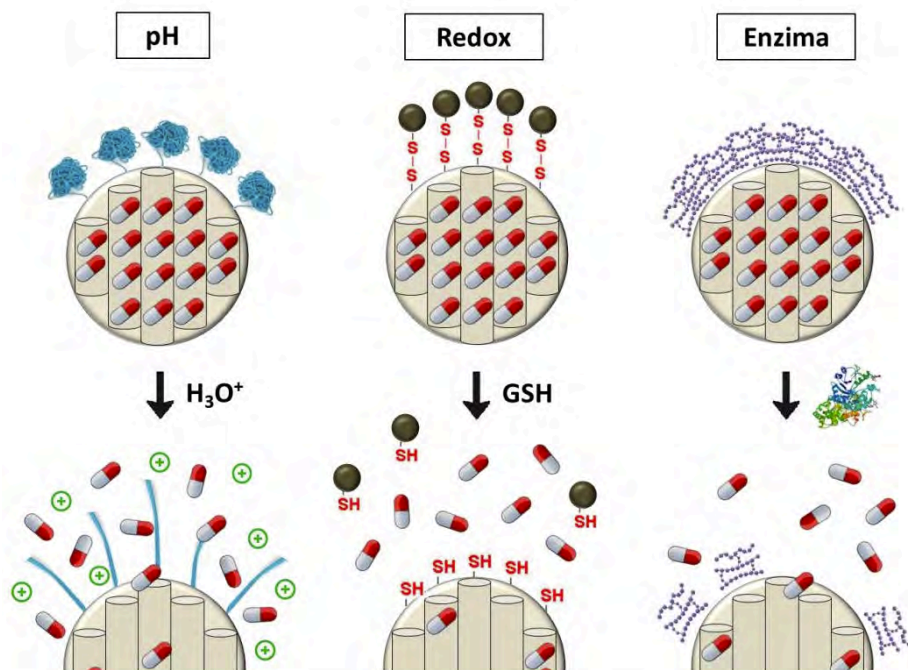


Figura 25. Ilustración representativa de sistemas MSNs de liberación de fármacos basados en estímulos internos. De izquierda a derecha: nanosistema basado en MSNs recubiertas con polímero sensible a pH; MSNs funcionalizadas con nanopartículas inorgánicas unidas mediante puentes disulfuro que responden ante potencial redox; MSNs funcionalizadas con un polímero degradable por enzimas.

○ ESTÍMULOS EXTERNOS

Se basan en alteraciones físicas extracorpóreas, entre las que se incluyen cambios de temperatura, la aplicación de campos magnéticos, ultrasonidos o luz. Este tipo de estímulos confieren gran control a nivel espacial y temporal sobre las condiciones de liberación en el tejido o células diana. Sin embargo también tienen algunas limitaciones, como por ejemplo en el caso del estímulo de luz su capacidad de penetrar en los tejidos.¹¹⁰ Se comentan a continuación los principales tipos de estímulos externos:

- **Temperatura:** la temperatura es una de las estrategias más estudiadas como estímulo externo para el diseño de MSNs, sobre todo en el campo de la oncología. Muchos de estos sistemas utilizan polímeros termosensibles que son capaces de liberar la carga tras una fase de transición dependiente de temperatura. Otros sistemas utilizan parafinas para bloquear la salida de los poros, de forma que cuando la temperatura del ambiente supera la temperatura de fusión de la parafina la puerta “se derrite” permitiendo así la salida del compuesto encapsulado. Idealmente los nanodispositivos

dependientes de temperatura deberían retener la carga en su interior a temperatura corporal (37°C), y liberar el fármaco en un área donde localmente se haga aumentar la temperatura.

- **Campo magnético y ultrasonidos:** se trata de técnicas no invasivas que pueden penetrar en los tejidos y se pueden controlar mediante cambios de frecuencia, potencia, ciclos y tiempo de aplicación. En cuanto al campo magnético, sus ventajas radican en que pueden causar diferentes efectos en MSNs funcionalizadas con partículas de óxido de hierro (nanocristales magnéticos), bien guiando al material bajo un campo magnético permanente o bien consiguiendo la liberación del compuesto por un aumento de temperatura tras aplicar un campo magnético alterno. La primera opción se suele llevar a cabo aplicando un campo magnético extracorpóreo sobre la diana biológica durante la inyección del nanodispositivo. También se pueden llevar a cabo aplicaciones de imagen por resonancia magnética, realizando de esta forma diagnóstico y terapia en un solo sistema. La segunda opción consistiría en aplicar un campo magnético oscilante que fuera capaz de generar calor por la presencia de los nanocristales magnéticos (consiguiendo de esta forma tratamiento por hipertermia). Con respecto a los ultrasonidos, las ondas pueden disparar la liberación de los fármacos mediante efectos térmicos o mecánicos, generados por fenómenos de cavitación o por fuerzas de radiación. Entre sus ventajas están la prevención de daños en tejido sano, la ausencia de radiaciones ionizantes y la fácil regulación de la penetración en el tejido modificando los parámetros de aplicación.
- **Luz:** los sistemas estímulo-respuesta basados en luz pueden conseguir la liberación de la carga bajo demanda en respuesta a la iluminación con una longitud de onda determinada (ultravioleta, visible o infrarrojo cercano – NIR). Los sistemas de apertura se basan en procesos de: (i) fotodimerización, fotoconversiones cis-trans; (ii) foto-rotura de enlaces químicos de forma directa o mediante fotosensibilizadores y (iii) calor foto-inducido mediante nanopartículas de oro. Aunque la luz es un sistema fácil de aplicar, con baja toxicidad y elevada precisión a la hora de focalizar el sitio diana, este tipo de estímulo tiene una desventaja, y es que tiene poco poder de penetración en tejido (aprox. 10nm). Es por ello que en los últimos años las fuerzas se han invertido en desarrollar sistemas más biológicamente aplicables utilizando grupos fotosensibles que respondan a longitudes de onda mayores, o bien recurriendo a la tecnología de los dos fotones. Estos nuevos sistemas permiten reemplazar la luz ultravioleta-visible por un láser NIR (700-1000nm) con mayor poder de penetración y mínimos daños en tejido.

La **Figura 26** recoge un ejemplo gráfico de algunos de los posibles estímulos externos y de sus mecanismos de acción.

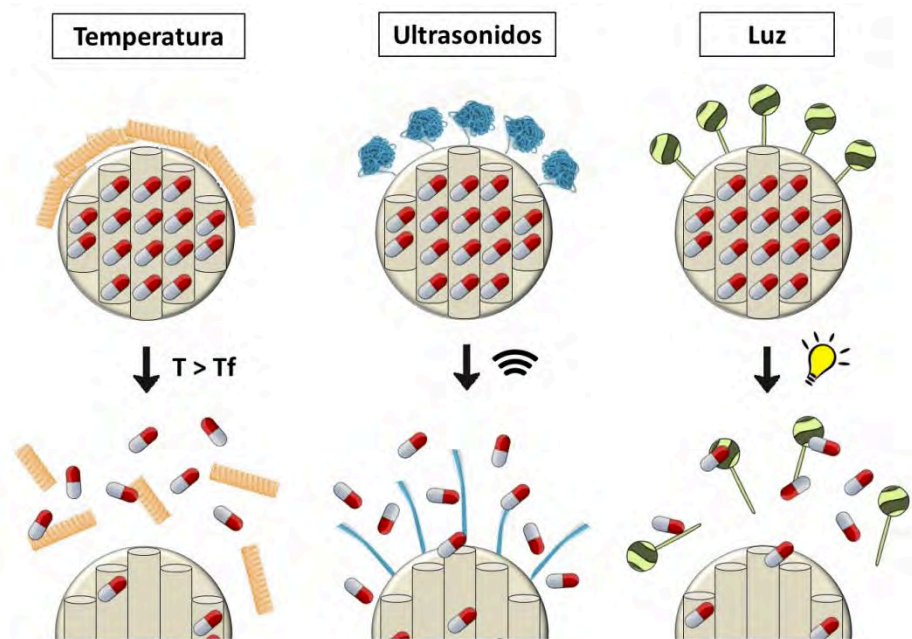


Figura 26. Ilustración representativa de sistemas MSNs de liberación de fármacos basados en estímulos externos. De izquierda a derecha: nanosistema basado en MSNs recubiertas con parafina, que se funde cuando la temperatura sobrepasa la temperatura de fusión; MSNs funcionalizadas con polímero sensible a irradiación por ultrasonidos; MSNs funcionalizadas con un fotosensibilizador y un *linker* degradable por luz.

8.2. Targeting y entrada en la célula de las nanopartículas mesoporosas

La entrada de nanopartículas en la célula implica mecanismos altamente regulados y complejas interacciones biomoleculares para sobrepasar la membrana plasmática, que actúa como una barrera que separa el interior celular del medio exterior. Las características estructurales y biomoleculares (como la bicapa de fosfolípidos con proteínas y otras biomoléculas integradas) de la membrana plasmática resultan en una carga absoluta negativa, con algunos pocos dominios catiónicos y cierta permeabilidad selectiva ante iones, (bio)moléculas y algunos tipos de nanopartículas. Conocer el mecanismo por el cual las nanopartículas entran en la célula es crucial, puesto que la ruta de entrada que sigan va a determinar el desarrollo de la función del material y, por tanto, la respuesta biológica de la célula.^{112,113}

¹¹² DONAHUE N.D., ACAR H., WILHELM S. *Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking and kinetics in nanomedicine.* Adv Drug Deliv Rev. **2019**, 143: 68 – 96.

¹¹³ YAMEEN B., CHOI W.I., VILOS C., et al. *Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting.* J Control Rel. **2014**, 190: 485 – 499.

Son varias las posibles rutas de acceso al interior celular con las que cuentan las nanopartículas para cruzar la membrana plasmática (Figura 27) que en general se pueden categorizar en dos grandes grupos: (1) rutas basadas en endocitosis y (2) rutas de entrada directa.¹¹²

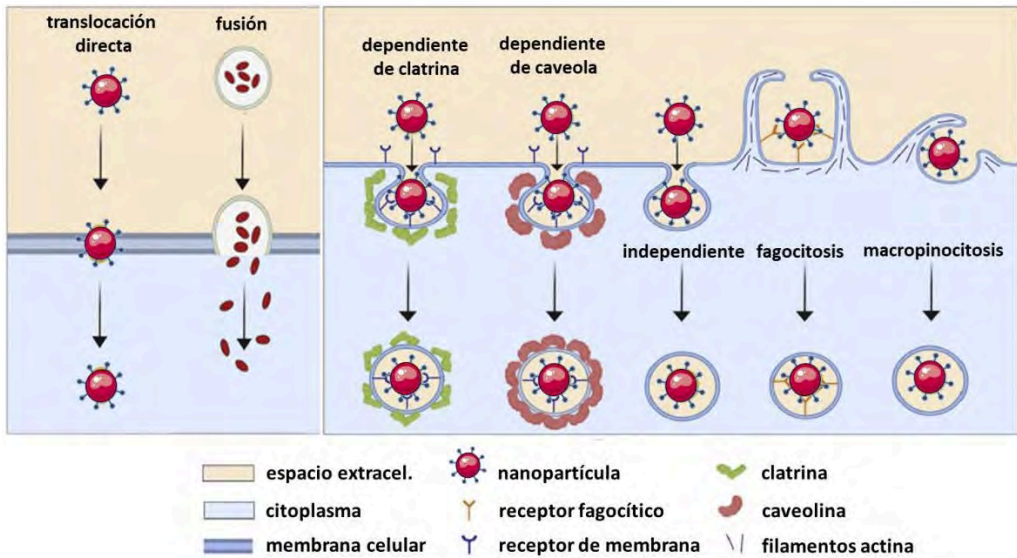


Figura 27. Visión global esquemática de las rutas de entrada de NPs en la célula, bien vía directa (panel izquierda) o bien vía endocitosis (panel derecha). Entre las principales estrategias de entrada directa están la translocación directa o la fusión lipídica: ambas permiten el acceso directo de las nanopartículas al citoplasma, si bien dependen de las propiedades físico-químicas del material. Para la entrada vía endocitosis existen distintos mecanismos: dependiente de clatrina, dependiente de caveola, independiente de clatrina o caveolina, fagocitosis y macropinocitosis. Todas estas rutas de entrada son distintas entre sí y están muy reguladas a nivel biomolecular, y determinan cuál va a ser el transporte intracelular de la nanopartícula y por tanto su respuesta biológica y efecto terapéutico. Adaptado a partir de Adv Drug Deliv Rev. 2019, 143: 69 – 96. Copyright © 2019 Elsevier B.V.

En general las nanopartículas se internalizan en las células vía endocitosis y no por entrada directa, si bien hay que tener en cuenta que su tamaño y morfología, así como la presencia de grupos funcionales en su superficie externa, van a influir en la capacidad de internalizarse en la célula a través de esta vía.

La endocitosis dependiente de clatrina suele ser la principal ruta de acceso de las MSNs a la célula. Las fases que componen dicha ruta son: (i) nucleación de proteínas citosólicas involucradas en la endocitosis para formar una “bolsa” recubierta, (ii) doblamiento e invaginación de la membrana plasmática, (iii) escisión – por ejemplo, separación del cuello de la invaginación de la membrana para formar una vesícula intracelular, (iv) des-recubrimiento y recuperación de las proteínas endocitóticas de la vesícula intracelular.

Esta ruta es la que siguen nanopartículas de tamaño aproximado entre 100 y 500nm. Una vez escindida de la membrana, la vesícula se fusiona con endosomas tempranos que, o bien se reciclan, o bien se fusionan con lisosomas, dando lugar a la digestión enzimática de la nanopartícula y consecuente liberación de su carga (Figura 28). Este proceso de endocitosis se puede estudiar mediante técnicas como microscopía confocal, microscopía de transmisión electrónica o citometría de flujo.^{112, 114}

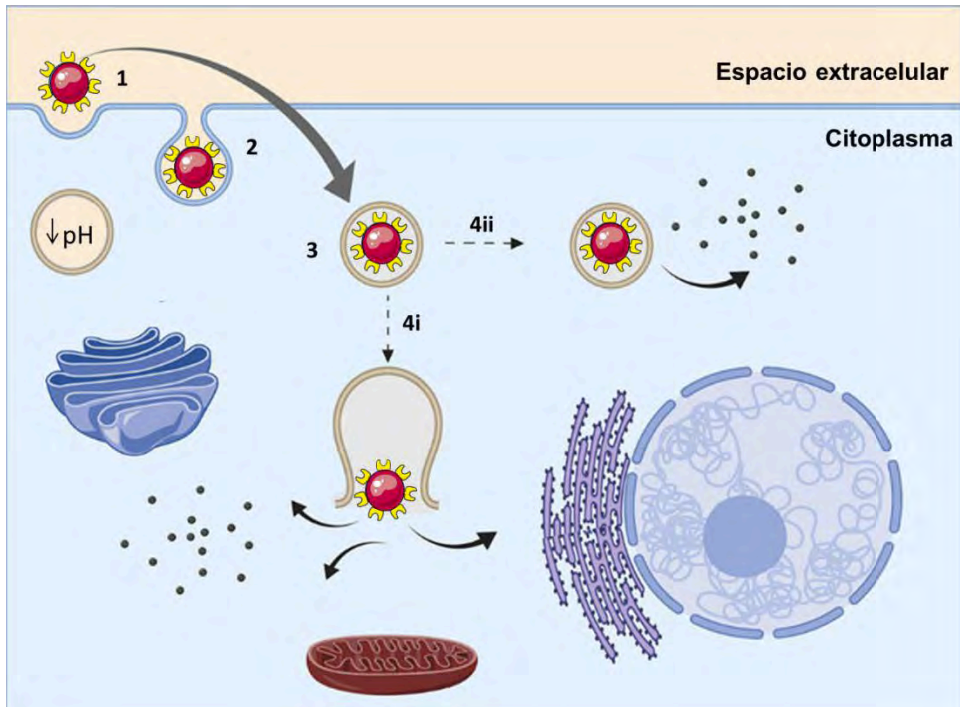


Figura 28. Representación esquemática de los diferentes estadios de entrada en la célula de una nanopartícula mesoporosa de sílice, y de la subsiguiente liberación de la carga en el citoplasma. 1) Unión activa de la nanopartícula a la superficie de la célula mediante interacción específica ligando-receptor. 2) Proceso de endocitosis mediada por receptor. 3) MSN en vesícula de endocitosis y fusión con lisosomas (acidificación de la vesícula). 4i) La MSN sale del lisosoma y alcanza el citoplasma (escape endosomal), liberando la carga en el interior de la célula. 4ii) Ruptura o digestión de la puerta molecular por modificaciones de pH o acción enzimática, con la consecuente liberación de la carga de la MSN. Adaptado a partir de *Adv Drug Deliv Rev.* 2019, 143: 69 – 96. Copyright © 2019 Elsevier B.V.

¹¹⁴ ARGYO C., WEISS V., BRÄUCHLE C., *et al.* Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as universal platform for drug delivery. *Chem. Mater.* 2014, 26(1): 435 – 451.

Si no hay una selectividad suficiente de los fármacos hacia su diana en cuestión se pueden producir efectos secundarios no deseados además de una reducción en su eficacia terapéutica, siendo un claro ejemplo el de la quimioterapia. Por ello, el principal reto de los nanodispositivos “dirigidos” es conseguir una elevada especificidad y una eficiencia de la liberación de su carga de manera simultánea, evitando uniones no específicas y la activación de efectos inmunogénicos (Figura 29).¹¹⁴ Para limitar la no especificidad y favorecer la internalización específica en la célula o el tejido diana, las MSNs se pueden diseñar de forma que se dirijan activamente hacia una región concreta. Así pues, a pesar del éxito de desarrollar sistemas que se acumulan de forma pasiva en el lugar de interés, el *targeting* activo también juega un papel importante en mejorar la biodisponibilidad del nanomaterial.¹¹⁵

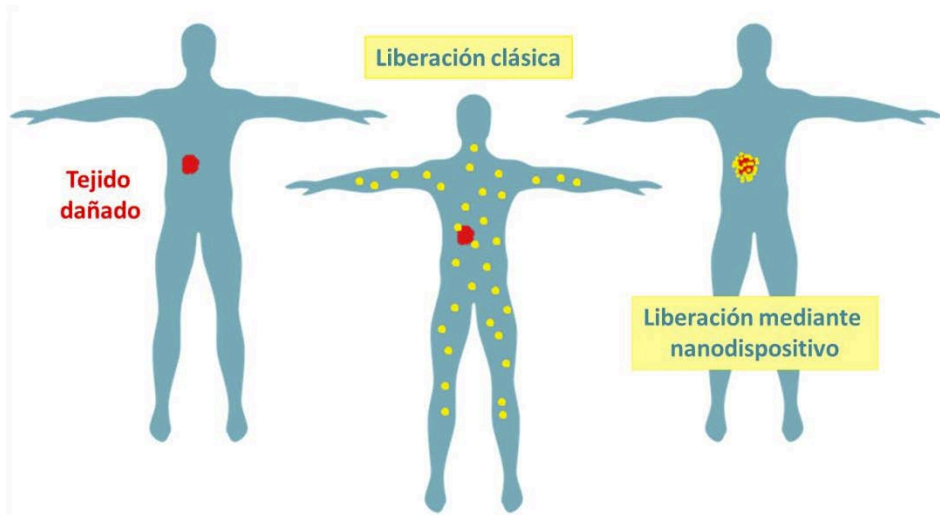


Figura 29. Esquema de la liberación dirigida de fármacos al tejido dañado (derecha) en comparación con la liberación clásica (centro).

El **targeting pasivo** se basa en la permeabilidad aumentada de la vasculatura de los tumores (efecto EPR) para dirigir la acumulación de los nanodispositivos al tumor. La mayor permeabilidad y la ausencia de drenaje linfático permiten que se produzca una acumulación preferencial de partículas de cierto tamaño (como liposomas, nanopartículas o fármacos macromoleculares) en el tejido tumoral. Un tipo de *targeting* similar sería el llamado efecto ELVIS (*extravasation via leaky vasculature followed by inflammatory cell sequestration*), que permite a las nanopartículas alcanzar de forma pasiva sitios de inflamación al extravasarse y ser “secuestradas” por las células inflamatorias.¹¹⁶

¹¹⁵ YE H., SHEN Z., YU L., WEI M., LI Y. *Manipulating nanoparticle transport within blood flow through external forces: an exemplar of mechanics in nanomedicine*. Proc R Soc A. **2018**, 474: 20170845.

Sin embargo, la falta de interacciones específicas para conseguir la internalización de las partículas hace que la eficacia terapéutica del nanodispositivo disminuya, pudiendo resultar en la expulsión del fármaco y aparición de resistencias. Además, el efecto EPR no es universal para todos los tipos de tumores. Por ello, las estrategias de **targeting activo** utilizan ligandos en la superficie de las partículas que interactúan de forma selectiva con receptores específicos en la superficie de la célula diana, favoreciendo así la unión del nanomaterial y su internalización, con el consecuente aumento de la eficacia terapéutica del fármaco encapsulado en cuestión (Figura 30).¹¹⁶

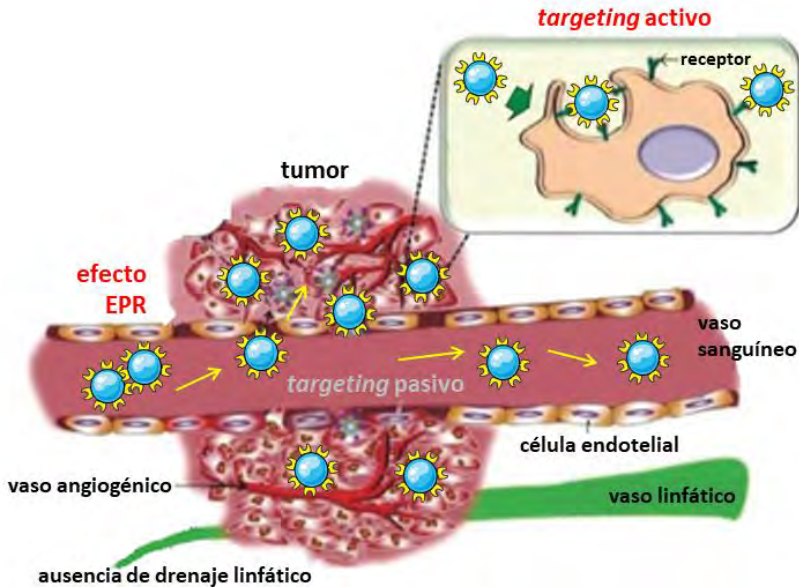


Figura 30. Representación esquemática de los fenómenos de **targeting pasivo** (o efecto EPR) y **targeting activo**. El **targeting pasivo** ocurre cuando tiene lugar la extravasación de las nanopartículas debido a la mayor permeabilidad de la vasculatura del tumor y ausencia de drenaje linfático en el mismo. El **targeting activo** se puede conseguir funcionalizando las nanopartículas con agentes directores que permitan el reconocimiento celular específico y consecuente entrada en la célula. Adaptado a partir de Proc R Soc A. 2018, 474: 20170845. Copyright © 2018, The Royal Society.

¹¹⁶ a) TARN D., ASHLEY C., XUE M., *et al.* Mesoporous silica nanoparticle nanocarriers: biofunctionality and biocompatibility. *Acc Chem Res.* **2013**, 46(3): 792 – 801. b) ZHOU M., HOU J., *et al.* Targeted delivery of hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy. *Drug Delivery.* **2018**, 25: 716 – 722. c) WAN Q., JIANG J., *et al.* Targeted delivery of low-dose dexamethasone using PCL-PEG micelles for effective treatment of rheumatoid arthritis. *J Control Release.* **2016**, 230: 64 – 72.

8.3. Biocompatibilidad, biodistribución, biodegradabilidad y excreción de las nanopartículas mesoporosas

El estudio de cómo la modulación de las características de estos nanodispositivos puede influenciar en su compatibilidad y seguridad es realmente importante para el diseño de sistemas de liberación de fármacos eficientes y seguros.

Así pues, parámetros como la estructura, forma, tamaño de partícula, el tamaño de poro y su geometría y las características de superficie juegan un papel importante en la entrada en la célula, la translocación intracelular y la citotoxicidad, así como en la biodistribución, circulación sanguínea, biodegradación, excreción y toxicidad *in vivo* (Figura 31).¹¹⁷ En este sentido, por ejemplo, el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas puede tener un impacto significativo en su farmacocinética, previniendo su rápida degradación y proporcionando una mayor y más duradera estabilidad en medio biológico.

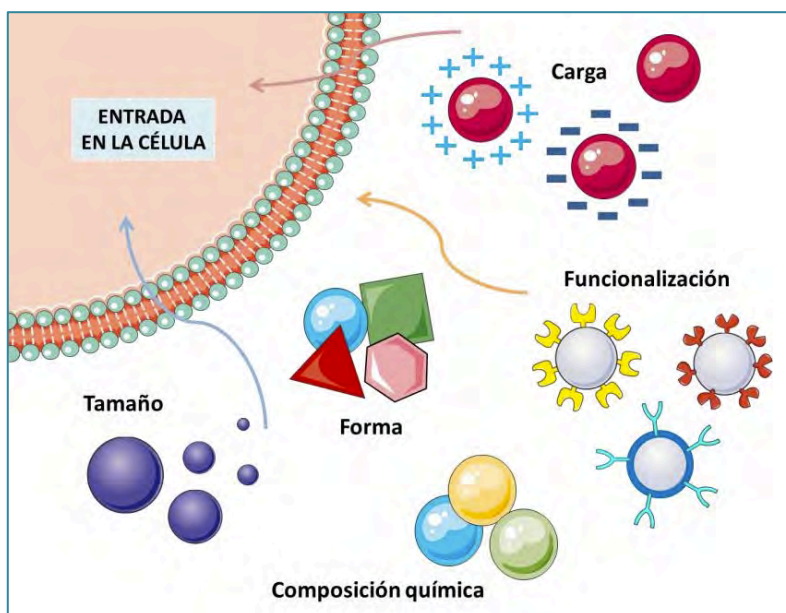


Figura 31. Esquema de las principales características de las nanopartículas que determinan las interacciones con la célula y el subsecuente mecanismo de internalización.

¹¹⁷ TANG F., LI L., CHEN D. *Mesoporous silica nanoparticles. Synthesis, biocompatibility and drug delivery*. Adv Mater. 2012, 24: 1504 – 1534.

❖ BIOCOMPATIBILIDAD

Para aplicaciones biomédicas *in vivo* es crucial que las nanopartículas no sólo lleven a cabo su objetivo terapéutico, sino que no deben producir cambios no específicos y deletéreos sobre el organismo.

Aunque, como se ha mencionado anteriormente, la sílice se ha utilizado entre otros casos como excipiente en la industria farmacéutica y en general se considera que tiene una baja toxicidad, sí que se han descrito algunos efectos tóxicos *in vivo*, por lo que la toxicidad de estos sistemas sobre el organismo debe estudiarse en detalle. El mecanismo exacto de la toxicidad causada por las MSNs sigue siendo incierto, si bien algunas teorías proponen la inducción de daño en la membrana,¹¹⁸ la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)¹¹⁹ o la interrupción de la respiración celular.¹²⁰

Se ha demostrado que parámetros como los que se detallan a continuación influyen en la biocompatibilidad de las MSNs:¹²¹

- El **tamaño de partícula** es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta, puesto que la cantidad de nanopartículas que se internalicen en la célula va a depender del tamaño de las mismas (cuanto más pequeñas, mayor internalización). También el tamaño está relacionado con la citotoxicidad que las MSNs puedan causar. En general, las partículas pequeñas muestran mayor toxicidad que las partículas de mayor tamaño (considerando un rango de entre 25 y 260nm).¹²²
- Las **propiedades estructurales** de las MSNs son otro punto de interés en cuanto a biocompatibilidad se refiere, haciendo referencia a la organización estructural del material (estructura amorfa u organizada). Por ejemplo, en el caso de los glóbulos rojos, se puede producir la lisis celular si entran en contacto con sílice amorfa a elevadas concentraciones. Esta citotoxicidad hemolítica se basa en la interacción entre los grupos silanol de la superficie de estos materiales de sílice y los grupos presentes en la membrana de los glóbulos. Aunque las MSNs con estructura ordenada (como sería el caso de la MCM-41) presentan más silanoles debido a su elevada área de superficie, la mayoría de estos

¹¹⁸ CHANG J.S., CHANG K.L.B., HWANG D.F., KONG Z.L. *In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line*. Environ Sci Technol. **2007**, 41: 2064 – 2068.

¹¹⁹ LIN W., HUANG Y.W., ZHOU Z.D., MA Y. *In vitro toxicity of silicananoparticles in human lung cancer cells*. Toxicol Appl Pharmacol. **2006**, 217: 252 – 259.

¹²⁰ TAO Z., MORROW M.P., ASEFA T., SHARMA K.K., et al. *Mesoporous silica nanoparticles inhibit cellular respiration*. Nano Lett. **2008**, 8: 1517 – 1526.

¹²¹ LIU H.J., XU P. *Smart mesoporous silica nanoparticles for protein delivery*. Nanomaterials. **2019**, 9: 511.

¹²² LIN Y.S., HAYNES C.L. *Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering and pore integrity on hemolytic activity*. J Am Chem Soc. **2010**, 132: 4834 – 4842.

grupos silanol se encuentran en la parte interna de la nanopartícula, con lo cual la relativamente baja concentración de silanoles exteriores se traduce en una mayor **hemocompatibilidad**.¹²³ Precisamente esta hemocompatibilidad es un factor importante a tener en cuenta, puesto que la inyección por vía intravenosa a través de la cola en modelos murinos es una de las principales vías de administración de nanopartículas *in vivo*.⁹⁴

- De manera similar, la **forma** de las MSNs tiene repercusiones en cuanto a su biocompatibilidad. No solo es importante el ratio de aspecto (proporción entre anchura y altura), sino que una forma más esférica o más tubular puede afectar en la internalización del material por parte de la célula (siendo dicha entrada dependiente de la morfología de la nanopartícula y de la línea celular). Por ejemplo, la capacidad endocítica de fibroblastos es significativamente mayor para MSNs esféricas en comparación con MSNs tipo “bastón”.¹²⁴
- También es importante tener en cuenta la **funcionalización de la superficie** de las MSNs, puesto que determinadas modificaciones pueden interaccionar con los lípidos y proteínas de la membrana celular, alterando su estructura y conformación. En este sentido, se sabe que las partículas con superficie catiónica inducen respuestas inmunes más intensas, citotoxicidad y menores tiempos de circulación en comparación con partículas de superficie aniónica o neutra; pero a su vez las superficies cargadas positivamente son sinónimo de mayor transporte transvascular e intracelular, debido al potencial generalmente negativo de la membrana celular.¹²⁵ Por tanto, tener en cuenta la modificación de la superficie de las MSNs es crucial a la hora de mejorar su biocompatibilidad y eficacia. En este sentido, la PEGilación es la modificación más habitual y eficiente para lograr este fin, puesto que el PEG sobre la superficie puede hacer que se forme una corona hidrofílica alrededor de la partícula, aumentando de esta forma la dispersión del material, disminuyendo la endocitosis e incrementando los tiempos de circulación *in vivo* (al retrasar la opsonización).¹²⁶ También se utilizan otros grupos funcionales para mejorar la biocompatibilidad de las MSNs y manipular su distribución y

¹²³ SLOWING I.I., WU C.W., VIVERO-ESCOTO J.L., LIN V.S.Y. *Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells*. *Small*. **2009**, 5: 57 – 62.

¹²⁴ TREWYN B.G., NIEWEG J.A., ZHAO Y., LIN V.S.Y. *Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane penetration*. *Chem Eng J*. **2008**, 137: 23 – 29.

¹²⁵ NEL A.E., MÄDLER L., VELEGOL D., *et al.* *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. *Nat Mat*. **2009**, 8: 543.

¹²⁶ a) VERONESE F.M., PASUT G. *PEGylation, successful approach to drug delivery*. *Drug Discov Today*. **2005**, 10: 1451 – 1458. b) TAO Z., TOMS B.B., GOODISMAN J., ASEFA T. *Mesoporosity and functional group dependent endocytosis and cytotoxicity of silica nanomaterials*. *Chem Res Toxicol*. **2009**, 22: 1869 – 1880.

excreción *in vivo*, como los grupos amino (-NH₂), carboxilo (-COOH) o fenil (-Ph).^{114,116}

- Finalmente, y sobre todo *in vivo*, es importante la **dosis** de administración de los materiales. Liu y colaboradores, realizaron un estudio exhaustivo en el que administraron MSNs por vía intravenosa (i.v) en ratones para determinar entre otros parámetros la toxicidad asociada a la administración de una sola dosis como para una administración continuada.¹²⁷ Los autores determinaron que, para una sola dosis, la toxicidad de las MSNs se situaba en 1000mg/kg; mientras que para una administración continua durante 14 días, los animales toleraban bien dosis de 20, 40 y 80mg/kg. Además, la toxicidad a nivel de órganos (concretamente, daño hepático) sólo se observó a dosis elevadas de nanopartículas, por encima de los 500mg/kg en monodosis. En el caso que nos ocupa en esta tesis se ha visto que las MSNs son bien toleradas en nuestros sistemas *in vitro* (< 100µg/mL) e *in vivo* (< 200µg/kg).

❖ BIODISTRIBUCIÓN, BIODEGRADABILIDAD Y EXCRECIÓN

Cuando las nanopartículas se administran en el organismo, se observa una distribución sistémica a través del torrente sanguíneo, con una acumulación preferencial en los principales órganos diana. Entre ellos se incluyen hígado, pulmones, riñones, bazo, cerebro y tracto gastrointestinal – siendo el hígado, los pulmones y el bazo los órganos de mayor acumulación, independientemente de la ruta de administración (esto se atribuye a la elevada capacidad que tienen estos órganos para retener sustancias extrañas).^{128, 129}

Las nanopartículas hidrofóbicas generalmente tienen vidas medias más cortas en el organismo (entre segundos y minutos) debido a que rápidamente se eliminan de la circulación a través de los elementos celulares del sistema retículo-endotelial (SRE, también conocido como sistema fagocítico mononuclear (SFM)), en concreto hígado y bazo. Aunque este comportamiento podría limitar la biodisponibilidad y utilidad de las nanopartículas como transportadores de fármacos, algunas aplicaciones *in vivo* dependen de la rápida internalización por parte de los macrófagos para que las partículas lleguen a los nódulos linfáticos o sitios de inflamación.

¹²⁷ LIU T., LI L., TENG X., HUANG H., *et al.* Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials*. **2011**, 32: 1657.

¹²⁸ a) CHEN Y., CHEN H., SHI J. *In vivo bio-safety evaluations and diagnostic/therapeutic applications of chemically designed mesoporous silica nanoparticles*. *Adv Mater*. **2013**, 25: 3144. b) WU T., TANG M. *Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs*. *J Appl Toxicol*. **2018**, 38, 25.

¹²⁹ HE Q., SHI J. *Mesoporous silica nanoparticles based nano drug delivery systems: synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility*. *J Mater Chem*. **2011**, 21: 5845.

Cuando se administran al torrente sanguíneo, el tamaño de partícula tiene un efecto importante en el ratio y la ruta de eliminación que el nanofármaco va a seguir en el organismo (Figura 32). Por ejemplo, los riñones pueden excretar partículas siempre y cuando sean inferiores a los 5-8nm. Por su parte, hígado y bazo pueden atrapar nanopartículas de tamaño superior a los 200nm; a su vez, el hígado es capaz de expulsar posteriormente dichas partículas al torrente sanguíneo, pero esto no necesariamente implica que vaya a tener lugar su excreción (puesto que el conducto biliar tiene aproximadamente unos 30nm de diámetro). Las células de Kupffer son las que retienen las partículas hasta que el hígado las consigue degradar. En referencia a las nanopartículas de tamaño entre 30-40nm hasta unos pocos cientos de nanómetros, pueden acumularse de manera pasiva en los tumores (en caso de haberlos) a través del efecto EPR.¹²⁵ Haciendo referencia de nuevo al estudio mencionado en el apartado anterior de Liu, los autores también concluyeron que un periodo de cuatro semanas era suficiente para la eliminación del 50% de las nanopartículas administradas (i.v) al organismo, resultados que obtuvieron tras analizar el contenido en sílice en diferentes tejidos.¹²⁷

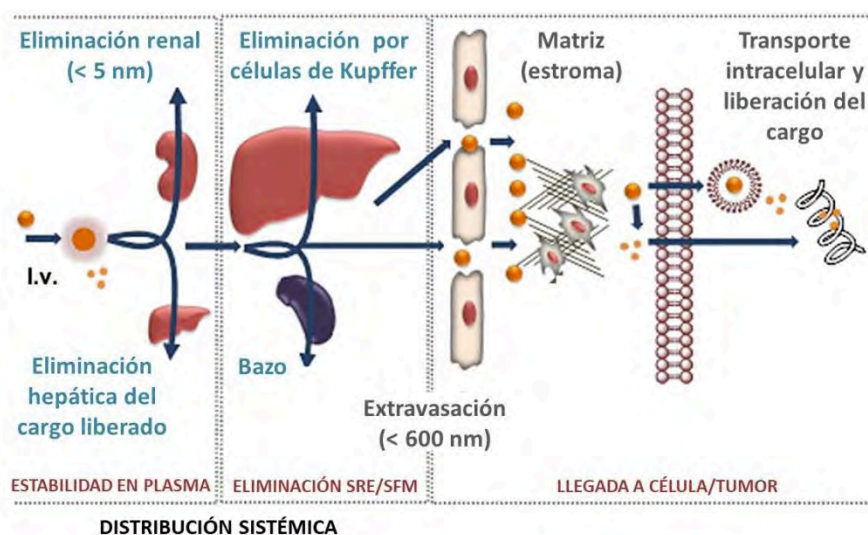


Figura 32. Biodistribución *in vivo* de nanopartículas inyectadas por vía intravenosa. Cuando el diámetro es superior a los cientos de nm, las partículas se acumulan en pulmón, bazo e hígado. En el rango de 20 – 150 nm de diámetro, las nanopartículas también se pueden acumular en tumores (si los hay) por el efecto EPR. Por debajo de los 5 nm, las partículas administradas se filtran y excretan rápidamente por los riñones. Adaptado a partir de J Control Rel. 2013, 28: 782 – 794. Copyright © 2013 Elsevier B.V.

En cuanto a la biodegradabilidad, otro de los factores clave en torno a la seguridad de las nanopartículas, se parte de que el soporte de las MSNs está constituido por enlaces -Si-O-. Estos enlaces son susceptibles a la hidrólisis del grupo siloxano (Si-O-Si) y subsecuente generación de ácido ortosilícico (Si(OH)₄), que se tolera bien por el organismo y se excreta a través de la orina. Este hecho corrobora la evidencia de que la eliminación vía renal es la principal vía de excreción de las MSNs.¹³⁰

Conocer y entender todos estos conceptos es fundamental para poder optimizar el diseño de las nanopartículas, y por ende, su efecto terapéutico y llegada a clínica. A pesar de que se pueden encontrar datos contradictorios en la literatura – probablemente debido a que cada material presenta características únicas – son muchos los estudios que están contribuyendo a aportar cada vez mayor luz sobre la bioseguridad de las MSNs.

¹³⁰ a) BUNKER B.C. *Molecular mechanisms for corrosion of silica and silicate glasses*. J Non-Cryst Solids. **1994**, 179: 300 – 308. b) POPPLEWELL F., KING S.J., DAY J.P., ACKRILL L.K., *et al*. *Kinetics of uptake and elimination of silicic acid by a human subject: a novel application of ³²Si and accelerator mass spectrometry*. J Inorg Biochem. **1998**, 69: 177. c) HAO N., LIU H., LI L., CHEN D., LI L., TANG F. *In vitro degradation behavior of silica nanoparticles under physiological conditions*. J Nanosci Nanotechnol. **2012**, 12: 6346.

Capítulo II •

Objetivos

Dada la relevancia de los materiales mesoporosos en aplicaciones de liberación controlada de fármacos, la presente tesis pretende contribuir al campo de la biomedicina mediante el diseño, la síntesis, la caracterización y la evaluación tanto *in vitro* como *in vivo* de un conjunto de nanodispositivos basados en nanopartículas mesoporosas de sílice, funcionalizadas con galacto-sacáridos que actúan como puertas moleculares y cargadas con compuestos fluorescentes (detección) o con fármacos terapéuticos (tratamiento), para aplicaciones de liberación controlada en enfermedades relacionadas con procesos de senescencia.

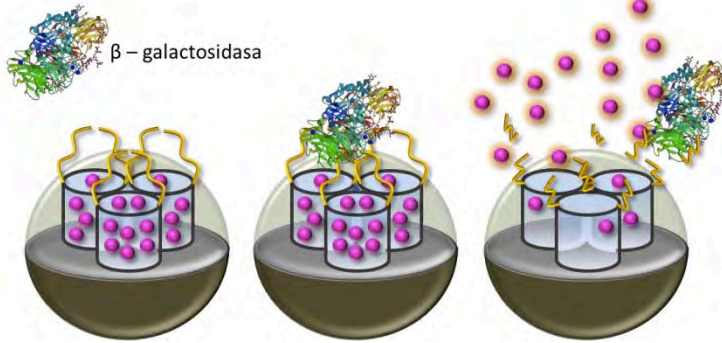
Los objetivos concretos en referencia a cada Capítulo son:

- Sintetizar y optimizar un conjunto de nanodispositivos mesoporosos para el *targeting* selectivo de células senescentes. Caracterizar los materiales a nivel estructural mediante técnicas estándar, y a nivel funcional en presencia del estímulo de β -galactosidasa.
- Validar *in vitro* e *in vivo*, en un modelo de melanoma y en un modelo de fibrosis pulmonar, las nanopartículas cargadas con el fluoróforo rodamina B (con fines de detección) y las nanopartículas cargadas con el fármaco citotóxico doxorubicina (con fines terapéuticos).
- Poner a punto un modelo de senescencia inducida por palbociclib en una línea celular de cáncer de mama triple negativo, y validar el efecto senolítico del fármaco navitoclax en nano-formulación. Poner posteriormente a punto el modelo de ratón y validar la eficacia antitumoral de la combinación de senogénesis (palbociclib) y senolisis dirigida (navitoclax encapsulado).
- Realizar el rastreo posicional de una quimioteca de hexapéptidos en un modelo celular previamente establecido para la búsqueda de compuestos con actividad senolítica. Determinar las secuencias de los compuestos candidatos y validar los hexapéptidos de composición definida.

Capítulo III •

Síntesis y caracterización *in vitro* de nanopartículas Gal·NP para liberación controlada en células senescentes

• | Resumen del capítulo



El empleo de nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) como sistema de liberación controlada y dirigida de fármacos ha adquirido durante los últimos años gran importancia, debido a las múltiples ventajas que presentan. Entre ellas, destaca la posibilidad de funcionalizar su superficie con biomoléculas que actúen como puerta molecular. Estas puertas moleculares permiten una liberación controlada de la carga encapsulada en el interior de las nanopartículas, en respuesta únicamente a un estímulo externo específico.

El objetivo principal en el presente Capítulo es el diseño, síntesis y caracterización de nuevos nanomateriales para la detección y eliminación de células senescentes, que puedan ser aplicables a enfermedades relacionadas con procesos de senescencia como son la fibrosis pulmonar idiopática, la cirrosis hepática o el cáncer.

De esta forma, se pretende desarrollar y caracterizar *in vitro* un conjunto de nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con galacto-sacáridos que puedan liberar su carga de forma selectiva en las células senescentes.

1 | Introducción

Durante los últimos años la senescencia se ha relacionado con múltiples patologías crónicas, entre las que se incluyen fibrosis pulmonar y hepática, aterosclerosis, fibrosis cardíaca después de un infarto de miocardio, obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades renales o desórdenes neurológicos. En todos estos casos se ha visto que la senescencia puede tener efectos beneficiosos (limitando la progresión del proceso patológico) o efectos perjudiciales (contribuyendo al desarrollo de la patología).^{1,2} Para hacer frente a este problema deben surgir estrategias para prevenir, reemplazar o eliminar células senescentes, estrategias que van a ser de interés fundamental tanto en aplicaciones de investigación básica como clínicas.

Poco antes de 2012 se publicaron dos trabajos que señalaban la implicación de las células senescentes en procesos de envejecimiento, así como demostraban que su eliminación podía ser terapéutica. En el primer trabajo consiguieron eliminar células senescentes p16 positivas en un modelo de ratón con progeria genéticamente modificado, lo cual supuso un arresto de todos los fenotipos de envejecimiento acelerado propios de la enfermedad y el rejuvenecimiento de algunos de los tejidos dañados.³ En el segundo trabajo, la degeneración tisular se se revirtió mediante reactivación de la expresión de la telomerasa en ratones envejecidos deficientes en dicha enzima.⁴ Sin embargo estos ejemplos se llevaron a cabo en ratones transgénicos, con lo que seguía siendo necesario el reemplazamiento o la eliminación de células senescentes mediante estrategias farmacológicas que permitiesen el tratamiento de pacientes.

Una primera aproximación para lograr este fin podría ser el desarrollo de sistemas transportadores selectivos que fueran capaces de liberar su carga en éstas células senescentes. Fue entonces, en 2012, cuando nuestro grupo desarrolló un nanosistema para llevar a cabo la liberación selectiva de compuestos en células senescentes.⁵

¹ MUÑOZ-ESPÍN D., SERRANO M. *Cellular senescence: from physiology to pathology*. Nat Rev Mol Cell Biol. **2014**, 15(7): 482 – 96.

² BURTON D. G. *Cellular senescence, ageing and disease*. Age. **2009**, 31: 1 – 9.

³ BAKER D.J., WIJSHAKE T., TCHKONIA T., LEBRASSEUR N.K., CHILDS B.G., VAN DE SLUIS B., KIRKLAND J.L., VAN DEURSEN J.M. *Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders*. Nature. **2011**, 479(7372): 232 – 236.

⁴ JASKELIOFF M., MULLER F.L., PAIK J.H., THOMAS E., JIANG S., ADAMS A.C., et al. *Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice*. Nature. **2011**, 469(7328): 102 – 106.

⁵ AGOSTINI A., MONDRAGÓN L., BERNARDOS A., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., DOLORES MARCOS M., SANCENÓN F., et al. *Targeted cargo delivery in senescent cells using capped mesoporous silica nanoparticles*. Angew Chemie - Int Ed. **2012**, 51(42): 10556 – 10560.

La estrategia del grupo se basó en utilizar nanopartículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con galacto-oligo-sacáridos (GOS).⁶

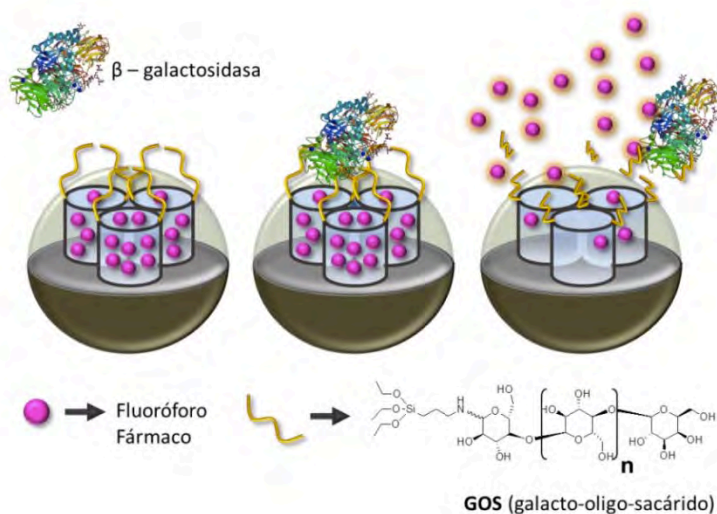


Figura 33. Representación esquemática del material mesoporoso, cargado con un compuesto determinado y funcionalizado con moléculas de galacto-oligo-sacárido (GOS). Es en presencia de la enzima β-galactosidasa cuando se activa el mecanismo de liberación controlada gracias a la hidrólisis de las moléculas de GOS que inicialmente se encuentran bloqueando la salida de los poros.

