

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Evaluación biológica en cultivos celulares y modelos animales del transporte dirigido de fármacos mediado por nuevos vectores antitumorales basados en ciclodextrinas



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Simona Plesselová

**Facultad de Farmacia
Universidad de Granada
2021**

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Simona Plesselova
ISBN: 978-84-1306-876-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/68573>

Esta Memoria ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada con la Ayuda para la Formación de Profesorado Universitario (FPU 15/034701) de Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Los gastos experimentales derivados de la misma han sido sufragados por los proyectos de investigación CTQ2014-55474-C2-2-R y CTQ2017-86125-P de Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.



Parte de los resultados que se recogen en esta Tesis Doctoral han sido presentados en los XL, 41 y 45 Congresos de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular y en los artículos:

- Ortega-Muñoz M, Vargas-Navarro P, Hernandez-Mateo F, Salinas-Castillo A, Capitan-Vallvey LF, Plesselova S, Salto-Gonzalez R, Giron-Gonzalez MD, Lopez-Jaramillo FJ, Santoyo-Gonzalez F, Acid anhydride coated carbon nanodots: activated platforms for engineering clicked (bio)nanoconstructs, *Nanoscale*, 2019, 11 (16): 7850-7856.
- Calar K, Plesselova S, Bhattacharya S, Jorgensen M, de la Puente P, Human Plasma-Derived 3D Cultures Model Breast Cancer Treatment Responses and Predict Clinically Effective Drug Treatment Concentrations, *Cancers*, 2020, 12 (7): 2072-6694.

ABREVIATURAS

A: adenina	Ig: inmunoglobulina
ABC: <i>ATP-binding cassette</i>	IGF-1: factor de crecimiento insulínico-1
AMP: adenosín monofosfato	IL: interleucina
APS: persulfato de amonio	IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ATP: adenosín trifosfato	IVIS: <i>In vivo imaging system</i>
BCG: bacilo de Calmette-Guérin	LB: Luria Bertani
BCRP: <i>breast cancer resistance protein</i>	MAPK: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
BFP: <i>blue fluorescent protein</i>	MDR: <i>multidrug resistance</i>
BP: bifosfonatos	MEM: <i>Minimum Essential Medium</i>
BRCA1/2: <i>breast cancer gene 1/2</i>	miRNA: microRNA
BSA: albúmina de suero bovino	mRNA: RNA mensajero
C: citosina	MRP: <i>multidrug resistance-associated proteins</i>
cAMP: adenosín monofosfato cíclico	MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
CD: ciclodextrina	NIR: <i>near infrared</i>
cDNA: DNA complementario	NK: <i>Natural Killer</i>
CFP: <i>cyan fluorescent protein</i>	NP: <i>nanopartícula(s)</i>
CNDs: Carbon Dots	OMS: Organización Mundial de la Salud
ctDNA: <i>circulating tumor DNA</i>	PAA: poliaspartato
CTLA-4: anticuerpo anti-citotóxico del antígeno T-linfocítico	PBS: <i>phosphate-buffered saline</i>
DEPC: dietilpirocarbonato	PCL: policaprolactona
DMEM: <i>Dulbeco's Modified Eagle Medium</i>	PCR: <i>polymerase chain reaction</i>
DMSO: dimetilsulfóxido	PDH: piruvato deshidrogenasa
DNA: ácido desoxirribonucleico	PDK: piruvato deshidrogenasa quinasa
ECM: matriz extracelular	PEG: polietilenglicol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	PEI: polietilenimina
EGF: factor de crecimiento epidermal	PET: <i>positron emission tomography</i>
EGFP: <i>enhanced green fluorescent protein</i>	PGA: ácido poliglutámico o poliglicólico
ERK: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>	P-gp: glicoproteína P
FBS: suero bovino fetal	PLA: ácido poliláctico
FDA: <i>Food and Drug Administration</i>	PLGA: ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico)
FRET: transferencia de energía de resonancia	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
G: guanina	PSA: antígeno prostático específico
GFP: <i>green fluorescent protein</i>	RISC: <i>RNA-induced silencing complex</i>
GFPwt: <i>green fluorescent protein wild type</i>	RMN: resonancia magnética nuclear
GLUT-1: <i>glucose transporter-1</i>	RNA: ácido ribonucleico
HA: ácido hialurónico	ROS: especies reactivas de oxígeno
HIF-1: <i>hypoxia inducible factor-1</i>	SDS: dodecil sulfato sódico
ICG: <i>indocyanine green</i>	sgRNA: RNA guía simple
IFN- α : interferon- α	shRNA: <i>short hairpin RNA</i>