Puesto que la presencia de β-galactosidasa sobreexpresada está considerada un marcador característico de células senescentes, el mecanismo de funcionamiento de las nanopartículas es el siguiente: al estar derivatizadas con moléculas voluminosas de GOS, el sistema mantiene la carga encapsulada en ausencia de estímulo (“liberación cero”), mientras que en células senescentes con elevada actividad β-galactosidasa se produce la hidrólisis del GOS y por tanto la liberación selectiva del contenido de los poros específicamente en estas células (Figura 33).

Las nanopartículas se probaron en células de levadura genéticamente modificadas para que mostrasen sobreexpresión de β-galactosidasa, y también se validaron en células senescentes humanas – concretamente en fibroblastos derivados de pacientes de disqueratosis congénita. En ambos modelos celulares las nanopartículas funcionalizadas con GOS demostraron liberar la carga encapsulada de forma selectiva en células senescentes y no en células control, con elevada especificidad y sin efectos tóxicos detectables.⁵

⁶ LEE B.Y., HAN J.A., IM J.S., MORRONE A., JOHUNG K., GOODWIN E.C., KLEIJER W.J., DIMAIO D., HWANG E.S. *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. *Aging Cell*. **2006**, 5(2): 187 - 195.

Motivados por los resultados obtenidos, el grupo ha seguido trabajando en el sistema de nanopartículas para validar su funcionamiento en otros modelos de enfermedades relacionadas con procesos de senescencia, como podrían ser la fibrosis pulmonar idiopática o el cáncer. Sin embargo, el primer paso antes de saltar a nuevos modelos celulares debía ser la optimización del nanosistema, haciendo referencia en concreto a las moléculas que se estaban utilizando como “puerta molecular” – es decir, el GOS.

La elección de polisacáridos como puertas moleculares se debe a que estos compuestos son biocompatibles, fáciles de preparar y de bajo coste. En este caso, el polisacárido GOS empleado estaba disponible comercialmente (PROMOVITA), y en concreto se trataba de un hidrolizado de galacto-oligo-sacáridos que contenía al menos un 60% de galacto-oligo-sacáridos, 33% de disacáridos, 39% de trisacáridos, 18% de tetrasacáridos, 7% de pentasacáridos y 3% de sacáridos mayores. Es decir, GOS es en realidad un hidrolizado de galacto-oligo-sacáridos, presentando en su composición una mezcla heterogénea de moléculas de distinto tamaño. Este hecho dificultaba la caracterización de las nanopartículas, no siendo posible determinar concretamente el número de unidades que conformaban los galacto-oligo-sacáridos que se anclaban en la superficie de la nanopartícula.

Es por ello que tras una búsqueda exhaustiva se identificó el polisacárido galactan, un polímero de composición definida que consta de dos trisacáridos de galactosa unidos por enlace o-glicosídico β -1,4. Puesto que este sacárido es un hexámero de galactosas con composición por tanto conocida, se esperaba poder obtener una mejor caracterización del sólido funcionalizado final. Igualmente se esperaba que su empleo como puerta molecular produjese una mejora en la respuesta del nanomaterial respecto al previamente descrito GOS, ya que en este caso el material estaría funcionalizado con moléculas de un tamaño homogéneo y relativamente grande (seis unidades de galactosa), mejorando así el bloqueo de los poros del material mesoporoso.

En el trabajo fin de máster titulado “Desarrollo de nanodispositivos terapéuticos aplicados a enfermedades relacionadas con procesos de senescencia” (defendido por la autora de ésta tesis)⁷ se presenta la síntesis y caracterización tanto estructural como funcional de los dos sistemas de nanopartículas – GOS y galactan, con el fin de comparar la respuesta del nuevo galacto-hexa-sacárido en su funcionamiento como puerta molecular en referencia al GOS original. Los resultados obtenidos de esta tesina de máster confirmaron la validez y el mejor funcionamiento del galactan como puerta molecular, mostrando el nuevo nanodispositivo un incremento de su selectividad hacia células senescentes.

⁷ GALIANA I. *Desarrollo de nanodispositivos terapéuticos aplicados a enfermedades relacionadas con procesos de senescencia*. Máster Universitario en Biotecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Valencia, 2015.

De esta forma se establece el punto de partida de éste Capítulo, en el cual se van a detallar el desarrollo y la validación a nivel *in vitro* de un set de nanopartículas mesoporosas de sílice con diferentes cargas y funcionalizadas con el galacto-hexa-sacárido galactan. Nanopartículas que en los siguientes Capítulos se validarán en modelos celulares e *in vivo* en modelos de ratón de diferentes enfermedades relacionadas con procesos de senescencia.

2 | Objetivos

Teniendo en cuenta el escenario planteado en la Introducción, los objetivos en este Capítulo son:

- ✓ Diseño, síntesis y optimización de cinco nanodispositivos mesoporosos para el *targeting* selectivo de células senescentes, cargados con diferentes fluoróforos (para detección) y fármacos (para tratamiento) y funcionalizados con el galacto-hexa-sacárido galactan como puerta molecular. Como fluoróforos se utilizarán rodamina B (Rho) y verde de indocianina (ICG), y como fármacos doxorubicina (Dox) y navitoclax (Nav).
- ✓ Caracterización estructural de los materiales sintetizados mediante técnicas estándar.
- ✓ Caracterización funcional de los materiales sintetizados mediante la comprobación *in vitro* del funcionamiento de los nanodispositivos en presencia del estímulo capaz de abrir la puerta molecular (β -galactosidasa).

3 | Resultados y discusión

Diseño del sistema

En la presente tesis se ha propuesto desarrollar y optimizar una nanoterapia innovadora dirigida a células senescentes como estrategia enfocada a diagnóstico/tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos de senescencia. El dispositivo propuesto consiste en nanopartículas mesoporosas de sílice que contienen en el interior de sus poros una carga encapsulada (bien un fluoróforo, bien un fármaco), y que están recubiertas con un galacto-hexa-sacárido – galactan – que bloquea los poros actuando como puerta molecular e impidiendo la salida del compuesto encapsulado.

Este sistema es capaz de mantener la carga en su interior hasta el momento en que la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β Gal) está presente. En ese momento, la enzima rompe los enlaces glicosídicos del galacto-hexa-sacárido, produciéndose así la liberación selectiva de la carga en las células diana (Figura 34).

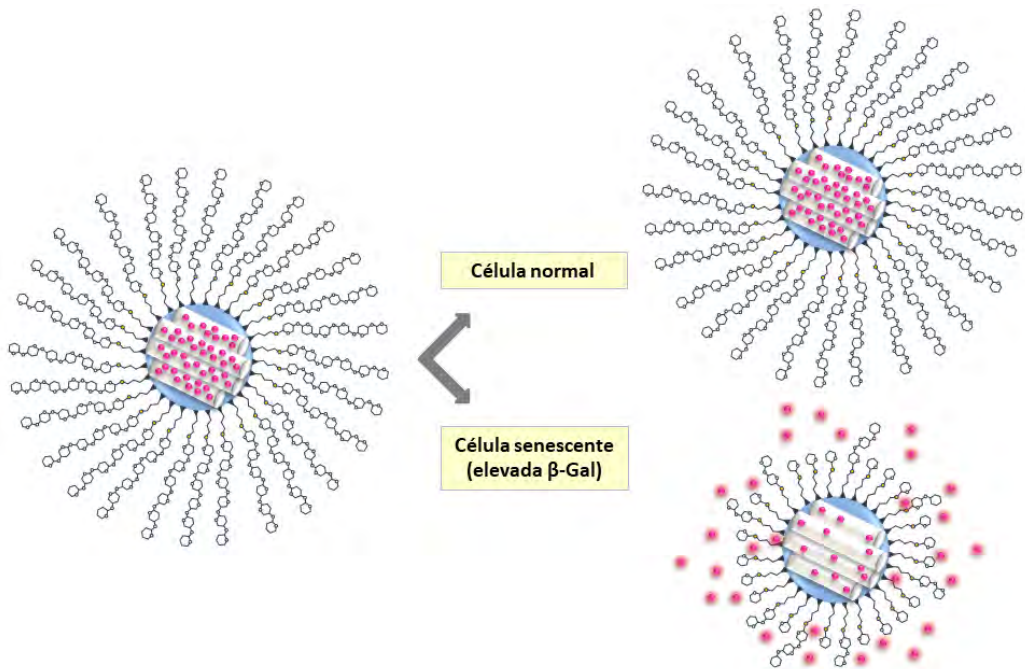


Figura 34. Representación esquemática del mecanismo de acción del nanodispositivo diseñado. Debido a la acción de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia, el galactosacárido se hidroliza y se libera la carga encapsulada en células senescentes con dicha actividad enzimática.

Siguiendo este planteamiento y con el objetivo de cubrir aplicaciones tanto de diagnóstico como de tratamiento, se sintetizaron cinco sólidos diferentes en función de la carga encapsulada. Dos de estos sólidos se cargaron con fluoróforos con vistas a ser utilizados en estrategias de detección; mientras que un tercer sólido se cargó con un fármaco citotóxico y un cuarto material se cargó con un compuesto senolítico, éstos dos últimos con vistas a ser utilizados como tratamiento. El quinto nanodispositivo únicamente se funcionalizó con el galacto-hexa-sacárido, de forma que no transportaba ningún tipo de carga encapsulada.

Así pues, los cinco sólidos sintetizados y caracterizados fueron los que se detallan a continuación:

- **Gal-NP(Rho)**: cargado con el fluoróforo rodamina B – Rho.
- **Gal-NP(ICG)**: cargado con el fluoróforo verde de indocianina – ICG.

- **Gal·NP(Dox)**: cargado con el citotóxico doxorrubicina – Dox.
- **Gal·NP(Nav)**: cargado con el senolítico navitoclax – Nav.
- **Gal·NP(0)**: sin carga encapsulada – 0.

En este Capítulo se describe el proceso de síntesis y caracterización a nivel estructural de los cinco sólidos citados, así como también se detalla la validación funcional *in vitro* en presencia de una β -galactosidasa externa añadida al medio de ensayo. La validación funcional en modelo celular y en modelo *in vivo* de ratón de los sólidos **Gal·NP(Rho)** y **Gal·NP(Dox)** se detalla en el Capítulo IV, mientras que la correspondiente validación para los sólidos **Gal·NP(0)**, **Gal·NP(ICG)** y **Gal·NP(Nav)** se recoge en el Capítulo V.

Síntesis de los materiales

La síntesis de materiales basados en nanopartículas de sílice mesoporosa es un área bien estudiada y conocida por el grupo de investigación, de manera que para llevar a cabo la síntesis de los nanodispositivos del presente trabajo se siguieron estrategias ya establecidas por el propio grupo, tal y como se describe en varios de sus artículos.^{8,9,10}

El proceso de síntesis llevado a cabo se puede resumir, brevemente, en cuatro pasos generales que se representan gráficamente en la **Figura 35**:

1. En primer lugar se sintetizó el esqueleto mesoporoso de MCM-41, siguiendo la metodología de síntesis que se ha descrito en el Capítulo I (Introducción: **Figura 18**).
2. A continuación el material mesoporoso obtenido se cargó con los correspondientes compuestos descritos, esto es: rodamina B, verde de indocianina, doxorrubicina o navitoclax.
3. Los sólidos ya cargados se funcionalizaron con 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES), aprovechando los defectos estructurales en forma de grupos silanol presentes en la superficie de los mismos.

⁸ BERNARDOS A., AZNAR E., MARCOS M. D., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., SANCENÓN F. SOTO J. *et al.* *Enzyme-Responsive Controlled Release Using Mesoporous Silica Supports Capped with Lactose*. *Angew Chem.* **2009**, 121: 5998 – 6001.

⁹ CASASÚS R., MARCOS M.D., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., ROS-LIS J.V., SOTO J., VILLAESCUSA L. *et al.* *Toward the development of ionically controlled nanoscopic molecular gates*. *J Am Chem Soc.* **2004**, 126: 8612.

¹⁰ COLL C., CASASÚS R., AZNAR E., MARCOS M.D., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., SANCENÓN F. *et al.* *Nanoscope hybrid systems with a polarity-controlled gate-like scaffolding for the colorimetric signalling of long-chain carboxylates*. *Chem Commun.* **2007**: 1957 – 1959.

4. Finalmente se ancló el galacto-hexa-sacárido galactan como puerta molecular para bloquear la salida de los poros y obtener los nanodispositivos finales.

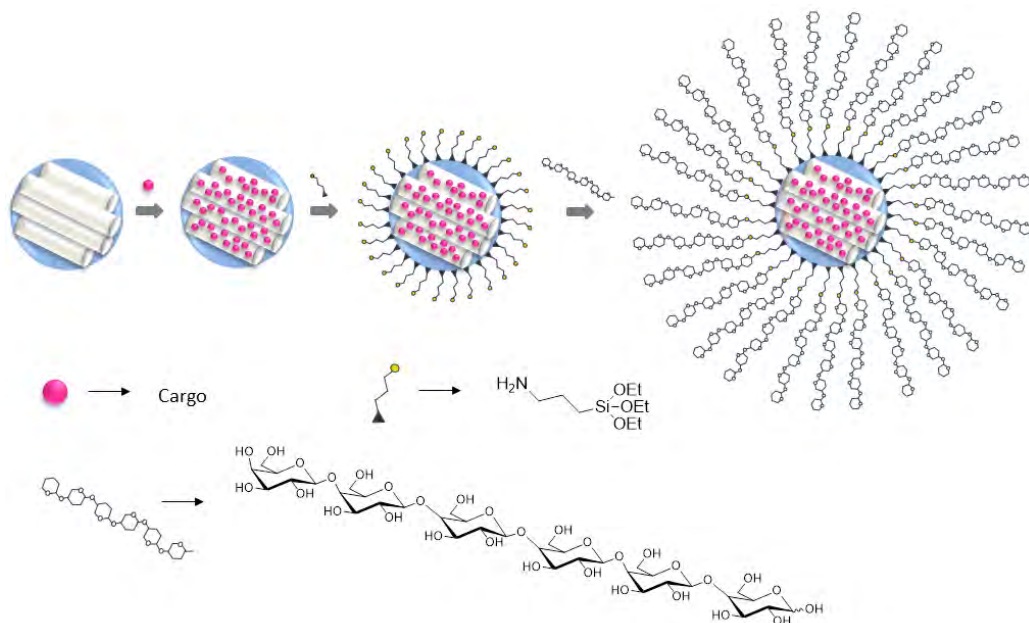


Figura 35. Representación esquemática de los pasos de síntesis de un nanodispositivo Gal-NP. Tras obtenerse la estructura MCM-41 mediante procedimientos estándar de síntesis, se lleva a cabo un paso de carga en el que se encapsula en el interior del material mesoporoso el compuesto deseado (fluoróforo o fármaco). A continuación la superficie de los materiales se funcionaliza con un derivado de trialcóxido de silano (APTES) que reacciona con los defectos estructurales en forma de grupos silanol que están presentes en la superficie de los sólidos. En un último paso se anclan las moléculas de galactan (galacto-hexa-sacárido) que van a bloquear la salida de los poros, reteniendo así la carga en el interior de los mismos.

Caracterización estructural de los materiales

Para la caracterización de los materiales preparados se emplearon las técnicas estándar de difracción de rayos X en polvo, microscopía de transmisión electrónica, DLS (*dynamic light scattering*), adsorción-desorción de N_2 , análisis elemental y análisis termogravimétrico. Además se utilizaron la espectroscopía de UV-visible y la espectroscopía de fluorescencia para monitorizar la liberación de la carga de las nanopartículas en presencia del estímulo deseado.

Así pues, los estudios de difracción de rayos X en polvo permitieron comprobar la correcta síntesis de los materiales, que en todos los casos preservaron la estructura mesoporosa deseada. Es importante señalar que en un diagrama típico de difracción de RX en polvo de una MCM-41 se pueden observar cuatro picos de

Bragg característicos, debidos a la ordenación hexagonal del material y que se indexan como (100), (110), (200) y (210); correspondiéndose en unidades de ángulo 2θ a los picos que aparecen aproximadamente a 2, 3.5, 4.2 y 5.7 grados, respectivamente. De los cuatro, el pico (100) es el más intenso y característico de este tipo de materiales mesoporosos, y su presencia permite confirmar la naturaleza del material y por tanto si el proceso de síntesis ha tenido lugar correctamente.¹¹ Teniendo esto en mente, la **Figura 36** muestra una selección de patrones de difracción de diferentes sólidos sintetizados, concretamente del material MCM-41 sin calcinar (referido como a), MCM-41 calcinada (referida como b), y los sólidos finales **Gal·NP(Rho)**, **Gal·NP(0)** y **Gal·NP(ICG)** (curvas c, d y e respectivamente).

En todos los difractogramas se preserva el pico (100) aproximadamente a 2.5 grados 2θ , lo cual confirma la naturaleza de la fase mesoporosa MCM-41 de todos los sólidos. Más en detalle, el material sin calcinar presenta las cuatro reflexiones típicas a bajo ángulo de una matriz hexagonal, anteriormente mencionadas. En el patrón correspondiente a la MCM-41 calcinada se puede observar un cambio significativo en el pico (100), que se ensancha y se desplaza, así como un ensanchamiento de los picos (110) y (200). Estos cambios se deben a la condensación de los silanoles en el paso de calcinación, que causa aproximadamente una contracción de la celda de 4Å.

Como se puede observar en la figura, este desplazamiento se preserva en los difractogramas de los sólidos finales **Gal·NP(Rho)**, **Gal·NP(0)** y **Gal·NP(ICG)**. En estos materiales las reflexiones (110) y (200) prácticamente se pierden debido a una reducción del contraste, relacionada con la carga de los mesoporos con el correspondiente fluoróforo y con el proceso de funcionalización con grupos orgánicos. Aun así, la intensidad del pico (100) en los tres patrones indica claramente que el proceso de carga, la funcionalización adicional con el producto 3-aminopropiltriétoxosilano (APTES) y el anclaje del galacto-hexa-sacárido (galactan) no han modificado sustancialmente la matriz mesoporosa del material, preservando los tres sólidos el pico típico de la matriz inorgánica.

¹¹ COLL C. *Superficies químicamente modificadas para la detección colorimétrica y eliminación de aniones de interés medioambiental en aguas*. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de València, 2010.

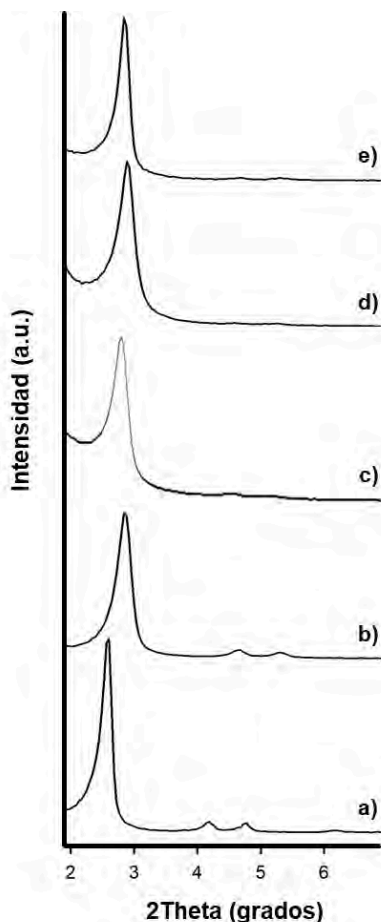


Figura 36. Difractogramas de rayos X que muestran los patrones de difracción del soporte MCM-41 sin calcinar (curva a), MCM-41 tras el proceso de calcinación (curva b), sólido final Gal-NP(Rho) (curva c), sólido final Gal-NP(0) (curva d) y sólido final Gal-NP(ICG) (curva e).

La presencia de la estructura mesoporosa en los sólidos funcionalizados finales también se confirmó mediante microscopía de transmisión electrónica. Como muestra la **Figura 37**, los canales típicos de la matriz MCM-41 se pueden observar como rallas blancas y negras alternadas, así como también se aprecian los poros hexagonales característicos de la matriz en disposición de panal de abejas. Esto se puede apreciar con mayor claridad en la MCM-41 calcinada (**Figura 37b**) o en el sólido **Gal-NP(0)** (**Figura 37d**), en los que los poros no presentan carga de compuesto; también se puede apreciar en el sólido **Gal-NP(ICG)**, cuyas imágenes se tomaron con un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (**Figura 37e**). Debido a que las imágenes del sólido **Gal-NP(Rho)** no se tomaron con este equipo de alta resolución se puede observar en la **Figura 37c** una disminución del contraste entre rayas blancas y negras, lo cual se debe a la carga

de los poros y a la funcionalización de la superficie del material. Con los análisis de microscopía también se pudo confirmar que los materiales sintetizados presentaban una geometría esférica con diámetros de entre 80 y 100nm.

En definitiva, de estos estudios se pudo concluir que en todos los casos se conservaban la geometría esférica y la estructura mesoporosa de las nanopartículas, inclusive en los sólidos finales, indicando esto que los procesos de carga y funcionalización tuvieron lugar correctamente y no alteraron las características de la matriz de partida.

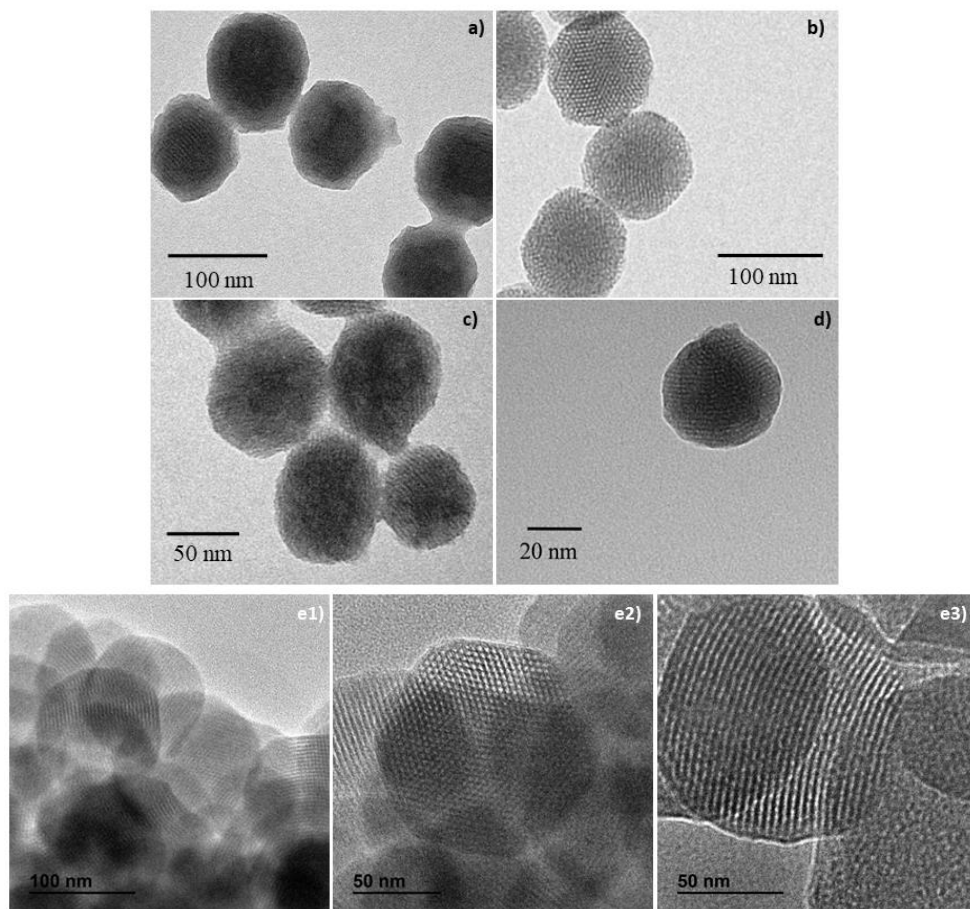


Figura 37. Imágenes representativas de TEM correspondientes a los sólidos MCM-41 sin calcinar (a), MCM-41 calcinada (b), Gal-NP(Rho) (c), Gal-NP(0) (d) y Gal-NP(ICG) (e1, e2, e3). Las imágenes muestran la presencia de la estructura mesoporosa en los sólidos funcionalizados finales. Los canales típicos de la matriz MCM-41 se pueden observar como rallas blancas y negras alternas, así como también se puede apreciar la disposición de los poros en forma de panal de abeja. Los materiales obtenidos eran partículas esféricas de alrededor de 80-100 nm de diámetro. En el caso de las imágenes correspondientes al sólido Gal-NP(ICG) (e1, e2, e3) se tomaron con un microscopio de transmisión electrónica de alta resolución para mayor apreciación en detalle de la estructura mesoporosa (TEM de Emisión de Campo de 200 kV).

Por otro lado, los análisis de adsorción-desorción de N_2 de los sólidos permitieron obtener información sobre el tamaño y volumen de poro y la superficie específica de los sólidos sintetizados (Tabla 1). Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno de la MCM-41 calcinada y de los sólidos finales Gal-NP(Rho), Gal-NP(0) y Gal-NP(ICG) se pueden observar en la Figura 38, y representan el volumen de N_2 adsorbido en cm^3 por gramo de adsorbato frente a la presión relativa (P/P_0 , siendo P_0 la presión de saturación). Para este tipo de materiales se suele obtener una isoterma de tipo IV, en la que el proceso de adsorción se relaciona con la condensación de nitrógeno en el interior de los poros por capilaridad.

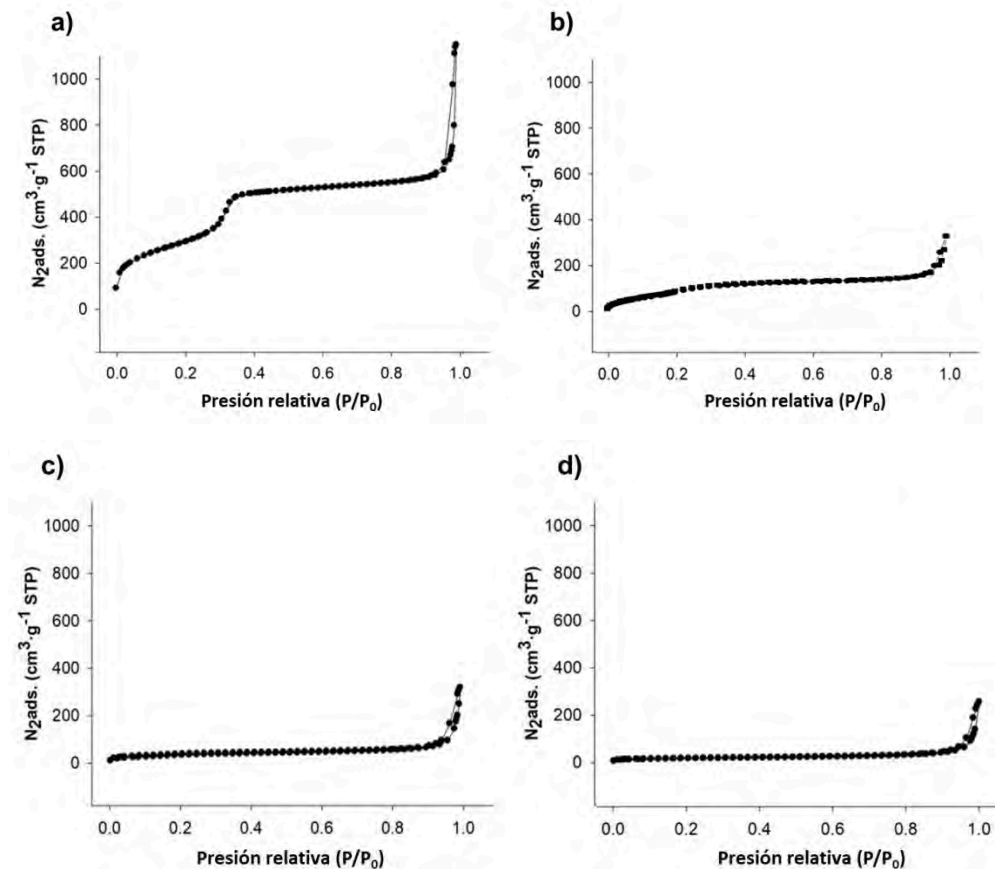


Figura 38. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 para (a) MCM-41 calcinada, (b) Gal-NP(Rho), (c) Gal-NP(0) y (d) Gal-NP(ICG).

Tabla 1. Superficie específica (modelo BET), volumen de poro y tamaño de poro de la MCM-41 calcinada y de los sólidos finales Gal-NP(Rho), Gal-NP(0) y Gal-NP(ICG). El tamaño y volumen de poro corresponden únicamente a los mesoporos intrapartícula y se calcularon según el modelo BJH. El tamaño de poro se estimó aplicando el modelo BJH sobre la parte de la curva de adsorción de la isoterma con valores $P/P_0 < 0.4$.

Sólido	S_{BET} (m^2g^{-1})	Volumen poro (cm^3g^{-1})	Tamaño poro (nm)
MCM-41 calcinada	1091	0.9	2.8
Gal-NP(Rho)	373	0.4	---
Gal-NP(0)	126	0.1	---
Gal-NP(ICG)	57	0.05	---

Precisamente, la curva de la **Figura 38a** corresponde a la matriz MCM-41 calcinada y muestra esa isoterma de tipo IV típica para los sólidos mesoporosos, consistente en un paso (o “escalón”) de adsorción a valores de P/P_0 de entre 0.1 y 0.3 debido a la mencionada condensación del nitrógeno. Si el material sigue adsorbiendo gas, los poros se llenan y se empieza a observar una desviación de la curva a presiones elevadas (en torno a 0.8-0.9), lo cual se asocia con el llenado del vacío que existe entre las nanopartículas y se considera porosidad textural. Aplicando el modelo BJH en la curva de la isoterma se calcularon el diámetro y el volumen de poro, siendo de 2.8nm y $0.9cm^3g^{-1}$ respectivamente. Por otro lado, con el modelo BET se calculó la superficie específica total de la MCM-41 calcinada, siendo ésta de $1091m^2/g$.

Las curvas de las **Figuras 38b, 38c y 38d** corresponden a las isotermas de adsorción-desorción de los sólidos finales **Gal-NP(Rho)**, **Gal-NP(0)** y **Gal-NP(ICG)** respectivamente, y son características de sistemas mesoporosos con los poros bloqueados en los que no se puede dar la entrada de nitrógeno. Así pues, en estas curvas no se observa un aumento aparente en la adsorción de nitrógeno a bajas presiones: como era de esperar, el volumen de nitrógeno adsorbido (según modelo BJH, $0.4cm^3g^{-1}$ para **Gal-NP(Rho)**, $0.1cm^3g^{-1}$ para **Gal-NP(0)** y $0.05cm^3g^{-1}$ para **Gal-NP(ICG)**) y el área de superficie específica ($373m^2g^{-1}$ para **Gal-NP(Rho)**, $126m^2g^{-1}$ para **Gal-NP(0)** y $57m^2g^{-1}$ para **Gal-NP(ICG)**) dieron valores inferiores en comparación con el material de partida MCM-41. En otras palabras, las curvas presentan una geometría plana respecto a la de la MCM-41 calcinada, lo cual indica una reducción apreciable de la porosidad de las nanopartículas debida a que los poros están correctamente llenados y tapados. Sin embargo, a altas presiones sí que se observa un aumento de la adsorción como ocurría con la MCM-41 calcinada, signo de que la porosidad textural se conserva en los sólidos finales.

En definitiva, las isothermas de adsorción-desorción de N_2 junto con la disminución que se produce en el volumen de poro y en la superficie específica de los materiales finales respecto a la MCM-41 calcinada indican que el paso de cargado de las nanopartículas con los compuestos correspondientes y su posterior funcionalización tuvieron lugar correctamente en el caso de las nanopartículas **Gal-NP(Rho)** y **Gal-NP(ICG)**. En el sólido **Gal-NP(0)** también se confirma que los poros estaban bloqueados debido a la funcionalización de la superficie, reflejándose esto en una menor capacidad de adsorción de nitrógeno.

Los valores BET de superficie específica, volúmenes de poro y tamaños de poro calculados a partir de las isothermas de los sólidos MCM-41, **Gal-NP(Rho)**, **Gal-NP(0)** y **Gal-NP(ICG)** aparecen listados en la **Tabla 1**.

Por otra parte también se realizaron estudios de DLS con el fin de determinar el tamaño y la distribución/dispersión de los materiales. Concretamente el dato que el DLS proporciona es el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas, que en este caso se muestra para la MCM-41 calcinada de partida y para los sólidos **Gal-NP(0)** y **Gal-NP(ICG)** en la **Figura 39**. Como se puede observar en el gráfico, para cada uno de los materiales se obtuvo una única distribución de la población de nanopartículas, lo cual es indicativo de una buena dispersión de las mismas. Comparando además con la MCM-41 madre, el aumento de diámetro hidrodinámico que se obtuvo con las nanopartículas **Gal-NP** era consistente con la funcionalización externa de la superficie de las nanopartículas con el galacto-hexa-sacárido. Los valores concretos obtenidos para los tres sólidos se recogen en la **Tabla 2**.

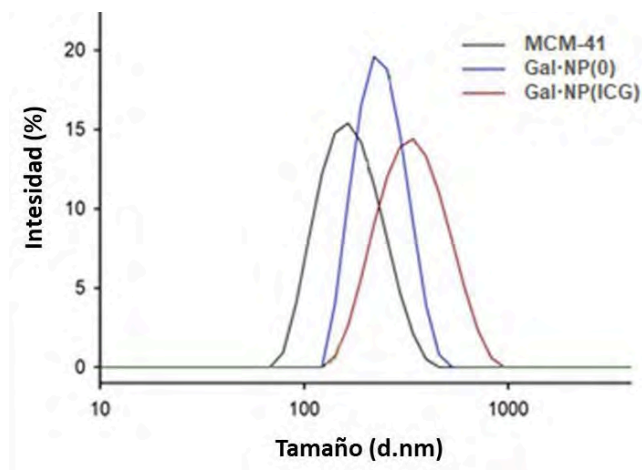


Figura 39. Análisis DLS que muestra el diámetro hidrodinámico de la MCM-41 calcinada (línea negra) y de los sólidos finales Gal-NP(0) (línea azul) y Gal-NP(ICG) línea roja.

Tabla 2. Diámetro hidrodinámico de los materiales seleccionados.

Sólido	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial zeta (mV)
MCM-41 calcinada	183 ± 8	-31.2
Gal-NP(O)	250 ± 6	-5.6
Gal-NP(ICG)	376 ± 18	-13.5

Por último, el contenido de materia orgánica en los sólidos finales se determinó mediante análisis elemental y análisis termogravimétrico, y se recoge en la **Tabla 3**. En este caso también se incluyen los datos correspondientes a los sólidos cargados con compuestos terapéuticos, esto es, **Gal-NP(Dox)** y **Gal-NP(Nav)**, puesto que al estar destinados para tratamiento el contenido de fármaco encapsulado es de relevancia a la hora de plantear su dosificación.

Tabla 3. Contenido (α) en mg por gramo de sólido de sacárido (puerta molecular) y carga total para los sólidos finales sintetizados.

Sólido	$\alpha_{\text{sacárido}}$ (mg/g sólido)	α_{carga} (mg/g sólido)
Gal-NP(Rho)	138	148
Gal-NP(ICG)	189	49
Gal-NP(Dox)	192	101
Gal-NP(Nav)	141	58

Tras la visión global de todas las técnicas de caracterización estructural llevadas a cabo con los materiales, se puede concluir que los sólidos finales sintetizados presentaban la estructura mesoporosa esperada, habiéndose producido pues correctamente los procesos de carga y funcionalización.

Caracterización funcional de los materiales: ensayos de liberación *in vitro*

En el trabajo previo de Agostini *et al*⁵ se diseñaron nanopartículas cargadas con un fluoróforo y funcionalizadas con una capa de galacto-oligo-sacáridos (GOS) de diferentes longitudes. Con estas GOS-NP ya se comprobó que la β -galactosidasa podía digerir el recubrimiento de azúcares, permitiendo así la difusión de la carga fuera del soporte de sílice.

En este caso se mejoró el sistema utilizando moléculas de galacto-oligo-sacárido de tamaño homogéneo (seis unidades de galactosa) y se sintetizaron nanopartículas **Gal-NP**. Con esta estrategia se encapsularon tanto fluoróforos como compuestos citotóxicos/senolíticos, y se llevó a cabo una validación *in vitro* del comportamiento de la nueva puerta molecular en presencia de una β -galactosidasa externa, con el objetivo de estudiar el perfil de liberación de los nanodispositivos sintetizados.

Estos ensayos de liberación se realizaron en solución acuosa a pH 4.5 (pH óptimo de funcionamiento de la enzima) en presencia y ausencia del estímulo capaz de abrir la puerta molecular, en este caso una enzima β -galactosidasa de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*). En la **Figura 40** se pueden observar las cinéticas de liberación obtenidas para cada uno de los sólidos con carga sintetizados.

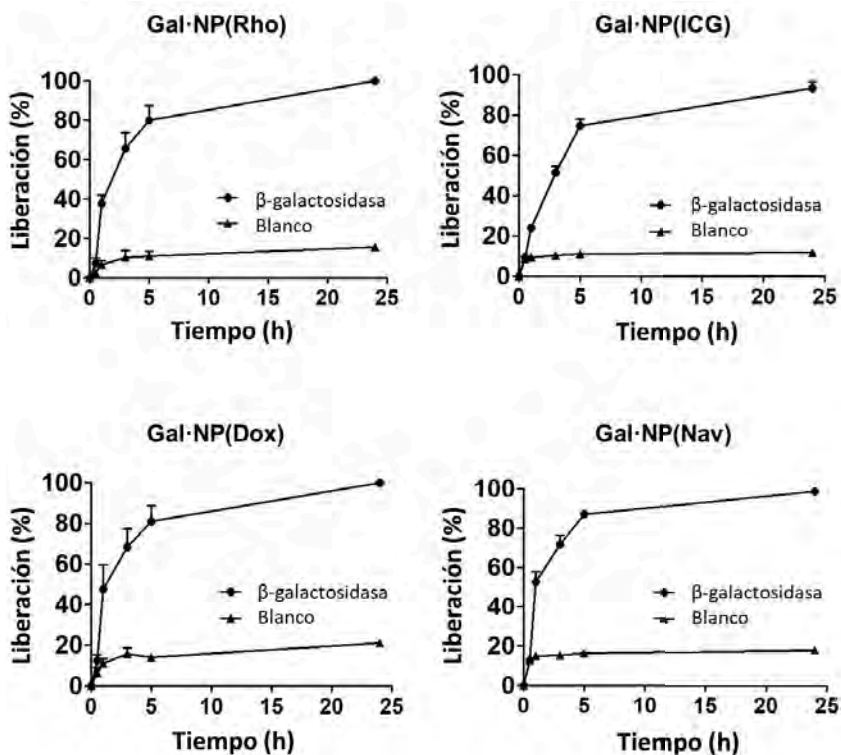


Figura 40. Estudios de liberación *in vitro* de los sólidos Gal-NP(Rho), Gal-NP(ICG), Gal-NP(Dox) y Gal-NP(Nav) mediante espectroscopía de fluorescencia o espectroscopía UV-visible. Las gráficas representan los perfiles de liberación de la carga encapsulada en ausencia (*blank*) o en presencia de la enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, en agua pH 4.5 y temperatura ambiente, a los tiempos indicados. Los datos (n=3) se expresan como media \pm SEM.

En un experimento tipo, el sólido se suspende en agua a pH ácido y se añade el estímulo de β -galactosidasa. La suspensión de nanopartículas se deja agitando y a determinados tiempos se recoge un alícuota que se centrifuga (para eliminar la nanopartículas), sobre la que se monitoriza la cantidad de carga liberada por espectroscopía de fluorescencia o de UV-visible (según el compuesto cargado) a lo largo del tiempo. Este mismo experimento se realiza en paralelo en las mismas condiciones pero con ausencia de enzima.

Como se puede observar en las gráficas, en ausencia de β -galactosidasa se produce una liberación mínima de los correspondientes compuestos encapsulados (curva blanco). Esto indica que la carga (rodamina B, verde de indocianina, doxorubicina o navitoclax) permanece retenida en las nanopartículas, puesto que el polisacárido que está actuando como puerta molecular impide su salida de los poros. El pequeño porcentaje de liberación que se observa en ausencia enzimática se puede asociar a la presencia de restos de compuesto adsorbido en la superficie de los sólidos, que no se eliminaron en el proceso de lavado de los materiales. Sin embargo, esta liberación es mínima en comparación con la liberación de fluoróforo/citotóxico/senolítico que se produce en presencia enzimática (curva *β -galactosidase*). Así pues, en presencia de β -galactosidasa se puede observar que tiene lugar la liberación de los compuestos en los cuatro materiales, produciéndose un aumento de la intensidad de señal que alcanza valores de en torno el 70% de la liberación máxima a partir de las 2.5 horas, presentando su máximo de liberación a las 24 horas en todos los casos.

Estos resultados demuestran que los cuatro sólidos sintetizados – **Gal-NP(Rho)**, **Gal-NP(ICG)**, **Gal-NP(Dox)** y **Gal-NP(Nav)** – cumplen su función de la manera esperada. La puerta molecular consistente en el galacto-hexa-sacárido es funcional bloqueando los poros y mediando la liberación del contenido de las nanopartículas únicamente ante la presencia del estímulo específico que permite su apertura al hidrolizarlas (esto es, la enzima β -galactosidasa).

4 | Conclusión

En resumen, en este Capítulo se recoge la síntesis y caracterización de cinco nanodispositivos mesoporosos de sílice formados por el soporte inorgánico MCM-41, cargados con diferentes compuestos fluorescentes o terapéuticos y funcionalizados con un galacto-hexa-sacárido como puerta molecular, de forma que se obtuvieron los sólidos finales **Gal-NP(Rho)** – cargado con rodamina B, **Gal-NP(ICG)** – cargado con verde de indocianina, **Gal-NP(Dox)** – cargado con doxorubicina, y **Gal-NP(Nav)** – cargado con navitoclax.

Mediante técnicas de caracterización estándar se comprobó que todos los sistemas presentaban la estructura típica de los materiales mesoporosos, que no se vio alterada durante los procesos de carga y de funcionalización. Además los materiales se validaron *in vitro*, demostrando el correcto funcionamiento de la puerta molecular y respondiendo al estímulo enzimático externo con liberaciones próximas a cero en su ausencia.

Tras la síntesis y caracterización *in vitro* de las nanopartículas, se validó su uso en sistemas más complejos. Así pues, los estudios funcionales en modelos celulares y modelos *in vivo* de ratón se detallan en los Capítulos IV y V.

5 | Sección experimental. Material y métodos

Síntesis de los materiales

- *Reactivos.*

El tetraetilortosilicato (TEOS), el bromuro de n-cetiltrimetilamonio (CTAB), el hidróxido de sodio (NaOH), la rodamina B (Rho), el verde de indocianina (ICG), el 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) y la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* se adquirieron de Sigma-Aldrich. Los disolventes de grado analítico son de Scharlab. El galacto-hexa-sacárido galactan (de patata, $\geq 80\%$ seis monosacáridos de galactosa unidos por enlaces glicosídicos β -1,4) y la doxorrubicina se adquirieron de Carbosynth, y el navitoclax proviene de MedChemExpress. Todos los productos se utilizaron tal y como se recibieron.

- *Síntesis del soporte mesoporoso MCM-41.*

Para la síntesis del soporte de sílice mesoporoso MCM-41,¹² en primer lugar se disolvió 1g (2.74mmol) de bromuro de N-cetiltrimetilamonio (#H6269, Sigma) en 480mL de agua destilada, y la disolución se dejó agitando en una placa calefactora a una temperatura de 28-30°C. A continuación se añadieron a la solución de CTAB (rápidamente, para evitar la carbonatación) 3.5mL de NaOH 2M en agua destilada (#1310732, Sigma). En este punto la temperatura de la solución se ajustó a 80°C y se fueron añadiendo 5mL (2.57×10^{-2} mol) de TEOS (#131903, Sigma) gota a gota a la solución de surfactante. La mezcla se dejó incubando 2h en agitación, hasta que dio lugar a un precipitado blanco. Posteriormente el producto sólido obtenido se

¹² KRESGE C.T., LEONOWICZ M.E., ROTH W.J., VARTULI J.C., BECK J.S. *Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism.* Nature. **1992**, 359(6397): 710 – 712.

centrifugó a 9500rpm durante 20 minutos y se lavó con agua destilada mediante centrifugaciones seriadas hasta que el pH de la disolución se neutralizó.

Una vez alcanzado el pH deseado las muestras se dejaron en la estufa a 60°C durante 24h para eliminar toda la humedad. Pasado un día, para obtener el material mesoporoso final se procedió al calcinado de las muestras en la mufla (Mufla Furnace), utilizando un programa consistente en calentar hasta 550°C y mantener esta temperatura 5h en atmosfera oxidante, con el objetivo de eliminar el CTAB. Al eliminar el agente director de la estructura, los poros quedan libres y vacíos para poder continuar con la síntesis del material.

- *Cargado del soporte MCM-41.*

La carga del soporte mesoporoso sintetizado con los diferentes compuestos se llevó a cabo como se detalla a continuación para cada uno de ellos:

- Para la carga de rodamina B – sólido **Gal-NP(Rho)** – se suspendieron 200mg de MCM-41 en una solución de 16mL de etanol junto con 76.65mg de rodamina (#R6226, Sigma).
- Para la carga de verde de indocianina – sólido **Gal-NP(ICG)** – se suspendieron 200mg de MCM-41 en una solución de 45mL de agua junto con 9,5mg del fluoróforo (#I2633, Sigma).
- Para la carga de doxorubicina – sólido **Gal-NP(Dox)** – se suspendieron 200mg de MCM-41 en una solución de 12.5mL de agua y 110mg de doxorubicina (#AD15377, Carbosynth).
- Para la carga de navitoclax – sólido **Gal-NP(Nav)** – se suspendieron 300mg de MCM-41 en 10mL de diclorometano anhidro junto con 23mg de navitoclax (#HY10087, MedChemExpress).

En todos los casos las soluciones se dejaron agitar en matraces de fondo redondo durante 24 horas a temperatura ambiente. Al día siguiente los sólidos cargados se separaron mediante filtrado a vacío y se dejaron secar a 37°C.

- *Funcionalización de los sólidos NP: anclaje de la puerta molecular.*

La funcionalización de las nanopartículas ya cargadas con los correspondientes fluoróforos o fármacos se llevó a cabo en dos pasos consecutivos:

- Para los sólidos **Gal-NP(Rho)** y **Gal-NP(Dox)** se suspendieron 200mg del material cargado en 7.5mL de diclorometano y se añadieron 280µL de APTES (#440140, Sigma) a la mezcla de reacción. Tras 5.5h en agitación los sólidos se aislaron mediante filtrado a vacío y se dejaron secar a 37°C. Las nanopartículas obtenidas se suspendieron en 24mL de agua con 383mg de galactan

(#OG71532, Carbosynth), y se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 21h.