siRNA: *small interfering RNA*
SPION: *nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro*
SPECT: *single photon-emission computed tomography*
T: timina
TBS: *Tris-buffered saline*
TC: tomografía computerizada
TE: tampón Tris-EDTA
TEMED: tetrametilendiamina
TGF- β : factor de crecimiento transformante- β
TGS: tampón Tris-Glicina-SDS
TIMP: inhibidores de las metaloproteasas tisulares
TME: microambiente tumoral
Tris: tampón tris(hidroximetil)aminometano
tRNA: RNA de transferencia
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
YFP: *yellow fluorescent protein*

ÍNDICE

1. RESUMEN/ ABSTRACT	17
2. INTRODUCCIÓN.....	23
3. ANTECEDENTES	31
3.1. Cáncer. Definición y epidemiología	31
3.2. Biología celular y molecular de cáncer y factores de riesgo.....	32
3.3. Microambiente tumoral	33
3.4. Diagnóstico del cáncer	34
3.4.1. Pruebas de laboratorio	35
3.4.2. Biopsia	35
3.4.3. Biopsia líquida.....	35
3.4.4. Técnicas de imagen.....	36
3.5. Tratamiento del cáncer	46
3.5.1. Cirugía.....	46
3.5.2. Radioterapia	46
3.5.3. Quimioterapia.....	47
3.5.4. Terapia Hormonal.....	53
3.5.5. Inmunoterapia.....	53
3.5.6. Terapia dirigida.....	54
3.6. Tipos de cáncer y su tratamiento	79
3.6.1. Cáncer de mama.....	79
3.6.2. Osteosarcoma.....	81
3.6.3. Cáncer colorrectal.....	82
3.6.4. Cáncer cervical.....	82
3.7. Modelos tridimensionales de cultivo celular.....	82
3.7.1. Diferencias entre los modelos bidimensionales y tridimensionales.....	83
3.7.2. La importancia de los cultivos tridimensionales en el estudio del cáncer.....	84
3.7.3. Tipos de cultivos tridimensionales.....	86
3.7.4. Organoides	91
4. OBJETIVOS	95
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
5.1. Materiales	99
5.1.1. Instrumentación	99
5.1.2. Líneas celulares.....	100
5.1.3. Animales de experimentación	101
5.1.4. Material para el cultivo de células.....	101
5.1.5. Material para la manipulación de ácidos nucleicos.....	102
5.1.6. Material para la manipulación de proteínas.....	106
5.1.7. Programas informáticos	106
5.2. Métodos	108
5.2.1. Métodos de cultivo y manipulación de bacterias	108
5.2.2. Métodos de cultivo, manipulación y observación de células eucariotas.....	108
5.2.3. Técnicas para el análisis de ácidos nucleicos.....	114
5.2.4. Técnicas para el análisis de proteínas.....	117
5.2.5. Síntesis de nanopartículas	119
5.2.6. Determinación del tamaño de las nanopartículas.....	119
5.2.7. Extractos mitocondriales	119
5.2.8. Ensayos en modelos <i>in vivo</i>	119
5.2.9. Análisis estadístico.....	120
6. RESULTADOS.....	123
6.1. Nanopartículas poliméricas basadas en polietilenimina	123