- Para los sólidos **Gal-NP(0)**, **Gal-NP(ICG)** se suspendieron 300mg de las nanopartículas cargadas (MCM-41 calcinada en el caso de **Gal-NP(0)**) en 11mL de acetonitrilo anhidro, en los que se añadieron 400μL de APTES. Tras 5.5h en agitación los sólidos se separaron mediante filtración a vacío y finalmente se suspendieron en una solución de 40mL de agua y 740mg de galactan para el anclaje del azúcar durante 21h.
- Para el sólido **Gal-NP(Nav)** se añadieron, en la misma mezcla de reacción de carga descrita previamente, 420μL de APTES. La disolución se dejó agitar durante 5.5h y el sólido funcionalizado se aisló mediante filtrado a vacío. El anclaje del galacto-hexa-sacárido se realizó de igual forma que para los sólidos **Gal-NP(0)** y **Gal-NP(ICG)**.

En todos los casos los productos finales se obtuvieron tras realizar varios lavados con agua (y también etanol frío en el caso de **Gal-NP(Nav)**) mediante ciclos de centrifugación y posterior secado a 37°C, y se almacenaron en desecador a temperatura ambiente.

Caracterización estructural de los materiales: técnicas generales, equipos y condiciones de trabajo

La caracterización se llevó a cabo en el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universitat Politècnica de València (UPV), a excepción del análisis elemental que se realizó en la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Para caracterizar los materiales preparados se utilizaron las siguientes técnicas con los siguientes equipos y condiciones:

- *Difracción de rayos X en polvo (DRX).*

Los estudios de rayos X se llevaron a cabo en un difractómetro Bruker AXS D8 Advance, utilizando radiación Cu-Kα. Para llevarlas a cabo, se molturaron aproximadamente 200mg (o en su defecto la cantidad máxima posible) de cada uno de los sólidos, preparándose una pastilla. El programa que se utilizó emplea unas ventanas de bajo ángulo (ventana de divergencia de 0.2mm, ventana de dispersión de 3mm y ventana del detector de 1mm) durante 11 minutos, sin giro de la muestra.

- *Análisis termogravimétrico (TGA).*

Los análisis termogravimétricos para la determinación de la cantidad de materia orgánica presente en los sólidos se realizaron en un equipo TGA/SDTA 851e Mettler Toledo Balance, en atmósfera oxidante (aire, 80mL/min) y con un programa de calor consistente en una rampa calentamiento de 10°C por minuto de 393K a 1273K, con un paso isotérmico de calor a ésta temperatura durante 30 minutos.

- *Análisis elemental (AE).*

Los estudios de análisis elemental se realizaron en un CE Instrument EA-1110 CHN Elemental Analyzer, para lo cual los sólidos finales se enviaron al Centro de Microanálisis Elemental de la UCM. Mediante estos análisis se determinó el contenido de nitrógeno, carbono e hidrógeno de los materiales.

- *Microscopía electrónica de transmisión (TEM).*

Las imágenes de TEM, que permiten observar la estructura microscópica de los materiales sintetizados, se tomaron con un microscopio Philips CM10 del Servicio de Microscopía de la UPV, trabajando a 100kV. También se utilizó un equipo de alta resolución en la misma universidad, un microscopio JEOL JEM 2100F de emisión de campo de 200kV. Para la observación se preparó una disolución en dicloroetano de una pequeña cantidad de cada uno de los sólidos, y se depositó una gota de la suspensión sobre una rejilla de cobre recubierta de 300 mallas de carbono.

- *Adsorción-desorción de nitrógeno (porosimetría).*

Las isothermas de adsorción-desorción de N₂ se grabaron en un analizador automático Micromeritics TriStar II Plus. Las muestras se des-gasearon a 40°C bajo vacío durante la noche, y las medidas se realizaron a 77K. Las áreas específicas de superficie se calcularon a partir de los datos de adsorción en el rango de bajas presiones utilizando el modelo Brunauer-Emmett-Teller (BET).¹³ El tamaño de poro se determinó siguiendo el método Barret-Joyner-Halenda (BJH).¹⁴

¹³ BRUNAUER S., EMMETT P. H. & TELLER E. *Adsorption of Gases in Multimolecular Layers.* J Am Chem Soc. **1938**, **1938**, 60: 309–319.

¹⁴ BARRETT E. P., JOYNER L. G. & HALENDA P. P. *The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms.* J Am Chem Soc. **1951**, 73: 373–380.

- *DLS (Dynamic light scattering)*

Las medidas de DLS para determinar el diámetro hidrodinámico y la dispersión de las nanopartículas se llevaron a cabo en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS.

- *Espectroscopía UV-visible y de fluorescencia.*

Para poder seguir la liberación de la carga de las nanopartículas en los ensayos de liberación *in vitro*, las medidas en UV-visible de las alícuotas tomadas a lo largo del tiempo se llevaron a cabo en un espectrómetro Lambda 35 UV/vis Perkin Elmer Instruments, y la espectroscopía de fluorescencia se realizó en un espectrofluorímetro JASCO FP-8300.

Ensayos de liberación *in vitro*

Para llevar a cabo los ensayos de liberación *in vitro* de los sólidos sintetizados y comprobar así el correcto funcionamiento de la puerta en presencia del estímulo capaz de hidrolizarla, se suspendieron 2mg del sólido final – **Gal·NP(Rho), Gal·NP(ICG), Gal·NP(Dox), Gal·NP(Nav)** – en 5mL de agua a pH 4.5 en viales de vidrio. A las suspensiones se añadió la enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (#G5160, Sigma), a una concentración de 1000ppm (5mg). Los sólidos se dejaron en agitación durante 24 horas, durante las cuales se fueron tomando y centrifugando alícuotas (0.3mL) a diferentes tiempos (0, 1, 3, 5 y 24h) con el objetivo de seguir a lo largo de las horas la liberación de la carga encapsulada.

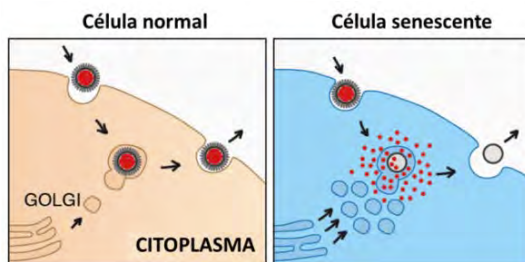
La cantidad de carga liberada se determinó en un espectrofluorímetro JASCO FP-8300, monitorizando la emisión (para Rho, ICG y Dox) o la absorción (para Nav) del fluoróforo o el fármaco en la solución acuosa en función del tiempo. Las longitudes de onda empleadas fueron para cada caso: Rho λ_{ex} = 550 nm, Rho λ_{em} = 580 nm; ICG λ_{ex} = 775 nm, ICG λ_{em} = 799 nm; Dox λ_{ex} = 495 nm, Dox λ_{em} = 556 nm; Nav λ_{abs} = 356 nm.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo de manera paralela para cada sólido en condiciones de “blanco” o “control”, suspendiendo la misma cantidad de nanopartículas en el mismo volumen de agua indicado anteriormente pero sin llevar a cabo la adición de la enzima que actuaría como estímulo.

Capítulo IV •

Evaluación del targeting y la liberación controlada de las nanopartículas en modelos de melanoma y fibrosis pulmonar

• | Resumen del capítulo



En muchas enfermedades asociadas al envejecimiento se produce la acumulación de células senescentes. En trabajos recientes se ha demostrado que la eliminación selectiva de dichas células podría ser una aproximación terapéutica prometedora; sin embargo, muchos de los fármacos utilizados para la eliminación de esta población pueden provocar efectos secundarios no deseados sobre la población celular no senescente.

En este proyecto de tesis se utiliza la elevada actividad β -galactosidasa presente en células senescentes como clave para la liberación selectiva de fármacos terapéuticos encapsulados en nanopartículas funcionalizadas con galacto-oligo-sacáridos. En este Capítulo, dichas nanopartículas se validan en dos modelos de patología (fibrosis pulmonar idiopática y melanoma) en los que la eliminación selectiva de células senescentes puede contribuir con un efecto terapéutico positivo. Concretamente, se demuestra en modelo de ratón que los fluoróforos encapsulados en el sistema de liberación controlada se liberan y acumulan preferencialmente en células senescentes. En el modelo murino de fibrosis pulmonar se muestra que las nanopartículas terapéuticas llegan selectivamente a las células senescentes, donde liberan el fármaco citotóxico encapsulado; el tratamiento consigue no sólo eliminar dichas células sino también reducir la acumulación de colágeno asociada a la enfermedad, lográndose la restauración de la función pulmonar. Por otra parte, en el modelo de xenoinjertos de melanoma se pone de manifiesto que el fármaco citotóxico encapsulado se libera preferencialmente en las células tumorales diana en las que previamente se ha inducido senescencia con palbociclib, causando su eliminación y contribuyendo por tanto a la regresión del tumor. En ambos modelos, además, la encapsulación en nanopartículas funcionalizadas con galacto-oligo-sacáridos reduce los efectos secundarios del fármaco citotóxico.

El trabajo que este Capítulo recoge está publicado bajo la referencia:

MUÑOZ-ESPÍN D., ROVIRA M., GALIANA I., GIMÉNEZ C., LOZANO-TORRES B., PAEZ-RIBES M., et al. A versatile drug delivery system targeting senescent cells. *EMBO Mol Med.* 2018, 10: e9355.

La investigación se ha llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Manuel Serrano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid). En este Capítulo se detallan los experimentos en los que nuestro grupo ha participado en mayor medida, mencionándose en menor detalle el resto de procedimientos que quedan completamente recogidos en el artículo.

1 | Introducción

Durante los últimos años se han planteado como necesarios la búsqueda y el desarrollo de terapias anti-senescencia cuyo objetivo sea la eliminación específica de las células senescentes. En este sentido, y centrando el punto de mira en el desarrollo de estas aproximaciones, la estrategia en la que se basa este proyecto recurre al uso de nanomateriales híbridos con puertas moleculares como vehículo para alcanzar, de forma selectiva, estas células diana.^{1,2,3,4,5,6,7}

Así pues, tras su caracterización estructural y funcional en el Capítulo III, las nanopartículas **Gal-NP** sintetizadas (cuya apertura se produce únicamente en presencia de SA-βGal) se validan en este Capítulo en dos escenarios médicos: fibrosis pulmonar idiopática y melanoma, cuya incidencia y relevancia patológica se detallan a continuación.

▪ FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es una enfermedad crónica progresiva intersticial que afecta a los pulmones y tiene una alta prevalencia, elevada mortalidad y pocas opciones de tratamiento.⁸ Afecta a aproximadamente 5 millones de personas en el mundo y tiene una prognosis devastadora, siendo los índices de mortalidad de alrededor de un 70-80% y la esperanza de vida de unos 3-5 años. La cicatrización del pulmón que se produce en la IPF no puede revertirse, y ningún tratamiento actual ha probado ser eficaz para resolver la enfermedad, con lo cual las terapias se enfocan a aliviar los síntomas e intentar frenar su avance.⁹

¹ SLOWING I., TREWYN B.G., LIN V.S.-Y. *Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells.* J Am Chem Soc. **2006**, 128(46): 14792 – 14793.

² TAO Z., TOMS B.B., Goodisman J., Asefa T. *Mesoporosity and functional group dependent endocytosis and cytotoxicity of silica nanomaterials.* Chem Res Toxicol. **2009**, 22(11): 1869 – 1880.

³ BERNARDOS A. *et al.* *Enzyme-responsive intracellular controlled release using nanometric silica mesoporous supports capped with “saccharides”.* ACS Nano. **2010**, 4(11): 6353 – 6368.

⁴ HOCINE O. *et al.* *Silicalites and mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy.* Int J Pharm. **2010**, 402(1–2): 221 – 230.

⁵ SLOWING I. *et al.* *Exocytosis of mesoporous silica nanoparticles from mammalian cells: from asymmetric cell-to-cell transfer to protein harvesting.* Small. **2011**, 7(11): 1526 – 1532.

⁶ YANES R.E. *et al.* *Involvement of lysosomal exocytosis in the excretion of mesoporous silica nanoparticles and enhancement of the drug delivery effect by exocytosis inhibition.* Small. **2013**, 9(5): 697 – 704.

⁷ AZNAR E. *et al.* *Gated materials for on-command release of guest molecules.* Chem Rev. **2016**, 116(2): 561 – 718.

⁸ YANAGIHARA T., SATO S., UPAGUPTA C., KOLB M. *What have we learned from basic science studies on idiopathic pulmonary fibrosis?* Eur Respir Rev. **2019**, 28: 190029.

⁹ SOMOGYI V., CHAUDHURI N., TORRISI S.E., *et al.* *The therapy of idiopathic pulmonary fibrosis: what is next?* Eur Respir Rev. **2019**, 28: 190021.

La IPF se caracteriza por la acumulación excesiva de matriz extracelular en el espacio intersticial y el espacio alveolar, lo que da lugar a la cicatrización y destrucción del epitelio pulmonar y a las subsecuentes dificultades respiratorias y falta de oxígeno (Figura 41). La erosión telomérica, la pérdida de proteostasis, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular y el agotamiento del reservorio de células madre son algunos de los mecanismos que se manifiestan en la patogénesis de la enfermedad.^{10,11} La incidencia sigue aumentando con el paso de los años, lo cual inevitablemente repercute en el aumento de la carga económica sanitaria. Las opciones de tratamiento son sin embargo limitadas, siendo el último recurso el trasplante de pulmón (opción disponible sólo para algunos pacientes).

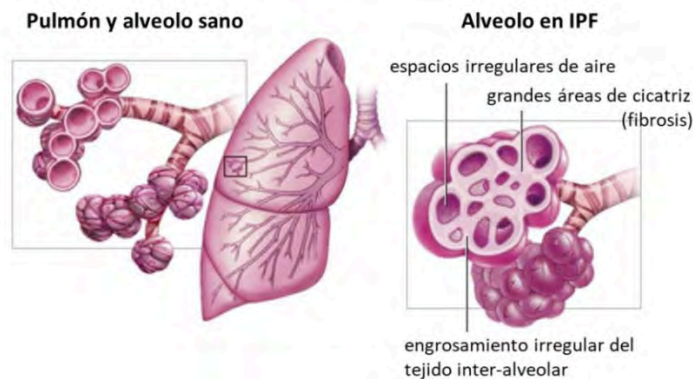


Figura 40. Representación gráfica de la IPF. La fibrosis pulmonar engrosa y deja cicatrices en el tejido que se encuentra alrededor de los alveolos y entre ellos, como se muestra a la derecha. A la izquierda se muestra un pulmón sano. Adaptado a partir de Mayo Foundation for Medical Education and Research. Copyright © 2016 Mayo.

Recientemente han entrado en clínica dos nuevos fármacos, la pirfenidona y el nintedanib, que ralentizan la pérdida de la función pulmonar de los pacientes (la pirfenidona, además, mejora tímidamente su supervivencia). Sin embargo, y es de gran importancia el considerarlo, ambos fármacos tienen efectos secundarios serios, con lo cual no suponen una mejora en la calidad de vida de los pacientes y tampoco detienen o revierten la enfermedad. Es por ello que se requieren con urgencia nuevas opciones terapéuticas. En el intento de lograr una mayor comprensión de la patogénesis de la IPF, algunos estudios han dejado ver que existen varias rutas patogénicas comunes con el cáncer, con lo cual se ha propuesto el uso de fármacos efectivos frente a la progresión tumoral para el

¹⁰ DUITMAN J., VAN DEN ENDE T., SPEK A. *Immune checkpoints as promising targets for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis?* J Clin Med. **2019**, 8: 1547.

¹¹ CAZZOLA M., MATERA M.G., ROGLIANI P., CALZETTA L. *Senolytic drugs in respiratory medicine: is it an appropriate therapeutic approach?* Expert Opin Investig Drugs. **2018**, 27: 573 – 581.

tratamiento de la IPF. En este sentido, varios trabajos han estudiado el uso de inhibidores de *check-points* inmunológicos con el objetivo de ver si esta estrategia terapéutica es igual de prometedora como lo es en cáncer. Sin embargo, aunque hay algunos estudios en los que sí se observa que la inhibición de determinadas proteínas específicas de estos *check-points* limita la fibrosis pulmonar, el conjunto global de datos parece no tener claro el papel que esta inhibición tiene en IPF – sugiriendo que únicamente la inhibición de PD-1/PD-L1 puede que sea beneficiosa.¹⁰

Por otro lado se ha visto que las células epiteliales alveolares (AECs) y los fibroblastos pulmonares asumen identidad de células senescentes en la IPF, contribuyendo al desarrollo de la fibrosis. De hecho, marcadores de senescencia como p21, p16 o SA-βGal aparecen aumentados en ambos tipos celulares en tejido pulmonar de pacientes de IPF en comparación con tejido pulmonar sano. El secretoma de los fibroblastos y las células alveolares de estos pacientes también presenta contenido elevado de marcadores pro-fibróticos e inflamatorios, y se cree que participa en la perpetuación de la cicatriz fibrótica. Por todo ello, la senescencia se reconoce como una de las dianas terapéuticas para el tratamiento de la IPF.¹² En este sentido, se han propuesto estrategias para aumentar la sensibilidad a la muerte por apoptosis de los fibroblastos y miofibroblastos senescentes presentes en la enfermedad, mediante la inhibición de factores anti-apoptóticos. La enzima anti-apoptótica y pro-senescente, NADPH oxidasa 4, se ha utilizado como diana en un modelo murino de fibrosis pulmonar persistente, provocando la inducción de apoptosis de los miofibroblastos intersticiales y mejorando notablemente la fibrosis pulmonar y la supervivencia.¹³ El cóctel senolítico compuesto por dasatinib (D) y quercetina (Q) demostró ser efectivo a la hora de eliminar AECs senescentes y mejorar la fibrosis en un modelo de IPF inducida por bleomicina¹⁴ o por radiación.¹⁵ De hecho, este mismo año se ha llevado a cabo el primer ensayo clínico en humanos con dicho cóctel senolítico (D+Q) para evaluar la fiabilidad de la intervención.¹⁶ Si bien los resultados obtenidos indican que, a corto plazo, la administración intermitente de DQ puede aliviar la disfunción física que acompaña a la IPF – datos que corresponden con los

¹² GULATI S., THANNICKAL V.J. *The aging lung and idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Med Sci. **2019**, 357: 384 – 389.

¹³ a) HECKER L., LOGSDON N.J., *et al.* *Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance*. Sci Transl Med. **2014**, 6: 231ra47. b) SANDERS Y.Y., LIU H., LIU G., *et al.* *Epigenetic mechanisms regulate NADPH oxidase-4 expression in cellular senescence*. Free Radic Biol Med. **2015**, 79: 197 – 205. c) HECKER L., VITTAL R., JONES T., *et al.* *NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury*. Nat Med. **2009**, 15: 1077 – 1081.

¹⁴ LEHMANN M., KORFEI M., MUTZE K., *et al.* *Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo*. Eur Respir J. **2017**, 50(2).

¹⁵ SCHAFFER M.J., WHITE T.A., IJIMA K., *et al.* *Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease*. Nat Commun. **2017**, 8: 14532.

¹⁶ JUSTICE J.N., NAMBIAR A.M., TCHKONIA T., *et al.* *Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study*. EBioMedicine. **2019**: 554 – 563.

obtenidos en modelo murino de fibrosis inducida por bleomicina – es necesario seguir realizando más estudios a mayor escala que permitan evaluar el efecto de éstos y de otros fármacos senolíticos como tratamiento de la IPF, puesto que a día de hoy existe controversia en cuanto a si serían una aproximación terapéutica adecuada para el tratamiento de la enfermedad pulmonar (por ejemplo, el dasatinib podría tener efectos agravantes a largo plazo, puesto que se ha visto que puede inducir daño endotelial e hipertensión pulmonar).^{11,17}

Situados en este contexto, la relación entre la patogénesis de la FPI y los niveles elevados de senescencia junto con un envejecimiento pulmonar prematuro^{18,19} representan un escenario idóneo para estudiar el comportamiento terapéutico del sistema de nanopartículas senolíticas. Para inducir la fibrosis pulmonar en el modelo animal se utilizó un tratamiento con bleomicina durante un periodo de dos semanas,²⁰ que provoca la aparición de focos de células senescentes y un gran gran depósito de colágeno. Una vez desarrollada la fibrosis y con ella la acumulación de células senescentes, se administraron las nanopartículas cargadas con un compuesto citotóxico. El objetivo tras el tratamiento con el nanomaterial es conseguir la eliminación de las células senescentes acumuladas y lograr la regeneración tisular (**Figura 42**).

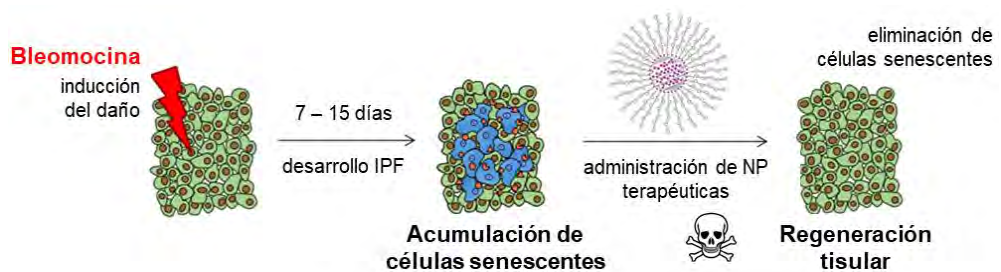


Figura 41. Inducción de fibrosis pulmonar idiopática mediante bleomicina y regeneración del tejido pulmonar tras la administración terapéutica de nanopartículas mesoporosas capaces de liberar su contenido de manera específica en células senescentes.

¹⁷ MAILLEUX A.A., CRESTANI B. Licence to kill senescent cells in idiopathic pulmonary fibrosis? *Eur Respir J.* **2017**, 50: 1701360.

¹⁸ TSANG A.R., WYATT H.D., TING N.S., BEATTIE T.L. *hTERT mutations associated with idiopathic pulmonary fibrosis affect telomerase activity, telomere length, and cell growth by distinct mechanisms.* *Aging Cell.* **2012**, 11(3): 482 – 490.

¹⁹ ÁLVAREZ D. *et al.* IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* **2017**, 313(6): L1164 – L1173.

²⁰ a) MOURATIS M.A., AIDINIS V. *Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin.* *Curr Opin Pulm Med.* **2011**, 17(5): 355 – 361. b) LIU T., DE LOS SANTOS F.G., PHAN S.H. *The bleomycin model of pulmonary fibrosis.* *Methods Mol Biol.* **2017**, 1627: 27 – 42.

▪ MODELO DE MELANOMA

Por otro lado, está descrito que la senescencia prevalece en tumores pre-malignos, y la progresión hacia la malignidad requiere evadir ésta senescencia. Los tumores malignos, sin embargo, pueden todavía entrar en estado senescente mediante intervenciones que restauren la función supresora tumoral o que inactiven oncogenes. Las células tumorales senescentes pueden ser eliminadas por células del sistema inmunológico, lo cual puede tener como resultado una regresión tumoral eficiente. También la quimioterapia estándar puede inducir senescencia, que en parte puede subyacer a su actividad terapéutica.²¹ Sin embargo la acumulación de células senescentes también puede tener un carácter negativo en la evolución tumoral. Por todo esto la senescencia constituye un nuevo “punto final” que puede ser relevante en el desarrollo de nuevos fármacos o marcadores de diagnóstico, y abre un posible escenario para evaluar el comportamiento terapéutico de las nanopartículas. Así pues, el segundo escenario planteado en este proyecto fue un modelo de cáncer en combinación con quimioterapia para inducir senescencia en el tumor.

En concreto se trabajó con melanoma, la forma más grave y agresiva de cáncer de piel que se inicia en los melanocitos. Se puede presentar en piel, mucosa, o en definitiva en toda región anatómica que presente éstas células, pero rápidamente puede metastatizar a través de los nódulos linfáticos a pulmón, hígado y cerebro. Si bien es menos común que otros tipos de cáncer de piel (como el carcinoma basocelular o el carcinoma de células escamosas), es mucho más peligroso debido a su rápida capacidad de metástasis si no se trata en etapas tempranas. Sólo el 20-30% de los melanomas surgen en lunares existentes, mientras que el 70-80% restante surgen en piel con aspecto normal. Generalmente es un cáncer curable si se detecta y trata en fases iniciales, si bien si se extiende puede llegar a ser mortal. A nivel de cifras, se estima que en 2019 se habrán diagnosticado 192.310 casos de melanoma en EEUU, de los cuales 95.830 serán no invasivos y se limitarán a la capa superior de la piel; 69.480 serán invasivos, penetrando en la segunda capa de la piel (datos de Skin Cancer Foundation, actualizados en abril de 2019).²²

Los melanomas están presentes en muchas formas, tamaños y colores diferentes, por lo que es difícil establecer un conjunto completo de señales de advertencia. Las opciones de tratamiento dependen de la etapa de la enfermedad, la ubicación del tumor y el estado general de salud del paciente, y se engloban en: extirpación quirúrgica del melanoma, inmunoterapia, terapia dirigida, quimioterapia y radiación.

²¹ COLLADO M., SERRANO M. *Senescence in tumours: evidence from mice and humans*. Nat Rev Cancer. **2010**, 10(1): 51 – 57.

²² *The Skin Cancer Foundation* A 501(c)(3), nonprofit organization [EIN: 13-2948778]. ©2019.

Tras décadas sin disponer de opciones terapéuticas eficaces frente al melanoma avanzado, el primer éxito en la historia de su tratamiento se inició con el descubrimiento de la mutación V600 en el proto-oncogén B-Raf, que codifica para una serina/treonina kinasa (BRAF).²³ Con el desarrollo de pequeñas moléculas dirigidas a bloquear dicho gen se mejoraron los ratios de supervivencia libre de progresión y supervivencia total en un gran número de pacientes con tumores con BRAF mutado. El éxito de estos tratamientos también fue en paralelo con el crecimiento de la inmunoterapia, siendo el melanoma un tumor ideal para el estudio de inhibidores de puntos de control. Así pues, esta era empezó con el desarrollo de anticuerpos frente a CTLA-4. Hasta día de hoy, en la **Figura 43** se esquematizan las opciones terapéuticas y fármacos aprobados por la FDA que están disponibles actualmente en clínica para el tratamiento del melanoma en sus diferentes estadios.²⁴

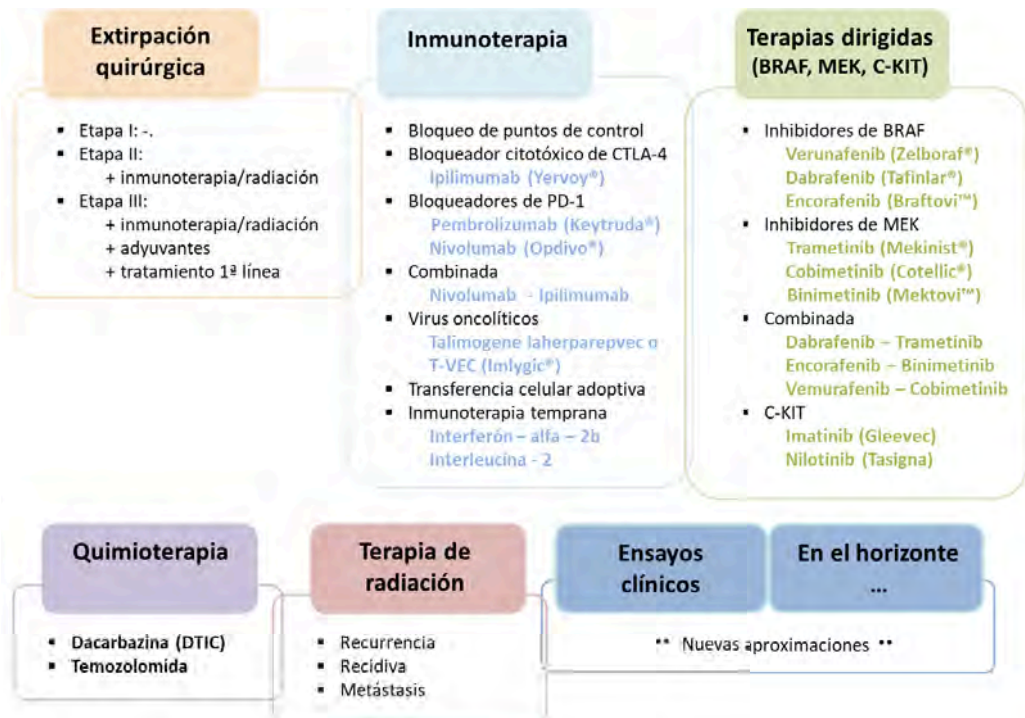


Figura 42. Esquema resumen de las líneas de tratamiento actuales frente al melanoma. Datos obtenidos de la *Skin Cancer Foundation*, revisados y actualizados en abril 2019 por Halpern A.C, MD; Marghoob A.A, MD; Reiter, O., MD.; y de la *American Cancer Society*, revisados médicamente en agosto 2019.

²³ DAVIES H., BIGNELL G.R., COX C., et al. *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature. 2002, 417: 949 – 954.

²⁴ SCHADENDORF D., LIVINGSTONE E., ZIMMER L. *Treatment in metastatic melanoma – time to re-think*. Editorial Annals of Oncology. 2019, 30.

Sin embargo, la administración repetida de muchos de los fármacos quimioterapéuticos suele terminar en el desarrollo de quimioresistencia y toxicidad sistémica severa, así como también puede surgir resistencia frente a la radioterapia. En aras de buscar nuevas alternativas, un trabajo reciente de este año ha desarrollado un nuevo compuesto desestabilizador de tubulina (QW-296), poco susceptible a desarrollar resistencias y cuya solubilidad se ha mejorado mediante su encapsulación en nanopartículas poliméricas. La administración sistémica de estas nanopartículas en modelo murino con melanoma metastásico de pulmón resultó en una regresión significativa del tumor y un aumento de la supervivencia media.²⁵

Siguiendo en la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento, se ha visto que el eje ciclina D – CDK4/6 – Rb aparece desregulado en el 85-90% de los melanomas, por lo que podía representar una nueva diana terapéutica. Como se comentó en detalle en el Capítulo I, el palbociclib es un inhibidor altamente selectivo de CDK4/6 que ha demostrado ser efectivo en la inhibición del crecimiento de células malignas tanto *in vitro* como *in vivo*, impidiendo la fosforilación de Rb y frenando la progresión G1/S del ciclo celular. Así pues, por ejemplo, Von Euw y colaboradores han evaluado el potencial terapéutico del palbociclib en un panel de líneas celulares de melanoma con el fin de identificar biomarcadores potenciales de sensibilidad y resistencia.²⁶ Además, la combinación de inhibidores de CDK4/6 (como palbociclib) con inhibidores de BRAF y MEK se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de melanoma, si bien es cierto que se cree que el momento de “adición” de los inhibidores de CDK4/6 al tratamiento puede determinar el impacto de la eficacia de la triple combinación de fármacos. Así, un estudio actual ha determinado que la adición de palbociclib antes del tratamiento con inhibidores de BRAF y MEK bloquea el desarrollo de resistencias y produce respuestas robustas y duraderas en células de melanoma con BRAF mutado. Sin embargo, los efectos sinérgicos se pierden cuando el tratamiento con palbociclib se inicia una vez las células ya han adquirido resistencia a la inhibición de BRAF, con lo cual los pacientes tienen menos probabilidades de tener una respuesta favorable al subsiguiente tratamiento con la triple combinación farmacológica.²⁷

²⁵ BARIWAL J., KUMAR V., CHEN H., *et al.* Nanoparticulate delivery of potent microtubule inhibitor for metastatic melanoma treatment. *J Control Rel.* **2019**, 309: 231 – 243.

²⁶ VON EUW E.M., CONKLIN D., RONG H-M., GONG K-W, FINN R, SLAMON D. *Identification of markers of sensitivity and resistance to palbociclib (PD0332991) in melanoma.* Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Abstract 1321. **2014**.

²⁷ MARTIN C.A., CULLINANE C., KIRBI L., ABUHAMMAD S., *et al.* Palbociclib synergizes with BRAF and MEK inhibitors in treatment naïve melanoma but not after the development of BRAF inhibitor resistance. *Int J Cancer.* **2018**, 142: 2139 – 2152.

En referencia al tema que nos ocupa en la presente tesis, se ha visto que el tratamiento con el actualmente aprobado por la FDA vemurafenib consigue un buen efecto anti-tumorigénico en metástasis de melanoma con BRAF mutado; sin embargo, aunque inicialmente tras el tratamiento se produce una regresión del tumor, suele ocurrir recidiva en el mismo sitio en que se encontraba el tumor original. Puesto que se observó que la inducción de apoptosis en las células de melanoma *in vitro* era incompleta, gracias al estudio con un amplio panel de líneas celulares de melanoma se ha comprobado que vemurafenib – además de inhibir BRAF mutado – también induce características de senescencia inducida por estrés en las células tumorales. Este fenotipo senescente se caracterizó a través de los cambios observados en la morfología celular, la formación de heterocromatina y el incremento de los niveles de actividad β -galactosidasa; además estas marcas de senescencia inducidas a partir de la inhibición de BRAF también se detectaron en células humanas de melanoma xenoinjertadas en ratones atímicos. Este hecho proporciona una posible explicación al porqué no se produce una remisión completa y sin recidivas del melanoma en los pacientes tras el efecto pro-apoptótico del tratamiento con vemurafenib, siendo precisamente el responsable el reservorio de células senescentes que aparece como consecuencia del tratamiento.²⁸

Con el fin de probar que la eliminación de las células senescentes que se inducen como consecuencia de un tratamiento quimioterapéutico puede ser favorable a la hora de conseguir la regresión tumoral, y puesto que el palbociclib es un buen candidato terapéutico frente al melanoma, el escenario que se planteó para la validación de las nanopartículas **Gal-NP** se basó en la inducción de senescencia con el inhibidor de CDK4/6 en un modelo de melanoma. Tras una o dos semanas de tratamiento con el inhibidor se detiene la proliferación tumoral, al haber inducido senescencia en las células cancerosas. Una vez desarrollada la senescencia, los animales se trataron con las nanopartículas citotóxicas con el objetivo de eliminar dichas células senescentes y conseguir la reducción del tumor (**Figura 44**).

²⁸ HAFERKAMP S., BORST A., ADAM C., *et al.* Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *J Invest Derm.* **2013**, 133: 1601 – 1609.

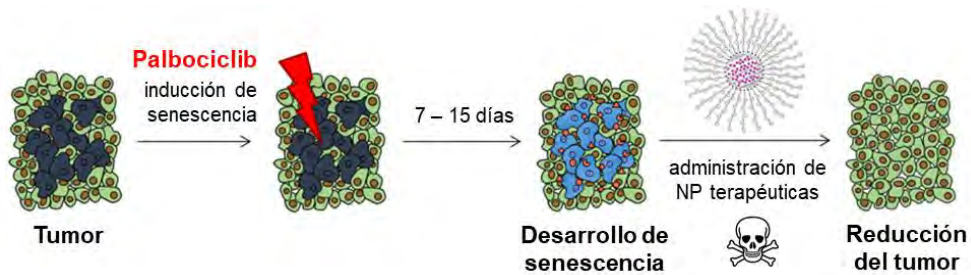


Figura 43. Inducción de senescencia en células tumorales mediante el tratamiento con palbociclib. Las células tumorales senescentes se consiguen eliminar tras la administración terapéutica de nanopartículas mesoporosas capaces de liberar su contenido de manera específica en células senescentes, consiguiéndose de esta manera la reducción del tumor.

2 | Objetivos

En este Capítulo se realizan estudios pre-clínicos para evaluar el *targeting in vivo* y la efectividad terapéutica de las **Gal-NPs** en modelos *in vitro* e *in vivo* de fibrosis pulmonar idiopática y melanoma. Para ello, los objetivos específicos que se plantean son:

- ✓ Puesta a punto de un modelo de fibrosis pulmonar idiopática inducida por bleomicina, y evaluación del efecto terapéutico de las nanopartículas cargadas con doxorubicina en la evolución de la enfermedad.
- ✓ Puesta a punto de un modelo de senescencia inducida por palbociclib en cultivo celular y modelo murino de xenoinjertos de melanoma, y evaluación del efecto terapéutico de las nanopartículas cargadas con el fármaco citotóxico en la progresión del tumor.

3 | Resultados y discusión

Validación de la liberación específica del cargo de las Gal-NPs en modelos celulares de senescencia

Las nanopartículas **Gal-NP** están funcionalizadas con un galacto-hexa-sacárido, es decir, una molécula de azúcar formada por seis galactosas unidas por enlaces $\beta(1,4)$. Estas nanopartículas se cargaron en primer lugar con el fluoróforo rodamina B, siendo el sólido resultante **Gal-NP(Rho)**. Una vez caracterizadas y validadas estructural y funcionalmente *in vitro* (como se ha descrito en el Capítulo III) se inició el estudio de su comportamiento en sistemas celulares estableciendo una colaboración con el grupo del Dr. Manuel Serrano en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid). El *targeting* a células senescentes de éstas nanopartículas se validó en tres líneas celulares humanas de cáncer (SK-MEL-103, NCI-H226 y UT-SCC-42B) tratadas con palbociclib para inducir senescencia. De las tres líneas celulares mencionadas éste Capítulo se va a centrar en los estudios con SK-MEL-103 (línea de melanoma) si bien los resultados obtenidos fueron similares en las otras dos líneas estudiadas.

En primer lugar la inducción de senescencia en SK-MEL-103 tras el tratamiento con palbociclib se comprobó mediante ensayo colorimétrico de actividad β -galactosidasa. Como se puede ver en la **Figura 45**, tras una semana de tratamiento se produce un cambio fenotípico fácilmente detectable en las células, que se vuelven mucho más grandes y planas, presentan mayor número de vesículas y algunas se vuelven multinucleadas. Además del cambio morfológico, la coloración azul que caracteriza la presencia de actividad β -galactosidasa debido al procesamiento del sustrato X-Gal únicamente se da en las células tratadas con palbociclib.

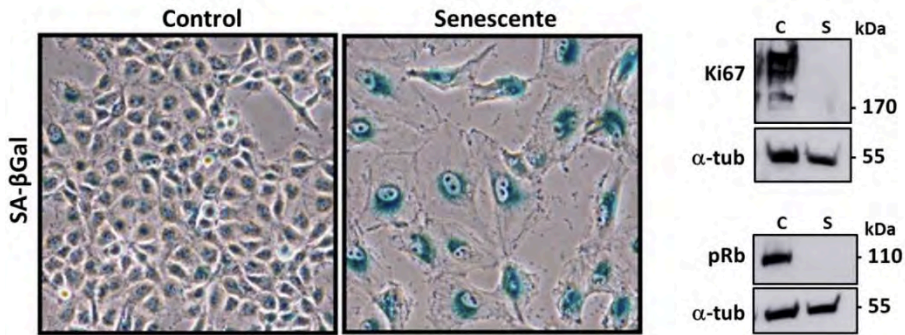


Figura 44. Palbociclib induce senescencia en SK-MEL-103. Ensayo de actividad β -galactosidasa (SA- β Gal) en células SK-MEL-103 de melanoma tratadas con palbociclib $1 \mu\text{M}$ durante una semana. En la derecha se muestran las bandas obtenidas por análisis *western blot* para determinar la presencia o ausencia de los marcadores Ki67 (359 kDa) y pRb (110 kDa) en células control y células previamente tratadas con palbociclib. La α -tubulina (55 kDa) se utilizó en ambos casos como control de carga.

Para corroborar el estado senescente se estudiaron marcadores moleculares de senescencia. En concreto, se estudiaron los marcadores Ki67 y la proteína de retinoblastoma fosforilada (pRb). Como se muestra en la [Figura 45](#) la expresión de Ki67 disminuye hasta casi desaparecer en células senescentes tratadas con palbociclib, lo cual indica la parada de ciclo celular. Por otra parte, la inhibición de CDK4/6 da lugar a la ausencia de fosforilación de Rb, lo que causa el arresto del ciclo celular en la transición G1/S. Esto se corresponde también con las bandas detectadas para éste marcador, apareciendo señal de pRb únicamente en células control, confirmándose por tanto una hipo-fosforilación de Rb en las células tratadas con palbociclib.

Una vez comprobada la inducción de senescencia en la línea celular, se procedió a llevar a cabo la validación funcional de las nanopartículas **Gal-NP(Rho)** en cultivo. Para ello el material se incubó tanto con células senescentes como con células control y se estudió y cuantificó la liberación de rodamina mediante microscopía confocal.

En concreto, las células SK-MEL-103 se trataron o no con palbociclib $1 \mu\text{M}$ durante una semana, y tras este periodo los cultivos se incubaron con nanopartículas **Gal-NP(Rho)** durante 16 horas ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$). En la [Figura 46](#) se observa en verde la señal correspondiente a la calceína, colorante que únicamente emite fluorescencia en células vivas y que se utilizó para delimitar visualmente el citoplasma, de forma que se pudiese discernir la señal de rodamina en el exterior e interior celular. Así pues, se aprecia claramente que la señal de fluorescencia roja correspondiente al fluoróforo liberado de la nanopartícula **Gal-NP(Rho)** es notablemente mayor en células senescentes en comparación con las control, que

presentan señal muy débil y con un patrón más punteado en lugar de difuso. Dicho patrón punteado y nítido sería característico de las nanopartículas “cerradas” que no han liberado la carga encapsulada.

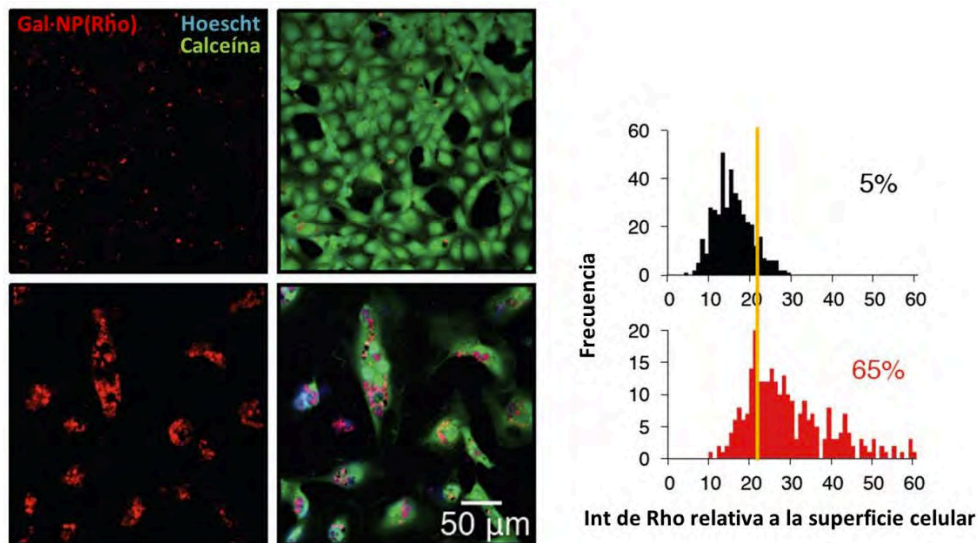


Figura 45. Las nanopartículas Gal-NP(Rho) liberan su contenido de manera preferencial en células senescentes. Células SK-MEL-103 se trataron o no trataron con palbociclib $1 \mu\text{M}$ durante una semana, y tras este periodo los cultivos se trataron con nanopartículas Gal-NP(Rho) durante 16 horas ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$). En las imágenes representativas de microscopía confocal se puede apreciar la liberación de rodamina en rojo, además de una co-tinción con calceína y Hoechst para el núcleo. Los gráficos de la derecha muestran la intensidad de rodamina relativa a la superficie de la célula en controles (arriba) y senescentes (abajo). Cada ensayo se repitió al menos tres veces, obteniéndose resultados similares.

Se concluye por tanto que el fluoróforo se libera de forma más eficiente en células senescentes tratadas previamente con palbociclib, lo cual confirma el funcionamiento del sistema que previamente se había visto *in vitro* y demuestra la funcionalidad y selectividad de la encapsulación en las nuevas nanopartículas Gal-NP (Figura 47).

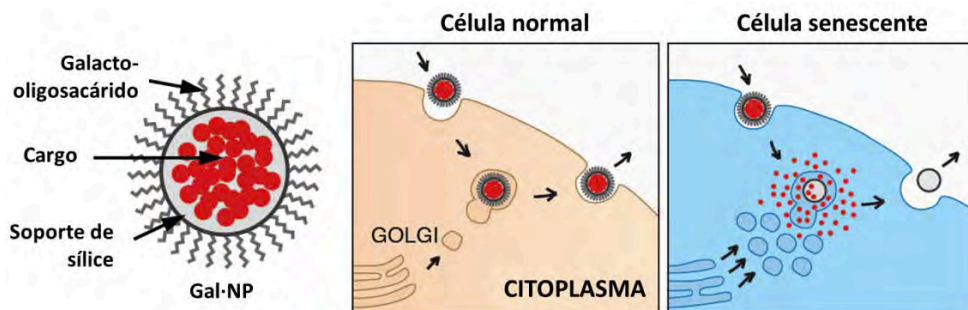


Figura 46. Las nanopartículas Gal-NP se basan en un soporte mesoporoso de sílice (MCM-41) que se puede cargar con diferentes compuestos y que presenta una capa de galacto-hexa-sacáridos (galactan) que actúa como puerta bloqueando la salida de los poros. La entrada de las nanopartículas en la célula tiene lugar por endocitosis, y tras fusionarse los endosomas con las vesículas lisosomales, se expulsan de la célula por exocitosis. El elevado contenido de β -galactosidasa lisosomal en células senescentes hace que las nanopartículas liberen su contenido en éstas células, al producirse la hidrólisis mediada por la enzima de la capa de galacto-hexa-sacáridos.

Las nanopartículas Gal-NP(Rho) liberan el fluoróforo encapsulado en un modelo *in vivo* de xenoinjerto con tratamiento de quimioterapia

Para evaluar *in vivo* la liberación selectiva de la carga encapsulada en las nanopartículas Gal-NP(Rho), se utilizó un modelo de xenoinjerto con senescencia inducida por quimioterapia en ratones atímicos (inmunodeprimidos).

La formación de los xenoinjertos (entendidos como proceso de implantación de células de una especie en otra distinta) se llevó a cabo de manera subcutánea, inyectando las células SK-MEL-103 en ambos flancos de la parte inferior de la espalda del ratón, como se ve en la [Figura 48](#). Una vez formado el tumor, los animales iniciaron el tratamiento diario con palbociclib vía oral durante una semana.



Figura 47. Ratón atímico *nude* hembra en el que se muestran los tumores xenoinjerto tras la inyección subcutánea, en ambos flancos inferiores de la espalda, de células de melanoma SK-MEL-103.

La inducción de senescencia resultó efectiva y muy eficiente, como se puede comprobar en la imagen de la **Figura 49**. La fotografía muestra dos tumores (control y tratado con palbociclib) en los que se ha realizado la tinción de actividad β -galactosidasa, que dio únicamente positivo (azul) en el tumor senescente. El arresto de ciclo celular también se comprobó *in vivo* mediante la detección de los marcadores Ki67 y pRb por inmunohistoquímica, realizada sobre secciones obtenidas a partir de los tumores. En el panel derecho de la **Figura 49** se puede observar la ausencia del marcador de proliferación Ki67 en tumores tratados con palbociclib, así como una reducción de la señal de Rb fosforilado respecto a los tumores control.