6.2.	Bifosfonatos como moléculas directoras hacia el osteosarcoma y metástasis óseas	128
6.3.	Ácido hialurónico como molécula directora hacia el cáncer de mama triple negativo....	143
6.4.	Ensayos en modelos 3D de cáncer de mama derivados de plasma humano (HuP3D).....	163
6.5.	Carbohidratos como moléculas directoras hacia distintos tipos de tumores	175
7.	DISCUSIÓN	187
7.1.	Bifosfonatos como moléculas directoras hacia el osteosarcoma.....	189
7.2.	Ácido hialurónico como molécula directora hacia el cáncer de mama triple negativo y el cáncer de cérvix uterino	194
7.3.	Modelos tridimensionales de cáncer de mama derivados del plasma humano (HuP3D)	197
8.	CONCLUSIONES	207
9.	BIBLIOGRAFÍA	211

1.RESUMEN/ABSTRACT

1. RESUMEN/ ABSTRACT

A pesar de los grandes avances en los últimos años en las técnicas de diagnóstico y en el tratamiento, el cáncer sigue siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial, provocando un gran impacto socio-económico. Por lo tanto, es importante el diagnóstico temprano del cáncer para planificar el tratamiento y disminuir su mortalidad. (1–3) Asimismo, en muchos tipos de cáncer se producen resistencias al tratamiento lo que origina la progresión tumoral y el agravamiento de la enfermedad, sumados a los numerosos efectos secundarios que presentan los agentes quimioterapéuticos, como es la cardiotoxicidad de la doxorubicina, lo que disminuye la calidad de la vida de los pacientes oncológicos. (1–3) Sería necesario el desarrollo de nuevos agentes de diagnóstico y tratamientos específicos y personalizados para el tratamiento del cáncer. (4) Una solución atractiva pueden ser los agentes teragnósticos que permiten simultáneamente el diagnóstico y el tratamiento del cáncer mediante el uso de nanopartículas unidas a sondas fluorescentes para el diagnóstico y monitorización en tiempo real; a agentes terapéuticos como son los fármacos quimioterapéuticos o el material genético para la terapia génica y a moléculas directoras para el transporte dirigido hacia las dianas moleculares sobre-expresadas específicamente en las células tumorales. (5–7) Además, en la terapia génica es necesario el desarrollo de nuevos vectores de transfección específicos, eficaces y menos tóxicos. (8,9)

En la presente tesis, hemos realizado la evaluación biológica de diversos agentes teragnósticos específicos para el diagnóstico y el tratamiento de tumores que actualmente presentan un mal pronóstico y problemas de resistencias y recurrencias como son el cáncer de mama triple negativo, el osteosarcoma o el cáncer de cérvix uterino. (10–12)

Para ello, se han ensayado los agentes teragnósticos PEI-NIR-780, que permiten simultáneamente el diagnóstico específico gracias a la sonda NIR-780 que fluoresce en el infrarrojo cercano (NIR, *near infrared*) y la terapia génica gracias a la polietilenimina (PEI) que permite establecer fuerzas electrostáticas con el material genético a través de sus aminas secundarias y terciarias. (13,14) La fluorescencia en el infrarrojo cercano permite el diagnóstico del cáncer en estadios tempranos debido a su alta sensibilidad, permitiendo la posibilidad de diagnóstico *in vivo* y evitando la autofluorescencia de los tejidos. Las sondas NIR-780 presentan además la capacidad de transporte dirigido específicamente hacia las células tumorales. (15,16) En la presente tesis, hemos demostrado que estas nanopartículas tienen una buena capacidad de unión al DNA, protección de la degradación de las DNAsas, una baja citotoxicidad y una buena eficiencia de transfección.

Además, permiten su funcionalización con β -ciclodextrinas para la inclusión de agentes quimioterapéuticos poco solubles como es la doxorubicina para aumentar su solubilidad, permitiendo su liberación controlada y favoreciendo su transporte dirigido hacia las células tumorales. (17,18) Asimismo, las aminas secundarias y terciarias de PEI han permitido su funcionalización con moléculas directoras como bifosfonatos o ácido hialurónico para su transporte dirigido y específico hacia sus dianas moleculares sobre-expresadas en los tejidos tumorales.