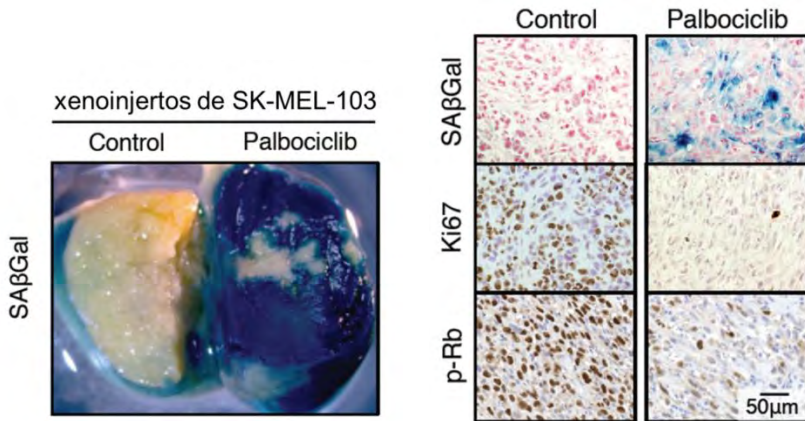


Figura 48. Inducción de senescencia en xenoinjertos subcutáneos de tumores de melanoma SK-MEL-103 en ratones atímicos *nude* hembra. Tras la formación de los tumores, los ratones se trataron diariamente con palbociclib (vía oral, 100 mg/kg) durante una semana. La fotografía muestra porciones representativas de tumores control y senescentes después de realizarse una tinción de actividad SA- β Gal. En el panel de la derecha se muestran secciones de tumores control y tumores tratados con palbociclib procesados para tinción SA- β Gal e inmunohistoquímicas de Ki67 y Rb fosforilado (pRb). El experimento se repitió al menos dos veces con resultados similares.

Una vez comprobada la inducción de senescencia en el tumor tras el tratamiento con palbociclib, en una primera aproximación los ratones se trataron con las nanopartículas **Gal-NP(Rho)** por vía intravenosa (vena de la cola), administrándose 200µL de una suspensión concentrada de 4mg/mL de nanopartículas. A las 6 horas post-inyección, los animales se eutanasiaron y los tumores extraídos se analizaron en el IVIS para la detección de fluorescencia (**Figura 50**).

Es importante remarcar, puesto que se aprecia notablemente en la imagen de los tumores, que la longitud de onda de excitación empleada para la detección de rodamina se superpone parcialmente con la auto-fluorescencia característica de

las células senescentes.^{29,30} Es por eso que los tumores tratados con palbociclib aparecen con una fuerte señal de auto-fluorescencia, lo cual corrobora de nuevo que eran senescentes. De este modo, la señal de rodamina se detectó sobre este fondo de auto-fluorescencia en los tumores, y en los que la señal de fluorescencia resultó ser significativamente mayor respecto a los tumores control también tratados con las nanopartículas **Gal-NP(Rho)**. En el panel de la derecha se cuantifica la señal obtenida tras el procesamiento de las imágenes obtenidas por el sistema de imagen IVIS, y representa la diferencia en intensidad de fluorescencia detectada en tumores control y senescentes tras restar los correspondientes valores de auto-fluorescencia.

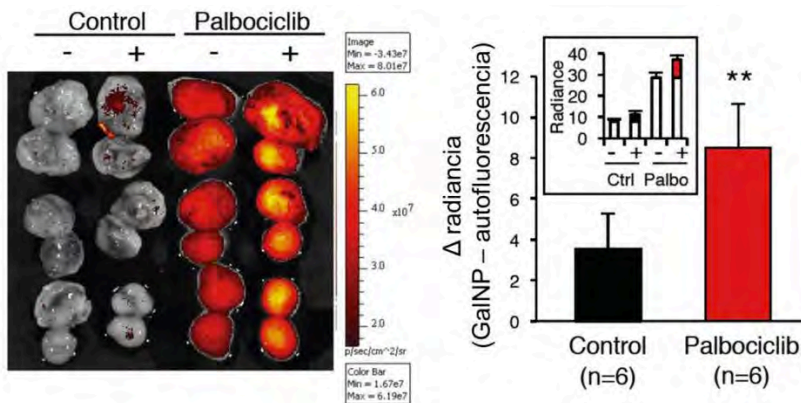


Figura 49. Las nanopartículas Gal-NP(Rho) liberan el cargo selectivamente en tumores senescentes. Los ratones control o tratados con palbociclib durante 7 días se trataron vía intravenosa con 200 μ L de una suspensión de Gal-NP(Rho) a una concentración de 4 mg/mL. A las 6 horas los animales se sacrificaron, los tumores se extrajeron y la fluorescencia se analizó por sistema de imagen IVIS. La gráfica indica la diferencia media de radiancia en los tumores de los grupos control y palbociclib a los que se inyectaron nanopartículas. La gráfica más pequeña muestra los valores absolutos de radiancia para cada grupo (las diferencias correspondientes se destacan en negro o en rojo). Los valores se expresan como media \pm SD, y la estadística (**) se llevó a cabo mediante test T-Student de dos colas ($p < 0.01$).

Los estudios *ex vivo* mostraron que a las 6 horas post-inyección la acumulación del cargo procedente de las nanopartículas **Gal-NP(Rho)** ocurre de forma preferencial en el tumor (Figura 51), no detectándose emisión de fluorescencia significativa en otros órganos tales como hígado, bazo o pulmón.

²⁹ CHO S., HWANG E.S. *Fluorescence-based detection and quantification of features of cellular senescence*. *Methods Cell Biol.* **2011**: 149 – 188.

³⁰ GEORGAKOPOULOU E. *et al. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues*. *Aging (Albany, NY)*. **2012**, 5(1): 37 – 50.

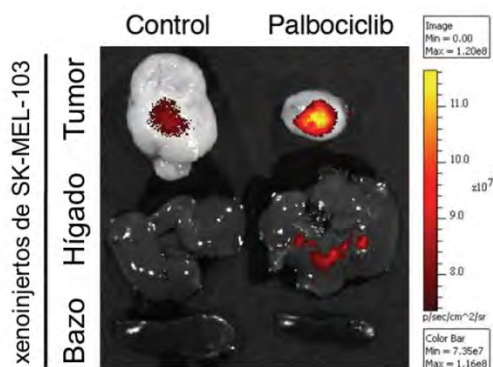


Figura 50. Análisis *ex vivo* de la liberación de cargo de Gal-NP(Rho) en los diferentes órganos del animal. En la imagen se muestran los tumores subcutáneos de SK-MEL-103, el hígado y el bazo de ratones *nude* atímicos tratados o no tratados con palbociclib a los que se les administraron las nanopartículas Gal-NP(Rho). A las 6 horas post-inyección los animales se sacrificaron, se recogieron órganos y tumores y la fluorescencia de rodamina se analizó por imagen en IVIS.

Las nanopartículas Gal-NP(Rho) liberan el fluoróforo encapsulado en un modelo *in vivo* de fibrosis pulmonar

Como se ha explicado en la introducción de este Capítulo la senescencia celular aparece en altos niveles en fibrosis pulmonar, tanto en humanos como en ratón, y contribuye activamente a las manifestaciones patológicas de la enfermedad.³¹ Es por ello que planteó estudiar si el sistema de liberación **Gal-NP** selectivo para células senescentes sería efectivo en este modelo de senescencia *in vivo*.

En este caso se trabajó con ratones macho de la cepa C57BL/6, que se trataron con bleomicina para inducir farmacológicamente fibrosis pulmonar. La bleomicina se administró mediante instilación intratraqueal, lo que produjo en los animales la aparición de una fibrosis completa de pulmón en un periodo de dos semanas. Esta fibrosis vino acompañada por áreas focales de células con tinción positiva para actividad SA-βGal, así como por la aparición de depósitos de colágeno como revela la tinción de Masson (Figura 52).

³¹ a) HECKER L. *et al.* Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med.* **2014**, 6(231): 231ra47. b) AOSHIBA K., TSUJI T., NAGAI A. Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells. *Eur Respir J.* **2003**, 22(3): 436–443. c) AOSHIBA K. *et al.* Senescence-associated secretory phenotype in a mouse model of bleomycin-induced lung injury. *Exp Toxicol Pathol.* **2013**, 65: 1053–1062.

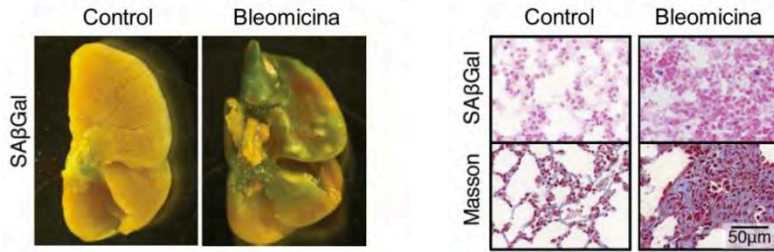


Figura 51. Caracterización del modelo de fibrosis pulmonar. Ratones C57BL/6 macho se administraron vía intratraqueal con una sola dosis de bleomicina (1.5 U/kg), y el desarrollo de la fibrosis y aparición de áreas focales de senescencia se analizaron dos semanas después. Las fotografías de la izquierda muestran pulmones representativos después de una tinción SA-βGal de tejido completo. A la izquierda se muestran secciones de pulmones tratados o no tratados con bleomicina, procesados para tinción de actividad β-galactosidasa y tinción de Masson para detectar fibras de colágeno (teñidas en azul).

Dos semanas después de la administración de bleomicina, los ratones se trataron por vía intravenosa con las nanopartículas **Gal·NP(Rho)**, y 6 horas después de la inyección se analizó *ex vivo* la señal de fluorescencia de los pulmones en el IVIS. Como se puede observar en la **Figura 53**, la señal de rodamina se observó preferencialmente en los pulmones fibróticos en comparación con los pulmones sanos.

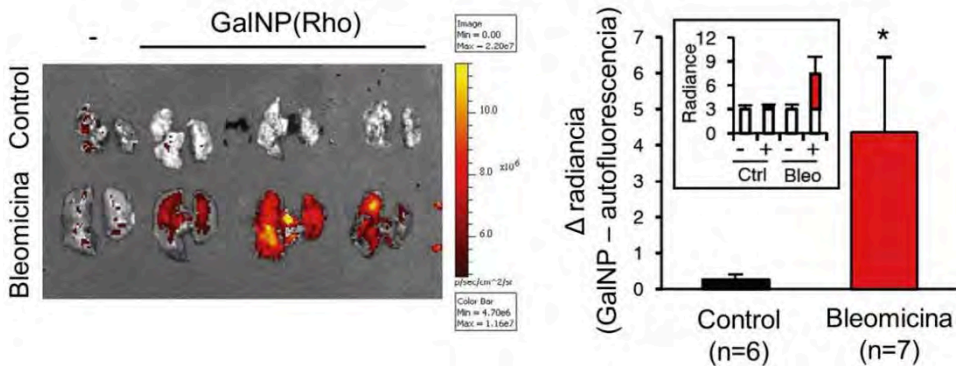


Figura 52. Las nanopartículas Gal·NP(Rho) liberan el cargo selectivamente en los pulmones de ratones fibróticos. Las nanopartículas Gal·NP(Rho) se administraron tanto a ratones control como a ratones tratados con bleomicina por vía intravenosa (200 µL, suspensión de 4 mg/mL). 6 horas después de la inyección los ratones se eutanasiaron y los pulmones se analizaron en IVIS. La gráfica del panel superior indica la diferencia media de radiancia en los pulmones de los grupos control y bleomicina a los que se inyectaron nanopartículas, mientras que la gráfica más pequeña muestra los valores absolutos de radiancia para cada grupo (las diferencias correspondientes se destacan en negro o en rojo). Los valores se expresan como media ± SD, y la estadística (*) se llevó a cabo mediante test T-Student de dos colas ($p < 0.05$).

La diferencia en niveles de fluorescencia entre pulmones sanos y pulmones fibróticos también se cuantificó mediante microscopía confocal. Para ello, 6 horas después de la administración de las nanopartículas los pulmones se extrajeron y se obtuvieron secciones a partir de los mismos, que se analizaron al microscopio. Como se puede ver en la gráfica de la **Figura 54**, el porcentaje de células positivas para rodamina fue más abundante en los pulmones con fibrosis.

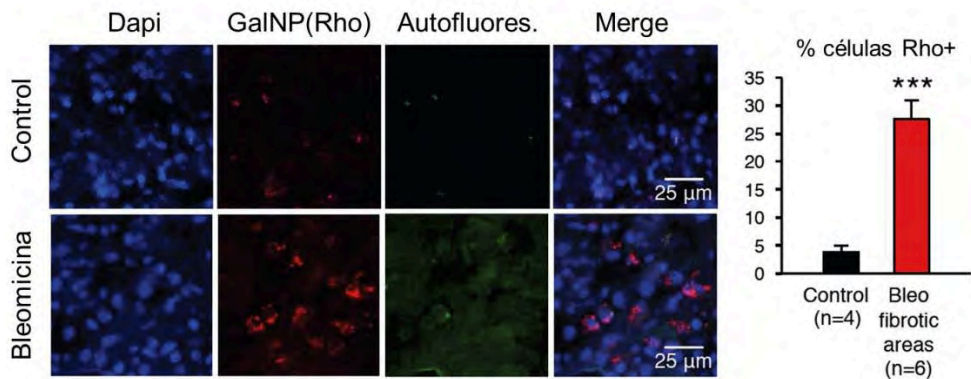


Figura 53. Estudios de microscopía confocal que muestran la liberación selectiva del cargo en las nanopartículas Gal·NP(Rho) en los pulmones de animales fibróticos. Después de inyectar las nanopartículas Gal·NP(Rho) a ratones sanos y ratones fibróticos, tras extraer los pulmones se obtuvieron secciones de los mismos que se analizaron a las 6 horas post-administración por microscopía confocal. Las imágenes se corresponden con secciones representativas de pulmones sanos y pulmones fibróticos. En la gráfica de la derecha se muestra el porcentaje de células positivas para rodamina en las áreas fibróticas de los pulmones de animales tratados con bleomicina en comparación con tejido pulmonar sano de ratones control. Los valores se expresan como media \pm SD y la estadística se obtuvo mediante test T-Student de dos colas (***) $p < 0.001$.

La fluorescencia diferencial que se observaba entre pulmones sanos y pulmones fibróticos podría deberse, al menos en parte, a un acceso y a una acumulación diferencial (y favorecedora) de las nanopartículas **Gal·NP** en los animales tratados con bleomicina. Para corroborar este hecho, a partir de los pulmones y otros órganos seleccionados de ratones sanos y ratones fibróticos se llevaron a cabo estudios de biodistribución de silicio utilizando un equipo de espectroscopía de masas acoplado inductivamente a plasma (ICP-MS), con el fin de detectar la presencia de las nanopartículas a partir de la cuantificación de su principal componente (i.e silicio).

Los resultados obtenidos mostraron que 6 horas después de la inyección intravenosa de nanopartículas los niveles de silicio eran similares tanto en pulmones como en el resto de órganos, tanto en animales sanos como en animales tratados con bleomicina (**Figura 55**). Estos resultados demuestran que las nanopartículas **Gal-NP** se acumulan de manera equivalente en pulmones control y fibróticos, si bien la liberación de rodamina encapsulada se produce de forma preferencial en pulmones con fibrosis y áreas focales de senescencia.

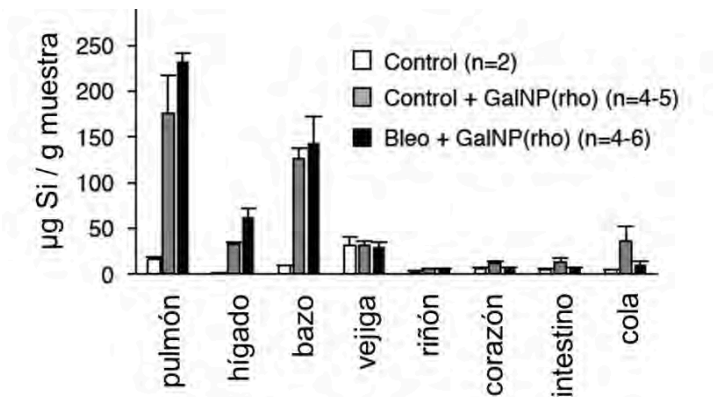


Figura 54. Estudios de biodistribución de las nanopartículas Gal-NP(Rho) en pulmón, hígado, bazo, vejiga, riñón, corazón, intestino y cola. 200 μ L de una suspensión 4 mg/mL de nanopartículas se inyectaron vía intravenosa en ratones C57BL/6 tanto control como tratados con bleomicina. 6 horas después los órganos se extrajeron y procesaron para la determinación de silicio. El gráfico muestra los μ g de silicio (Si) por gramo de muestra, detectados por ICP-MS en los diferentes órganos que se detallan.

Validación de la actividad terapéutica de las nanopartículas Gal-NP cargadas con un fármaco citotóxico en modelos celulares

Una vez demostrado que las nanopartículas **Gal-NP** son capaces de liberar compuestos fluorescentes preferencialmente en células senescentes, el siguiente paso para su validación fue estudiar si nanopartículas cargadas con compuestos citotóxicos se abrirían de igual manera y de forma selectiva en células senescentes.

Para determinar qué compuesto citotóxico encapsular en el soporte mesoporoso, el equipo del Dr. Manuel Serrano (CNIO) llevó a cabo un rastreo entre 80 fármacos anti-tumorales, con el objetivo de identificar aquellos capaces de eliminar por igual células senescentes y células no senescentes. La actividad de estos compuestos se testó en tres líneas celulares de cáncer (SK-MEL-103, NCI-H226 y la línea de hepatocarcinoma Huh7) bajo condiciones de proliferación o de senescencia inducida por palbociclib. La conclusión de dicho ensayo fue que la

doxorubicina, fármaco habitualmente utilizado en quimioterapia, era el fármaco citotóxico más eficiente frente a células senescentes en las tres líneas celulares testadas. Es importante remarcar en este punto que la doxorubicina puede causar muerte a través de múltiples mecanismos, muchos de los cuales no están relacionados con la división celular.³² En base a esto, se sintetizaron y caracterizaron las nanopartículas **Gal-NP(Dox)** tal y como se ha descrito en el Capítulo III, con el objetivo de encapsular el fármaco citotóxico para lograr la eliminación selectiva de células senescentes.

Gracias a la fluorescencia intrínseca que posee la doxorubicina, antes de pasar al modelo *in vivo*, se pudieron realizar ensayos en cultivo celular para determinar la liberación preferencial de la carga en células senescentes mediante microscopía confocal. Así pues, células SK-MEL-103 control y senescentes (palbociclib 1 μ M durante 14 días, tinción SA- β Gal positiva) se trataron con **Gal-NP(Dox)**, y se observaron a los 30 minutos post-adición de las nanopartículas por microscopía confocal. Como se puede observar en la **Figura 56**, a la media hora de haber añadido las nanopartículas se podía detectar una fuerte señal de fluorescencia con localización perinuclear en células senescentes, mientras que dicha fluorescencia no se detectaba de forma tan intensa en células control igualmente tratadas con nanopartículas. Sin embargo, como se puede observar en las imágenes la doxorubicina libre dio señal tanto en células control como en células senescentes, observándose acumulación nuclear y con poca localización citoplasmática. Las diferencias en cuanto a localización de señal de la doxorubicina libre y de la doxorubicina encapsulada eran además consistentes con la ruta de entrada esperada de las nanopartículas por vía endocitosis, con la posterior digestión del galacto-hexa-sacárido actuando como puerta molecular por la β -galactosidasa lisosomal.

³² GEWIRTZ D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* **1999**, 57(7): 727 – 41.

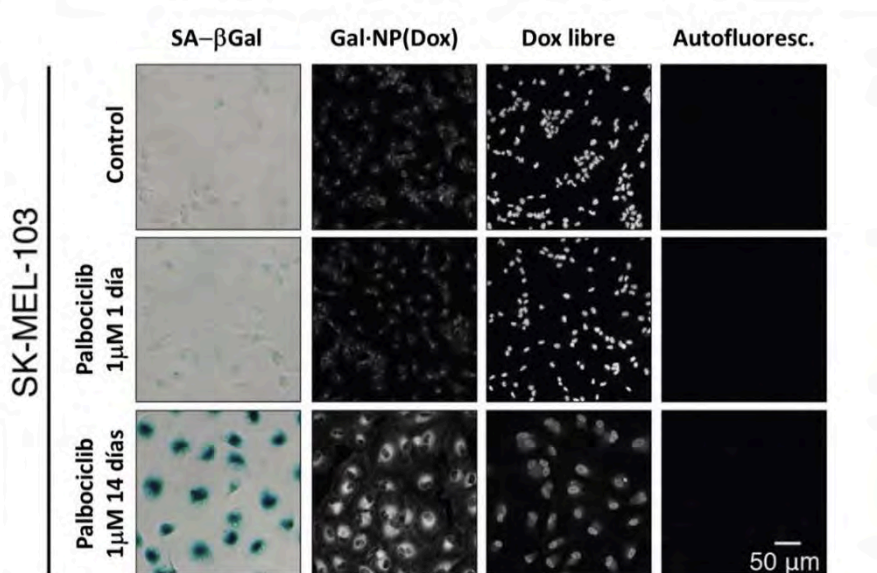


Figura 55. Células de melanoma SK-MEL-103 se trataron o no trataron con palbociclib 1 μM durante 14 días, y la inducción de senescencia se comprobó mediante tinción de actividad SA- βGal . Los cultivos se trataron con doxorubicina libre 50 μM o con Gal-NP(Dox) (1 mg/mL, filtradas) durante 30 minutos. Las imágenes son representativas y muestran la fluorescencia de la doxorubicina por microscopía confocal.

Como control adicional se incluyeron en el ensayo células SK-MEL-103 tratadas únicamente durante 1 día con la misma concentración de palbociclib, tratamiento que como confirma la tinción de actividad SA- βGal no es suficiente para inducir el estado senescente. La adición de las nanopartículas **Gal-NP(Dox)** a estas células tratadas a tan corto plazo con palbociclib resultó en bajos niveles de fluorescencia, que fueron similares a los niveles detectados en las células control.

Para confirmar que la liberación de la droga encapsulada estaba relacionada con el estado de senescencia, se llevó a cabo este mismo ensayo en la línea SAOS-2 de células de osteosarcoma. Ésta línea se caracteriza por no tener expresión de Rb, y por tanto ser resistente a la inhibición de CDK4/6 y consecuente inducción de senescencia por palbociclib. Así pues, como se puede ver en la [Figura 57](#), el tratamiento de ésta línea celular con **Gal-NP(Dox)** no resultó en liberación de doxorubicina en células tratadas con palbociclib tanto ni a corto como a largo plazo, siendo la señal de fluorescencia obtenida equivalente a la que mostraban las células control. En paralelo las células también se trataron con doxorubicina libre, que en comparación con las nanopartículas sí que mostraron una señal nuclear fuerte tanto en células control como en células tratadas con palbociclib.

Es importante destacar que estos resultados se contraponen con la localización perinuclear de la doxorubicina que se observó en las células SK-MEL-103

senescentes tratadas con **Gal-NP(Dox)** de la **Figura 56**, lo que refuerza la idea de que las nanopartículas entran en la célula mediante endocitosis, formando endosomas que se fusionan con lisosomas, en los que se produce la liberación preferencial de la carga en células senescentes gracias a su elevado contenido en β -galactosidasa lisosomal.

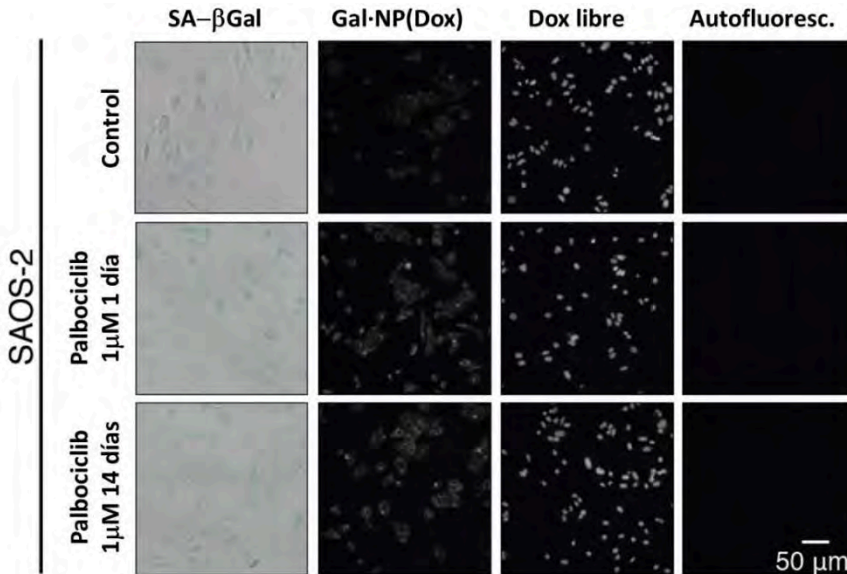


Figura 56. Células SAOS-2 de osteosarcoma se trataron con palbociclib 1 μ M durante 1 o 14 días, tras los cuales se les hizo un ensayo de actividad SA- β Gal. Los cultivos se trataron con doxorubicina libre 50 μ M o Gal-NP(Dox) (1 mg/mL, filtradas) durante 30 minutos. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal.

Finalmente, está descrito que hay formas conjugadas de doxorubicina con tropismo lisosomal que inducen eficientemente muerte por apoptosis.^{33,34} Para determinar el tipo de muerte que las nanopartículas inducen, se llevaron a cabo estudios de microscopía de fluorescencia por *time-lapse* en los que se monitorizaron los cultivos durante las horas posteriores a la adición de nanopartículas, con el objetivo de detectar las células positivas para anexina V (señal de fluorescencia verde). Como se puede ver en la **Figura 58**, tanto en las imágenes representativas como en la gráfica de cuantificación, las células

³³ SHENG Y., XU J., YOU Y., XU F., CHEN Y. *Acid-sensitive peptide-conjugated doxorubicin mediates the lysosomal pathway of apoptosis and reverses drug resistance in breast cancer.* Mol Pharmaceutics. **2015**, 12(7): 2217 - 2228.

³⁴ NAIR J.B., MOHAPATRA S., GHOSH S., MAITI K.K. *Novel lysosome targeted molecular transporter built on a guanidinium-poly-(propylene imine) hybrid dendron for efficient delivery of doxorubicin into cancer cells.* Chem Commun Chem Commun. **2015**, 51(51): 2403 - 2406.

senescentes tratadas con **Gal-NP(Dox)** sufrieron muerte masiva por apoptosis en 48 horas, mientras que las células control tratadas con las nanopartículas permanecieron viables durante este tiempo.

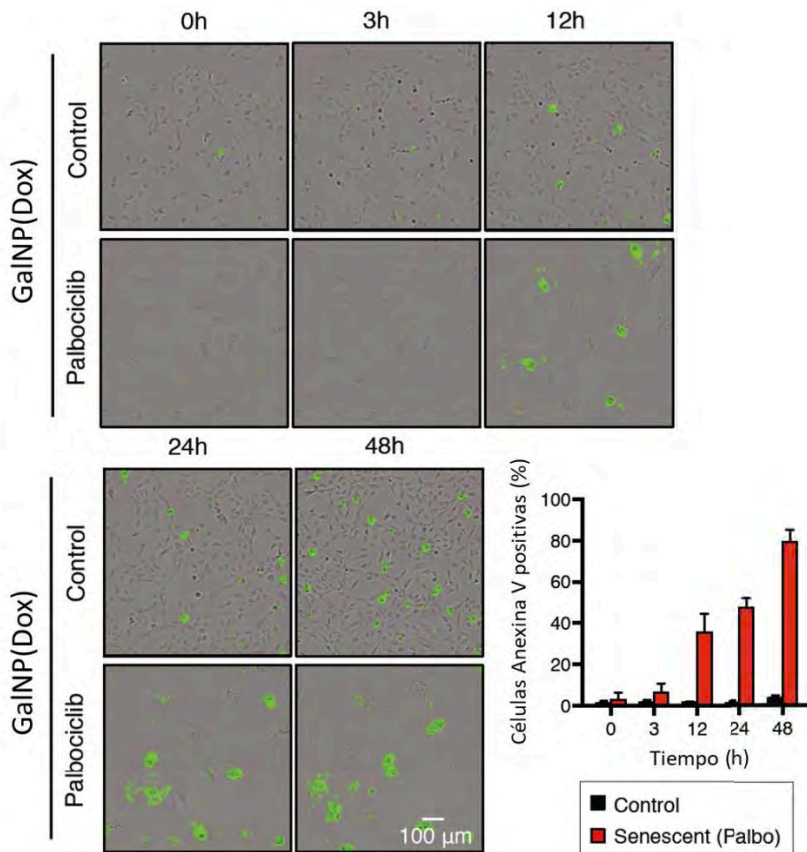


Figura 57. El tratamiento con Gal-NP(Dox) induce muerte por apoptosis. Células SK-MEL-103 de melanoma se trataron o no trataron con Palbociclib 5µM durante 14 días. Los cultivos se expusieron posteriormente a Gal-NP(Dox) (0.06mg/mL, filtradas) y la señal de anexina V se monitorizó a lo largo del tiempo durante 48 horas y se cuantificó a los tiempos indicados mediante microscopía confocal.

Validación de la actividad terapéutica de las nanopartículas Gal-NP(Dox) en un modelo *in vivo* de melanoma

En base a los resultados obtenidos en cultivo celular con las nanopartículas **Gal-NP(Dox)**, se evaluó la eficiencia de la doxorubicina encapsulada como agente senolítico en *xenoinjertos* de melanoma previamente tratados con palbociclib para la inducción de senescencia en las células tumorales.

De la misma forma que se hizo para estudiar el comportamiento de las nanopartículas **Gal·NP(Rho)**, las células SK-MEL-103 se inyectaron subcutáneamente en los flancos inferiores de la espalda de ratones *nude* inmunodeprimidos para inducir la formación de los tumores. Una vez desarrollados los tumores los animales se trataron con dosis diarias de palbociclib y de **Gal·NP(Dox)**, solos o en combinación.

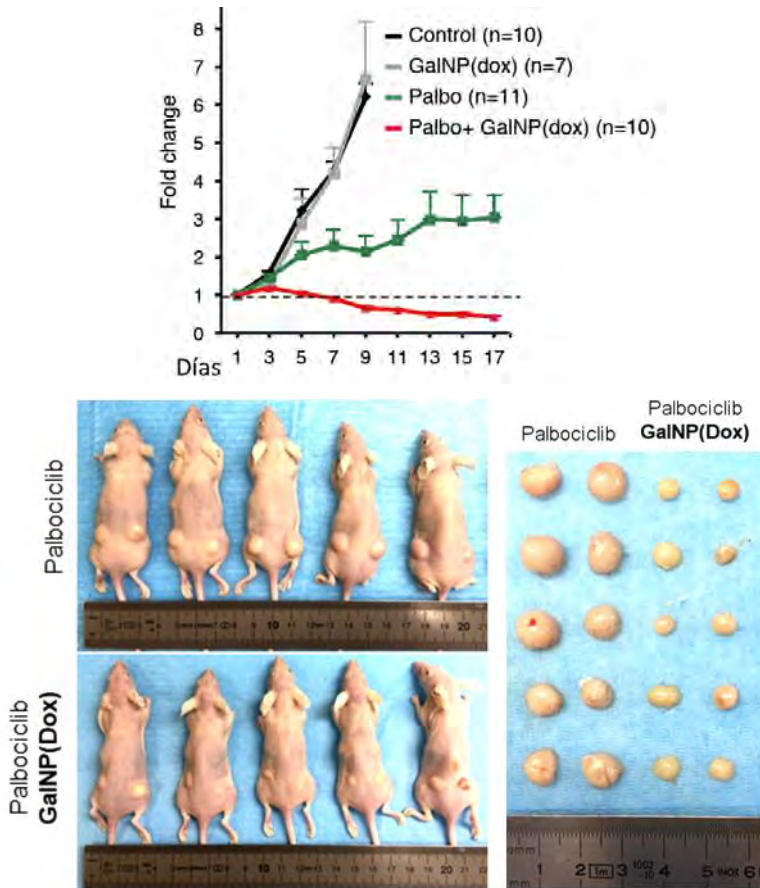


Figura 58. Ratones *nude* atímicos hembra con xenoinjertos subcutáneos de SK-MEL-103 se trataron diariamente con palbociclib (vía oral, 50 mg/kg) y/o Gal·NP(Dox) (vía intravenosa, 200 μ L de una suspensión 4 mg/mL con el equivalente de 1 mg/kg de doxorrubicina a liberar) solos o en combinación. Para cada tumor se calculó el cambio de volumen relativo respecto a su línea base de partida antes de empezar el tratamiento. Los valores se expresan como media \pm SEM.

Como se puede ver en la **Figura 59**, que representa el cambio de volumen de los tumores respecto al tamaño de partida que presentaban antes de iniciar el tratamiento, los resultados obtenidos claramente mostraron que las nanopartículas **Gal·NP(Dox)** tienen un efecto terapéutico beneficioso cuando se

combinan con palbociclib (línea roja). Si bien el tratamiento únicamente con palbociclib (línea verde) consigue frenar el crecimiento del tumor, cuando se administraban solas sin co-tratamiento (línea gris) las nanopartículas no ejercían ningún tipo de efecto sobre el crecimiento del tumor. Así pues, este resultado demostraba que la administración de **Gal-NP(Dox)** no consigue lograr un efecto terapéutico en la reducción del tamaño tumoral en ausencia de palbociclib, de forma que la actividad terapéutica de las nanopartículas **Gal-NP** requiere la inducción de senescencia mediante el tratamiento previo con el inductor. Cabe comentar que, aunque no se muestran en esta tesis, se obtuvieron resultados similares con las nanopartículas **Gal-NP(Dox)** en *xenoinjertos* de células NCI-H226 (cáncer de pulmón).

Finalmente, un aspecto beneficioso de la encapsulación de fármacos es la reducción de la toxicidad del compuesto transportado. En el caso de la doxorubicina, la cardiotoxicidad es el efecto secundario más serio que se le asocia.³⁵ Para comprobar la protección que la encapsulación proporciona frente a la toxicidad de la doxorubicina, se seleccionaron dosis de fármaco libre y encapsulado que fueran similarmente efectivos a la hora de reducir el tamaño de los *tumores* senescentes después de un tratamiento diario de aproximadamente dos semanas. Como marcadores cardíacos se midieron los niveles de ARNm de *Myh7* y *Nppa*, que reflejan hipertrofia cardíaca en respuesta a la muerte de cardiomiocitos inducida por doxorubicina.^{36,37}

Como se puede ver en la **Figura 60**, los niveles de ambos marcadores se disparan significativamente en el caso del tratamiento con doxorubicina libre (barra amarilla), mientras que se mantienen a nivel basal del control cuando la doxorubicina se administra encapsulada en las nanopartículas **Gal-NP(Dox)** (barra roja). Esto indica que la encapsulación del fármaco citotóxico no sólo es efectiva en la eliminación de células senescentes *in vivo*, sino que cuenta con la ventaja añadida de reducir la toxicidad asociada con el mismo.

³⁵ CHATTERJEE K., ZHANG J., HONBO N., KARLINER J.S. *Doxorubicin cardiomyopathy*. *Cardiology*. **2010**, 115(2): 155 – 162.

³⁶ BARRY S.P., DAVIDSON S.M., TOWNSEND P.A. *Molecular regulation of cardiac hypertrophy*. *Int J Biochem Cell Biol*. **2008**, 40(10): 2023 – 2039.

³⁷ RICHARD C. *et al.* *Oxidative stress and myocardial gene alterations associated with Doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats persist for 2 months after treatment cessation*. *J Pharmacol Exp Ther*. **2011**, 339(3): 807 – 814.

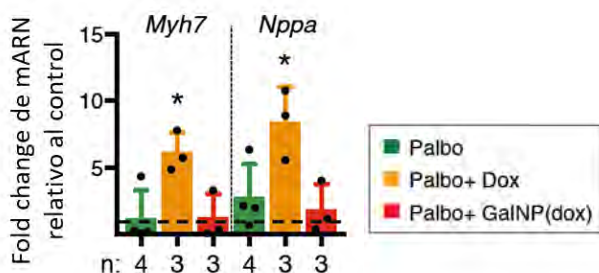


Figura 59. La encapsulación de la doxorubicina disminuye su cardiotoxicidad. Niveles de ARNm de los marcadores de cardiotoxicidad en los corazones de los ratones después de los tratamientos diarios indicados en la Figura 17. Como control interno para normalizar los valores se utilizaron *Actb* y *Gadph*. Los valores son relativos respecto a ratones control y se expresan como media \pm SD. La estadística se analizó por *one-way* ANOVA y test de comparaciones múltiples de Dunnett (*versus* grupo de tratamiento sólo palbociclib). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Tratamientos durante 7 días: palbociclib vía oral, 50 mg/kg; doxorubicina libre vía intravenosa (cola) 1 mg/kg; Gal-NP(Dox) vía intravenosa (cola) 200 μ L de suspensión 4mg/mL.

En conclusión, los resultados mostrados refuerzan el concepto de que la encapsulación en el sistema **Gal-NP** supone un vehículo eficaz para liberar fármacos terapéuticos específicamente en células senescentes.

Actividad terapéutica de las nanopartículas Gal-NP(Dox) en un modelo *in vivo* de fibrosis pulmonar

En base a los buenos resultados obtenidos *in vivo* en el modelo de melanoma, la actividad terapéutica de las nanopartículas **Gal-NP(Dox)** se quiso validar también en un modelo *in vivo* de fibrosis pulmonar donde se ha demostrado que el tratamiento con compuestos senolíticos reduce la fibrosis y favorece la recuperación funcional del tejido.³⁸ Los resultados obtenidos se van a presentar parcialmente y resumidos en éste Capítulo, puesto que fueron realizados en su práctica totalidad por el grupo del Dr. Manuel Serrano con el que colaboramos.

Como se puede observar en la Figura 61, y aprovechando la fluorescencia de la doxorubicina, el primer estudio que se realizó fue para determinar por imagen si las nanopartículas liberaban de forma eficiente la doxorubicina en pulmones fibróticos pero no en pulmones sanos. Para ello se administraron, de forma periódica y durante 14 días, nanopartículas **Gal-NP(Dox)** tanto en animales control como en animales previamente tratados con bleomicina. Una vez finalizado el tratamiento los ratones se eutanasiaron y los pulmones se examinaron *ex vivo* por

³⁸ KRIZHANOVSKY V. *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008, 134(4): 657 – 667.

imagen en IVIS, con el objetivo de determinar la fluorescencia total que presentaban.

Como se muestra en la figura, únicamente los pulmones tratados con doxorubicina encapsulada presentaban una señal focalizada de fluorescencia, habiendo diferencias en cuanto a intensidad probablemente debidas a la distribución no uniforme de las áreas focales de células senescentes en el pulmón fibrótico. Por el contrario, la doxorubicina en formulación libre se distribuía de forma más indistinta por todo el pulmón, mientras que las nanopartículas en pulmones control no presentaban una liberación significativa de la carga encapsulada.

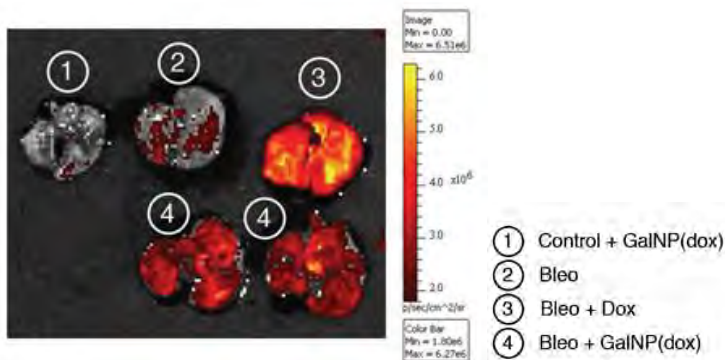


Figura 60. Ratones C57BL/6 macho se sometieron a una única administración intratraqueal de bleomicina (1.5 U/kg). 14 días después los ratones se trataron cada 4 días con doxorubicina libre (vía intravenosa, 4 mg/kg) o cada 2 días con Gal-NP(dox) (vía intravenosa, 200 μ L de suspensión 4 mg/mL con un total de 1 mg/kg de doxorubicina) durante 14 días más (es decir, hasta día 28 post-administración de bleomicina). Al final del tratamiento los ratones se sacrificaron, se recogieron los pulmones, y la fluorescencia de la doxorubicina se analizó mediante IVIS.

En base a estos primeros resultados en el modelo, a continuación se llevó a cabo un estudio longitudinal en el que se evaluó el desarrollo de la enfermedad mediante pletismografía y tomografía computarizada, de acuerdo al esquema que se muestra a la izquierda de la **Figura 62**. A los animales, ratones macho C57BL/6, se les administró una única dosis de bleomicina vía intratraqueal y diez días después se inició un tratamiento diario con doxorubicina libre o encapsulada en **Gal-NP(Dox)** por vía intravenosa. El tratamiento se mantuvo durante 18 días, es decir, hasta día 28 post-administración de la bleomicina.

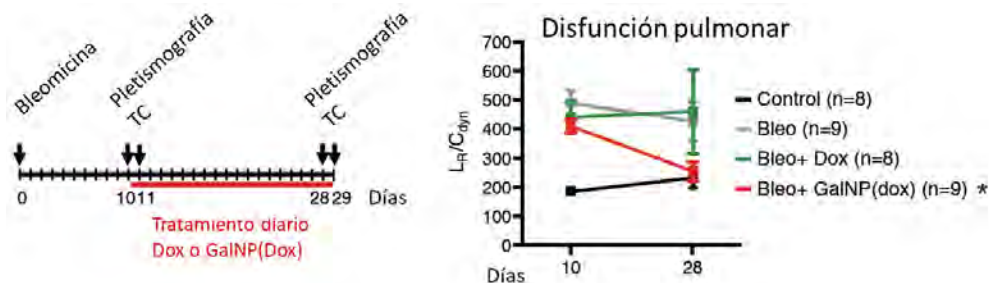


Figura 61. El tratamiento con GalNP(dox) mejora la función pulmonar en animales con fibrosis. Los estudios de pletismografía se utilizaron para determinar el ratio entre la resistencia pulmonar (*lung resistance*, L_R) y la compliancia pulmonar (C_{dyn}) antes y después de los tratamientos indicados. Los valores se expresan como media \pm SEM, y la estadística se llevó a cabo para cada grupo mediante test T-Student de dos colas comparando los valores L_R/C_{dyn} iniciales y finales. * $p < 0.05$.

Para poder entender cómo se evaluó la disfunción de los pulmones, y por tanto la eficacia del tratamiento, cabe definir en primer lugar los parámetros L_R y C_{dyn} . El parámetro L_R hace referencia a la resistencia pulmonar, mientras que C_{dyn} es la compliancia pulmonar: es decir, la distensibilidad pulmonar determinada por su cambio de volumen con la presión. Sería el ratio L_R/C_{dyn} el que determinaría el nivel de disfunción pulmonar de los animales.

Diez días después de haber administrado la dosis de bleomicina se realizó la primera pletismografía. Como se puede observar en la gráfica de la [Figura 62](#), el resultado mostraba que todos los animales tratados presentan un aumento significativo del ratio L_R/C_{dyn} respecto a los animales control no tratados, indicativo de fibrosis pulmonar. Partiendo de esta pletismografía inicial, los ratones fibróticos se empezaron a tratar con dosis diarias de doxorubicina libre o encapsulada en **Gal·NP(Dox)** durante aproximadamente dos semanas. En la gráfica se puede observar cómo, en la pletismografía realizada al final del tratamiento, los ratones administrados con las nanopartículas – pero no aquellos tratados con el fármaco libre – recuperan unos valores L_R/C_{dyn} similares a los de ratones control sanos. Esto significa que el tratamiento con **Gal·NP(Dox)** mejoró significativamente la elasticidad pulmonar, mientras que la doxorubicina libre no consiguió restaurar la funcionalidad de los pulmones una vez finalizado el tratamiento.

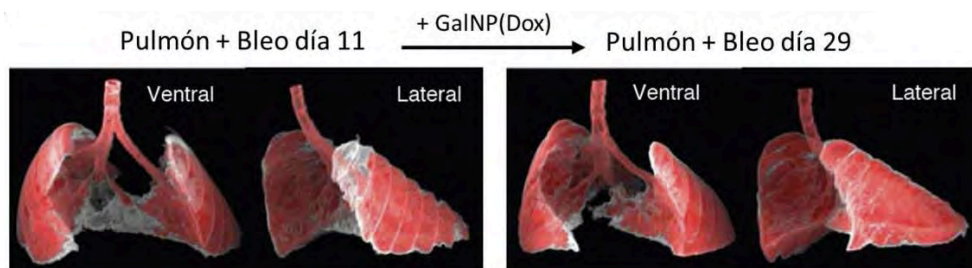


Figura 62. Representación 3D de unos pulmones representativos antes y después del tratamiento con Gal·NP(Dox). El tejido pulmonar sano se muestra en rojo, y las lesiones fibróticas se muestran en gris. Se pueden observar las vistas lateral y ventral de los pulmones.

Estos resultados se confirmaron mediante tomografía computarizada (TC), que cuantificó una reducción significativa en el volumen pulmonar afectado por inflamación y fibrosis en los ratones tratados con las nanopartículas. Las imágenes de la TC no se muestran, pero en la **Figura 63** se puede apreciar (claramente y de forma visual mediante una representación 3D) la evolución del estado de los pulmones en una comparativa del antes y del después del tratamiento con **Gal·NP(Dox)**. Finalmente, los análisis de histología de los pulmones fibróticos tratados durante dos semanas con doxorubicina encapsulada presentaron una reducción significativa de los depósitos de colágeno (característicos de la fibrosis) en las áreas dañadas (ver publicación Muñoz-Espín, EMBO Mol Med. 2018, 10).

4 | Conclusión

Estudios recientes muestran la existencia de múltiples enfermedades que están asociadas con la presencia de células senescentes, y cuya eliminación tiene beneficios terapéuticos en modelos de ratón.^{39,40} En este Capítulo se presenta una estrategia versátil para liberar pequeños compuestos terapéuticos en lesiones senescentes *in vivo*. Se demuestra que la encapsulación de fármacos citotóxicos en nanopartículas capaces de liberar su carga de manera selectiva en células senescentes es terapéutica frente a tumores previamente tratados con quimioterapia para inducir senescencia, así como en un modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina.

³⁹ CHILDS B.G. *et al.* Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov.* **2017**, 16(10): 718 – 735.

⁴⁰ SOTO-GAMEZ A., DEMARIA M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today.* **2017**, 22(5): 786 – 795.

La encapsulación en nanopartículas funcionalizadas con el galacto-hexa-sacárido galactan tiene su base en los elevados niveles de actividad β -galactosidasa lisosomal presentes en células senescentes. Dicha encapsulación consiste en unas nanopartículas esféricas de aproximadamente 100 nm de diámetro de sílice mesoporosa, cargadas con el compuesto terapéutico de elección y funcionalizadas con galacto-oligo-sacáridos que evitan la difusión de la carga fuera de los poros en los que se encuentra encapsulada. Con esta aproximación en un trabajo previo se encapsuló rodamina y las nanopartículas demostraron liberar la carga de manera preferencial en fibroblastos progéricos (disqueratosis congénita) en comparación con fibroblastos sanos.⁴²

Como se recoge en este Capítulo, estos resultados también se han obtenido en líneas de cáncer sensibles a tratamiento con palbociclib, un compuesto inhibidor de CDK4/6 que induce eficientemente senescencia en células tumorales; así como en un modelo *in vivo* de fibrosis pulmonar idiopática inducida por bleomicina, caracterizándose ésta enfermedad por la presencia de abundantes células senescentes.^{43,44,45} La encapsulación del fármaco citotóxico doxorrubicina en nanopartículas **Gal-NP** ha conseguido además reducir la exposición al mismo en células no senescentes y tejidos sanos, con lo cual se reducen los efectos secundarios no deseados (siendo éstos, en el caso de la doxorrubicina, la cardiotoxicidad).

Aparte del potencial terapéutico que el sistema de encapsulación ha demostrado, los resultados obtenidos con un fluoróforo encapsulado dan pie a que el nanosistema se pudiese utilizar para la detección de senescencia por imagen *in vivo*. En los dos modelos de fibrosis y *xenoinjerto* que se han presentado se han podido detectar, respectivamente, regiones pulmonares con acumulación de células senescentes y tumores con proliferación arrestada por tratamiento con palbociclib.

Esto abre la posibilidad de encapsular trazadores o agentes de contraste para aplicaciones de imagen biomédica que busquen detectar áreas senescentes presentes en múltiples desórdenes relacionados con la edad. Por ejemplo, las nanopartículas **Gal-NP** podrían liberar gadolinio o radioisótopos emisores de positrones en lesiones senescentes, que se podrían detectar por resonancia

⁴² AGOSTINI A., MONDRAGÓN L., BERNARDOS A., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., DOLORES MARCOS M., SANCENÓN F., *et al.* Targeted cargo delivery in senescent cells using capped mesoporous silica nanoparticles. *Angew Chemie - Int Ed.* **2012**, 51(42): 10556 – 10560.

⁴³ YANAI H. *et al.* Cellular senescence-like features of lung fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Aging (Albany NY)*. **2015**, 7(9): 664 – 672.

⁴⁴ MINAGAWA S. *et al.* Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2011**, 300(3): L391 – 401.

⁴⁵ ÁLVAREZ D. *et al.* IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. **2017**, 313(6): L1164 – L1173.

magnética o por tomografía por emisión de positrones, respectivamente. Las nanopartículas también podrían servir para evaluar la respuesta de tumores sólidos a la administración de quimioterapias inductoras de senescencia o radioterapias.

Por otra parte, la senescencia celular es una característica que define una amplia variedad de lesiones pre-malignas, tanto en humanos como en ratón.⁴⁶ En base a esto, se podría plantear que el sistema **Gal-NP** pudiese también utilizarse para el diagnóstico de tumores pre-cancerosos.

En resumen, en este Capítulo se presenta una estrategia versátil basada en un nanosistema de sílice mesoporosa que podría utilizarse terapéuticamente para eliminar células senescentes o como sistema de diagnóstico por imagen clínica. El sistema **Gal-NP** podría pues tener un uso potencial como herramienta diagnóstica, con la cual detectar y eliminar simultáneamente lesiones senescentes asociadas con numerosas patologías o presentes en el proceso de envejecimiento.

5 | Sección experimental. Materiales y métodos

Líneas celulares

Las líneas humanas SK-MEL-103 (melanoma), NCI-H226 (carcinoma de pulmón de célula escamosa) y SAOS-2 (sarcoma osteogénico primario) se obtuvieron de la ATCC. Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM, excepto la NCI-H226 que se mantuvo en medio RPMI; en todos los casos suplementados con suero fetal bovino (FBS) 10% y penicilina-estreptomina (todo de Gibco). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en condiciones de O₂ 20% y CO₂ 5%, y se realizaron de forma rutinaria test de contaminación por micoplasma. Para la inducción de senescencia, el medio de cultivo se suplementó con palbociclib (PD033299, Pfizer Inc.) a 1 o 5µM, según se indica en los pies de figura.

Estudios de liberación de Gal-NP por microscopía confocal

Para los ensayos de imagen con **Gal-NP(Rho)**, las células SK-MEL-103 se tripsinizaron y sembraron en placas multi-pocillo de 96 y fondo claro (#655087, Greiner Bio-One), a una densidad de 6000 células control y 4000 células senescentes por pocillo. Una vez las células adheridas, el medio se cambió a

⁴⁶ COLLADO M., SERRANO M. *Senescence in tumours: evidence from mice and humans*. Nat Rev Cancer. **2010**, 10(1): 51 – 57.

DMEM suplementado con 0.1% FBS. Tres días después, las células se expusieron a las nanopartículas a una concentración de 50µg/mL en medio DMEM 0.1% FBS. Para la tinción de citoplasma y núcleo, las células se incubaron durante 30 minutos con calceína AM 0.05µM (#C3099, Mol Probes) y Hoechst 4µM (#3342, ThermoFisher Scientific).

Para las nanopartículas **Gal-NP(Dox)** las células SK-MEL-103 se sembraron de la misma forma y a las mismas concentraciones anteriormente mencionadas. Al día siguiente se añadieron las nanopartículas a una concentración de 1 mg/mL en DMEM 10% FBS, previamente filtradas a través de un filtro de jeringa de 0.45µm. La incubación se llevó a cabo durante 30 minutos a 37°C, tiempo tras el cual las células se lavaron con DMEM, se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 minutos y se montaron en glicerol 30%. Para la observación de los pulmones de animales tratados con **Gal-NP(Rho)**, los ratones se trataron con 200µL de una suspensión de nanopartículas a 4mg/mL en DMEM. 6 horas post-inyección los animales se eutanasiaron y los pulmones se extrajeron y colocaron en criomoldes con OCT (Leica Biosystems), y se dejaron congelar en hielo seco durante 30 minutos. Se cortaron secciones de los bloques congelados de OCT, las cuales se lavaron con PBS y se fijaron en paraformaldehído 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron utilizando medio de montaje Vectashield suplementado con 1.5mg/mL de DAPI antes de tomar las imágenes. En todos los casos, el equipo que se utilizó fue un microscopio confocal TCS-SP5 (AOBS) de Leica Microsystems, utilizando un objetivo seco 20X PL APO 0.7 NA o un objetivo de inmersión 40X HCX PL APO 1.2 NA. La rodamina B se detectó utilizando una longitud de onda de excitación de 561 nm (láser DPSS) y con una ventana de emisión entre 570 y 590nm. Para la doxorubicina se utilizaron longitudes de onda de excitación de 488nm (láser argón) y una ventana de emisión de entre 545 y 605nm. Con estas mismas longitudes de onda tanto para la rodamina como para la doxorubicina se tomaron imágenes con células no tratadas con nanopartículas, para determinar la auto-fluorescencia en cada caso. El análisis de las imágenes obtenidas se llevó a cabo con el *software* LAS AF v2.6 equipado con un módulo HCS-A (Leica Microsystems). La intensidad relativa de rodamina en la superficie celular se cuantificó con *software* Definiens XD Developer v2.5 (Definiens).

Ensayo de apoptosis

La señal de anexina V se midió con el sistema IncuCyte Live-Cell Analysis System (Essen BioScience). Brevemente, las células SK-MEL-103 senescentes (tratadas con palbociclib 5µM dos semanas) o control se sembraron en placas multi-pocillo de 96 y fondo claro (#655087, Greiner Bio-One) con DMEM 2% FBS. La anexina V (*annexinV Green reagent for apoptosis*, #4642) se añadió a las células. Dos horas después los cultivos se trataron con **Gal-NP(Dox)** a una concentración de 0.06

mg/mL, previamente filtradas con filtro de jeringa de 0.45µm. Las imágenes se fueron tomando a lo largo del tiempo. Las células positivas para la señal de anexina se cuantificaron por triplicados y se normalizaron respecto al número total de células por campo correspondiente.

Inmunohistoquímica en secciones de parafina

Las muestras de tejido se fijaron en formalina neutra tamponada 10% (formaldehído 4% en solución), se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 3mm, que se montaron y secaron. Para las diferentes tinciones los portaobjetos se desparafinaron en xileno y se re-hidrataron a diluyendo a través de series graduadas de etanol hasta llegar a agua. La tinción de Masson se utilizó para confirmar la presencia de áreas fibróticas en los pulmones, como se indica en el apartado correspondiente.

Para las inmunohistoquímicas, se utilizó una plataforma automática de inmunotinción (Ventana DiscoveryXT, Roche). La recuperación de antígeno se llevó primero a cabo con tampón pH elevado (CC1m, Roche), la peroxidasa endógena se bloqueó y los portas se incubaron con los anticuerpos primarios adecuados: Ki67 (#0003110QD, Master Diagnostica) y Rb fosforilado Ser807/811 (#9308, Cell Signaling). Tras la incubación con el anticuerpo primario, los portas se incubaron con los correspondientes sistemas de visualización (OmniRabbit, Ventana, Roche) y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (Chromomap, Ventana, Roche). Las reacciones inmunohistoquímicas se llevaron a cabo utilizando 3,30-diaminobenzidintetrahidrocloruro (DAB) como cromógeno, y los núcleos se co-tiñeron con hematoxilina. Finalmente, los portas se deshidrataron, lavaron y montaron con un medio de montaje permanente para la evaluación al microscopio.

Formación de *xenoinjertos*

Los *xenoinjertos* se establecieron utilizando las líneas celulares SK-MEL-103 o NCI-H226 (en este último caso, los resultados no se muestran en el Capítulo). Las células se tripsinizaron, se contaron en hemocitómetro y se inyectaron subcutáneamente en los dos flancos inferiores de la espalda de ratones *nude* atímicos hembra de 8-10 semanas (*Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu*), adquiridos de Envigo. Se inyectaron 10^6 células en un volumen de 100µL por flanco dorso-lateral. El volumen de los tumores se fue midiendo cada dos días con un calibrador, y se calculó como $V=(a \times b^2)/2$, donde a es el largo y b es el corto de dos diámetros perpendiculares.

Inducción de fibrosis

El modelo de fibrosis se estableció en ratones C57BL/6 *wild-type* macho de 8-10 semanas. Los animales se anestesiaron por inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina (75mg/kg) y medetomidina (1mg/kg). Se colocaron en un soporte Tilting WorkStand para roedores (EMC Hallowell) y se intubaron intratraquealmente con un catéter 24GA (BD Biosciences). Una vez intubados, la bleomicina (#15361, Sigma) se inoculó a una concentración de 1.5U/kg.

Tratamiento de los ratones

Los cálculos experimentales a partir de los ensayos de caracterización indican que aproximadamente se liberan 30mg de fármaco por gramo de **Gal-NP(Dox)**.

Las nanopartículas se pesaron en viales de cristal (Z256161, Sigma), a una concentración de 4mg/mL en DMEM 10% FBS, y se dejaron agitar en placa magnética durante 1 hora. La administración a los ratones se hizo por vía intravenosa (cola), inyectando 200µL de la suspensión previamente preparada (equivalentes a 1mg/kg de fármaco liberado).

La doxorubicina (#D1515, Sigma) se disolvió en DMEM 7% salino a concentración 1mg/kg, y se administró vía intravenosa de forma diaria durante los tiempos indicados.

El palbociclib (Pfizer Inc.) se disolvió en lactato de sodio 50mM a concentración de 12.5mg/mL, y se administró por vía oral diariamente a las dosis indicadas. El tratamiento con palbociclib se inició en todos los casos un día antes de la administración del fármaco citotóxico en formulación libre o en nanoformulación.

Western blot

Las células se lavaron después de los correspondientes tratamientos y se lisaron con 150 – 200µL de tampón de lisis (25mM Tris HCl pH 7.5, SDS 1%, 1mM EDTA pH 8 e inhibidores de proteasas) suplementado con inhibidor de fosfatasa para el análisis de pRb. A continuación las células se recogieron, se pasaron a través de una aguja de 25G y se hirvieron durante 10 minutos. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método BCA. Una vez cuantificados los lisados se resolvieron en geles de acrilamida/bisacrilamida de entre el 6 y el 8%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (#10600003, Acefesa) y se incubaron con los correspondientes anticuerpos siguiendo procedimientos estándar.

Anticuerpos primarios: phospho-Rb (Ser807/811) (D20B12) (#8516, #9308, Cell Signaling); Ki-67 (D3B5) (#9129, Cell Signaling).

Anticuerpos secundarios: anti-rabbit IgG peroxidase (#A6154, Sigma).

Ensayo de actividad SA-βGal

La tinción de actividad β-galactosidasa se llevó a cabo en células, órganos completos (pulmones o tumores) o en criosecciones de tejido (pulmones o tumores) preservados en OCT. Se utilizó para ello el kit β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling).

En células, la tinción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de los órganos completos o criosecciones, para ambos primero se llevó a cabo un paso de fijación a temperatura ambiente (durante 45 min o 2 min, respectivamente) con una solución de PBS 2% formaldehído y 0.2% glutaraldehído. Se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante toda la noche a 37°C con la solución de tinción (X-gal disuelto en N-N-dimetilformamida, pH 6).

En el caso de los órganos completos, a continuación se llevó a cabo una deshidratación en dos pasos consecutivos en 50% y 70% etanol. Luego se embebieron en parafina para finalmente seccionar los bloques de forma seriada.

Las secciones obtenidas se tiñeron con rojo nuclear o se procesaron para inmunohistoquímica.

Pletismografía

Los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina (75mg/kg) y medetomidina (1mg/kg). Se colocaron a continuación en un soporte Tilting WorkStand para roedores (EMC Hallowell) y se intubaron intratraquealmente con un catéter 24GA (BD Biosciences). Luego los animales se colocaron en un pletismógrafo adaptado para roedores anestesiados (Emka Technologies), y se utilizó un MiniVent Model 845 (Harvard Apparatus) conectado al pletismógrafo para ventilar a una frecuencia de 150 latidos/min y 10 mL/kg de volumen tidal. La presión transpulmonar se midió con un transductor de presión conectado a la cánula. El flujo de aire y el volumen tidal se determinaron con un transductor de flujo fijado a la cámara del pletismógrafo. La resistencia pulmonar (L_R) y la compliancia pulmonar (C_{dyn}) se calcularon y analizaron con el *software* iox2 (Emka Technologies).

Imagen *in vivo* y *ex vivo* por IVIS

Para la toma de imágenes de fluorescencia *in vivo* y *ex vivo* se utilizó un equipo IVIS Spectrum Imaging System (Perking Elmer Inc.). En los ensayos *in vivo*, los animales se anestesiaron con isoflurano al 4% (IsoVetBraun) durante la inducción, que se bajó al 2% durante el mantenimiento (tiempo de escaneo). En el

caso de la toma de imágenes *ex vivo*, los ratones se eutanasiaron por exposición a CO₂ y los órganos y tumores se analizaron inmediatamente tras recogerse.

La rodamina B se detectó con unas longitudes de onda de 535nm para la excitación y de 580nm para la emisión. La doxorubicina se detectó con longitudes de excitación y de emisión de 430 y 600nm, respectivamente. La cuantificación de fluorescencia obtenida en las imágenes se llevó a cabo con el *software* Living Image 3.2 (Perkin Elmer Inc.). Se dibujaron las regiones de interés (ROIs) sobre las señales de fluorescencia tanto en los pulmones como en los tumores, para cuantificar así la liberación de los fluoróforos. La fluorescencia se midió en fotones por segundo por centímetro cuadrado por estereorradián ($\text{p/s}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{sr}^{-1}$).

Estudios de biodistribución de silicio

Los animales se sacrificaron 6 horas post-administración de las nanopartículas **Gal-NP(Rho)** y los órganos seleccionados se extrajeron para la determinación de silicio: pulmones, hígado, bazo, vejiga, riñones, corazón, intestino y cola.

Los órganos se pesaron y luego se digirieron con 1mL de hidróxido de tetrametilamonio (TMHA, #75592, Sigma) durante 2 horas a 80°C, en botes de politetrafluoroetileno (PTFE) y con un bloque digestor Bloc Digest 20 (Selecta). Tras enfriarse, las muestras se diluyeron hasta 10mL en matraces Erlenmeyer de polipropileno (para evitar la contaminación por silicio) y se mantuvieron en tubos de poliestireno. Para el análisis se tomaron 0.5mL de las muestras digeridas, que se diluyeron a 10mL con una solución de ácido nítrico 2% y ácido clorhídrico 1%. También se prepararon soluciones estándar a partir de un estándar de silicio (1000 mg/L, #08729, Sigma) específico para espectroscopía de masas con plasma acoplado por inducción (ICP-MS), que se digirieron y trataron exactamente de la misma manera que los órganos. Las muestras se analizaron en un sistema ICP-MS Agilent 7900, y los resultados se calcularon utilizando las rectas de calibrado obtenidas a partir de las soluciones estándar. Los datos se expresan como $\mu\text{g Si/g}$ muestra.

Métodos estadísticos

Para determinar si los datos obtenidos eran significativamente estadísticos se llevaron a cabo tests T-Student (dos colas) o *one-way* ANOVA seguido por test de comparaciones múltiples de Dunnett, según se indica en los pies de figura. Los datos se representan como la media de las réplicas indicadas en cada experimento. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) o el error estándar de la media (SEM), según se indica en las leyendas. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Experimentos con animales

Todos los animales se mantuvieron en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo condiciones específicas libres de patógenos, de acuerdo a las recomendaciones de FELASA. Todos los experimentos llevados a cabo fueron previamente aprobados por un comité de ética (CElyBA).

Capítulo V •

**Combinación nanoterapéutica de
senogénesis (palbociclib) y senolisis
(navitoclax) en un modelo ortotópico triple
negativo de cáncer de mama**

● | Resumen del capítulo



En este Capítulo se estudia la eficacia antitumoral de una terapia de combinación basada en senog nesis y senolisis dirigida en un modelo ortotópico inmunocompetente de cáncer de mama triple negativo, un subtipo de cáncer altamente agresivo y con mal pronóstico por las pocas opciones de tratamiento disponibles.

La senog nesis se inducir谩 con palbociclib, mientras que la senolisis se conseguir谩 con la nano-formulación del fármaco navitoclax, que permite dirigir de forma selectiva el compuesto a las células diana. El tratamiento con palbociclib combinado con la eliminación de las células tumorales senescentes tras el tratamiento con navitoclax encapsulado consigue retrasar o incluso prevenir la proliferación tumoral, reduce las metástasis y tiene el beneficio adicional de disminuir la toxicidad sistémica del fármaco senolítico.

Estado del trabajo que este Capítulo recoge:
SUBMITTED

1 | Introducción

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres de todo el mundo (a excepción de los cánceres de piel no melanomas). En el año 2018 se diagnosticaron aproximadamente 2.088.849 nuevos casos a nivel mundial (teniendo en cuenta ambos sexos y todas las edades, excepto África oriental – datos Globocam 2018), y en la actualidad es el tumor más frecuente en la población femenina. La mayoría de diagnósticos se producen en mujeres de entre 45 y 65 años, si bien a partir de los 75 años (con el envejecimiento) aumenta el número de mujeres diagnosticadas. A nivel nacional, según los datos del Observatorio del Cáncer de la AECC de 2018, la tasa de incidencia se sitúa en torno a 138 casos por cada 100.000 habitantes; y se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida es de, aproximadamente, 1 de cada 8 mujeres.¹

Aunque la mortalidad por cáncer de mama ha descendido en los últimos años gracias a los programas de cribado y a la mejora de los tratamientos, éste sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en España en las mujeres. Si se consideran ambos sexos, sólo es superado en mortalidad por los cánceres de pulmón, estómago, colorrectal e hígado. Si bien el número de casos y las tasas de incidencia aumentan lentamente, el número de muertes está estabilizado en nuestro país, y las tasas de mortalidad descienden debido, sobre todo, a un mejor resultado de los tratamientos y a la detección precoz de esta neoplasia. Puesto que cada año se dispone de mayor información para diagnosticar precozmente y tratar el cáncer de mama, la supervivencia global a los 5 años del diagnóstico de este tumor es actualmente de alrededor del 82,8% en nuestro país.^{1,2}

El cáncer de mama puede originarse en diferentes partes del seno. La mayoría de los cánceres se inician en los conductos que llevan la leche hacia el pezón, siendo cánceres ductales. Los cánceres lobulillares se originan en las glándulas que producen la leche (**Figura 64**). También hay otros tipos de cáncer de seno que son menos comunes, como el tumor filodes y el angiosarcoma.

¹ Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). 2018 © AECC Asociación Española Contra el Cáncer.

² Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2018 ©.

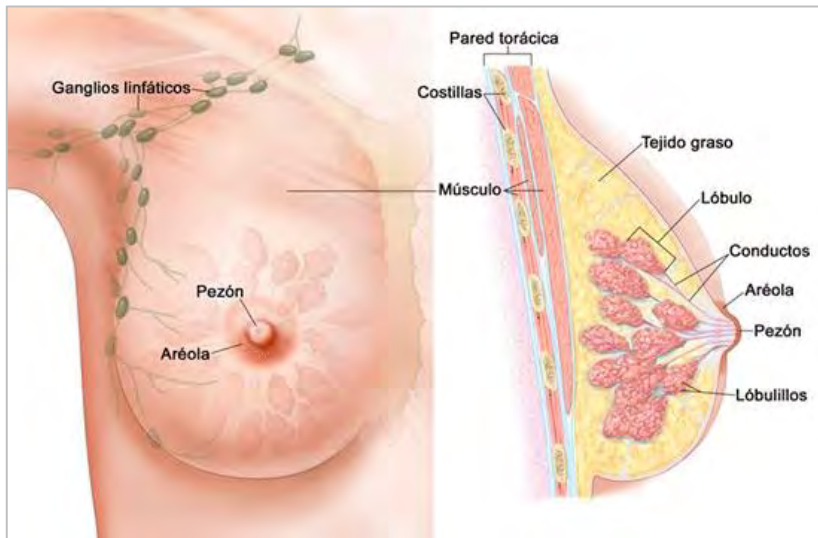


Figura 63. Anatomía de la mama femenina. Obtenida de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), © 2018.

Gracias a los avances tecnológicos, se ha podido establecer una clasificación más precisa del cáncer de mama, que se relaciona mejor con el riesgo de recaída de la enfermedad. Así es como cada vez está tomando más importancia el subtipo de cáncer de mama (o clasificación molecular) a la hora de plantear el tratamiento, estableciéndose cuatro grupos en función de la presencia o ausencia del receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (Her2) (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación molecular del cáncer de mama.

	ER	PR	Her2
Luminal A	+	+	-
Luminal B	+	-	+
Her2 positivo	-	-	+
Basal (triple negativo)	-	-	-

Centrándonos en el subtipo molecular que nos ocupa en la presente tesis, el cáncer de mama triple negativo (o *basal like*) se define como tumores que carecen de expresión de receptor de estrógenos, receptor de progesterona y receptor del factor de crecimiento epidérmico 2. Se caracterizan por su naturaleza agresiva, recurrente y metastásica, y representan el 15% de los tipos de cáncer de mama.

Debido a que existe un vacío importante en cuanto a opciones de tratamiento y terapias dirigidas y específicas para éste tipo de cáncer (ya que no responde a terapia hormonal) el TNBC presenta una muy baja supervivencia, siendo su ratio de mortalidad el más elevado de entre todos los subtipos de cáncer de mama.^{3,4,5} Sin embargo, Turner y colaboradores han demostrado recientemente que un subgrupo específico de TNBC positivo para el receptor de andrógenos también responde al tratamiento de inhibición de CDK4/6,⁶ estando actualmente en marcha algunos ensayos clínicos combinando palbociclib o ribociclib con fármacos anti-andrógenos (ClinicalTrials.gov ID: NCT02605486, NCT03090165).

A modo de recordatorio, y como se ha comentado en la Introducción, el palbociclib es un inhibidor oral altamente específico que bloquea de forma equitativa la actividad de las kinasas CDK4/6 dependientes de ciclina D1 a muy bajas concentraciones.^{7,8} En base a los resultados pre-clínicos,⁶ y después de varios ensayos clínicos (PALOMA 1, PALOMA 2, PALOMA 3)^{9,10} éste fármaco se administra actualmente como terapia en combinación con letrozol o fulvestrant para el tratamiento de pacientes de cáncer de mama avanzado de tipo ER+/Her2-.

³ KAU P., NAGARAJA G.M., ZHENG H., GIZACHEW D., GALUKANDE M., KRISHNAN S., *et al.* A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer*. **2012**, 12.

⁴ FOULKES W.D., SMITH I.E., REIS-FILHO J.S. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. **2010**, 363(20): 1938 – 1948.

⁵ AYSOLA K, DESAI A., WELCH C., XU J., QIN Y., REDDY V., MATTHEWS R., *et al.* Triple negative breast cancer – an overview. *Hereditary Genet*. **2013**.

⁶ ASGHAR U.S., BARR A.R., CUTTS R., BEANEY M., BABINA I., SAMPATH D., *et al.* Single-cell dynamics determines response to CDK4/6 inhibition in triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. **2017**, 23(18): 5561 – 5572.

⁷ FRY D.W., HARVEU P.J., KELLER P.R., ELLIOTT W.L., *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*. **2004**, 3(11): 1427 – 1438.

⁸ FINN R.S., DERING J., CONKLIN D., KALOUS O., *et al.* PD0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res*. **2009**, 11(5): 1 – 13.

⁹ a) BEAVER J.A., AMIRI-KORDESTANI L., CHARLAB R., *et al.* FDA approval: Palbociclib for the treatment of postmenopausal patients with estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. **2015**, 21(21): 4760 – 4766. b) FINN R., CROWN J., LANG I., BOER K. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. **2015**, 16(1): 25 – 35. c) CHIU J.W., KWOK G., YAU T., LEUNG R. Editorial to “Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer”. *Transl Cancer Res*. **2017**, 6(S2): S376 – S379. d) TRAINA T., CADOO K., GUCALP A. Palbociclib: an evidence-based review of its potential in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther*. **2014**, 4(6): 123 - 133. e) TURNER N.C., RO J., ANDRÉ F., LOI S., *et al.* Palbociclib in hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. **2015**, 373(3): 209 – 219. f) CRISTOFANILLI M., TURNER N.C., BONDARENKO I., RO J., *et al.* Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. **2016**, 17(4): 425 – 439.

¹⁰ PERNAS S., TOLANEY S.M., WINER E.P., GOEL S. CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions. *Ther Adv Med Oncol*. **2018**, 10: 1-15.

A pesar sin embargo de los buenos resultados que se han obtenido en clínica con los inductores de senescencia (como el palbociclib) en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, cabe recordar que si las células senescentes permanecen en el organismo y se acumulan pueden convertirse en un repositorio potencial de futuras carcinogénesis y metástasis (Figura 65).^{11,12,13} Así pues, las mejoras a largo plazo de los tratamientos de quimioterapia y de los tratamientos inductores de senescencia pasan inevitablemente por la eliminación de las células senescentes.¹⁴

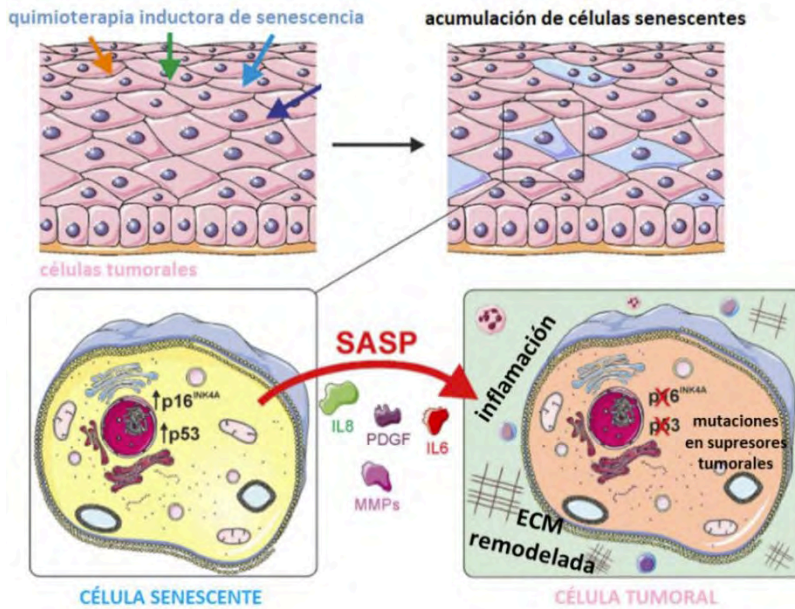


Figura 64. La senescencia celular genera un microambiente pro-tumorigénico. El estado senescente se caracteriza por la activación de los genes supresores tumorales $p16^{INK4A}$ y/o $p53$, así como por la secreción de varias citocinas (p.e. IL6, IL8), factores de crecimiento (PDGF), metaloproteinasas (MMPs) y vesículas extracelulares. Este fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) genera un microambiente pro-tumorigénico al inducir la remodelación de la matriz extracelular e inflamación. Modificado a partir de Schosserer *et al*, *Frontiers in Oncology* (2017), 7: 278.

¹¹ WIELAND E., RODRIGUEZ-VITA J., LIEBLER S.S., MOGLER C., MOLL I., HERBERICH S.E., *et al*. *Endothelial Notch1 Activity Facilitates Metastasis*. *Cancer Cell*. **2017**, 31(3): 355 – 67.
¹² MILANOVIC M., FAN D.N.Y., BELENKI D., DÄBRITZ J.H.M., ZHAO Z., YU Y., *et al*. *Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness*. *Nature*. **2017**, 553(7686): 96 – 100.
¹³ PARRINELLO S. *Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation*. *J Cell Sci*. **2005**, 118(3): 485 – 96.
¹⁴ KIRKLAND J.L., TCHKONIA T., ZHU Y., NIEDERNHOFER L.J., ROBBINS P.D. *The Clinical Potential of Senolytic Drugs*. *J Am Geriatr Soc*. **2017**, 65(10): 2297 – 301.

El desarrollo de un método selectivo y universal para eliminar células senescentes podría ser una terapia con gran potencial, pero a día de hoy todavía no se han aprobado fármacos senolíticos con ese perfil. Sin embargo, sí que se conocen moléculas pequeñas con efecto senolítico tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.¹⁵ Entre ellos, el navitoclax es un potente fármaco mimético del dominio BH3 que presentan las proteínas de la familia BCL-2, y es capaz de inhibir específicamente a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-w y Bcl-XL.¹⁶ Presenta, sin embargo, algunos efectos secundarios que previenen que la FDA lo apruebe para uso en clínica; siendo su mayor toxicidad asociada la trombocitopenia, efecto que se deriva de la inhibición de Bcl-XL.^{17,18}

En este Capítulo se presenta una combinación de senogénesis con senolisis dirigida en un modelo ortotópico e inmunocompetente de cáncer de mama triple negativo. El hecho de utilizar un modelo *in vivo* de dichas características resulta de extrema importancia, puesto que va a ser capaz de reproducir las características biológicas del tipo específico de cáncer que se da en humanos.

A pesar de que tradicionalmente los modelos de tipo xenoinjerto ectópico son los que se han utilizado para evaluar la actividad clínica de fármacos potencialmente anticancerígenos, los ratones inmunodeprimidos que normalmente se usan presentan un microambiente diferente al que se da en ese tipo de cáncer en humanos. Que el tumor se estudie en el microambiente apropiado es de vital importancia, ya que esto permite que tanto la ruta y el patrón de crecimiento como el fenotipo metastásico se puedan mimetizar y reproduzcan al máximo lo que podría ocurrir en ese cáncer en humanos.

Por ello se han establecido los modelos de tipo xenoinjerto ortotópico (en los que las células cancerosas se implantan en el propio sitio de origen natural del tumor), con el objetivo de reproducir el tumor humano en el lugar anatómico apropiado. Esto permite que los procesos moleculares asociados con la progresión del cáncer se puedan reproducir y que el tumor pueda metastatizar de manera similar y hacia los sitios habituales en que lo hace en humanos.^{19,20,21,22} El uso de ratones

¹⁵ LOZANO-TORRES B., ESTEPA-FERNÁNDEZ A., ROVIRA M., ORZÁEZ M., SERRANO M., MARTÍNEZ-MÁÑEZ R., *et al.* *The chemistry of senescence.* Nat Rev Chem. **2019**.

¹⁶ ZHU Y., TCHKONIA T., FUHRMANN-STROISSNIGG H., DAI H.M., LING Y.Y., STOUT M.B., *et al.* *Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors.* Aging Cell. **2016**, 15(3): 428 – 35.

¹⁷ CHANG J., WANG Y., SHAO L., LABERGE R-M., DEMARIA M., CAMPISI J., *et al.* *Clearance of senescent cells by ATB263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice.* Nat Med. **2015**, 22(1): 78 – 83.

¹⁸ KILE B.T. *The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets.* Br J Haematol. **2014**, 165(2): 217 – 226.

¹⁹ JUNG J. *Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development.* Toxicol Res. **2014**, 30(1): 1 – 5.

²⁰ KILLION J.J., RADINSKY R., FIDLER I.J. *Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice.* Cancer Metastasis Rev. **1998**, 17(3): 279 – 284.

²¹ MANZOTTI C., AUDISIO R.A., PRATESI G. *Importance of orthotopic implantation for human tumors as model systems: relevance to metastasis and invasion.* Clin Exp Metastasis. **1993**, 11(1): 5 – 14.

inmunocompetentes para establecer estos modelos, que mantienen el sistema inmune totalmente funcional, permite poder evaluar la eliminación inmunológica de las células senescentes y reproducir así, por tanto, el escenario que se daría en el organismo del paciente. Esto, a su vez, permite poder evaluar las ventajas que supone el uso de fármacos senolíticos en un contexto más similar al real, en el que el sistema inmune también actúa como barrera de defensa.

Así pues, la senogénesis en el modelo propuesto se consigue con el inhibidor de CDK4/6 palbociclib, y la senolisis se produce mediante el tratamiento con una forma nano-encapsulada de navitoclax, en MSNs funcionalizadas con galacto-oligo-sacáridos. Mediante la senolisis generada por navitoclax nano-formulado, este trabajo demuestra una eliminación efectiva de las células senescentes inducidas quimioterapéuticamente por palbociclib, lo cual supone una mejora en la reducción del desarrollo del tumor, reduce la formación de metástasis y disminuye la toxicidad sistémica asociada al fármaco senolítico, hecho que podría abrir nuevos caminos para su aceptación en uso clínico.²³

2 | Objetivos

La hipótesis de trabajo propone que, tras la inducción de senescencia en cáncer de mama con palbociclib, la eliminación selectiva de las células tumorales puede representar un beneficio terapéutico para el paciente.

Para evaluar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos concretos:

- ✓ Puesta a punto de un modelo de senescencia inducida por palbociclib en cultivo celular y modelo *in vivo* de cáncer de mama triple negativo.
- ✓ Evaluación del efecto senolítico del navitoclax en combinación con palbociclib en un modelo inmunocompetente de cáncer de mama triple negativo, en formulación libre y en nano-formulación.

²² BIBBY M.C. *Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages*. Eur J Cancer. **2004**, 40(6): 852 – 857.

²³ MUÑOZ-ESPÍN D., ROVIRA M., GALIANA I., GIMÉNEZ G., LOZANO-TORRES B., *et al.* *A versatile drug delivery system targeting senescent cells*. EMBO Mol Med. **2018**, e9355.

3 | Resultados y discusión

Palbociclib induce senescencia en células 4T1 de cáncer de mama triple negativo

La línea celular murina 4T1 de cáncer de mama tiene un perfil triple negativo altamente agresivo, y el modelo *in vivo* recapitula en muchos aspectos las características de la enfermedad en humanos (rápida progresión, altamente agresivo y con elevada tendencia a metastatizar, sobre todo a pulmón, hígado y cerebro).^{24,25,26,27} La importancia de la inmunidad en la respuesta antitumoral, y particularmente en cuanto a la inducción de senescencia, hace que sea fundamental realizar los estudios de evolución tumoral en presencia de un sistema inmune intacto para obtener resultados fiables.^{28,29} Por este motivo se consideró trabajar con este modelo murino ortotópico e inmunocompetente de cáncer de mama para desarrollar los estudios *in vivo* de senoinducción y senolisis.

Sólo algunos subtipos de los tumores de cáncer de mama triple negativo responden al tratamiento con inhibidores de CDK4/6,³⁰ por lo que el primer objetivo del trabajo fue determinar la sensibilidad de la línea 4T1 de TNBC al tratamiento con palbociclib. Para la inducción de senescencia las células se trataron con palbociclib 5µM. El tratamiento dio como resultado la aparición de marcadores canónicos de senescencia en las células, como la sobreexpresión de la enzima lisosomal β-galactosidasa (SA-βGal)^{31,32} (Figura 66), que vino acompañada por un aumento del tamaño celular y un mayor número de vesículas intracelulares, de acuerdo a las características morfológicas descritas para el fenotipo senescente.^{1,19,31}

²⁴ KAUR P., NAGARAJA G.M., ZHENG H., GIZACHEW D., GALUKANDE M., KRISHNAN S., et al. *A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease.* BMC Cancer. **2012**, 12.

²⁵ FOULKES W.D., SMITH I.E., REIS-FILHO J.S. *Triple-Negative Breast Cancer.* N Engl J Med. **2010**, 363(20): 1938 – 48.

²⁶ AYSOLA K., DESAY A., WELCH C., et al. *Triple negative breast cancer – an overview.* Hereditary Genet. **2013**, Suppl 2.

²⁷ PULASKI B.A., OSTRAND-ROSENBERG S. *Mouse 4T1 Breast Tumor Model.* Curr Protoc Immunol. **2001**.

²⁸ COLLADO M., SERRANO M. *Senescence in tumours: evidence from mice and humans.* Nat Rev Cancer. **2010**, 10(1): 51 – 57.

²⁹ GOEL S., DECRISTO M.J., WATT A.C., BRINJONES H., SCENEAY J., LI B.B., et al. *CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity.* Nature. **2017**, 548(7668): 471 – 475.

³⁰ ASGHAR U.S., BARR A.R., CUTTS R., BEANEY M., BABINA I., SAMPATH D., et al. *Single-cell dynamics determines response to CDK4/6 inhibition in triple-negative breast cancer.* Clin Cancer Res. **2017**, 23(18): 5561 – 5572.

³¹ DIMRI G.P., LEET X., BASILE G., ACOSTA M., SCORRT G., ROSKELLEY C., et al. *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo (replicative senescence/tumor suppression/18-galactosidase).* Cell Biology. **1995**, 92(September): 9363 – 9367.

³² LEE B.Y., HAN J.A., IM J.S., MORRONE A., JOHUNG K., GOODWIN E.C., et al. *Senescence-associated β-galactosidase is lysosomal β-galactosidase.* Aging Cell. **2006**, 5(2): 187 – 195.

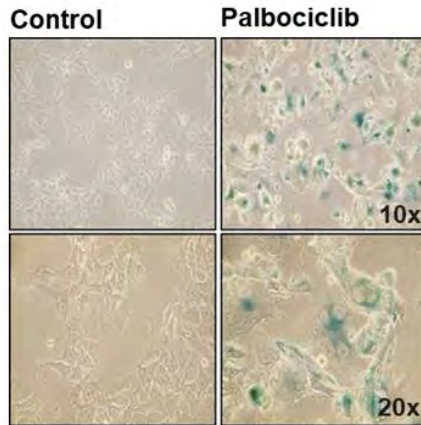


Figura 65. La actividad β -galactosidasa aumenta en células 4T1 tratadas con palbociclib. Las células 4T1 se trataron con palbociclib $5\mu\text{M}$ durante una semana, y la inducción de senescencia se confirmó mediante tinción de actividad β -galactosidasa (señal azul).

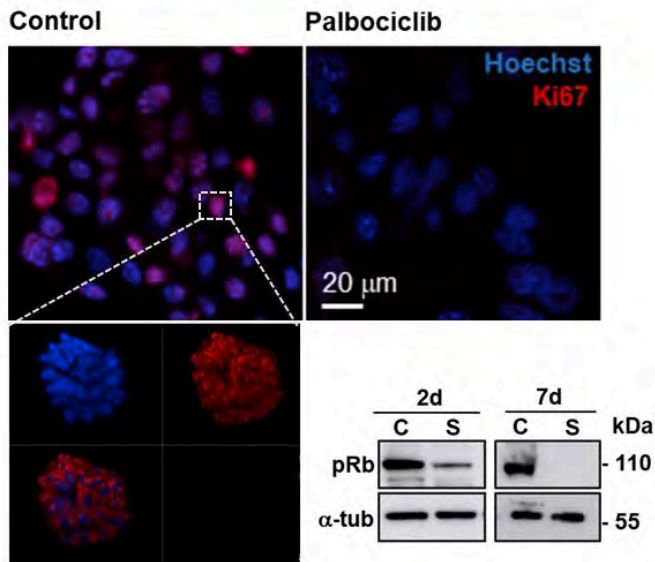


Figura 66. Disminución en la expresión del marcador de proliferación Ki67 tras la inducción de senescencia con palbociclib. Las imágenes de microscopía confocal muestran en rojo la señal de Ki67, y en azul la tinción de los núcleos. La señal de Ki67 se localiza alrededor de los cromosomas en el momento de la mitosis, como se puede observar en la imagen aumentada del núcleo de una célula control. El tratamiento con palbociclib también disminuye la expresión de la proteína de retinoblastoma fosforilada (pRb). Las células se trataron con palbociclib $5\mu\text{M}$ y los extractos de proteína total se obtuvieron a día 2 y a día 7 para llevar a cabo los análisis de *western blot* (banda esperada de pRb a 110kDa). La determinación de tubulina se incluyó como control de carga.

También se detectó una reducción en la inmunotinción del marcador de proliferación Ki67, lo cual es indicativo de arresto celular; así como una disminución progresiva en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) (Figura 67).

Para confirmar el arresto del ciclo celular en las células 4T1 tratadas con palbociclib se realizaron ensayos de clonogenicidad. Para ello se sembraron en placas de 24 pocillos el mismo número de células control y de células senescentes, y una semana después se analizó el nivel de proliferación mediante tinción cristal violeta. Las células senescentes mostraron una menor tinción, indicativo de un menor crecimiento celular consistente con el arresto de ciclo (Figura 68).

En conjunto, los resultados obtenidos confirman que el inhibidor de CDK4/6 palbociclib induce eficientemente senescencia en la línea murina 4T1 de cáncer de mama triple negativo.

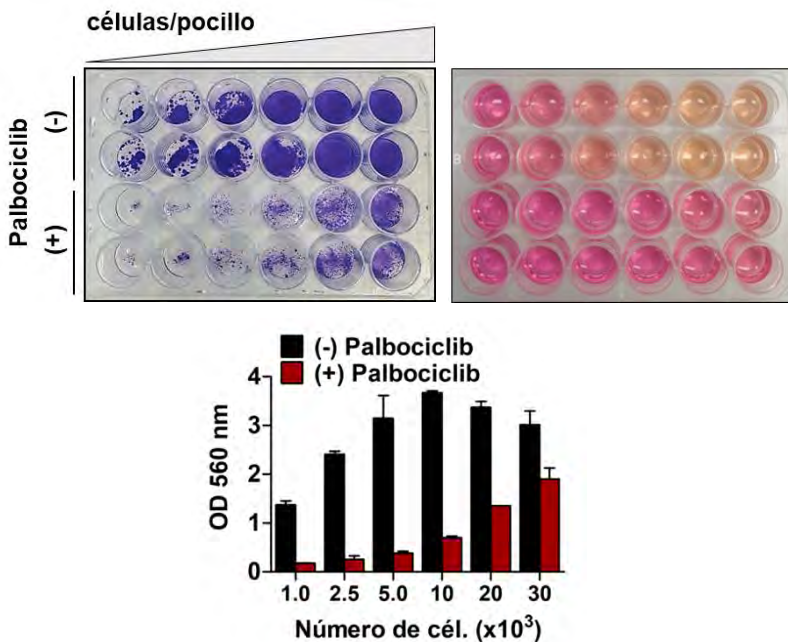


Figura 67. Las células 4T1 tratadas con palbociclib entran en arresto de ciclo. Células 4T1 control y células tratadas durante una semana con palbociclib se sembraron a diferentes densidades (1000, 2500, 5000, 10000, 20000, 30000 células/pocillo, de izquierda a derecha) y se dejaron proliferar durante una semana sin refrescar el medio. El arresto del ciclo celular se evaluó primero con el cambio de color del medio de cultivo, y posteriormente se confirmó tras la fijación de las células en placa y su tinción con cristal violeta. La gráfica representa la cuantificación del cristal violeta por absorbancia a 560nm.

Senólisis en células 4T1 senescentes de cáncer de mama

Las células senescentes se han catalogado como resistentes a la muerte por apoptosis, por lo que dependen en alto grado de varios factores de supervivencia. En particular, la dependencia de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL se ha reportado en distintas líneas celulares.^{33,34} Por ello, se planteó si la sobreexpresión de este miembro anti-apoptótico de la familia de proteínas BCL-2 también ocurría en células 4T1 tratadas con palbociclib.

Para abordar esta cuestión se analizó si ocurrían cambios en el perfil de expresión de Bcl-xL como consecuencia del tratamiento con el fármaco senogénico. Como se puede ver en la **Figura 69**, los niveles de la proteína anti-apoptótica aumentan significativamente con la inducción de senescencia en las células. Este aumento ocurre acompañado de un incremento en la expresión de la proteína pro-apoptótica de tipo BH3-only, Bim. Este perfil de expresión de proteínas BCL-2 es consistente con el llamado fenotipo de célula “primada”, en el cual las células presentan una elevada dependencia de proteínas anti-apoptóticas para su supervivencia y son altamente sensibles a fármacos miméticos del dominio BH3, como el navitoclax.³⁵

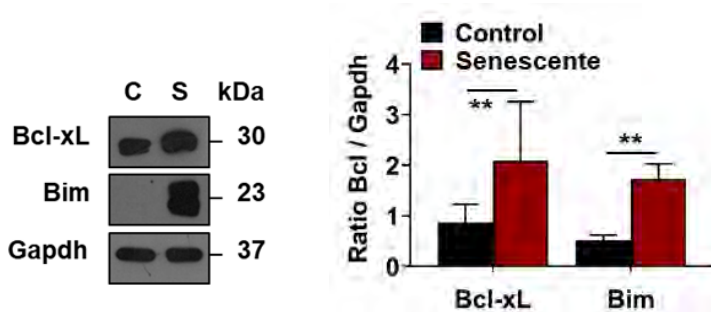


Figura 68. La proteína anti-apoptótica Bcl-xL está sobre-expresada en células tratadas con palbociclib. El perfil de expresión de proteínas BCL-2 en células 4T1 control y senescentes se analizó mediante *western blot*. La cuantificación de las bandas obtenidas se llevó a cabo utilizando GAPDH como control de carga. Los valores (n=4) se expresan como media \pm SD y la estadística se obtuvo mediante análisis T-test Student de dos colas: **p < 0.05.

³³ WANG E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* **1995**, 5585(112): 2284 – 2292.

³⁴ BAAR M.P., BRANDT R.M.C., PUTAVET D.A., KLEIN J.D.D., DERKS K.W.J., BOURGEOIS B.R.M., *et al.* Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell.* **2017**, 169(1): 132 – 147.

³⁵ BILLARD C. *BH3 Mimetics: Status of the Field and New Developments.* *Mol Cancer Ther.* **2013**, 12(9): 1691 – 1700.

En base a estos resultados se estudió la inhibición de las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2 tras el tratamiento con navitoclax, como estrategia para inducir selectivamente la muerte de las células 4T1 senescentes.

En primer lugar se analizó mediante citometría de flujo la funcionalidad de las mitocondrias después del tratamiento con el fármaco senolítico, utilizando para ello el fluoróforo JC-1.³⁶ Se trata de una sonda permeable que se acumula en mitocondrias y cambia su máximo de emisión de fluorescencia en función del potencial de membrana mitocondrial: presenta una emisión en rojo cuando se encuentra agregado en mitocondrias sanas y polarizadas, mientras que emite fluorescencia en verde cuando se presenta como monómero en mitocondrias despolarizadas después de haber sufrido la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP). Una disminución en la población de células con un ratio de fluorescencia rojo/verde elevado es indicativo de una pérdida de la función mitocondrial. Así pues, tras inducir senescencia con palbociclib se trataron tanto células 4T1 control como senescentes con navitoclax, y se analizaron los cambios en el potencial de membrana mitocondrial.