RESUMEN

Las nanopartículas de PEI recubiertas con bifosfonatos (PEI-BP) han demostrado su capacidad de transporte dirigido específico de la doxorubicina hacia los osteosarcomas y las metástasis óseas causadas por el cáncer de mama triple negativo, debido a su afinidad por el hidroxapatito, el principal constituyente del tejido óseo, y de los agentes de diagnóstico como es la indocianina green en los modelos animales con xenografts de ambos tipos de cáncer. Además, estas nanopartículas pueden dirigir el agente terapéutico hacia las mitocondrias, como un mecanismo alternativo de citotoxicidad en las células tumorales resistentes al tratamiento. (19)

Por otra parte, las nanopartículas PEI-NIR-780 recubiertas con el ácido hialurónico (HA) de 40-50 kDa han demostrado la capacidad de diagnóstico específico y transporte dirigido de la doxorubicina y del material genético tanto en los cultivos celulares como en los modelos animales de cáncer de mama triple negativo, que sobre-expresa los receptores CD44 específicos para HA. (20) Asimismo, hemos demostrado que estas nanopartículas son versátiles y permiten actuar como agentes teragnósticos también en otros tipos de cáncer CD44+, como es el cáncer cervical y, además, son capaces de evitar la cardiotoxicidad asociada al uso de la doxorubicina.

Por tanto, hemos demostrado que nuestros agentes teragnósticos son nanosistemas multifuncionales que permiten el tratamiento y el diagnóstico específicos y selectivos del cáncer, al dirigir específicamente y de forma eficiente el agente terapéutico (material genético y/o fármaco quimioterapéutico) al tejido tumoral sin afectar los tejidos sanos y permitiendo una monitorización del proceso en tiempo real.

Además, a pesar de que existen diferentes sub-tipos de cáncer de mama, en la práctica clínica se administra un tratamiento estándar en todas las pacientes (21) y se ha demostrado que las interacciones de las células tumorales con el microambiente tumoral interfieren en la eficacia terapéutica y en las resistencias al tratamiento. (22) Por tanto, hemos realizado un cribado de siete fármacos quimioterapéuticos comúnmente utilizados en la terapia clínica en cinco sub-tipos de células de cáncer de mama cultivadas en el modelo tridimensional de plasma humano (HuP3D) y hemos demostrado que el microambiente tumoral interfiere en la respuesta terapéutica originando una gran heterogeneidad y la necesidad de utilizar distintos parámetros para la evaluación de la eficacia terapéutica de los fármacos. Asimismo, se ha observado que las nanopartículas PEI-NIR-780 recubiertas con el ácido hialurónico permiten un transporte dirigido y diagnóstico específicos en las células de cáncer de mama triple negativo cultivadas en HuP3D.

Por último, hemos ensayado nuevos agentes de diagnóstico basados en las sondas fluorescentes NIR-783 y en las nanopartículas fluorescentes Carbon Dots conjugadas con los carbohidratos manosa, lactosa, N-acetilglucosamina y glucosa y hemos demostrado su baja citotoxicidad y su especificidad hacia las células tumorales que sobre-expresan los receptores GLUT1, galectina-3 y asialoglicoproteínas.

Despite the great advances in recent years in cancer diagnostics and treatment, it is still the second cause of death worldwide, having a great socio-economic impact. Therefore, early diagnosis of cancer is important to plan the treatment and reduce its mortality. (1–3) Furthermore, there is drug resistance in many types of cancer, which causes tumor progression and recurrences. Also, chemotherapeutic drugs have associated many serious side effects, such as the cardiotoxicity of doxorubicin, which reduces the life quality of cancer patients. (1–3) Therefore, it will be necessary to develop new diagnostic agents and specific and personalized treatments to overcome these issues. (4) Theragnostic reagents might be an attractive solution because they allow simultaneous cancer diagnosis and treatment through the use of nanoparticles attached to fluorescent probes for real-time diagnosis and monitoring; to therapeutic agents such as chemotherapeutic drugs or genetic material for gene therapy and to targeting molecules for specific transport to molecular targets overexpressed in tumor cells. (5–7) Furthermore, gene therapy requires the development of new specific, efficient, and less toxic transfection vectors. (8,9)

In this thesis, we have carried out the biological evaluation of various specific theragnostic reagents for the diagnosis and treatment of tumors that currently have a poor prognosis and high resistance and recurrence levels, such as triple-negative breast cancer, osteosarcoma, and cervical cancer. (10–12)

For this purpose, the PEI-NIR-780 theragnostic agents have been tested, which simultaneously allow specific diagnosis thanks to the NIR-780 probe that fluoresces in the near-infrared spectrum and gene therapy thanks to polyethyleneimine (PEI) that can establish electrostatic forces with genetic material through its secondary and tertiary amines. (13,14) The near-infrared fluorescence allows the cancer diagnosis in the early stages due to its high sensitivity, allowing the possibility of *in vivo* diagnosis and avoiding the tissue autofluorescence. Also, the NIR-780 probe can target specifically to tumor cells. (15,16) In the present thesis, we have shown that these nanoparticles have good DNA binding capacity, protection from DNase degradation, low cytotoxicity, and good transfection efficiency.

Also, they allow its functionalization with β -cyclodextrins for the inclusion of poorly soluble chemotherapeutic drugs such as doxorubicin to increase its solubility, allowing its controlled release and targeting towards tumor cells. (17,18) Likewise, the secondary and tertiary amines of PEI have allowed their functionalization with bioligands such as bisphosphonates or hyaluronic acid for their targeted and specific transport to their molecular targets overexpressed in tumor tissues.

The nanoparticles coated with bisphosphonates (PEI-BP) have demonstrated specific targeting of doxorubicin towards osteosarcomas and bone metastases caused by triple-negative breast cancer, due to their affinity for hydroxyapatite, the main constituent of bone tissue, and specific transport of diagnostic agents such as indocyanine green in animal models with xenografts of both cancer types. Besides, these nanoparticles can direct the therapeutic agents towards the mitochondria, as an alternative mechanism of cytotoxicity in tumor cells resistant to treatment. (19)

On the other hand, PEI-NIR-780 nanoparticles coated with hyaluronic acid (HA) of 40-50 kDa have demonstrated the capacity for specific diagnosis and targeted transport of doxorubicin and genetic material in cell cultures and animal models of

ABSTRACT

triple-negative breast cancer, over-expressing HA-specific CD44 receptors. (20) Furthermore, we have shown that these nanoparticles are versatile and can act as theragnostic reagents also in other types of CD44 + cancer, such as cervical cancer, and, also, they can avoid the cardiotoxicity associated with the use of doxorubicin.

Therefore, we have shown that our theragnostic agents are multifunctional nanosystems that allow the specific and selective cancer treatment and diagnosis by specifically and efficiently targeting the therapeutic agent (genetic material and/or chemotherapeutic drug) to tumor tissue without affecting healthy cells and allow real-time monitorization.

In addition, a standard clinical treatment is used in all breast cancer patients even though different molecular sub-types can be resistant to the treatment. (21) Also, it has been shown that the interactions of tumor cells with the tumor microenvironment interfere with the therapeutic efficacy and can cause drug resistance. (22) Therefore, we have screened seven chemotherapeutic drugs commonly used in clinical therapy in five breast cancer cells sub-types cultured in the three-dimensional model of human plasma (HuP3D) and we have shown that the tumor microenvironment interferes in the therapeutic response, causing great heterogeneity and the need to use different parameters for the evaluation of the drug efficacy. Likewise, it has been observed that PEI-NIR-780 nanoparticles coated with hyaluronic acid allow specific targeting and diagnosis in triple-negative breast cancer cells cultured in HuP3D.

Finally, we have tested new diagnostic agents based on the fluorescent NIR-783 probes and the fluorescent Carbon Dots nanoparticles conjugated with the carbohydrates such as mannose, lactose, glucose, and N-acetylglucosamine and we have demonstrated their low cytotoxicity and their specificity towards tumor cells that overexpress the GLUT-1, galectin-3, and asialoglycoproteins receptors.