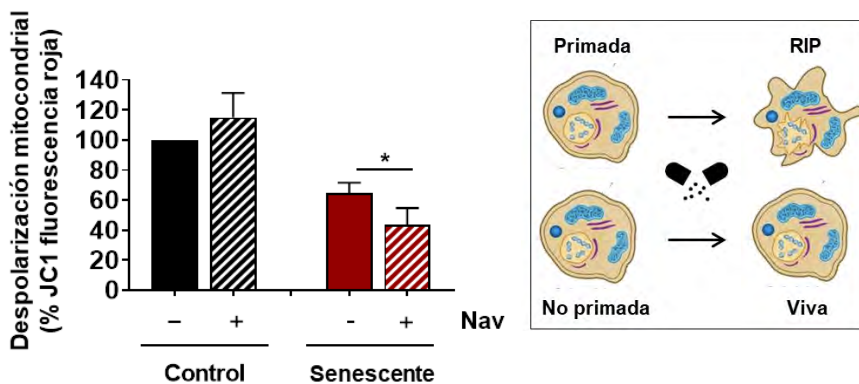


Figura 69. El tratamiento con navitoclax produce la despolarización de la mitocondria en células 4T1 senescentes. Se llevó a cabo el análisis de la fluorescencia roja de la sonda JC-1 para medir la despolarización mitocondrial (n=3). Los valores se expresan como media \pm SEM y la estadística se obtuvo mediante análisis T-test Student de dos colas: *p < 0.05. El esquema a la derecha representa gráficamente la predisposición de las células primadas a sufrir muerte celular ante la presencia del fármaco senolítico.

³⁶ REERS M., SMILEY S.T., MOTTOLA-HARTSHORN C., et al. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* 1995, 260: 406 – 417.

En la gráfica de la **Figura 70** la pérdida de la integridad de las mitocondrias se representa como una reducción de la fluorescencia roja de la sonda JC1. Las células 4T1 senescentes parten desde un inicio de un estado de mayor despolarización mitocondrial que sus respectivas células control, lo que significa que desde un inicio están “más primadas” (resultado que coincide con otros estudios realizados en células senescentes).^{37,38,39} Puesto que las células senescentes están más predispuestas a la apoptosis, la adición del fármaco navitoclax actúa como estímulo para disparar la MOMP, al bloquear e inhibir las proteínas anti-apoptóticas que mantienen el equilibrio. Por el contrario, las células control no muestran ningún efecto o cambio ante el tratamiento con navitoclax a dosis equivalentes. Esta diferencia confirma el potente carácter senolítico del fármaco.

Con el tratamiento con navitoclax no sólo se observó una mayor disminución del potencial mitocondrial (**Figura 70**), sino que ésta vino acompañada de una inducción selectiva de muerte únicamente en células 4T1 senescentes (**Figura 71**). De hecho, el IC₅₀ del navitoclax es de 0.3µM en los cultivos senescentes, mientras que esta concentración no produce muerte celular en los cultivos control – que presentaban una concentración IC₅₀ considerablemente más elevada. La actividad senolítica a ésta concentración IC₅₀ se confirmó también mediante ensayos de citotoxicidad con cristal violeta (**Figura 71**) y por citometría de flujo, cuantificando las células muertas que exponían fosfatidilserina en un ensayo de anexina V (**Figura 72**). Ambos estudios confirmaron la selectividad del navitoclax para inducir muerte celular únicamente en células senescentes. Finalmente, un ensayo de detección de actividad caspasa 3/7 confirmó que la muerte celular que se producía tras el tratamiento con navitoclax era de tipo apoptótica (**Figura 72**).

³⁷ SUGRUE M.M., WANG Y., RIDEOUT H.J., CHALMERS-REDMAN R.M.E., TATTON W.G. *Reduced mitochondrial membrane potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53-induced senescence*. *Biochem Biophys Res Commun*. **1999**, 261(1): 123 – 130.

³⁸ STAB B.R., MARTINEZ L., GRISMALDO A., LERMA A., GUTIÉRREZ M.L., BARRERA L.A., *et al*. *Mitochondrial functional changes characterization in young and senescent human adipose derived MSCs*. *Front Aging Neurosci*. **2016**, 8(DEC): 1 – 10.

³⁹ WANG D., LIU Y., ZHANG R., ZHANG F., SUI W., CHEN L., *et al*. *Apoptotic transition of senescent cells accompanied with mitochondrial hyper-function*. *Oncotarget*. **2016**, 7(19).

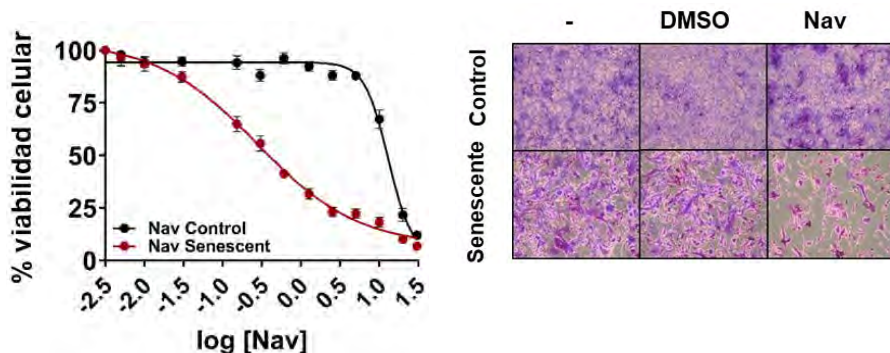


Figura 70. El navitoclax induce muerte celular en células 4T1 previamente tratadas con palbociclib. Células control y senescentes se trataron con diferentes concentraciones de navitoclax (0.05 a 30 μ M) y la viabilidad celular se midió tras 72 horas de tratamiento mediante detección luminiscente de ATP (n=6). La eliminación selectiva de las células senescentes también se analizó mediante tinción cristal violeta (panel a la derecha). Las células se trataron con navitoclax a la concentración IC₅₀ (0.3 μ M) durante 72 horas.

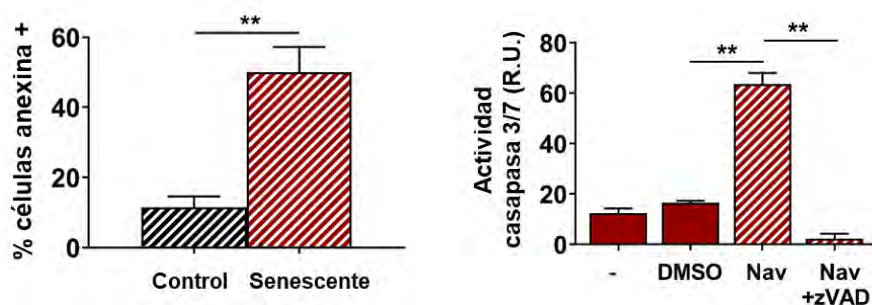


Figura 71. Izquierda: el tratamiento de las células 4T1 senescentes con navitoclax induce la acumulación de células positivas para anexina V. Se llevaron a cabo ensayos de citometría de flujo con células previamente tratadas con navitoclax a la concentración IC₅₀ (0.3 μ M) durante 72 horas. Los valores se expresan como media \pm SEM y la estadística se obtuvo por análisis T-test Student de dos colas: **p < 0.05. Derecha: el tratamiento con navitoclax induce apoptosis en células 4T1 senescentes. La actividad caspasa 3/7 se midió a las condiciones descritas, y los valores de tres experimentos independientes se representan como media \pm SD. La estadística se obtuvo mediante análisis T-test Student de dos colas: **p < 0.05

La combinación *in vitro* de palbociclib (senogénesis) y navitoclax (senolisis) demostró ser altamente efectiva y selectiva. Sin embargo *in vivo* el navitoclax induce trombocitopenia, la cual imposibilita su uso en clínica. Es por ello que la combinación *in vivo* de estos dos fármacos podría resultar en una terapia potencialmente tóxica que podría no poder ser aplicable como tratamiento a pacientes, por lo que se recurrió a la encapsulación del navitoclax en nanopartículas mesoporosas de sílice.

Gal·NP liberan selectivamente su carga en células 4T1 tratadas con palbociclib y mejoran la IC₅₀ del navitoclax en células senescentes

En base a las numerosas ventajas de las nanopartículas mesoporosas de sílice, el navitoclax se encapsuló en MSNs funcionalizadas con galacto-hexa-sacáridos (galactan), obteniéndose así las nanopartículas cargadas **Gal·NP(Nav)**. Además también se prepararon, con fines de trazabilidad y caracterización del sistema, nanopartículas similares cargadas con el fluoróforo verde de indocianina (ICG), dando lugar al sólido final **Gal·NP(ICG)**; así como nanopartículas únicamente funcionalizadas pero sin carga en su interior, siendo el material **Gal·NP(0)**.

Tras su previa caracterización estructural y funcional *in vitro* (Capítulo III), las nanopartículas **Gal·NP(ICG)** se validaron en la línea celular de cáncer de mama 4T1 mediante microscopía confocal y citometría de flujo. Ambos estudios mostraron que, tras 6 y 24 horas post-administración, las nanopartículas liberaban su contenido de forma más eficiente en células senescentes (previamente tratadas con palbociclib) en comparación con las células control, de acuerdo con sus mayores niveles de actividad β -galactosidasa (**Figura 73**). En el caso de las imágenes de microscopía confocal, la co-tinción con un marcador de membrana plasmática (señal verde) permitió confirmar que las nanopartículas se habían internalizado en las células. Además se pudo observar que el fluoróforo ICG se localiza en las células en la región perinuclear, lo cual es consistente con la liberación de la carga en el compartimento lisosomal.

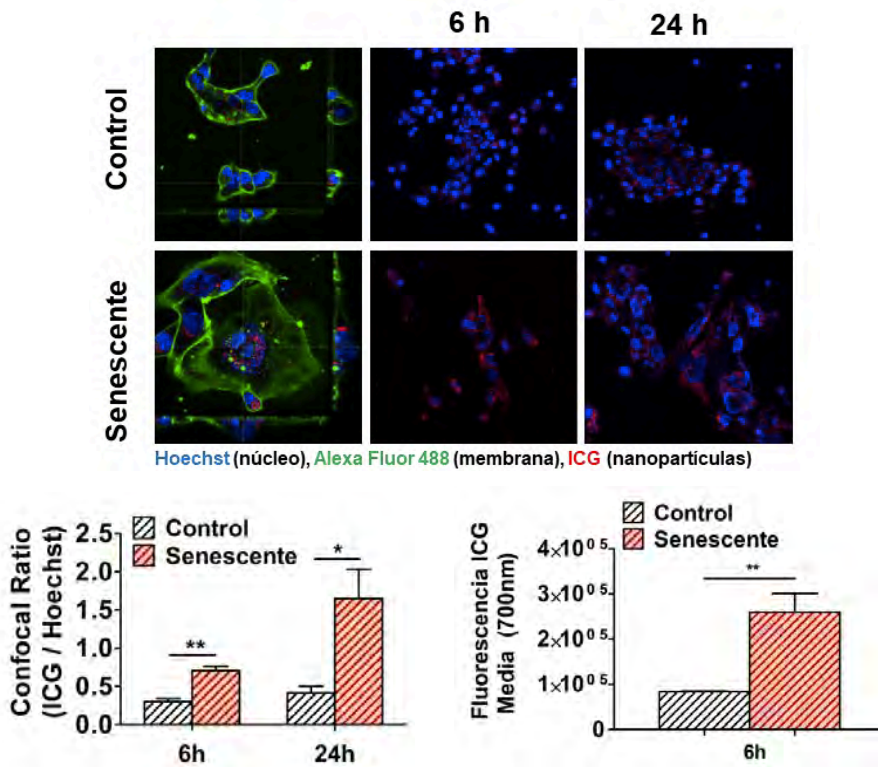


Figura 72. Las nanopartículas Gal-NP(IGC) liberan su carga preferencialmente en células senescentes. Panel superior y gráfica izquierda: se llevó a cabo el análisis mediante microscopía confocal de células 4T1 control y senescentes incubadas con Gal-NP(IGC) durante 6 o 24 horas. Azul: Hoechst; verde: conjugado WGA Alexa Fluor 488; rojo: ICG. Los valores se expresan como media \pm SEM y la estadística se obtuvo mediante análisis T-test Student de dos colas: $p < 0.05$. Gráfica derecha: validación de las nanopartículas Gal-NP(IGC) mediante citometría de flujo, determinándose la señal de fluorescencia del ICG a 700nm. Las células positivas para ICG se cuantificaron y se representan en la gráfica como media \pm SEM.

Para comprobar la biocompatibilidad de los materiales sintetizados se llevaron a cabo ensayos de viabilidad tras 72 horas en los que se trataron células 4T1 control y senescentes con las nanopartículas funcionalizadas pero sin carga **Gal-NP(0)**. Estos estudios mostraron que las nanopartículas vacías resultan inocuas para las células a las 72 horas y a todas las concentraciones estudiadas (Figura 74).

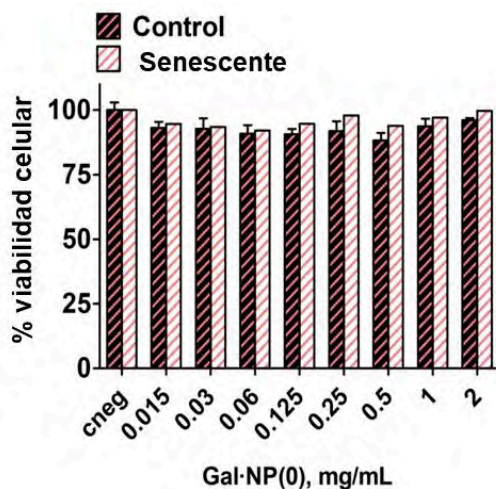


Figura 73. Ensayo de viabilidad celular con nanopartículas no cargadas Gal-NP(0) a diferentes concentraciones de sólido. Células control y células senescentes se trataron durante 72 horas con nanopartículas vacías y únicamente funcionalizadas con la puerta molecular, con el objetivo de estudiar la biocompatibilidad del sistema. Los ensayos se repitieron tres veces y se representa la media \pm SEM.

Una vez confirmado que las nanopartículas liberaban su contenido de forma eficiente y selectiva en células senescentes, así como su biocompatibilidad, se probó el sólido cargado con navitoclax **Gal-NP(Nav)** en las células 4T1. El tratamiento de las células 4T1 control y senescentes con concentraciones crecientes de navitoclax encapsulado provocó una disminución selectiva en la viabilidad de las células senescentes con una IC_{50} de $0.07\mu M$, significativamente inferior a la obtenida en formulación libre ($0.3\mu M$). La tinción cristal violeta de las células tratadas con **Gal-NP(Nav)** a la concentración IC_{50} confirmó la inducción selectiva de muerte en células senescentes (Figura 75).

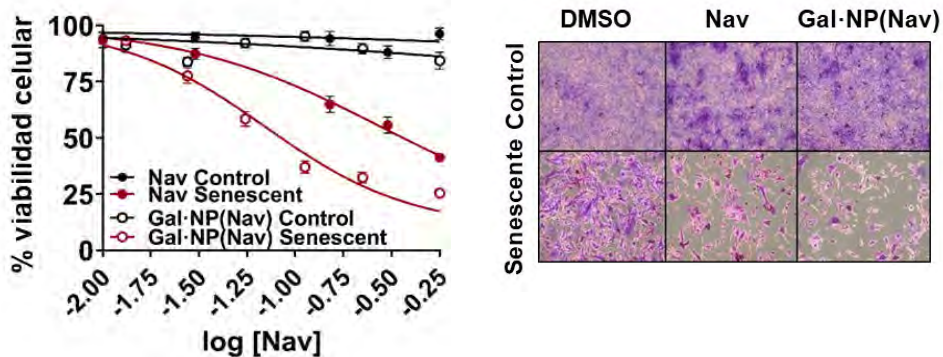


Figura 74. El tratamiento de células 4T1 senescentes con Gal-NP(Nav) induce muerte celular a las 72 horas. Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular a diferentes concentraciones de navitoclax en formulación libre y en nano-formulación, mediante detección luminiscente de ATP (panel izquierda, n=6) o mediante cristal violeta a concentración IC₅₀ de navitoclax (0.3μM, panel derecha).

Por tanto, las nanopartículas funcionalizadas con galacto-oligo-sacáridos demostraron ser capaces de liberar su carga de ICG preferencialmente en células senescentes 4T1 inducidas por palbociclib, a la par que el navitoclax mejoró su actividad senolítica en nano-formulación, confirmando esto la funcionalidad del método de encapsulación.

Imagen *in vivo* y tratamiento de xenoinjertos 4T1 de cáncer de mama triple negativo

Una vez demostrada la capacidad del palbociclib para inducir senescencia en el modelo celular 4T1, el siguiente paso fue estudiar la combinación de senogénesis (senoinducción por palbociclib) con senolisis dirigida (utilizando Gal-NP(Nav) y navitoclax libre) en un modelo ortotópico e inmunocompetente de cáncer de mama triple negativo, con el objetivo de mejorar la eficacia antitumoral. Además también se llevaron a cabo estudios de imagen con las nanopartículas Gal-NP(ICG).

Siguiendo el esquema temporal de la Figura 76, las células 4T1 se inyectaron ortotópicamente en ratones Balb/cByJ hembra de 4-6 semanas para inducir la formación del tumor. Tras una semana de libre crecimiento tumoral se inició el tratamiento con palbociclib durante una semana (50mg/kg). Una vez inducida la senescencia, las nanopartículas Gal-NP(ICG) cargadas con fluoróforo se inyectaron vía intraperitoneal en los ratones para llevar a cabo estudios de imagen en IVIS, con el objetivo de determinar su localización.

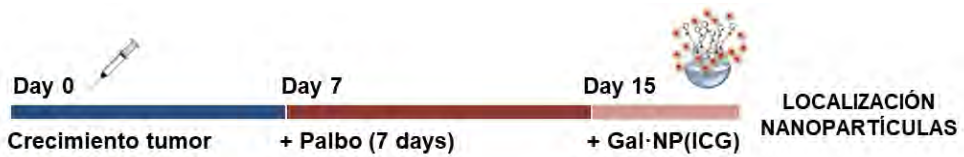


Figura 75. Esquema temporal del tratamiento con palbociclib en el modelo ortotópico 4T1. Los tumores se dejaron crecer durante una semana post-inyección de las células tumorales, y a día 7 se inició el tratamiento con palbociclib (vía oral, 50mg/kg), que se mantuvo durante una semana más. Las nanopartículas Gal·NP(IG) se inyectaron vía intraperitoneal (100mg Gal·NP(IG)/kg) y los animales se examinaron en IVIS a las 6 y a las 24 horas post-administración para estudiar la localización de las nanopartículas.

La inducción de senescencia se consiguió de forma eficiente en los animales tratados con palbociclib, como se puede observar en la [Figura 77](#), en la que los tumores senescentes aparecen con una remarcable tinción azul como consecuencia de la actividad SA- β Gal. También se confirmó la senescencia mediante estudios de inmunohistoquímica en secciones de tumor: el marcador de proliferación Ki67 dio tinción positiva para los tumores no tratados con palbociclib, mientras que los tumores tratados mostraron ausencia de señal, lo cual se corresponde con el arresto de ciclo celular que se produce al alcanzarse el estado senescente.

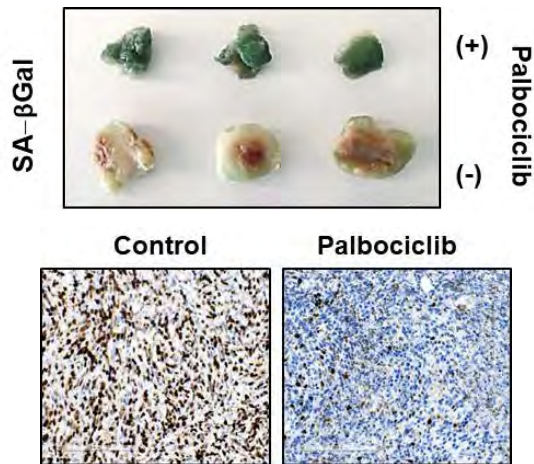


Figura 76. Palbociclib induce senescencia en células 4T1 de cáncer de mama triple negativo. Se muestra la tinción β -galactosidasa de los tumores de mama (arriba) y la inmunohistoquímica en secciones de tumor que revela la disminución del marcador de proliferación Ki67 en los tumores tratados con palbociclib (abajo).

Para validar *in vivo* la liberación preferencial de carga de las nanopartículas en células senescentes, el sólido **Gal-NP(ICG)** se administró por vía intraperitoneal tras una semana de tratamiento de los ratones con palbociclib. Los estudios de imagen *in vivo* de la distribución del fluoróforo 24 horas post-inyección de las nanopartículas mostraron claramente la acumulación preferencial de la sonda fluorescente en los tumores tratados con palbociclib (**Figura 78**), obteniéndose una señal débil sobre el fondo en los tumores no tratados con palbociclib pero en los que también se administró **Gal-NP(ICG)**. Estos resultados se confirmaron, como se puede ver en la figura, en los análisis *ex vivo* de los tumores en el IVIS.

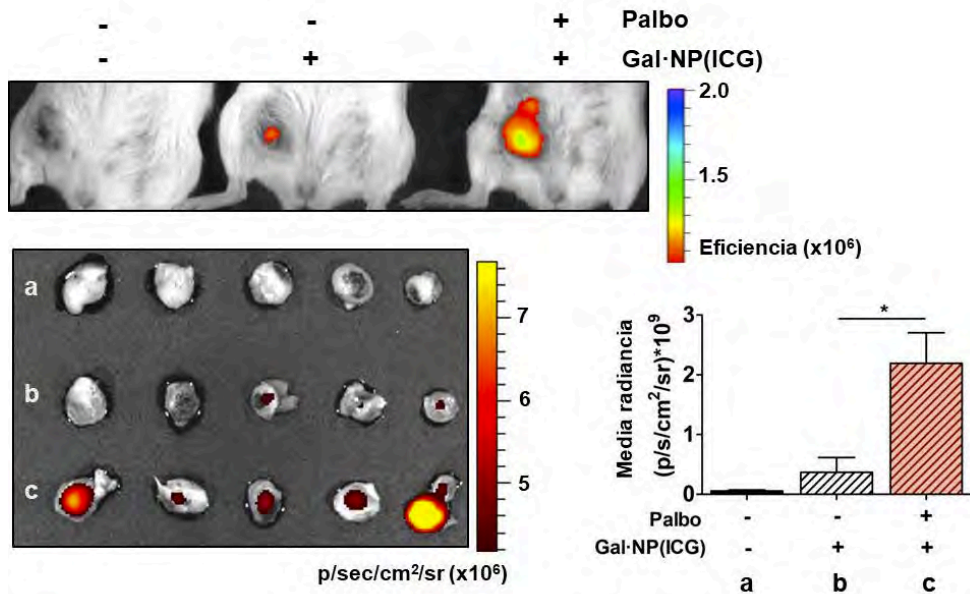


Figura 77. Las nanopartículas Gal-NP(ICG) son capaces de liberar selectivamente su carga en tumores de animales tratados con palbociclib. Se muestran las imágenes obtenidas por IVIS tanto *in vivo* como *ex vivo* de los tumores. El panel superior muestra las imágenes *in vivo*, mientras que el panel inferior muestra la señal de fluorescencia *ex vivo* en los tumores; así como la cuantificación de la fluorescencia emitida mediante el software Living Image® 4.3.1. Los valores (n=5) se expresan como media ± SEM y la estadística se obtuvo mediante análisis T-test Student de dos colas: *p < 0.05.

También se estudió la biodistribución de las nanopartículas en los animales mediante la determinación de silicio en diferentes órganos, por espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Los niveles de silicio indicaron que las nanopartículas se acumulan tanto en tumores senescentes como en tumores no senescentes (**Figura 79**). Por tanto, la mayor señal de fluoróforo en los tumores tratados con palbociclib (observada en la **Figura 78**) se debe a la liberación de la carga de las **Gal-NP(ICG)** inducida por la β-galactosidasa asociada a senescencia (hay que tener en cuenta que el fluoróforo está

fuertemente auto-silenciado (*auto-quenching*) en las nanopartículas cerradas).^{44,45,46} En conjunto, estos resultados indican que las nanopartículas **Gal·NP(ICG)** se pueden utilizar para la detección de senescencia mediante imagen óptica *in vivo*.

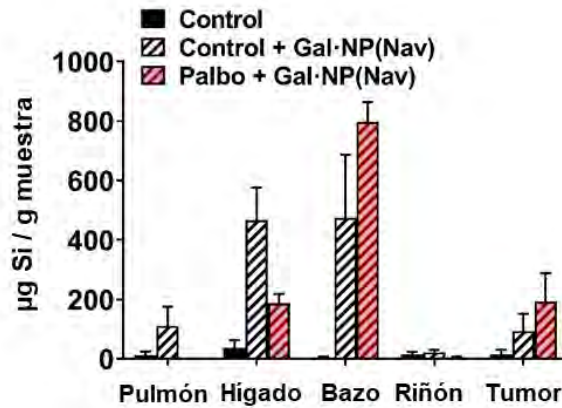


Figura 78. Biodistribución de las nanopartículas Gal·NP(ICG). El análisis de silicio en los distintos órganos se lleva a cabo mediante ICP-MS. Los datos se muestran como media \pm SEM y se representan como $\mu\text{g Si / g muestra}$.

Una vez demostrado que las nanopartículas funcionalizadas con galacto-hexa-sacáridos liberan preferencialmente el fluoróforo ICG en tumores senescentes, la siguiente cuestión fue estudiar si el navitoclax encapsulado también se dirigiría selectivamente a células senescentes en el modelo *in vivo* de cáncer de mama triple negativo.

Tres días después de inyectar ortotópicamente las células 4T1, cuando ya se aprecian visiblemente los tumores en la mama, los ratones se empezaron a tratar con palbociclib. Un día después de iniciar la administración los animales se tratan con navitoclax libre o con **Gal·NP(Nav)**, manteniéndose el tratamiento durante 16 días (Figura 80). La eficacia y la seguridad del tratamiento combinado de palbociclib y navitoclax en cualquiera de sus formulaciones se monitorizó midiendo el tamaño tumoral y registrando el peso de los animales cada dos días. El aspecto general de los ratones y sus comportamientos habituales (como por ejemplo el acicalamiento o *grooming*) se tuvieron también en cuenta, así como el ratio de supervivencia al final del experimento.

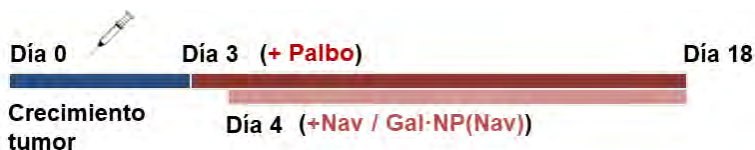


Figura 79. Esquema temporal del tratamiento en el modelo ortotópico 4T1 con palbociclib seguido del tratamiento senolítico con navitoclax, libre o en nano-formulación. Tres días después de la inyección de las células 4T1 empezó el tratamiento con palbociclib, que se mantuvo de forma diaria durante 17 días (vía oral, 100mg/kg). Un día después de iniciar la administración de palbociclib se inició el tratamiento senolítico, que se mantuvo durante 16 días (navitoclax libre: vía oral, 25mg/kg; Gal-NP(Nav): vía intraperitoneal, 40mg Gal-NP(Nav)/kg, equivalente a 2.5mg/kg de navitoclax).

El tamaño de los tumores se calculó mediante la fórmula siguiente (en la que “ancho” se considera la medida menor de dos diámetros perpendiculares):

$$Vol (mm^3) = \frac{largo \times ancho^2}{2}$$

Todos los grupos que recibieron tratamiento de palbociclib redujeron de forma significativa el tamaño tumoral en comparación con los grupos no tratados con el inhibidor de CDK4/6. De hecho, a los grupos que no se trataron con palbociclib (Control, Nav y **Gal-NP(Nav)**) se les tuvo que aplicar el punto final humanitario a los 15 días de iniciarse el tratamiento (**Figura 81**), debido a que los tumores alcanzaron el límite de tamaño permitido. Es importante tener en cuenta que los tratamientos senolíticos no presentaron efecto en el tumor en ausencia del tratamiento senogénico con palbociclib.

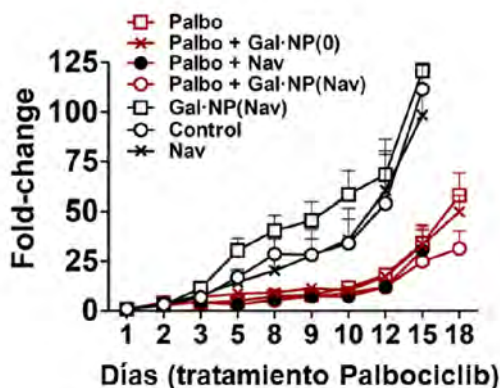


Figura 80. El co-tratamiento con palbociclib y Gal-NP(Nav) reduce el crecimiento tumoral. Ratones hembra Balb/cByJ inyectados ortotópicamente con células 4T1 de cáncer de mama, tratados diariamente con palbociclib (vía oral, 100mg/kg) y navitoclax libre (vía oral, 25mg/kg) o Gal-NP(Nav) (vía intraperitoneal, 200 μ L de una suspensión 4mg/mL) – solos o en combinación, como se indica. Para cada tumor se calculó el cambio de volumen relativo en comparación con su volumen de partida antes del tratamiento. Los valores se expresan como media \pm SEM.

En cuanto a los co-tratamientos del inductor de senescencia con el senolítico navitoclax, remarcablemente las nanopartículas Gal-NP(Nav) presentaron un beneficio terapéutico en combinación con palbociclib (Figura 82); mientras que el tratamiento con únicamente Gal-NP(Nav) no tuvo ningún tipo de efecto en los tumores. Esto demuestra que el efecto terapéutico de Gal-NP(Nav) requiere la previa inducción de senescencia.

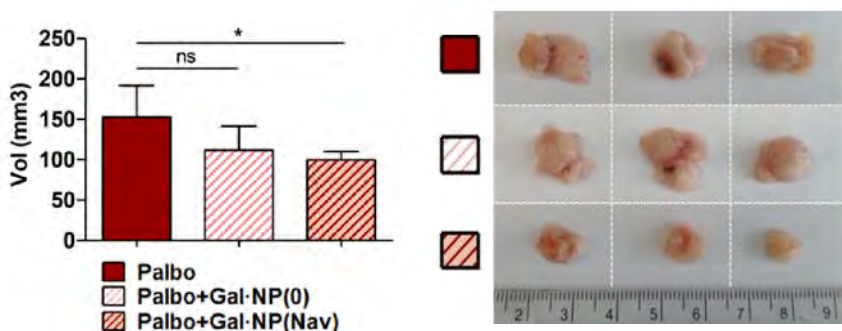


Figura 81. Imagen representativa de los tumores de la Figura 20, en la cual se puede observar una comparación *ex vivo* del tamaño de los tumores entre distintos grupos de tratamiento: palbociclib solo, palbociclib + nanopartículas vacías y palbociclib + navitoclax encapsulado. En la gráfica se expresa el tamaño tumoral en mm³ a día 18 final de tratamiento con palbociclib, como media \pm SD (n=5). La estadística se obtuvo mediante análisis One-way ANOVA: *p < 0.05.

La reducción del tamaño tumoral por tratamiento con palbociclib resulta de particular interés, puesto que los ensayos clínicos que actualmente están en marcha con palbociclib en combinación con bicalutamida para el tratamiento de pacientes de cáncer de mama triple negativo se centran en pacientes que sobreexpresan el receptor de andrógenos (AR) (ID ensayo clínico: NCT02605486).⁷ Como se puede ver en la **Figura 83**, la línea celular 4T1 con la que se trabaja en este Capítulo no expresa éste receptor, con lo cual la actividad antitumoral que se observa *in vivo* consecuencia del tratamiento con palbociclib sugiere el potencial de aplicación de éste fármaco a nuevos subgrupos de pacientes de TNBC, y evidencia la necesidad de buscar nuevos biomarcadores de sensibilidad al mismo.



Figura 82. Las células 4T1 son negativas para el receptor de andrógenos (AR). Se llevaron a cabo análisis de *western blot* para caracterizar la expresión de AR en la línea 4T1. Como control positivo de AR se utilizó la línea VCap (banda esperada a los 110kDa). La determinación de tubulina se utilizó como control de carga.

Mediante estudios de inmunofluorescencia se estudió la activación de la muerte celular como consecuencia del tratamiento senolítico, de forma que la determinación de actividad caspasa 3 en secciones de tumor demostró que en los tumores co-tratados con **Gal-NP(Nav)** tiene lugar la activación de apoptosis como consecuencia de la liberación de navitoclax (**Figura 84**).

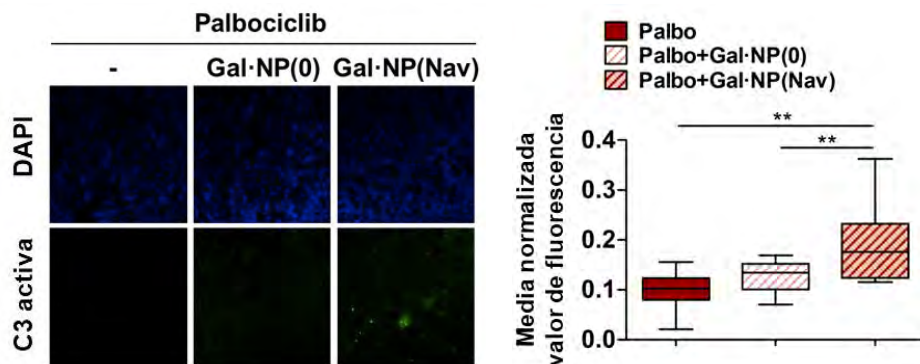


Figura 83. Caspasa 3 activa únicamente se detecta en tumores co-tratados con palbociclib y Gal-NP(Nav). Se muestran imágenes de inmunofluorescencia representativas de caspasa 3 activa (panel izquierda), así como la cuantificación de la señal de fluorescencia en las secciones de tumor (panel derecha). La estadística se obtuvo mediante análisis One-way ANOVA: **p < 0.05.

Es importante destacar que todos los animales co-tratados con palbociclib y **Gal-NP(Nav)** sobrevivieron hasta el final del experimento (Figura 85) sin cambios relevantes en su peso (Figura 86). En contraposición, la combinación de palbociclib y navitoclax en formulación libre produjo una clara disminución en la supervivencia de los animales: de los cinco ratones tratados con Palbo + Nav, dos murieron de forma natural durante el experimento y a los otros tres se les tuvo que aplicar el criterio de punto final humanitario a los 15 días de iniciarse los tratamientos, debido a la pérdida excesiva de peso (más del 10%) y a la pérdida de condiciones de bienestar animal (Figura 85 y 86). Estos resultados son claramente indicativos de la reducción de la toxicidad sistémica del navitoclax cuando se administra encapsulado.

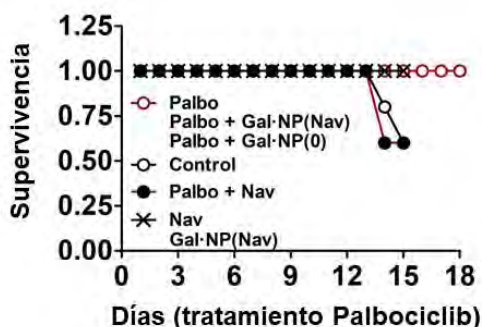


Figura 84. La encapsulación del navitoclax mejora la supervivencia de los ratones. Representación gráfica de la supervivencia de los animales durante el periodo del experimento (21 días desde la inyección de las células 4T1 para la formación de los tumores).

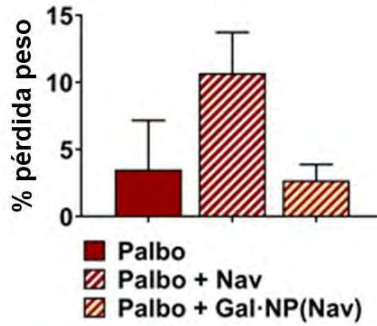


Figura 85. La pérdida de peso disminuye en los animales tratados con Gal-NP(nav). Se muestran los porcentajes de pérdida de peso como media \pm SEM.

Otro hecho a destacar es que los animales co-tratados con palbociclib y **Gal-NP(Nav)** presentan una reducción significativa en el número de metástasis en pulmón en comparación con los animales que únicamente se trataron con palbociclib (Figura 87). Este hecho es remarcable, puesto que la formación de metástasis es una de las consecuencias más negativas en la progresión del cáncer de mama.

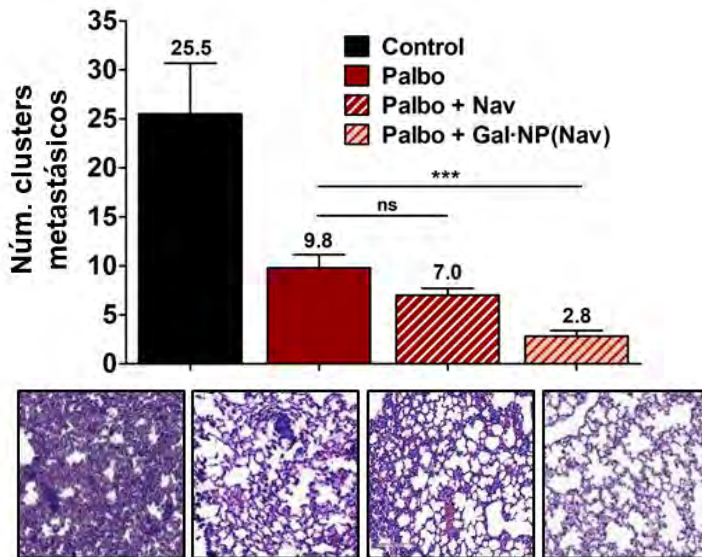


Figura 86. El tratamiento combinado de palbociclib y Gal-NP(Nav) reduce las metástasis en pulmón en el modelo 4T1 de cáncer de mama triple negativo. Los *clusters* metastásicos de células 4T1 se cuantificaron microscópicamente en diferentes secciones de pulmón teñidas con hematoxilina-eosina (n=5). Los valores se representan como media \pm SEM y la estadística se obtuvo mediante análisis One-way ANOVA: *** $p < 0.05$.

Así pues y en conjunto, se concluye que la encapsulación del fármaco senolítico navitoclax supone un beneficio a la hora de reducir el desarrollo del tumor y la formación de metástasis, con la ventaja añadida de disminuir los efectos secundarios negativos asociados al navitoclax.

4 | Conclusión

La senescencia se ha considerado tradicionalmente una estrategia evolutiva para evitar la proliferación tumoral. En base a esta concepción, los agentes antitumorales inductores de senescencia han evolucionado y alcanzado la clínica. Sin embargo, a medida que el conocimiento ha ido avanzando, el papel de doble filo que juega la senescencia en la evolución del cáncer se ha evidenciado.

Estudios recientes muestran que los quimioterapéuticos tradicionales (como la doxorubicina y la radioterapia) causan senescencia en tumores,⁴⁰ y ésta senescencia inducida terapéuticamente podría tener consecuencias tanto positivas como negativas en los pacientes. Por un lado, las células senescentes se eliminan por parte de los macrófagos y contribuyen a la generación de respuesta inmune antitumoral; pero por otro lado estas células senescentes son fuente de moléculas pro-inflamatorias que favorecen la carcinogénesis al actuar sobre el microambiente tumoral. Estudios recientes (Baker *et al*) han demostrado que la eliminación genética de células senescentes positivas para p16INK4A aumenta la supervivencia de los ratones con tumor.⁴⁰ Sin embargo, todavía no se ha abordado adecuadamente cómo el doble comportamiento de la senescencia podría estar afectando en aquellos tratamientos que inducen activamente senescencia en los tumores y que están en uso clínico, como el inhibidor de CDK4/6 palbociclib. Por tanto, teniendo en cuenta estas circunstancias existe un claro potencial de mejora del tratamiento que debe abordarse.

⁴⁰ BAKER D.J., WIJSHAKE T., TCHKONIA T., LEBRASSEUR N.K., CHILDS B.G., VAN DE SLUIS B., *et al*. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. **2011**, 479(7372): 232 – 236.

Los resultados obtenidos en el presente Capítulo han demostrado que la inducción de senescencia se produce de forma eficiente mediante el tratamiento con palbociclib de la línea 4T1 de TNBC negativa para el receptor de andrógenos. Como se ha dicho, los ensayos clínicos que actualmente se están llevando a cabo con palbociclib en pacientes de TNBC se centran en pacientes que sobre-expresan AR, de manera que los resultados que se reportan sugieren que existe cabida para la posible aplicación de tratamiento con palbociclib en nuevos subgrupos de pacientes con TNBC. Los estudios celulares también demuestran que las nanopartículas **Gal·NP(ICG)** liberan su contenido más eficientemente en células senescentes respecto a las células control, de acuerdo a sus mayores niveles de actividad β -galactosidasa. Además, el tratamiento de las células 4T1 con **Gal·NP(Nav)** induce una disminución selectiva de la viabilidad de las células senescentes a concentraciones de navitoclax significativamente inferiores respecto a la formulación libre del fármaco. A ese respecto, las nanopartículas funcionalizadas pero sin carga **Gal·NP(O)** resultan ser inocuas para las células tras 72 horas post-administración.

Los estudios de imagen *in vivo* de la distribución de las nanopartículas **Gal·NP(ICG)** a las 24 horas post-inyección claramente muestran una acumulación preferencial del compuesto fluorescente en los tumores tratados con palbociclib, hecho que se corrobora con la determinación de silicio en distintos órganos mediante estudios de ICP-MS. Esto demuestra que las nanopartículas se podrían utilizar para aplicaciones de detección de senescencia mediante imagen *in vivo*.

En términos de tratamiento, las nanopartículas cargadas con navitoclax **Gal·NP(Nav)** proporcionan un beneficio terapéutico en combinación con palbociclib. La encapsulación del navitoclax en los nanosopores contribuye a reducir significativamente su toxicidad sistémica asociada. Los animales tratados con la combinación palbociclib + **Gal·NP(Nav)** sobreviven al experimento *in vivo* sin cambios relevantes en cuanto a peso y bienestar animal, mientras que los ratones tratados con palbociclib + navitoclax libre mostraron una disminución en la supervivencia y pérdida de peso. Además, los ratones tratados con palbociclib y **Gal·NP(Nav)** presentan un menor número de metástasis en pulmón en comparación con los ratones únicamente tratados con palbociclib, resultado remarcable en términos de pronóstico de supervivencia a largo plazo.

En definitiva, en este trabajo se demuestra que la combinación de senogénesis (senoinducción con palbociclib) con senolisis dirigida mediante nano-formulación (navitoclax encapsulado) en un modelo ortotópico de cáncer de mama triple negativo mejora la eficacia antitumoral, reduce las metástasis y disminuye la toxicidad sistémica asociada al fármaco senolítico. Este modelo murino es altamente agresivo y recapitula todas las características del TNBC humano, con lo cual los resultados obtenidos del presente estudio son de particular relevancia en términos de translación a clínica.

5 | Sección experimental. Materiales y métodos

Línea celular

La línea celular 4T1 (*mus musculus*, glándula mamaria) se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés *American Type Culture Collection*) y se mantuvo en medio DMEM (Sigma) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para la inducción de senescencia, el medio se suplementó con palbociclib (PD-033299, Selleckchem) a concentración de 5μM y se mantuvo durante 7 días.

Tinción de actividad β-galactosidasa

Tanto células 4T1 como tejidos completos (porciones de tumor) se tiñeron para detección de SA-βGal utilizando el kit *Senescence β-galactosidase Staining Kit* (Cell Signaling). Las células se fijaron con PFA 4% a temperatura ambiente durante 15 min, y la tinción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante e incubando las muestras durante la noche a 37°C (sin CO₂). Las secciones de tumor se fijaron con PFA 4% durante 45-60 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se incubaron durante 5 horas con la solución de tinción, a 37°C sin CO₂.

Separación de proteínas y análisis *Western blot*

Las células se lavaron con PBS y se lisaron con 150-200μL de tampón de lisis (25mM Tris HCl 7.5, SDS 1%, 1mM EDTA pH 8 e inhibidores de proteasas) suplementado con inhibidor de fosfatasa para los análisis de pRb. A continuación las células se recogieron, se pasaron a través de una aguja de 25G varias veces y se incubaron durante 10 min a 95°C. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de BCA. Los lisados se resolvieron en geles de acrilamida/bis-acrilamida entre el 6-12%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Acefesa) y se incubaron con los correspondientes anticuerpos mediante procedimientos estándar.

Anticuerpos primarios: anticuerpo anti-Rb fosforilado (Ser807/811) (D20B12) (Cell Signaling); anticuerpo anti-receptor de andrógenos (Abcam); anticuerpo anti-Bcl-xL (Cell Signaling); anticuerpo anti-Bim (Cell Signaling).

Anticuerpos secundarios: anticuerpo IgG anti-conejo conjugado a peroxidasa (Sigma); anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa (Sigma).

Inmunofluorescencia de Ki67

Las células se fijaron con PFA 4%, se permeabilizaron con tritón X-100 0.3% y se bloquearon con BSA 5% durante 1 hora. A continuación se marcaron con una solución (BSA 1%, tritón X-100 0.3%) del anticuerpo primario de ratón Ki-67 (D3B5) (Cell Signaling), a 4°C durante toda la noche. La siguiente incubación con el anticuerpo anti-ratón IgG Fluor Goat 633 (Fisher) se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Para la visualización de los resultados se realizó el montaje de los cubreobjetos en medio de montaje, y las muestras se analizaron en un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS.

Ensayo de clonogenicidad

Se sembraron diferentes concentraciones de células 4T1 control y senescentes en placas multipocillo de 24, y se incubaron a 37°C y CO₂ durante una semana. Las colonias se fijaron con PFA 4% y se tiñeron con solución cristal violeta 0.05% durante 45 min y en oscuridad.

Determinación del perfil de proteínas BH3

Células control y células senescentes se trataron (o no trataron) con navitoclax 0.3µM durante 24 horas, y la actividad mitocondrial se midió mediante un ensayo en placa basado en la sonda JC1, previamente descrito por Lethai *et al.*⁴¹ Las células se sembraron en una placa multipocillo de 96 a una concentración de 200000 células/pocillo en tampón DTEB (trehalosa 135mM, HEPES-KOH 10mM pH 7.5, KCl 50mM, BSA 0.1%, succinato 5mM, EGTA 0.02mM, EDTA 0.02mM en agua destilada pH 7.5). Una vez sembradas, se añadieron a cada pocillo 100µL de DTEB suplementado (oligomicina 125µM, digitonina 0.10mg/mL, JC1 10µM y β-mercaptoetanol 50mM) y 2µL DMSO / 2µL péptidos BH3 / 1µL FCCP. La carga mitocondrial se midió siguiendo la fluorescencia en rojo de la sonda JC1 durante 3 horas, en un lector PerkinElmer Multimode Plate Reader Enight™.

Ensayos de viabilidad celular

Células 4T1 control y senescentes (previamente tratadas una semana con palbociclib 5µM) se sembraron en placas multipocillo de 96 de fondo claro a concentración de 3500 y 7500 células/pocillo, respectivamente. Al día siguiente se añadieron los tratamientos de navitoclax libre, **Gal·NP(Nav)** o **Gal·NP(0)** a

⁴¹ VO T.T., RYAN J., CARRASCO R., NEUBERG D., ROSSI D.J., STONE R.M., *et al.* Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML. *Cell*. **2012**, 151(2): 344 – 355.

diferentes concentraciones (0.03-20 μ M para navitoclax en libre formulación; 0.01-2mg/mL para **Gal·NP** previo filtrado en 0.45 μ m) y las células se incubaron durante 72 horas. La viabilidad celular se midió mediante luminiscencia utilizando el kit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) en un lector PerkinElmer Life Sciences Wallac Victor2™.