2.INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer engloba un conjunto de enfermedades caracterizadas por un crecimiento y división descontrolados de células, con capacidad de diseminarse y formar metástasis. Este crecimiento es originado por alteraciones genéticas que pueden ser hereditarias o inducidas por factores externos ambientales, estilo de vida y envejecimiento. Hoy en día, el cáncer es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, principalmente en estadios avanzados, debido a la formación de metástasis en órganos vitales y, además, tiene un gran impacto socio-económico. Por lo tanto, el diagnóstico temprano del cáncer es importante para planificar el tratamiento y disminuir su progresión y mortalidad. (1–3)

En los últimos años, las técnicas de imagen se han convertido en una herramienta importante en el diagnóstico y en la investigación del cáncer. Son técnicas no invasivas que permiten el estudio morfológico, estructural, metabólico y funcional del tejido tumoral, tanto en su lugar primario de origen como en las metástasis. Además, estas técnicas de imagen se pueden utilizar para una monitorización en tiempo real y para la planificación de las estrategias terapéuticas y el control de la respuesta del paciente a la terapia, con el objetivo de evitar recurrencias y generar una medicina más personalizada. (1–3)

Actualmente, las técnicas de diagnóstico disponibles en la práctica clínica (la ecografía, la resonancia magnética nuclear, la tomografía computerizada, la tomografía por emisión de positrones y la tomografía computerizada monofotónica) son muy efectivas, aunque presentan limitaciones, como son la exposición del paciente a radiaciones ionizantes, el uso de contrastes que pueden resultar tóxicos, una resolución espacial limitada, un tiempo y un coste elevados, la inaccesibilidad de algunas zonas del cuerpo, etc. (2,23) Además de las técnicas de diagnóstico anteriores, en la investigación biomédica y en los estudios histopatológicos de las biopsias tumorales, se emplean sistemas de visualización óptica basados o bien en bioluminiscencia o bien en fluorescencia, utilizando distintos tipos de marcaje y sondas que permiten observar las estructuras celulares y los procesos biológicos de interés sin necesidad de irradiar al paciente y utilizar contrastes tóxicos y a veces poco sensibles. (2,23)

Las técnicas basadas en fluorescencia son técnicas de bajo coste que permiten obtener imágenes de alto rendimiento y de alta sensibilidad, con una buena resolución espacial en el rango de las longitudes de onda ultravioleta-infrarrojo cercano (NIR, near infrared). La detección de fluorescencia en la región visible está limitada debido a la autofluorescencia tisular originada por la dispersión de los fotones por parte del tejido, la absorción de luz por parte de las proteínas de la muestra y la interferencia de las moléculas de agua. El uso de la luz a longitudes de onda de infrarrojo cercano supera algunas de estas limitaciones *in vivo*, permitiendo la penetración en los tejidos hasta algunos centímetros y reduciendo la autofluorescencia y la dispersión tisular. (7)

En los últimos años, la investigación basada en la fluorescencia en el infrarrojo cercano está recibiendo un mayor interés para el diagnóstico del cáncer en el estadio temprano debido a su alta sensibilidad, permitiendo la posibilidad de diagnóstico *in vivo*. La indocianina green, la única sonda NIR aprobada para su uso clínico, presenta una baja fotoestabilidad, una descomposición rápida en las soluciones acuosas y una baja

INTRODUCCIÓN

capacidad de dirigirse hacia los tumores, dando lugar a una fluorescencia inespecífica en los tejidos sanos. (15,16) Por ello, se han desarrollado nuevos análogos como son las sondas de cianina de heptametina (por ejemplo, NIR-780) que son colorantes biodisponibles y bioestables con baja toxicidad *in vivo* que presentan la capacidad inherente de dirigirse y acumularse específicamente en los tumores durante periodos de tiempo extendidos sin afectar a las células sanas, lo que permite su uso para la visualización, la terapia dirigida y el transporte de fármacos en varios tipos de cáncer. (16)