Para los ensayos de clonogenicidad las células se sembraron a concentración de 35000 (control) y 75000 (sensecentes) células/pocillo, y se trataron con navitoclax libre 0.3 μ M o la concentración equivalente de **Gal·NP(Nav)**. Tras 72 horas las colonias se fijaron con PFA 4% y se tiñeron con solución cristal violeta al 0.05%.

Ensayo de apoptosis (anexina V)

Para los ensayos de evaluación de apoptosis, células 4T1 control y senescentes se trataron – o no trataron – con navitoclax a concentración 0.6 μ M. Tras 72h de incubación, las células se marcaron con anexina V (*Alexa fluoresceinisothiocyanate-conjugated annexin V*, BD Bioscience) y yoduro de propidio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las suspensiones celulares se analizaron en un citómetro CytoFLEX S Beckman Coulter (software: CytExpert).

Ensayo de activación de actividad caspasa

Células 4T1 senescentes se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración de 1.5x10⁵ células/mL. Al día siguiente se trataron con navitoclax (1 μ M) y, en las condiciones correspondientes, con el inhibidor de caspasa 3 z-VAD-FMK a 5 μ M (ALX-260-020, Enzo Life Sciences). 48 horas después las células se recogieron y se obtuvieron extractos citosólicos S100. 50 μ g de proteína total se mezclaron con el tampón de ensayo (PBS, glicerol 10%, EDTA 0.1mM, DTT 2mM) que contenía el sustrato Ac-DEVD-afc a 20 μ M. La actividad se monitorizó en un espectrofluorímetro Victor 2.

Microscopía confocal y citometría de flujo con Gal·NP(ICG)

Células control y senescentes se sembraron en placas multipocillo de 6 a concentración de 150000 células/mL. Para los estudios de microscopía el sembrado de células se hizo sobre cubreobjetos circulares para la posterior visualización en confocal. Al día siguiente, se añadió una suspensión de 1mg/mL de **Gal·NP(ICG)** previamente filtrada, y las células se incubaron con las nanopartículas durante 6 horas. Tras el tiempo de incubación se hicieron varios lavados con PBS para eliminar las nanopartículas que no se hubiesen internalizado. Para microscopía, los cubreobjetos se montaron y se añadió

Hoechst y marcador de membrana plasmática (*WGA Alexa Fluor 488 conjugate*, ThermoFisher) para teñir núcleo y membrana, respectivamente, antes de la toma de imágenes por confocal. Para los estudios de citometría, las células se tripsinizaron, se añadió Hoechst y las suspensiones se analizaron en un citómetro CytoFLEX S Beckman Coulter (software: CytExpert).

Modelo animal

Los ratones hembra BALB/cByJ (de 28-34 días) se adquirieron de la casa Charles River Laboratories y se mantuvieron en racks ventilados bajo condiciones libres de patógenos en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España) con comida y agua *ad libitum* y ciclos alternados de luz y oscuridad. Todos los animales se trataron humanamente y los experimentos que se realizaron fueron previamente aprobados por el Comité de Ética para la Investigación y el Bienestar Animal.

Formación de los tumores

Para cada grupo se utilizaron 5 animales. Los ratones se anestesiaron con isofluorano y se les afeitó ligeramente la zona de inyección. A cada animal se le inyectaron, en la segunda mama inferior derecha y de forma subcutánea, 100 μ L de una suspensión de medio libre de suero con 0.5 millones de células 4T1 en pase temprano. El crecimiento de los tumores se controló cada dos días utilizando un calibrador electrónico, y el volumen de los mismos (mm³) se estimó mediante la fórmula $(\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$, considerándose como ancho el más corto de dos diámetros perpendiculares. Además del tamaño del tumor, el peso y el bienestar de los animales también se evaluaron a lo largo de todos los tratamientos, atendiendo a los criterios de la escala de Morton y Griffiths.

Tratamiento de los animales

El palbociclib (Selleckchem) para la inducción de senescencia se administró siempre de forma diaria por vía oral (50-100mg/kg) disuelto en lactato de sodio 50mM a una concentración de 16.5mg/mL.

En los experimentos de IVIS para visualizar la localización de las nanopartículas, los animales iniciaron el tratamiento con palbociclib una semana después de haberse inyectado las células para iniciar el tumor, y se mantuvo diariamente durante una semana más. Tras el tratamiento de inducción de senescencia, las nanopartículas **Gal-NP(ICG)** se administraron por vía intraperitoneal (200 μ L de una suspensión de 10mg/mL) y los animales se observaron en el IVIS a diferentes tiempos (6-24 horas post-inyección; λ_{exc} 745nm, λ_{em} 840nm). Los animales

finalmente se eutanasiaron en atmósfera de CO₂ y los órganos extraídos se observaron también *ex vivo* en el IVIS.

Para los tratamientos con navitoclax libre o encapsulado (Medchemexpress) la administración de palbociclib empezó un día antes de iniciarse el tratamiento senolítico, y tres días después de la inyección de células 4T1 para formar el tumor. El navitoclax también se administró de forma diaria durante 16 días por vía oral en el caso de la libre formulación (25mg/kg, disuelto en 15%DMSO/PEG400) o por vía intraperitoneal (200μL de una suspensión 4mg/mL, equivalente a 2.5mg/kg de navitoclax) en caso de las nanopartículas **Gal-NP(Nav)**. Al final de los tratamientos los animales se eutanasiaron y los órganos se extrajeron para posterior evaluación.

Para la preparación de las suspensiones de nanopartículas, los sólidos **Gal-NP** se pesaron en viales de cristal y se resuspendieron en DMEM libre de suero a las concentraciones previamente indicadas para cada uno de ellos. A continuación las suspensiones se sonicaron ligeramente en sonicador de baño y se dejaron agitando en placa durante 1 hora antes de su administración. Los cálculos experimentales *in vitro* indican que aproximadamente se liberan 60mg de navitoclax por gramo de nanopartículas.

Imagen por IVIS

Para la toma de imágenes de fluorescencia tanto *in vivo* como *ex vivo* de animales u órganos tras los tratamientos con **Gal-NP(ICG)** se utilizó un equipo IVIS *Spectrum Imaging System* (Caliper LifeSciences). Para la visualización de los animales *in vivo*, los ratones se anestesiaron con isoflurano 4-4.5% en el periodo de inducción, que se mantuvo al 2-2.5% durante el tiempo de escaneo. Para la toma de imágenes de órganos y tumores *ex vivo*, los animales se eutanasiaron a diferentes tiempos tras la administración de nanopartículas (6 o 24 horas) y los órganos se recogieron y se analizaron inmediatamente. La señal de las nanopartículas **Gal-NP(ICG)** cargadas con verde de indocianina se detectó utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 745 y 840nm, respectivamente. La cuantificación de fluorescencia se llevó a cabo con el software *Living Image*® 4.3.1 y se midió en fotones por segundo por centímetro cuadrado por estereorradian (p/s/cm²/sr). La liberación del fluoróforo se cuantificó delimitando manualmente las regiones de interés (ROIs) sobre las señales de fluorescencia detectadas en órganos y tumores.

Cuantificación de metástasis

Los pulmones de los animales se recogieron tras la eutanasia y se fijaron en PFA 4%. Se obtuvieron secciones de tejido en portaobjetos de vidrio, que se embebieron en parafina y se procesaron para realizar tinción hematoxilina-eosina. Las secciones teñidas de pulmón se escanearon en un equipo Leica Aperio 200 a una magnificación 10X. Los clusters metastásicos de células 4T1 se cuantificaron microscópicamente en diferentes secciones de tejido obtenidas a partir de cinco animales por grupo.

Inmunohistoquímica de Ki67

Los tumores se fijaron en PFA 4%, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones. Para la inmunohistoquímica se utilizó una plataforma de inmunotinción automática Leica Microsystems Bond RX[™]. Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario Ki67 (D3B5) (Cell Signaling) y después con el correspondiente anticuerpo secundario. Finalmente se contra-tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con un medio de montaje permanente para la visualización en microscopio confocal Leica SP8.

Inmunofluorescencia de caspasa 3

Las secciones de tumor (8µm) se fijaron en PFA 4% y se bloquearon en PBS con suero de cabra 5% y tritón X-100 0.1%. Las muestras se marcaron con el anticuerpo anti-caspasa 3 activa (Cell Signaling), seguido del anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies). Se obtuvieron imágenes de microscopía confocal de diez campos diferentes por muestra, en un microscopio Leica SP8. La cuantificación de la señal de caspasa 3 se llevó a cabo evaluando el valor de fluorescencia media de los diferentes campos, utilizando el software ImageJ.

Ensayos de biodistribución de silicio

Una vez eutanasiados los animales los órganos seleccionados se recogieron y se conservaron para llevar a cabo los estudios de detección de silicio: pulmones, hígado, bazo, riñones y tumor. Los órganos primero se pesaron, y a continuación se introdujeron individualmente en botes de teflón (politetrafluoroetileno, PTFE). En cada bote se añadió 1mL de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH, Sigma), los recipientes se cerraron firmemente y se llevó a cabo la digestión de las muestras durante 2 horas a 80°C en un bloque digestor *Bloc Digest 20* (Selecta). Una vez dejados enfriar los botes las muestras digeridas se diluyeron con agua milliQ hasta 10mL en matraces Erlenmeyer de polipropileno, a continuación se filtraron en

filtros de nylon de 0.45 μ m (Scharlab) y se mantuvieron en tubos de poliestireno hasta la determinación. Para el análisis, se diluyeron 0.5mL de muestra hasta 10mL con una solución de ácido nítrico 2% y ácido clorhídrico 1%. La determinación de silicio se llevó a cabo en un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) Agilent 7900 en modo H₂, utilizando germanio como estándar interno. También se preparó una curva de calibrado a partir de un estándar de silicio para ICP (Sigma), y las soluciones estándar se digirieron y trataron exactamente de la misma manera que las muestras de ratón. Los datos se expresan en μ g Si / g muestra.

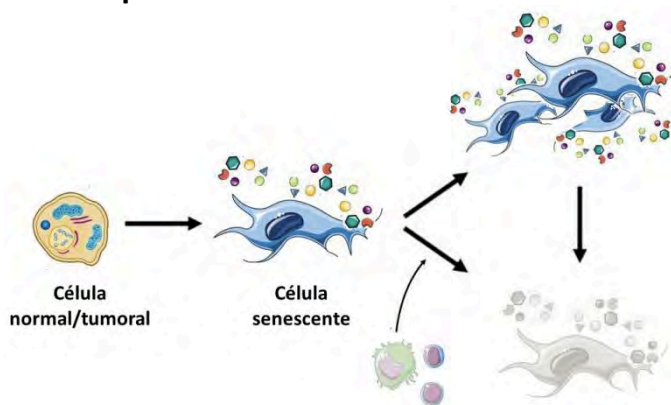
Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism. Las comparaciones de resultados entre grupos se realizaron mediante One-way ANOVA con una confianza del 95% o mediante análisis T-test Student.

Capítulo VI •

Identificación de nuevos compuestos senolíticos

● | Resumen del capítulo



Convencionalmente, el desarrollo de fármacos se ha basado en la síntesis individual y en la evaluación biológica de compuestos orgánicos en un intento de mejorar su actividad biológica, selectividad y biodisponibilidad. Este proceso de descubrimiento de nuevos fármacos uno a uno supone una inversión de una media de 12 años para encontrar un nuevo compuesto candidato con el que pasar a evaluación clínica.

Con el objetivo de incrementar el rendimiento en el desarrollo de fármacos surgió en los años 90 el concepto de química combinatoria, que permite la producción de miles de compuestos de manera simultánea. Es por ello que, desde su aparición al principio de los años 90, la química combinatoria ha atraído la atención de la industria farmacéutica como vía para reducir el tiempo y los elevados costes que normalmente lleva asociado el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos.

A día de hoy todavía no se han aprobado fármacos senolíticos con carácter selectivo y universal para eliminar células senescentes, si bien en el campo de la senescencia la investigación actual se focaliza en el desarrollo de terapias senolíticas (con el fin de reducir el impacto del envejecimiento y de enfermedades relacionadas con el mismo). Estudios *in vivo* ya han demostrado que la eliminación específica de estas células mejora la salud de los individuos, sin causar daño o afectación en tejidos sanos.

El objetivo de este Capítulo del trabajo consiste en la identificación de nuevas moléculas senolíticas mediante el uso de la química combinatoria. Para ello se realiza el rastreo de una quimioteca combinatoria de hexapéptidos de D-aminoácidos en busca de nuevos compuestos potencialmente senolíticos en un modelo celular de melanoma.

1 | Introducción

La eliminación de células senescentes podría ser una aproximación prometedora en el tratamiento y prevención de muchas enfermedades relacionadas con el proceso de envejecimiento. En este sentido, son varias las aproximaciones farmacológicas que están surgiendo en los últimos tiempos que se centran, bien directamente en la eliminación de células senescentes, o bien en prevenir el impacto pro-inflamatorio que dichas células tienen (Figura 88).

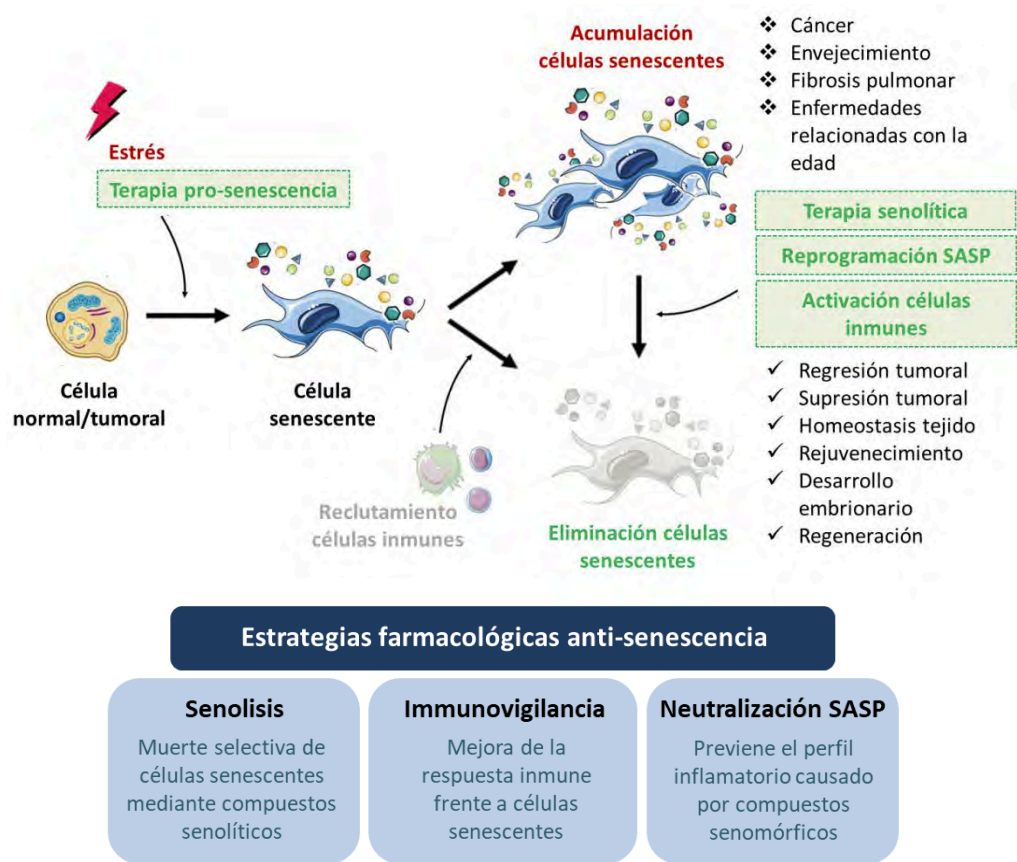


Figura 87. Eliminación de células senescentes y opciones terapéuticas. En un organismo sano la senescencia celular viene seguida por la eliminación de las células senescentes por parte del sistema inmune, dando paso a una serie de procesos considerados beneficiosos. Si esta eliminación no ocurre, las células senescentes se acumulan y pueden dar lugar a la aparición de cáncer o enfermedades asociadas con la edad. Se pueden llevar a cabo distintas estrategias terapéuticas (recuadradas en verde) para conseguir eliminar dichas células y lograr los efectos beneficiosos derivados. Modificado a partir de Lujambio A., BioEssays 2016 (38: S56-S64).

Como se puede ver esquematizado en la figura anterior, las principales estrategias farmacológicas anti-senescencia que existen hoy en día se pueden resumir en las siguientes:^{1,2,3}

- Por un lado se están invirtiendo muchos esfuerzos en desarrollar nuevos agentes farmacológicos que puedan inducir la muerte selectiva de estas células, compuestos normalmente conocidos como “senolíticos”.
- Otra de las estrategias para eliminar células senescentes consiste en potenciar la respuesta inmune frente a ellas (vigilancia inmunológica), lo cual supondría su eliminación de los tejidos.
- O bien se puede optar por bloquear específicamente componentes del fenotipo hipersecretor SASP, (mediante los llamados compuestos “senomórficos”), actuando sobre sus reguladores y efectores.

Puesto que en los últimos años se ha demostrado que la eliminación específica de células senescentes mediante senolisis contribuye positivamente a la mejora del individuo,^{4,5} este Capítulo se va a centrar en el desarrollo de nuevos compuestos senolíticos capaces de eliminar selectivamente dichas células.

A día de hoy los fármacos senolíticos en estudio se dirigen mayoritariamente a la inhibición de rutas de supervivencia relacionadas con las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2 o las proteínas HSP90 o HIF-1 α . Cabe destacar, además, que este año se han publicado por primera vez los resultados del tratamiento con fármacos senolíticos de una enfermedad mortal relacionada con la edad en pacientes humanos. En concreto en el ensayo clínico participaron pacientes de fibrosis pulmonar idiopática, una enfermedad crónica, irreversible y progresiva con una media de supervivencia de menos de cinco años y pocas opciones de tratamiento (como ya se ha comentado en el Capítulo IV). Los pacientes se trataron con dasatinib y quercetina (dos compuestos aprobados por la FDA para otras indicaciones), y aunque los resultados son preliminares (proporcionan una evidencia inicial de que los compuestos senolíticos pueden mejorar la disfunción pulmonar) y se continúa investigando, no había datos hasta el momento que demostrasen que fármacos dirigidos hacia células senescentes se pudiesen administrar de manera segura en pacientes o se pudiesen usar como

¹ OVADYA Y., KRIZHANOVSKY V. *Strategies targeting cellular senescence*. J Clin Invest. **2018**, 128(4): 1247 – 1254.

² SIEBEN C., STURMLECHNER I., VAN DE SLUIS B., *et al*. *Two-step senescence-focused cancer therapies*. Trends in Cell Biology. **2018**, 28: 723 – 737.

³ LOZANO-TORRES B., ESTEPA-FERNÁNDEZ A., *et al*. *The chemistry of senescence*. Nature Reviews Chemistry. **2019**.

⁴ LIU P., WU Y., LU Z., SHANG D. *et al*. *Cellular senescence-inducing small molecules for cancer treatment*. Current Cancer Drug Targets. Epub 2018/06/01, **2018**.

⁵ ZHANG B., LAM E.W., SUN Y. *Senescent cells: a new Achilles' hell to exploit for cancer medicine?* Aging Cell. **2018**: e12875. Epub 2018/11/20.

tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad. Ésta combinación de fármacos también se encuentra en ensayos clínicos en pacientes con daño renal crónico; además otro compuesto, UBX101, está en ensayos fase I para el tratamiento de osteoartritis en rodilla.^{3,6}

Actualmente no se dispone de un fármaco senolítico capaz de eliminar de manera efectiva cualquier tipo de célula senescente, ni tampoco de eliminar selectivamente un tipo celular senescente frente a otro. Puesto que encontrar un método selectivo para la eliminación de células senescentes podría ser una terapia de gran potencial, y ante los resultados prometedores tanto en modelo animal como en los primeros ensayos clínicos, se siguen buscando nuevas dianas y nuevas aproximaciones terapéuticas para inducir apoptosis en células senescentes. En este contexto, la química combinatoria ofrece una potente herramienta para proporcionar nuevos candidatos senolíticos.

Química combinatoria

El descubrimiento de fármacos es una disciplina altamente competitiva que requiere una innovación y un refinamiento constantes. Históricamente, la investigación para el descubrimiento de nuevas sustancias biológicamente activas se basaba en un proceso secuencial, en el que la síntesis de los compuestos ocurría de manera “artesanal”. Las estructuras líder utilizadas para el descubrimiento de fármacos surgían a partir del rastreo de caldos de fermentación microbiológicos, extractos de plantas, colecciones de compuestos, etc. Tras exhaustivas etapas de aislamiento, purificación y caracterización, la molécula candidata a fármaco se sometía a ensayos para detectar su potencial farmacológico. Este proceso era el que se utilizaba clásicamente en laboratorios de instituciones de enseñanza y empresas farmacéuticas, pero presentaba como clara desventaja el hecho de ser relativamente lento y generar un reducido número de derivados diferentes.⁷ Se trataba de rastreos caros, que suponían un largo trayecto desde la identificación de un *hit* hasta la identificación del compuesto activo. La novedad del compuesto una vez identificado podía además ser cuestionable y su obtención en grandes cantidades podía ser un factor limitante en el camino del desarrollo pre-clínico.⁸

⁶ JUSTICE J.N., *et al.* *Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study.* EBioMedicine. **2019**, 40: 554 – 563.

⁷ PATEL D.V., GORDON E.M. *Applications of small-molecule combinatorial chemistry to drug discovery.* Research Focus. **1996**, 1(4): 134 – 144.

⁸ ORTHOLAND J-Y., GANESAN A. *Natural products and combinatorial chemistry: back to the future.* Current Opinion in Chemical Biology. **2004**, 8: 271 – 280.

Así pues, la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la síntesis rápida de compuestos, ampliando la diversidad química utilizada, llevó a diferentes grupos de investigación a desarrollar un conjunto de estrategias y procesos que permitiesen la síntesis rápida y en paralelo de un gran número de sustancias (de decenas a millones). La llegada de la síntesis orgánica combinatoria de pequeñas moléculas empezó a atraer la atención de investigadores y empresas, ya que suponía acortar considerablemente los tiempos y los elevados costes asociados con la síntesis orgánica seriada y parecía ser una fuente adicional importante de diversidad molecular para los rastreos de nuevos fármacos.²

Así pues, los años 90 presenciaron el surgimiento de la llamada “química combinatoria”, que invadió laboratorios tanto académicos como industriales. Fue descrita por primera vez por Arpad Furka y sus colaboradores de la Universidad Eotvos Lorand (Budapest) en congresos internacionales celebrados en Praga y Budapest en 1988. Sin embargo, el concepto no se publicó en literatura hasta 1991, cuando tres artículos de los grupos de Furka, Houghten y Lam presentaron la química combinatoria a la comunidad científica.^{9,10,11} A pesar de que la generación de mezclas de compuestos orgánicos era un anatema a la química tradicional de síntesis orgánica, el concepto se aceptó con entusiasmo, especialmente en el sector de la industria farmacéutica.¹²

Claramente, una de las principales razones de dicha aceptación fue que, gracias al desarrollo de métodos automatizados de rastreo, durante las últimas décadas se han podido estudiar un gran número de compuestos en busca de actividad biológica. Poniendo un ejemplo, el número total de compuestos descritos en la literatura química hasta 1991 era de alrededor de 11 millones. Mediante métodos combinatoriales, este número de compuestos se puede conseguir por un solo equipo (una librería) en menos de una semana. No sólo eso, sino que la química combinatoria se puede emplear tanto para descubrir nuevas moléculas potencialmente bioactivas como para optimizar su actividad y/o disminuir su toxicidad, estando detrás de ello un planeamiento intencional de todas las etapas del proceso (desde la elección correcta de la estrategia de síntesis hasta la evaluación farmacológica).^{7,13}

⁹ FURKA A.S.F., ASGEDOM M., DIBÓ G. *More peptides by less labour*. Abs. 10th In. Symp. Med Chem., Budapest, Hungary. **1988**, 288.

¹⁰ HOUGHTEN R.A., PINILLA C. *Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery*. Nature. **1991**, 354(6348): 84 – 86.

¹¹ LAM K.S.S., HERST S.E., HRUBY E.M. *et al.* *A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity*. Nature. **1991**, 354: 82 – 84.

¹² LOWE G. *Combinatorial chemistry*. Chemical Society Reviews. **1995**: 309 – 317.

¹³ AMARAL P.A., NEVES G., FARIAS F., EIFLER-LIMA V.L. *Química combinatoria: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a prototipos de novos fármacos*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **2003**, 39: 351 – 363.

Quimiotecas

Una librería o quimioteca es una colección de moléculas sintetizadas simultáneamente en forma de mezclas o aisladas, a partir de uno o más sustratos de partida. Las quimiotecas pueden estar constituidas de decenas, cientos o miles de estructuras diferentes, y se pueden generar mediante aproximaciones sintéticas o biológicas. Históricamente, las primeras quimiotecas combinatoriales sintetizadas fueron las de péptidos,^{8,14} y a partir de 1992 se empezó a aplicar la química combinatoria a la síntesis de otras moléculas orgánicas. Se impulsó entonces la investigación de la síntesis en fase sólida y de la química combinatoria en el campo orgánico, ya que la diversidad potencial que se podía obtener con esta nueva metodología superaba las posibilidades de la química orgánica tradicional.^{15,16}

Las librerías biológicas de péptidos pueden acomodar típicamente sólo los 20 aminoácidos naturales; sin embargo las librerías de péptidos sintéticas tienen el potencial de poder incorporar D-aminoácidos y otros aminoácidos no naturales, así como también estructuras secundarias específicas que mejoren la actividad biológica. Además de aminoácidos, se pueden utilizar otras subunidades de componentes macromoleculares como monosacáridos, nucleótidos, lípidos o pequeñas fracciones orgánicas.¹⁷ Una vez sintetizados, los compuestos se estudian frente a la diana terapéutica seleccionada; de esta manera se acelera el proceso sintético y la identificación de moléculas biológicamente activas, característica de especial interés para el desarrollo de nuevos fármacos.

De entre los métodos generales que existen para preparar y llevar a cabo el rastreo de las librerías combinatoriales, nos vamos a centrar en aquellos que requieren deconvolución. En estos métodos, primero se sintetizan las mezclas de compuestos y luego se lleva a cabo el ensayo biológico. Esta aproximación metodológica incluye diferentes tipos de rastreo: (i) iterativo, (ii) posicional, (iii) partición ortogonal, (iv) deconvolución recursiva, y (v) deconvolución recursiva dual. Las principales ventajas de estos métodos que necesitan deconvolución son dos: por un lado, se pueden sintetizar y probar un gran número de péptidos (10^6 - 10^8); y por otro, existen múltiples posibles ensayos biológicos con los que comprobar la actividad de los compuestos. Sin embargo también cuentan con desventajas, y es que en general se necesitan pasos adicionales de síntesis y testado, lo cual requiere tiempo.⁴

¹⁴ MERRIFIELD, R. B. *Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide*. J Am Chem Soc. **1963**, 85: 2149.

¹⁵ BUNIN B.A.E. *A general and expedient method for the solid-phase synthesis of 1,4-benzodiazepine derivatives*. J Am Chem Soc. **1992**, 114: 10997 – 10998.

¹⁶ ZUCKERMANN R.N.K., KENT J.M., MOOS S.B.H. *Efficient method for the preparation of peptoids [oligo(N-substituted glycines)] by submonomer solid-phase synthesis*. J Am Chem Soc. **1992**, 114: 10646 – 10647.

¹⁷ AINA O.H., LIU R., SUTCLIFFE J.L, MARIK J., PAN C-X., LAM K.S. *From combinatorial chemistry to cancer-targeting peptides*. Molecular Pharmaceutics. **2007**, 4(5): 631 – 651.

Finalmente son varias las clasificaciones que se pueden establecer para definir las quimiotecas, en función del parámetro que se tenga en cuenta a la hora de realizar la clasificación (**Tabla 5**).

Tabla 5. Clasificación de las quimiotecas en función de su composición, de dónde se ensayen y de su naturaleza.

Según composición	Moléculas simples	Cada compuesto se prepara en un soporte sólido diferente (una partícula de resina por compuesto).
	Mezclas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Método <i>Split-and-Mix</i>:⁴ <ol style="list-style-type: none"> 1. Mezcla de la resina después de cada acoplamiento. 2. División de la mezcla. 3. Acople del siguiente aminoácido. ▪ Uso directo de mezclas de subunidades^{5,18}
Según dónde se ensayen	Solubles	Ensayo biológico en disolución.
	Unidas a soporte sólido	Ensayo biológico con las moléculas ancladas al soporte.
Según naturaleza de las moléculas que la componen	Peptídicas	
	No peptídicas	

Al mismo tiempo pueden surgir quimiotecas que sean el resultado de combinar estas clasificaciones. Todas estas consideraciones dan una idea general sobre cuánto abarca la química combinatoria. No se trata de una herramienta simple, sino que engloba diversas técnicas al ser posible utilizar metodologías de síntesis en fase sólida o en disolución, sintetizar los compuestos de forma manual o automatizada, sintetizar péptidos o cualquier otra molécula orgánica y obtener

¹⁸ PINILLA C., BLANC J., HOUGHTEN R.A. *Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic combinatorial libraries.* BioTechniques. **1992**, 13: 437 – 441.

quimiotecas compuestas por moléculas sencillas o por mezclas de las mismas.¹⁹ Las quimiotecas sintéticas solubles son las que se han utilizado en este trabajo y se describen con mayor detalle en el siguiente apartado.

Síntesis y deconvolución de quimiotecas solubles

Las quimiotecas sintéticas solubles se preparan por síntesis múltiple en fase sólida, que puede llevarse a cabo de dos formas diferentes: partiendo de la compartimentalización de la resina en bolsitas de polipropileno con la posterior incorporación de unidades definidas de compuestos, o bien partiendo de unidades combinatorializadas. En la primera estrategia de síntesis (*Split-and-Mix*)^{4,5} se separa la resina en varias porciones, se acopla la unidad deseada, se mezcla toda la resina y se vuelve a separar para acoplar la siguiente unidad. En el segundo caso en el que se parte de unidades ya combinatorializadas se lleva a cabo la síntesis de varias sub-quimiotecas al mismo tiempo, cada una compuesta por la misma mezcla de compuestos pero en distinta combinación. El número de sub-quimiotecas será el número de posiciones que se tienen que definir.¹¹

Existen dos posibles métodos de deconvolución de estas quimiotecas solubles. El primero es el formato iterativo, que implica una etapa de síntesis y una de identificación del compuesto activo. Así se identifica un residuo por cada ciclo de síntesis, y se va definiendo el compuesto activo final.⁵ Esta metodología resulta relativamente lenta, ya que después del paso de síntesis se escinden los compuestos del soporte sólido y se realiza el ensayo biológico, de forma que es necesario volver a hacer la síntesis (**Figura 89**).

¹⁹ MORA MUÑOZ, MdP. *Disseny, síntesis i caracterització estructural de moduladors de processos de reconeiximent molecular*. Tesis Doctoral, Universitat de València, 2004.

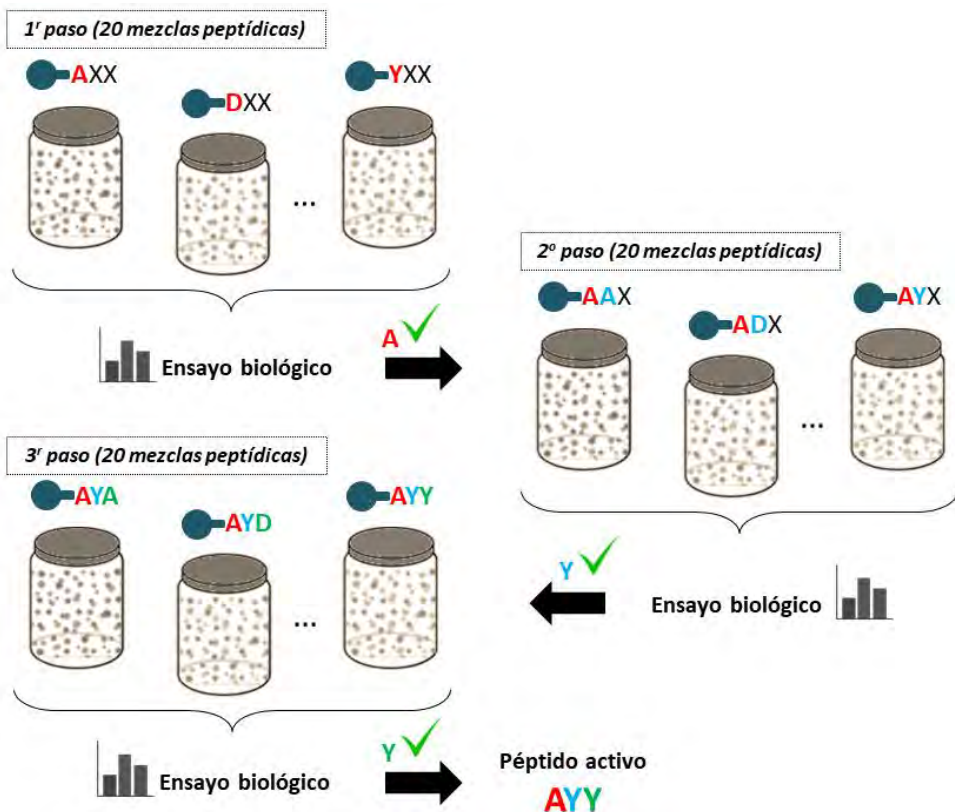


Figura 88. Deconvolución de una quimioteca de péptidos mediante el método iterativo.

Con el objetivo de hacer más rápido el proceso se propone el formato de rastreo posicional,⁵ en el que se sintetizan todas las sub-quimiotecas posibles y cuando se escinden del soporte sólido se lleva a cabo el ensayo biológico. Cuando se evalúa la actividad biológica de cada sub-quimioteca, se está evaluando la actividad de la posición definida. Del proceso de deconvolución se seleccionan las mezclas activas, y se lleva a cabo la síntesis de los compuestos definidos. Estas moléculas definidas se estudian para confirmar los resultados de la deconvolución de la quimioteca e identificar así el compuesto más activo.¹ Este método de deconvolución, que es el que se utilizó en el desarrollo de este Capítulo, se explica más en detalle en el apartado de Resultados y Discusión (Figura 90).

2 | Objetivos

En este Capítulo se va a llevar a cabo el rastreo de una quimioteca de hexapéptidos en busca de nuevos compuestos potencialmente senolíticos. En concreto los objetivos que se persiguen son:

- ✓ Puesta a punto de un modelo celular de senescencia en el que llevar a cabo los ensayos biológicos de selección y validación de los compuestos candidatos. Se trabajará con la línea celular de melanoma SK-MEL-103, en la que la inducción de senescencia se consigue mediante tratamiento con palbociclib.
- ✓ Establecer los controles celulares positivos y negativos que se usarán como control interno en los ensayos biológicos, los cuales permitirán confirmar la validez de los resultados obtenidos en los cribados.
- ✓ Rastreo posicional de una quimioteca de hexapéptidos en el modelo celular establecido para la búsqueda de mezclas con actividad senolítica.
- ✓ Determinación de las secuencias de hexapéptidos con actividad senolítica y validación de los hexapéptidos de secuencia definida sintetizados a partir de la deconvolución de la quimioteca.

3 | Resultados y discusión

Quimioteca de hexapéptidos y diseño del ensayo de rastreo posicional

Para la búsqueda de nuevos compuestos senolíticos se ha utilizado en este trabajo una quimioteca combinatorial de hexapéptidos de D-aminoácidos. Como se explica gráficamente en la **Figura 90**, esta quimioteca consiste en una serie de mezclas compuestas por hexapéptidos con una posición definida (P_n) y en el resto de posiciones mezclas equimolares de todos los aminoácidos (X). La librería se compone por tanto de 6 sub-quimiotecas (una por cada posición del hexapéptido), cada una de ellas compuesta por 20 mezclas con una únicamente una posición definida (P_n). El número total de péptidos de la quimioteca es de 20^6 compuestos, distribuidos en 120 mezclas.

Así por ejemplo, la sub-quimioteca que corresponde a la “posición 1” del hexapéptido (representada en azul en la **Figura 90**) está formada por veinte mezclas, en cada una de las cuales se conoce el aminoácido que ocupa el primer lugar – 20 posibles aminoácidos.

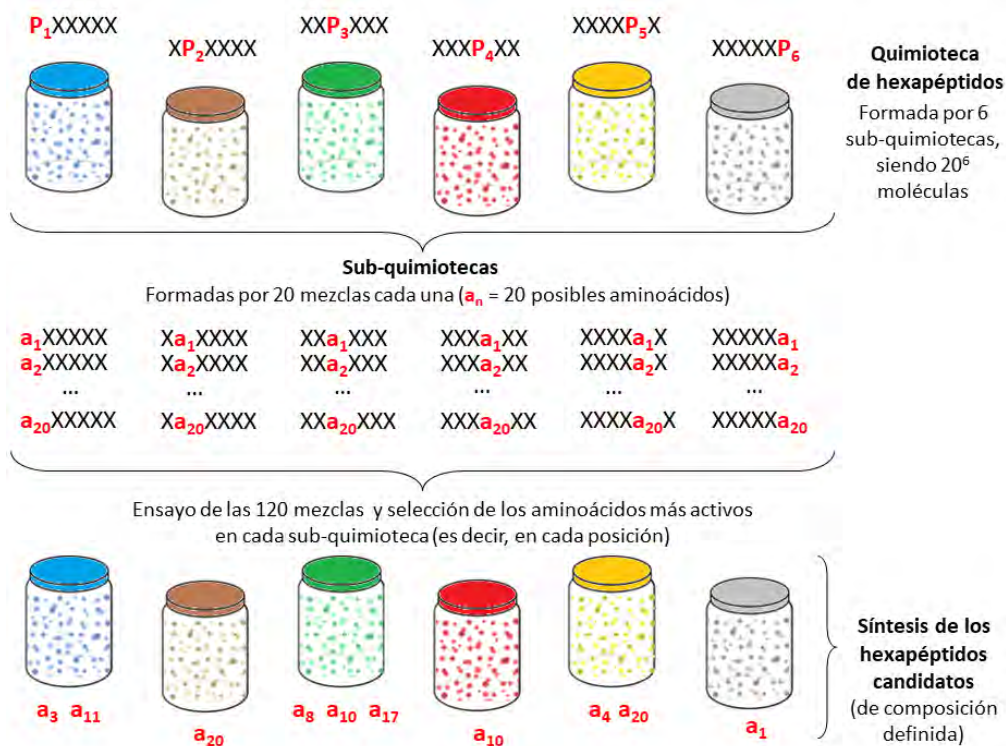


Figura 89. Deconvolución de una quimioteca de hexapéptidos de D-aminoácidos utilizando la metodología de rastreo posicional.

El cribado de hexapéptidos con actividad senolítica se llevó a cabo utilizando la estrategia de rastreo posicional a partir de la quimioteca original. La selección de los aminoácidos para cada una de las seis posiciones del hexapéptido se hizo en función de la capacidad senolítica de cada mezcla de la quimioteca en un ensayo de viabilidad *in vitro* con la línea tumoral de melanoma SK-MEL-103. Las mezclas se probaron en paralelo en células control y en células senescentes (tratadas durante una semana con palbociclib 5 μ M).

Para llevar a cabo este cribado se puso a punto en primer lugar el modelo celular de inducción de senescencia. De la misma forma que se describe en el Capítulo III, las células SK-MEL-103 se trataron con palbociclib 5 μ M durante una semana para establecer el cultivo senescente. Como se puede observar en la **Figura 91**, se comprobó que efectivamente la inducción de senescencia tenía lugar correctamente, presentando las células tratadas con palbociclib la tinción azul característica debida a la presencia de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia. También se apreciaban los cambios fenotípicos esperables en las

células senescentes, como el aumento de tamaño, la presencia de multi-núcleos y un sistema de vesículas de secreción sobre-expresado debido al SASP.

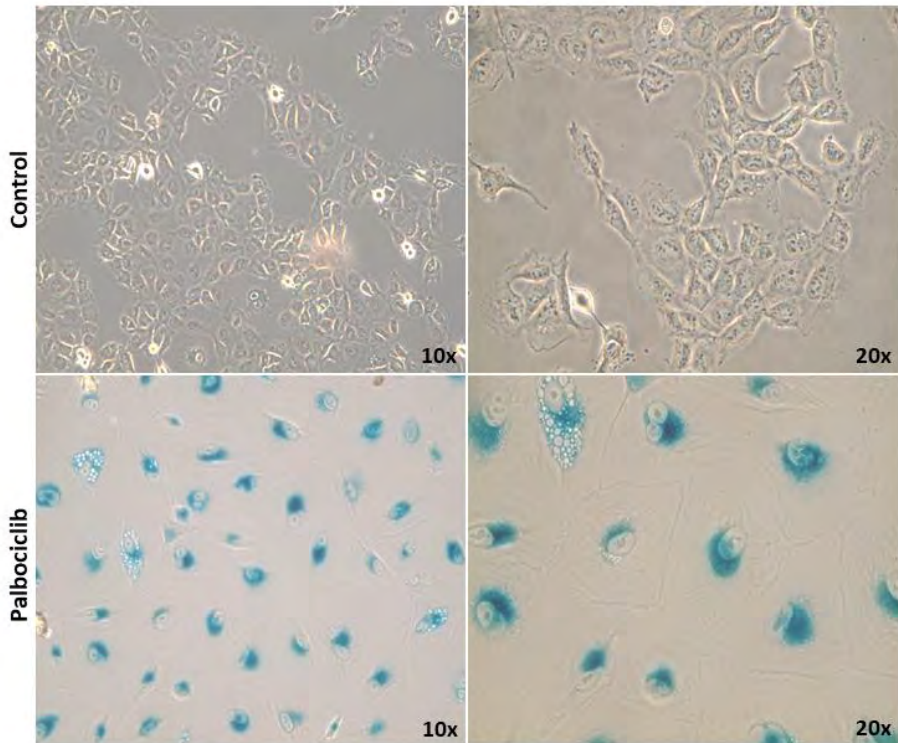


Figura 90. Células SK-MEL-103 control y senescentes (tratadas con palbociclib 5 μ M, 7 días) tras la tinción de actividad β -galactosidasa.

Una vez establecido el modelo, el siguiente paso antes de empezar con el rastreo de la quimioteca fue definir las condiciones que se usarían como control interno en los ensayos de viabilidad, además del correspondiente control negativo sin tratamiento. Puesto que el objetivo del ensayo de viabilidad celular era determinar actividad senolítica de los compuestos, es necesario incluir controles positivos de muerte (tanto para células control como para células senescentes) como referencia a la hora de validar el efecto de los hexapéptidos.

Así pues se hicieron ensayos piloto de viabilidad en los que células SK-MEL-103 control se trataron con doxorubicina 0.5 μ M y navitoclax 10 μ M, mientras que células senescentes (palbociclib 5 μ M) se trataron con navitoclax 10 μ M. Como control interno positivo de muerte en este ensayo se utilizaron unos microlitros de lejía en ambas condiciones. Como muestra la [Figura 92](#), la doxorubicina fue efectiva a la hora de eliminar prácticamente por completo a las células control, mientras que el navitoclax tuvo el mismo efecto en células senescentes. El

carácter senolítico del navitoclax también se confirmó a la par, estudiando la concentración de 10 μM tanto en células control como en células senescentes.

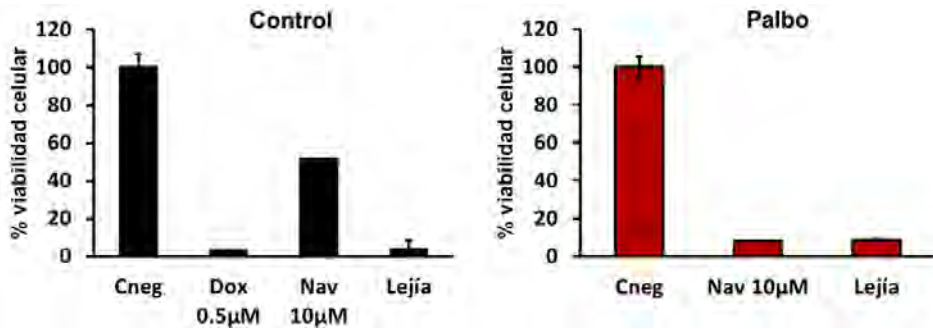


Figura 91. Ensayo de viabilidad celular para validar el uso de los compuestos doxorubicina y navitoclax como control interno de muerte tanto para células control (doxorubicina) como para células senescentes (navitoclax).

Sabiendo pues el efecto de los dos compuestos (citotóxico y senolítico), en todos los ensayos de rastreo así como en los posteriores ensayos de validación de los hexapéptidos definidos se utilizó doxorubicina 0.5 μM como control positivo para células control, y navitoclax 5 μM como correspondiente control positivo para células previamente tratadas con palbociclib.

Como se puede ver en la [Figura 93](#), para llevar a cabo el ensayo se siembran células control y células senescentes en placas blancas multipocillo de 96 (fondo claro), dejando 24 horas para que se adhieran. Al día siguiente del sembrado se añaden en placa las diferentes mezclas de hexapéptidos de la librería, y tras 48 horas se lleva a cabo la determinación de la viabilidad celular, utilizando para ello un kit que mide la cantidad de ATP presente en las células mediante luminiscencia, medida que es proporcional al número de células vivas ([Figura 94](#)).

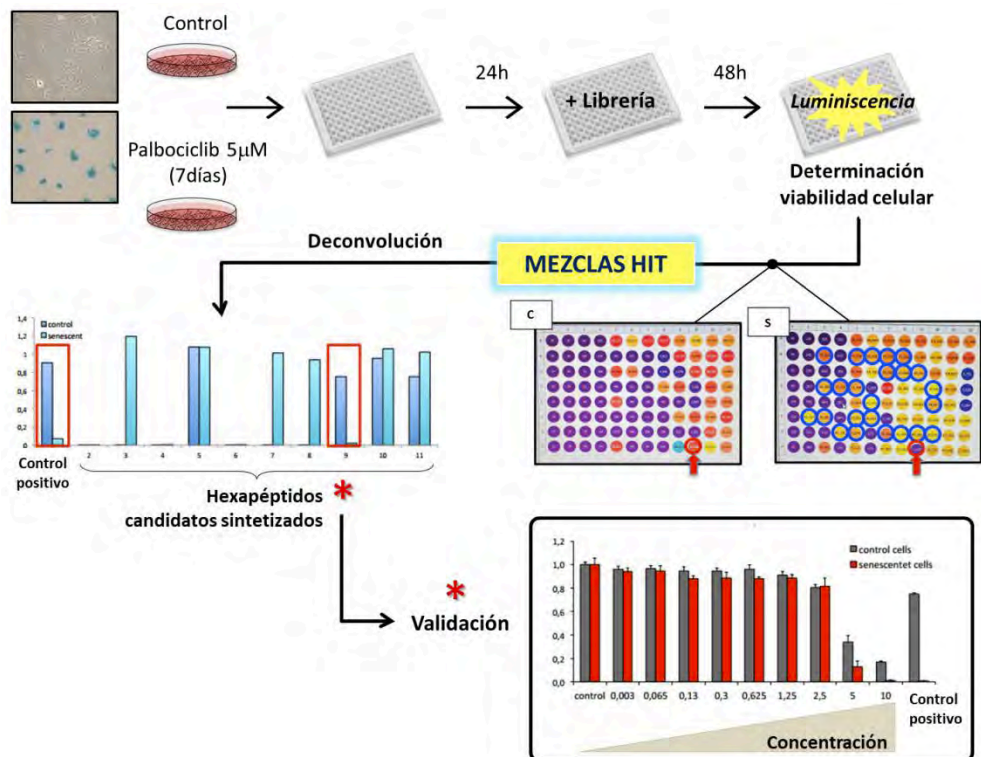


Figura 92. Esquema de la metodología de rastreo posicional llevada a cabo, basado en la capacidad senolítica de cada mezcla de la quimioterapia en un ensayo de viabilidad *in vitro* con la línea tumoral de melanoma SK-MEL-103. Se detalla todo el proceso, desde la siembra de las células control y senescentes hasta la validación de los hexapéptidos definidos sintetizados a partir de la deconvolución de la quimioterapia.

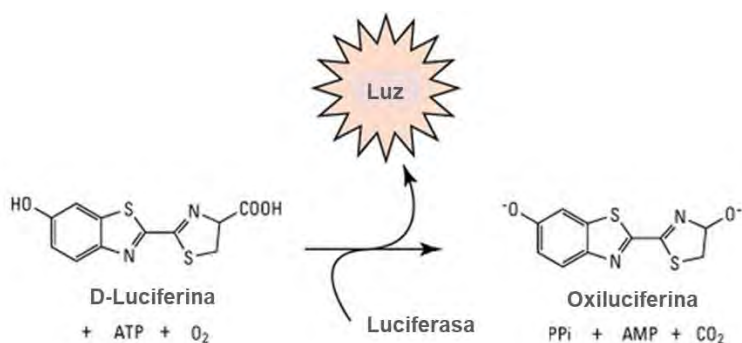


Figura 93. Reacción en la que se basa el ensayo de cuantificación de ATP. En presencia de ATP, la enzima luciferasa cataliza la reacción en la que una molécula de luciferina se convierte en oxiluciferina, siendo uno de los productos resultantes luz medible (y que es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente). Modificado a partir de:

http://bweb.ucsd.edu/courses/senior-design/projects/2014/project_7/the-solution.html

Una vez identificadas las mezclas más activas o *hit mixes* (es decir, aquellas que inducen muerte preferencialmente en células senescentes frente a células control), se determina a qué aminoácidos para cada posición definida corresponden. Realizando a continuación todas las combinaciones posibles, se determinan mediante deconvolución las secuencias de los diferentes hexapéptidos candidatos a sintetizar. Una vez sintetizados, los nuevos hexapéptidos se vuelven a testar en paralelo en células control y células senescentes para identificar aquellos más activos. De estos candidatos en estudio, y en base a los resultados de viabilidad obtenidos con cada uno de ellos, se seleccionan finalmente aquellos hexapéptidos que más actividad senolítica presentan y con ellos se lleva a cabo un último ensayo de validación, en el cual se estudian en varias concentraciones crecientes para acotar su ventana terapéutica.

Cribado de la quimioteca

Conociendo el diseño del ensayo y una vez establecidos los controles internos tal y como se ha explicado en el apartado anterior, se llevó a cabo la evaluación de la capacidad senolítica de cada una de las mezclas peptídicas que constituyen la quimioteca de hexapéptidos.

La selección de aminoácidos para cada una de las posiciones del hexapéptido se llevó a cabo en base a la actividad senolítica de las diferentes mezclas de la quimioteca, mediante un ensayo de viabilidad celular con la línea SK-MEL-103. Como se ha mostrado previamente en el esquema de la **Figura 93**, para llevar a cabo el rastreo se sembraron células control y células senescentes en placas multipocillo y se trataron con las mezclas peptídicas durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de tratamiento se realizó la lectura de viabilidad celular.

La quimioteca se testó a tres concentraciones diferentes (500, 600 y 700 μM) con el fin de maximizar la detección de diferencias de viabilidad entre células control y células senescentes (**Figura 95**). Cada una de las gráficas representa el conjunto de las 20 mezclas de hexapéptidos que se estudian en cada una de las 6 posiciones a definir de la quimioteca, mostrando las barras el porcentaje de viabilidad para cada una de las mezclas y siendo el eje X el aminoácido que está definido en cada mezcla peptídica (**Figura 96**).

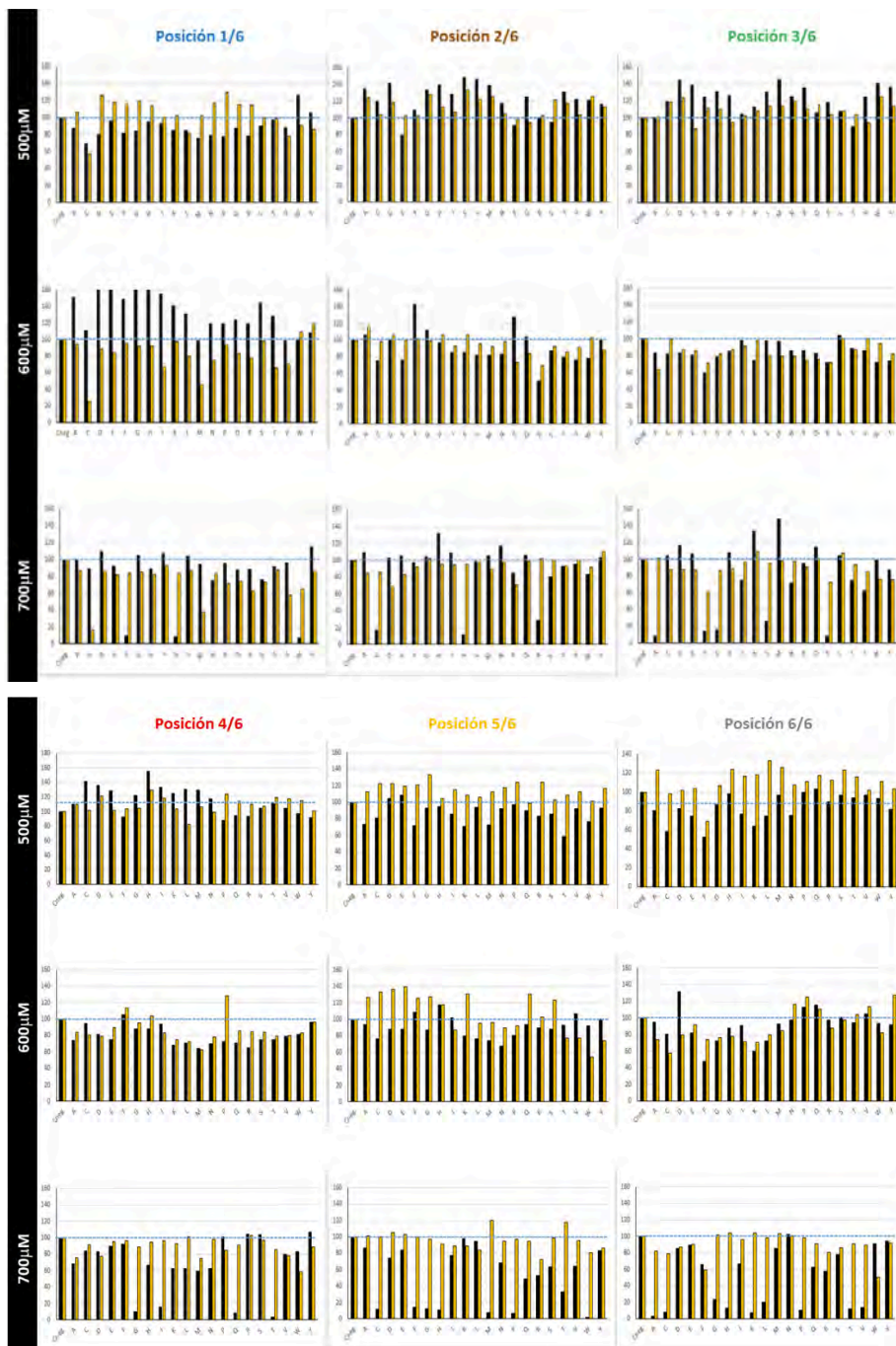


Figura 94. Gráficas de viabilidad celular obtenidas para células control (barra negra) y células senescentes (barra amarilla) tratadas con tres concentraciones distintas de la quimioteca de hexapéptidos (500, 600, 700 μM). Cada gráfica corresponde a las 20 mezclas peptídicas disponibles para cada posición, representando el eje X el aminoácido que está definido en cada una de estas mezclas.

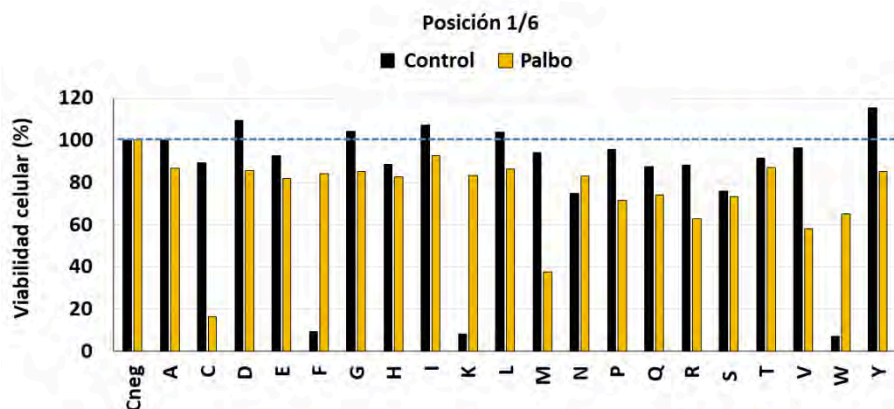


Figura 95. Visión ampliada de una de las gráficas representadas en la Figura 8, para mayor claridad de los resultados que dicha figura recoge. En este caso se muestran los resultados de viabilidad celular de las 20 mezclas de aminoácidos correspondientes a la sub-quimioteca con posición 1 del hexapéptido definida.

Así pues, combinando los resultados de viabilidad obtenidos en los tres ensayos se procedió al análisis de los mismos para establecer el criterio de selección a la hora de determinar qué aminoácidos presentaban mejor actividad senolítica para cada una de las posiciones del hexapéptido.

Antes de proceder a la selección todos los datos de viabilidad obtenidos en cada uno de los ensayos se normalizaron, y para cada una de las mezclas se calculó la diferencia entre el valor de viabilidad obtenido para células control y el valor obtenido para células senescentes. El criterio de selección de los aminoácidos para cada posición se basó en: (1) se seleccionaron los aminoácidos que en cada una de las posiciones provocaban más muerte en las células senescentes que en las control, (2) se tuvo en cuenta la reproducibilidad de resultados inter-ensayo y (3) que el sumatorio de las diferencias de viabilidad entre células control y células senescentes a las diferentes concentraciones fuera mayor o igual a 0.5. Un ejemplo de este análisis realizado para la posición P_n definida por una cisteína (Cys) sería el siguiente:

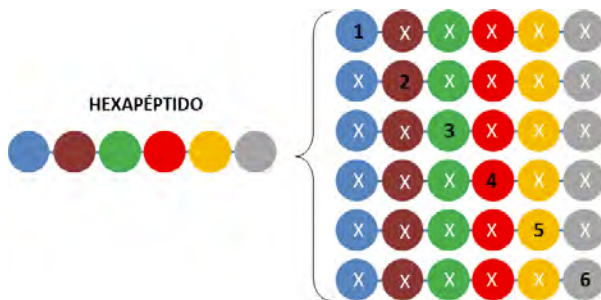
Tabla 6. Ejemplo del criterio de selección aplicado en la elección de los aminoácidos candidatos para cada posición del hexapéptido.

P _n	Datos viabilidad			(C-S)
	Control 500µM	Palbo 500µM	(C-S)	
Cys	1.22	0.99	0.3	

P _n	Datos viabilidad			(C-S)
	Control 600µM	Palbo 600µM	(C-S)	
Cys	1.19	0.92	0.3	

P _n	Datos viabilidad			Σ
	Control 700µM	Palbo 700µM	(C-S)	
Cys	1.25	1.03	0.2	0.8

Así pues, los aminoácidos que se seleccionaron como candidatos para cada una de las posiciones del hexapéptido fueron los que se recogen en la tabla de la **Figura 97**.



Aminoácidos seleccionados para cada posición:

(1)-xxxxx	x-(2)-xxxx	xx-(3)-xxx	xxx-(4)-xx	xxxx-(5)-x	xxxxx-(6)
Cisteína (C) Metionina (M) Valina (V)	Glutamina (Q)	Metionina (M)	Cisteína (C) Ácido aspártico (D)	Tirosina (Y)	Ácido aspártico (D) Metionina (M) Triptófano (W)

Figura 96. Esquema de las posiciones a definir del hexapéptido, junto con la tabla de aminoácidos seleccionados para las 6 posiciones.

La combinación de estos aminoácidos en cada una de las 6 posiciones combinatorializadas dio lugar a la síntesis de 18 hexapéptidos de composición definida ($3 \times 1 \times 1 \times 2 \times 1 \times 3 = 18$). Una vez sintetizados los hexapéptidos candidatos, se realizaron nuevamente ensayos de viabilidad tratando células control y células senescentes con la batería de los nuevos péptidos definidos, con el mismo fin de identificar su actividad senolítica. De los ensayos realizados, hubo dos de los hexapéptidos definidos que mostraron diferencias de viabilidad entre células control y células senescentes: los hexapéptidos **H8** y **H14** (**Figura 98**).

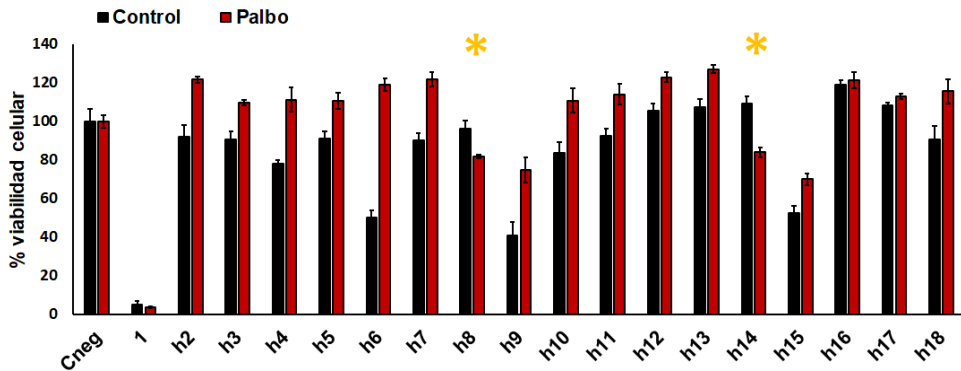


Figura 97. Ensayo de viabilidad en base a la actividad senolítica de los hexapéptidos de secuencia definida sintetizados (h2-h18), probados en células SK-MEL-103 control y senescentes. Se incluyen los controles internos negativo (Cneg) y positivo (1), siendo el positivo doxorubicina 0.5 μM para células control y navitoclax 5 μM para células senescentes.

Ensayos de validación de la actividad senolítica de H8 y H14

Con los hexapéptidos **H8** y **H14** seleccionados como candidatos se realizaron ensayos secundarios de validación, mediante estudios de viabilidad por clonogenicidad a distintas concentraciones de los compuestos. Para ello se sembraron células control y células senescentes en placas multipocillo de 24 y se incubaron durante 48 horas con los péptidos, para finalmente fijar las células con paraformaldehído y llevar a cabo una tinción con cristal violeta.

Para ambos compuestos se probaron concentraciones de 0.5 a 100 μM , incluyéndose para las células control doxorubicina 0.5 μM y navitoclax 5 μM como controles internos y, para células senescentes, navitoclax 5 y 10 μM . Los resultados obtenidos tanto para **H8** como para **H14** se muestran en las [Figura 99](#) y [Figura 100](#), respectivamente.

Como se puede observar, en el caso del hexapéptido **H8** ([Figura 99](#)) la placa de controles tratados presentó una monocapa de células en todos los pocillos de tratamiento, cuya densidad hasta la concentración de 50 μM se podía equiparar prácticamente a la densidad de células que se observaba en los pocillos sin tratamiento. Esto indica que la presencia del hexapéptido no tuvo efecto sobre las células hasta concentraciones muy elevadas (50, 75, 100 μM), y aún en esos casos las células no morían en su totalidad. Sin embargo, en la placa de senescentes la población de células empezaba a verse afectada por el tratamiento con el hexapéptido a partir de concentraciones de 10 μM , sin que quedasen ya prácticamente células vivas con las concentraciones superiores (25, 50, 75 y 100 μM). En el caso del hexapéptido **H14** ([Figura 100](#)) los resultados de clonogenicidad obtenidos fueron muy similares. El patrón del tratamiento sobre las células control prácticamente es el mismo que con el péptido **H8**, si bien en este caso las

células empiezan a verse afectadas a concentraciones un poco superiores (de 75 μM). Para las concentraciones inferiores de tratamiento se conserva la monocapa de células a niveles comparables con los controles sin tratar, confirmando esto que el hexapéptido no presentaba actividad alguna sobre su viabilidad. De nuevo, a pesar de verse una mayor afectación a concentraciones muy elevadas, las células no llegan a eliminarse al 100%. En cambio con éste péptido las células senescentes empezaban a disminuir su viabilidad de manera visible a concentraciones de 5 μM . Como se puede observar en las vistas ampliadas de los pocillos, la concentración de 10 μM afectaba prácticamente a la mitad de la monocapa, no quedando ya prácticamente células vivas a partir de la concentración de 25 μM .

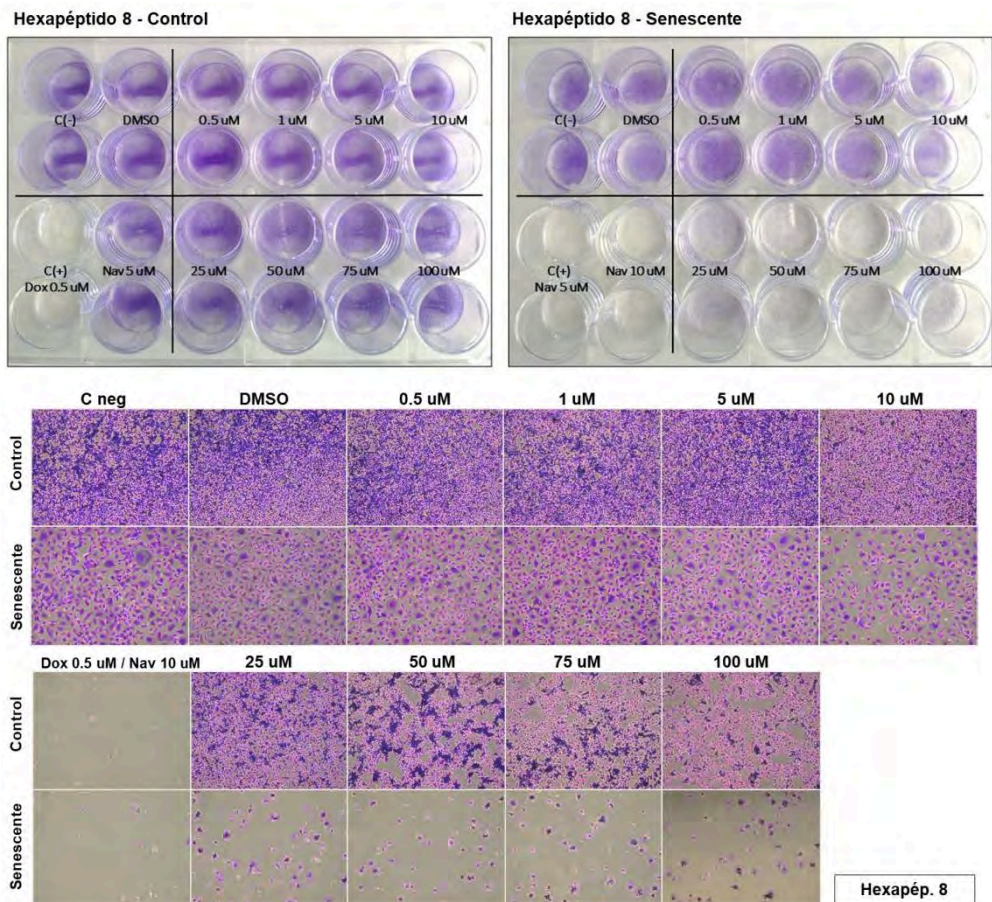
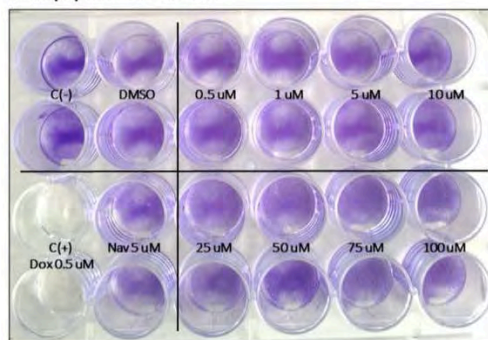


Figura 98. Análisis de la actividad senolítica del hexapéptido H8. Tinción cristal violeta de células senescentes frente a células control a diferentes concentraciones de péptido (panel superior). Imágenes microscópicas de células control y senescentes tratadas con hexapéptido H8 (panel inferior). Como controles positivos se utilizaron doxorubicina 0.5 μM para controles y navitoclax 10 μM para células senescentes.

Hexapeptido 14 - Control



Hexapeptido 14 - Senescente

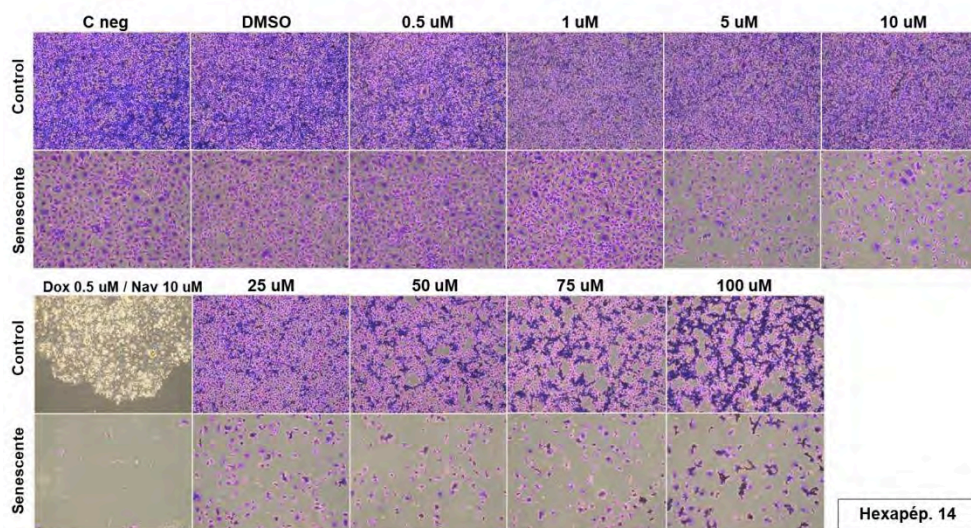
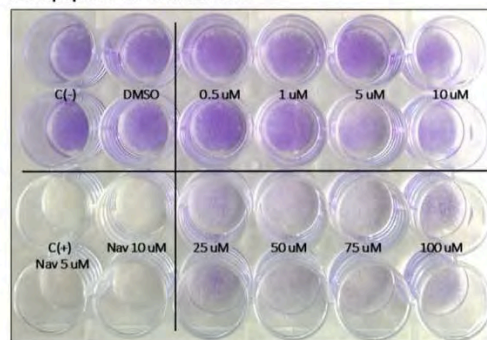


Figura 99. Análisis de la actividad senolítica del hexapéptido H14. Tinción cristal violeta de células senescentes frente a células control a diferentes concentraciones de péptido (panel superior). Imágenes microscópicas de células control y senescentes tratadas con hexapéptido H14 (panel inferior). Como controles positivos se utilizaron doxorubicina 0.5 μM para controles y navitoclax 10 μM para células senescentes.

Si bien los resultados que se presentan en esta tesis llegan hasta aquí, se sigue trabajando con los hexapéptidos **H8** y **H14** para comprobar si la actividad senolítica que han demostrado tener en la línea de melanoma SK-MEL-103 también se extiende a otras líneas celulares. Esto podría dar indicios de cuál podría ser su diana terapéutica de acción, confirmando si su efecto sobre la viabilidad celular está efectivamente relacionado con un estado de senescencia. Así pues, no sólo se están testando los hexapéptidos en otros modelos celulares, sino que también se ha iniciado la búsqueda de la posible diana implicada en el efecto senolítico. Entre los siguientes pasos a llevar a cabo también está el de trabajar sobre modificaciones de la secuencia y la conformación de los péptidos, con el objetivo de mejorar y optimizar su actividad y su farmacocinética en las

células e incluso de poder obtener compuestos derivados de los mismos. En vista de los resultados prometedores que se tienen hasta el momento, durante el desarrollo de esta tesis el grupo ha iniciado los trámites de solicitud de una patente con vistas a proteger las posibles drogas peptídicas con actividad senolítica. Por este motivo, las secuencias definidas de los hexapéptidos en cuestión, **H8** y **H14**, se mantienen por ahora bajo código.

4 | Conclusión

En la actualidad y debido al envejecimiento poblacional, existe un gran interés económico por el desarrollo de nuevos fármacos que mejoren la calidad de vida en pacientes de edad avanzada o con patologías relacionadas con la edad.

En el ámbito científico se ha demostrado muy recientemente en modelos animales que la acumulación de células senescentes contribuye al envejecimiento y a la progresión de enfermedades, así como que su eliminación mediante el uso de compuestos senolíticos puede ser terapéutica. En los últimos años se han desarrollado patentes y ensayos clínicos de moléculas pequeñas con actividad senolítica, si bien se trata en muchos casos de drogas con considerables efectos secundarios, con lo que el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas que conduzcan a la senolisis de forma segura sigue siendo un reto para la industria farmacéutica y cosmética.

En este contexto en este trabajo se han identificado dos péptidos de seis aminoácidos, **H8** y **H14**, que han demostrado tener actividad senolítica *in vitro* en la línea celular de melanoma humano SK-MEL-103.

Seguir desarrollando estos dos hexapéptidos con actividades senolíticas prometedoras podría llegar a permitir en un futuro la eliminación de células senescentes en dos tipos de situaciones: (i) en procesos de enfermedad ligada a envejecimiento en los que se ha demostrado la acción negativa de las células senescentes; (ii) en pacientes que se han sometido a tratamientos de quimioterapia que inducen senescencia, en los que la acumulación de células senescentes provoca efectos negativos a largo plazo (metástasis, enfermedades inflamatorias, etc).

Así pues las expectativas de la investigación van dirigidas a poder llegar a aplicar dichos compuestos (tanto éstos péptidos como moléculas derivadas de los mismos) en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el envejecimiento poblacional, así como en tratamientos dirigidos a disminuir los efectos secundarios de las quimioterapias en pacientes de cáncer.

5 | Sección experimental. Materiales y métodos

Líneas celulares y quimiotecas

La línea celular humana SK-MEL-103 (melanoma) se obtuvo de la ATCC y se mantuvo en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% (todo de Sigma). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en condiciones de O₂ 20% y CO₂ 5%. Para la inducción de senescencia, el medio de cultivo se suplementó con palbociclib (PD033299, Pfizer Inc.) a 5µM y se mantuvo durante 7 días.

La quimioteca con la que se trabajó fue una quimioteca combinatorial de hexapéptidos de D-aminoácidos (no se degradan en células), de la cual disponía el laboratorio de la Dra. Mar Orzaez y que estaba compuesta por un total de 120 mezclas peptídicas (stock de 3.9mM en agua 5% DMSO).

Tinción de actividad β-galactosidasa

Para llevar a cabo el ensayo de actividad β-galactosidasa asociada a senescencia se sembraron (en placa multipocillo de 6) células control y células senescentes a una densidad de 35000 y 30000 células/pocillo, respectivamente. Tras 24-48 horas en las que se dejó que las células se adhiriesen, se llevó a cabo el ensayo de tinción empleando el kit β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling). El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, incubándose las células toda la noche a 37°C con la solución de tinción (X-gal disuelto en N-N-dimetilformamida, pH 6).

Establecimiento de los controles positivos para los ensayos de viabilidad

Puesto que los ensayos biológicos asociados al rastreo de la quimioteca iban a ser ensayos de viabilidad (ya que la característica deseada para los péptidos era actividad senolítica), antes que nada se llevó a cabo un pre-ensayo en el que se establecieron las condiciones para los que serían los controles positivos a añadir en los ensayos biológicos a lo largo del rastreo. Se sembraron células control y células senescentes en placas multipocillo de 96, a unas densidades de 3500 y 5000 células (respectivamente) en 200µL de medio. Tras 24h, se añadieron los tratamientos: doxorubicina 0.5µM (Carbosynth) y navitoclax 10µM (ActiveBiochem) para las células control, y navitoclax 5 µM y 10 µM para las células senescentes. Como control interno positivo de muerte en este ensayo se utilizaron unos microlitros de lejía en ambas condiciones. Los tratamientos se dejaron incubar durante 48 horas, tiempo tras el cual se llevó a cabo la lectura de

la viabilidad celular utilizando el kit basado en luminiscencia CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega).

Rastreo posicional de la quimioteca completa

Para llevar a cabo los primeros ensayos de *screening* de la quimioteca completa, se probó la actividad de los hexapéptidos a tres concentraciones diferentes y considerablemente elevadas: 500, 600 y 700 μ M. Las células control y senescentes se sembraron de forma paralela en placas multipocillo de 96, a densidades de 3500 y 5000 células por pocillo en 200 μ L de DMEM (respectivamente). A las 24 horas se les añadió el tratamiento de hexapéptidos (concentración final en pocillo: 500-600-700 μ M), o bien los respectivos tratamientos con doxorubicina o navitoclax en el caso de los pocillos correspondientes a los controles positivos. En cada placa se incluyeron tanto controles positivos como negativos para validar las lecturas de viabilidades.

Los tratamientos se dejaron incubar con las células durante 48 horas, tiempo tras el cual directamente se hicieron las lecturas de viabilidad sobre cada placa con el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.

Ensayo de viabilidad con los hexapéptidos deconvolucionados

Los 18 hexapéptidos con secuencia definida (sintetizados a partir de la deconvolución de los resultados obtenidos del rastreo inicial de la quimioteca) se testaron de nuevo en ensayos de viabilidad para seguir estudiando su actividad senolítica. El procedimiento que se llevó a cabo de la misma forma que se ha descrito en el apartado anterior. Las células control y senescentes se sembraron en paralelo en placas de 96 pocillos: 3500 y 5000 células control y senescentes (respectivamente) por pocillo en 200 μ L de DMEM. Al día siguiente se añadieron los diferentes hexapéptidos sintetizados, que se probaron a dos concentraciones finales distintas: 50 μ M y 100 μ M. Igualmente se incluyeron controles positivos (doxorubicina para células control, navitoclax para células senescentes) y negativos en cada placa. Las disoluciones stock de hexapéptidos se prepararon en DMSO a una concentración de 13.5mM. Además se incluyó una placa extra en la que se añadió el tratamiento de hexapéptidos en ausencia de células, con el fin de descartar una posible señal basal de luminiscencia a la hora de realizar las lecturas de viabilidad.

Tras 48 horas de incubación de las células con los correspondientes tratamientos, se llevó a cabo la lectura de viabilidad de cada placa, utilizando el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.

Ensayo de validación por clonogenicidad

La validación final de la actividad senolítica de los dos hexapéptidos de secuencia definida seleccionados (**H8** y **H14**) se llevó a cabo mediante un ensayo de viabilidad basado en clonogenicidad. Para ello, se sembraron células control y células senescentes en placas de 24 pocillos, a unas densidades de 40000 células/mL y 21500 células/mL respectivamente. Al día siguiente, los dos hexapéptidos se probaron a diferentes concentraciones con el fin de obtener una curva de viabilidad. Partiendo de un stock de **H8/H14** de 13.5 mM en DMSO, las concentraciones finales estudiadas en placa fueron: 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 μ M. De la misma forma que en los ensayos anteriores, en cada placa se incluyeron pocillos a modo de control negativo y de control positivo, siendo los controles positivos doxorubicina 0.5 μ M y navitoclax 5 μ M para las placas de células control; y navitoclax 5 y 10 μ M para las placas de células senescentes.

Los hexapéptidos se dejaron actuar durante 48 horas. Tras el tiempo de incubación, el medio con los tratamientos se retiró y las células se lavaron varias veces con PBS. A continuación las células se fijaron con paraformaldehído 4% (15 minutos, temperatura ambiente), y tras lavarse nuevamente se añadió la disolución de cristal violeta (0.05%) para la tinción de las células que hubiesen quedado adheridas en placa. El cristal violeta se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 45 minutos. Finalmente se realizaron lavados seriados de las placas con agua del grifo para retirar el exceso de colorante no retenido en las células, y las placas se dejaron secar a temperatura ambiente antes de la visualización.

Capítulo VII •

Conclusiones y perspectivas

El desarrollo de sistemas de liberación controlada se ha convertido en un área de gran interés de la nanotecnología. De hecho han sido muchos los sistemas alternativos a las aproximaciones terapéuticas convencionales los que se han descrito durante los últimos años, gracias a la capacidad de la nanoformulación de mejorar el efecto terapéutico (dirigiéndolo, además, a la diana deseada) y de minimizar los posibles efectos secundarios de algunos de los fármacos actuales. Concretamente los materiales mesoporosos de sílice (MSNs) con puerta molecular, que pueden liberar bajo demanda las moléculas encapsuladas en su interior en presencia de estímulos específicos, han atraído considerable atención debido a su gran potencial de aplicación biomédica en el campo de la nanomedicina. Este potencial se debe en gran medida a las características únicas que presentan estos materiales, como son su elevada superficie y capacidad de carga, su no toxicidad (son biocompatibles) y su fácil funcionalización. De hecho, los MSNs surgen como herramienta prometedora a la hora de mejorar la solubilidad y la biodisponibilidad de los fármacos, así como para liberar cantidades exactas de compuestos en el lugar deseado.

El nanofármaco en el cual se basa esta tesis consiste en un nanodispositivo polivalente compuesto por un soporte mesoporoso funcionalizado con moléculas de azúcar que, tras el correspondiente estímulo externo, permiten la liberación controlada y selectiva de la carga encapsulada en el interior de los poros en células/tejidos en fase de senescencia.

Las células senescentes muestran un fenotipo radicalmente alterado que se cree que perjudica la función tisular. Estas células se acumulan en los tejidos, acelerando así el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades asociadas con la edad, como puede ser el cáncer. Puesto que existe un gran número de patologías asociadas al envejecimiento celular acelerado, surgen como fundamentales las estrategias terapéuticas que sean capaces de prevenir la aparición o de eliminar las células senescentes. En este contexto, la presente tesis pretende contribuir al desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos de senescencia, y la aproximación que se plantea para conseguir el objetivo de eliminar células senescentes es el desarrollo de un dispositivo capaz de liberar selectivamente su carga en dichas células.

Así pues, en el tercer Capítulo se presenta el diseño, el proceso de síntesis y la caracterización a nivel estructural del nanodispositivo propuesto. El sistema consiste en nanopartículas mesoporosas de sílice que contienen encapsulado en el interior bien un fluoróforo o bien un fármaco, y que están recubiertas con un galacto-oligo-sacárido que bloquea los poros actuando como puerta molecular e impidiendo la salida de las moléculas encapsuladas. Este sistema es capaz de mantener la carga en su interior hasta el momento en que la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal) está presente. En ese momento,

la enzima rompe los enlaces glicosídicos del galactosacárido, produciéndose así la liberación selectiva de la carga en células senescentes. Siguiendo este diseño se sintetizaron en total cinco sólidos diferentes, distintos únicamente entre sí en la carga encapsulada: **Gal-NP(Rho)**, con rodamina B; **Gal-NP(ICG)**, con verde de indocianina; **Gal-NP(Dox)**, con doxorubicina; **Gal-NP(Nav)**, con navitoclax; y **Gal-NP(0)**, sólido sin carga pero sí con galactosacárido. Los dos primeros sólidos se utilizarían como sistemas de detección al llevar fluoróforos como carga, mientras que los sólidos con los fármacos doxorubicina y navitoclax se utilizarían como sistemas terapéuticos. Por su parte, el sólido sin carga serviría para comprobar la biocompatibilidad del sistema y su inocuidad en el organismo. El conjunto de materiales se caracterizó mediante técnicas estándar para comprobar que mantenían las propiedades de los materiales mesoporosos; también se validaron a nivel *in vitro* para comprobar el correcto funcionamiento de la puerta molecular, poniéndolos para ello en presencia del estímulo enzimático capaz de hidrolizar el galactosacárido.

El Capítulo IV recoge la validación funcional (tanto *in vitro* en modelos celulares como *in vivo* en modelos de ratón) de los sólidos **Gal-NP(Rho)** y **Gal-NP(Dox)**, para lo cual se trabajó con dos modelos de patología. Por un lado se estudió el modelo de fibrosis pulmonar idiopática, una enfermedad crónica y progresiva con elevada mortalidad y pocas opciones de tratamiento, y cuya patogénesis se relaciona con una elevada senescencia y un envejecimiento pulmonar prematuro. Para inducir la fibrosis en el modelo se utilizó un tratamiento con bleomicina, y una vez desarrollada la enfermedad (y con ella la aparición de focos de células senescentes) se administraron las nanopartículas cargadas con el compuesto citotóxico doxorubicina. El otro escenario que se utilizó para la validación funcional de estas nanopartículas fue un modelo de cáncer en combinación con quimioterapia para inducir senescencia en el tumor. Se trabajó con xenoinjertos de melanoma en los que la inducción de senescencia se consiguió mediante el tratamiento con el fármaco palbociclib, de manera que una vez inducida la senescencia en las células cancerosas el modelo se trató con las nanopartículas **Gal-NP(Dox)**. La encapsulación del fármaco citotóxico doxorubicina demostró ser terapéutica en los tumores previamente tratados con palbociclib, así como en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Por un lado, la combinación de palbociclib y **Gal-NP(Dox)** consiguió reducir significativamente el volumen de los tumores tratados respecto al tamaño de partida, con la ventaja añadida de que la encapsulación del fármaco citotóxico no sólo era efectiva en la eliminación de las células senescentes, sino que era capaz de reducir la cardiotoxicidad asociada a la doxorubicina (su principal efecto secundario). En el modelo de fibrosis, el tratamiento con **Gal-NP(Dox)** mejoró significativamente la elasticidad pulmonar, consiguiendo restaurar la funcionalidad de los pulmones gracias a la eliminación de las áreas focales de células senescentes. Además también se validaron en ambos modelos las nanopartículas **Gal-NP(Rho)** cargadas con

fluoróforo, comprobándose que efectivamente el sistema liberaba su contenido de manera preferencial en células senescentes y demostrándose por tanto que el nanosistema se podría utilizar para aplicaciones de detección de senescencia por imagen *in vivo*.

En el Capítulo V se recoge el estudio del efecto de las nanopartículas **Gal-NP(ICG)**, **Gal-NP(Nav)** y **Gal-NP(O)** en combinación con el inductor de senescencia palbociclib, en este caso en un modelo ortotópico de cáncer de mama triple negativo. El TNBC se caracteriza por presentar una naturaleza agresiva y metastásica y, puesto que no responde a terapia hormonal, existen muy pocas opciones de tratamiento y terapias dirigidas específicas. Es por ello que su ratio de mortalidad es el más elevado dentro de los diferentes subtipos de cáncer de mama. Disponer de un modelo ortotópico e inmunocompetente que reproduce muchas de las características del TNBC en humanos planteaba el escenario ideal para estudiar el efecto de las nanopartículas senolíticas en combinación con previa quimioterapia para inducir senescencia. Así pues, y puesto que en general los TNBC no responden a inhibidores de CDK4/6 como es el palbociclib para detener su proliferación, lo primero que se hizo fue evaluar si el modelo de células 4T1 de cáncer de mama triple negativas (y negativas para el receptor de andrógenos) presentaba sensibilidad al fármaco. Los resultados que se obtuvieron demostraron que tras el tratamiento con palbociclib se producía un arresto estable del ciclo celular y el estado de senescencia se inducía de forma eficiente, sugiriendo esto que existe cabida para la posible aplicación del tratamiento con palbociclib en nuevos subgrupos de pacientes con TNBC. Una vez puesto a punto el modelo de senescencia inducida se validó la respuesta tanto de las nanopartículas **Gal-NP(ICG)** como de las nanopartículas **Gal-NP(Nav)** en el modelo celular. El sistema cargado con el fluoróforo verde de indocianina demostró liberar su carga de manera preferencial en las células senescentes, tal y como mostraron los estudios de microscopía confocal y de citometría de flujo. Estos resultados vinieron acompañados por la inducción selectiva de muerte celular únicamente en aquellas células co-tratadas con palbociclib y **Gal-NP(Nav)**, obteniéndose el efecto senolítico del fármaco a concentraciones de navitoclax significativamente inferiores en comparación con su formulación en libre. Antes de llevar a cabo el siguiente paso y proceder a la validación funcional de las nanopartículas en el modelo murino, las nanopartículas **Gal-NP(O)** demostraron tener toxicidad cero al administrarse como tratamiento de 72 horas, puesto que las células mantenían su viabilidad en valores en torno al 100%. El tratamiento con palbociclib también demostró frenar el crecimiento tumoral en el modelo ortotópico de ratón, en el cual los estudios de imagen con las nanopartículas **Gal-NP(ICG)** confirmaron la acumulación preferencial del fluoróforo en aquellos tumores tratados con el inductor de senescencia. Finalmente, y en términos de tratamiento, las nanopartículas **Gal-NP(Nav)** dieron como resultado un beneficio terapéutico al administrarse en los ratones en combinación con palbociclib. La

senolisis dirigida mediante nano-formulación logró mejorar la eficacia antitumoral, así como reducir las metástasis y disminuir la toxicidad sistémica asociada al fármaco senolítico.

Para terminar, y teniendo en cuenta que actualmente no se dispone de ningún fármaco senolítico capaz de eliminar de manera efectiva cualquier tipo de célula senescente, el Capítulo VI de la presente tesis se centró en la búsqueda de nuevos compuestos potencialmente capaces de inducir la muerte selectiva de dichas células. La estrategia de búsqueda consistió en llevar a cabo el rastreo de una quimioteca de hexapéptidos, poniendo para ello primero a punto un modelo celular de senescencia en el que llevar a cabo los ensayos biológicos de selección y validación de los compuestos candidatos. En concreto, se trabajó con la línea de melanoma SK-MEL-103, en la cual se demostró que el palbociclib inducía eficientemente el arresto de ciclo celular. Tras llevar a cabo el cribado inicial de la quimioteca, se seleccionaron los diferentes aminoácidos candidatos para cada una de las seis posiciones del hexapéptido. La combinación de estos aminoácidos para cada una de las posiciones combinatorializadas dio lugar a la síntesis de 18 hexapéptidos de composición definida. De los ensayos de viabilidad realizados con estos compuestos, fueron dos los que mostraron diferencias de viabilidad entre células control y células senescentes. Así pues, con estos dos hexapéptidos se llevaron a cabo nuevos ensayos de viabilidad en un rango amplio de concentraciones, y en ambos casos los compuestos presentaron una actividad senolítica remarcable en los cultivos de SK-MEL-103 tratados con palbociclib. Si bien los estudios de la presente tesis finalizan en este punto, el trabajo con los dos candidatos sigue en marcha con el fin de estudiar su efecto en otros modelos celulares y de identificar su diana de acción.

Así pues, y teniendo en cuenta los objetivos generales de la tesis enumerados en el Capítulo II, así como los objetivos propuestos para cada uno de los Capítulos presentados, las conclusiones generales alcanzadas en el presente trabajo son las que se citan a continuación:

- ✓ Se ha sintetizado y optimizado un conjunto de cinco nanodispositivos mesoporosos para el *targeting* selectivo de células senescentes. Los materiales, cargados con diferentes fluoróforos/fármacos y funcionalizados con galactan, se han caracterizado estructuralmente mediante técnicas estándar y funcionalmente en presencia del estímulo de β -galactosidasa.
- ✓ Tanto en cultivo celular como en ratón se han puesto a punto los modelos de i) fibrosis pulmonar idiopática inducida por bleomicina y ii) senescencia inducida por palbociclib en xenoinjertos de melanoma. Las nanopartículas cargadas con el fluoróforo rodamina B y las nanopartículas cargadas con el fármaco citotóxico doxorrubicina se han validado tanto *in vitro* como *in vivo* en dichos

modelos, comprobándose su validez para la detección de células senescentes y para lograr los fines terapéuticos correspondientes para cada patología.

- ✓ Se ha puesto a punto un modelo de senescencia inducida por palbociclib a partir de una línea celular de cáncer de mama triple negativo, y posteriormente se ha puesto a punto el correspondiente modelo de ratón, inmunocompetente y ortotópico. El efecto senolítico del fármaco navitoclax en nano-formulación y en combinación con palbociclib se ha validado *in vivo* e *in vitro* en dichos modelos, y se ha comprobado la eficacia antitumoral de la combinación de senogénesis (palbociclib) y senólisis dirigida con el fármaco navitoclax encapsulado en las nanopartículas.
- ✓ Se ha realizado el rastreo posicional de una quimioteca de hexapéptidos en un modelo celular de senescencia previamente establecido para la búsqueda de compuestos con actividad senolítica. Tras establecer los correspondientes controles biológicos y realizar el rastreo, se han determinado las secuencias de los compuestos candidatos seleccionados en la criba y se han validado en el modelo celular los hexapéptidos de composición definida con actividad senolítica.

Puesto que existe un número considerable de enfermedades asociadas con un envejecimiento celular acelerado (como serían el síndrome de Werner, el síndrome de Hutchinson-Gilford, el síndrome de Rothmund Thompson, la disqueratosis congénita o la fibrosis pulmonar idiopática, entre otros), y está bien establecido que la incidencia de tumores malignos aumenta progresivamente con la edad, surgen como fundamentales aquellas estrategias que sean capaces de prevenir, reemplazar o eliminar células senescentes. En este contexto y en base a los resultados obtenidos, la conclusión global de la presente tesis es que los sistemas mesoporosos de sílice para liberación controlada se podrían utilizar como terapia y como punto de partida para el desarrollo de nuevos nanodispositivos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos de senescencia. La combinación de los fármacos tradicionales con la nanotecnología permite llevar a cabo nuevas funciones, como son la liberación de la carga bajo demanda y la funcionalización con agentes directores que permitan dirigir específicamente el sistema a la célula o tejido diana de interés, cosa que la terapia convencional es muy difícil que consiga.

Sin embargo, teniendo en cuenta que estos materiales se encuentran todavía en los estadios iniciales de su uso en aplicaciones biomédicas, todavía es necesario resolver algunas de sus debilidades y sobre todo analizar de manera completa sus efectos sobre el organismo. Los siguientes escalones implican el estudio en profundidad del ratio beneficio/riesgo del uso de estos dispositivos, así como seguir invirtiendo esfuerzos en investigación para poder finalmente llegar a regularizar el uso de estas nanomedicinas en aplicaciones clínicas. Se espera que

en un futuro cercano se consigan muchos nuevos avances en el campo de la liberación controlada y del diseño de nuevos sistemas inteligentes que permitan acercarse un poco más a la medicina de precisión. Esperamos pues que los resultados conseguidos en esta tesis abran nuevos caminos y oportunidades, e inspiren el desarrollo de nuevos nanomateriales para su aplicación tanto en el campo de la senescencia como en otras áreas de la biomedicina.

Gracias a la Generalitat Valenciana por concederme la ayuda pre-doctoral Vali+D, y al Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) por los contratos que me permitieron empezar y terminar este camino.