Además de técnicas de diagnóstico adecuadas, es necesaria la implementación de tratamientos específicos y con escasos efectos secundarios para los pacientes. Así, se han desarrollado diversos tratamientos para frenar el crecimiento y la división descontrolada de las células tumorales, prevenir las recidivas o para aliviar los síntomas asociados al cáncer. La terapia tradicional en la práctica clínica consiste en la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia o la combinación de ellas. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos no siempre es suficiente, debido a las resistencias que se originan en las células tumorales y la frecuencia de las recurrencias, que conllevan la progresión tumoral y el agravamiento de la enfermedad. Además, estas terapias pueden presentar graves limitaciones como son (I) los efectos secundarios de los agentes quimioterapéuticos sobre las células sanas, que originan alopecia, náuseas, vómitos, debilidad, inmunodepresión, pérdida de fertilidad, etc., (II) la imposibilidad de extirpar zonas de vital importancia mediante la cirugía y los efectos psicológicos que causa la desfiguración de algunas zonas del cuerpo (por ejemplo la extirpación del tejido mamario) y (III) el daño local y las lesiones cutáneas producidas por la radioterapia en los tejidos sanos adyacentes. (6,24,25)

Uno de los agentes quimioterapéuticos más empleados es la doxorubicina, una antraciclina de amplio espectro utilizada para el tratamiento de numerosos tipos de tumores tanto sólidos como hematológicos. Su principal limitación es que origina cardiotoxicidad a largo plazo que puede dar lugar a fallo cardíaco. Asimismo, existen resistencias a doxorubicina en numerosos tipos de cáncer debido a la sobre-expresión de la glicoproteína P en la superficie de las células tumorales que causa el bombeo activo del fármaco hacia el exterior celular. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan un tratamiento específico de los tumores, evitando los efectos secundarios sobre las células sanas, las resistencias al tratamiento, las dificultades en la formulación farmacéutica y los problemas farmacocinéticos de los agentes quimioterapéuticos. (4)

Además, en las últimas décadas se ha desarrollado la terapia génica, cuyo pilar más importante es la introducción del material genético exógeno (genes, miRNA, siRNA, etc.) en el interior de las células tumorales, mediante la técnica denominada transfección, con la finalidad de editar los genes diana, modular su expresión o la síntesis de las proteínas defectuosas. (8) Los métodos de transfección consisten en el uso de vectores virales o de vectores no virales basados en lípidos o polímeros catiónicos. Mientras que los vectores virales son muy eficientes, presentan problemas de inmunogenicidad, una carga limitada, carcinogénesis y la dificultad de preparación a gran escala (9), por lo que el uso de los compuestos de transfección de naturaleza química ha recobrado un creciente interés en los últimos años, debido a una mayor seguridad, menor coste y facilidad de preparación. Sin embargo, estos compuestos

presentan una menor eficiencia de transfección y un mayor aclaramiento renal antes de alcanzar los tejidos diana cuando se administran por vía sistémica. Por tanto, hoy en día, permanece como uno de los principales objetivos de la terapia génica el encontrar nuevos vectores de transfección eficientes que sean capaces de proteger y llevar el material genético a las células diana donde se pueda expresar de manera eficaz. (9,26)

En los últimos años, la comprensión de las bases moleculares y genéticas del cáncer ha permitido desarrollar nuevas estrategias específicas y selectivas basadas en la terapia dirigida hacia las dianas moleculares que se encuentran mutadas o sobre-expresadas en los tejidos tumorales, como son, entre otros, receptores, factores de crecimiento, moléculas de señalización intra y extracelulares y moduladores de la apoptosis. Estas estrategias se basan en el uso de las nanopartículas dotadas con moléculas directoras (anticuerpos, carbohidratos, glicoproteínas, polímeros, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, etc.) que reconocen específicamente las dianas moleculares tumorales. (27,28)

Para una terapia dirigida, las nanopartículas de mayor interés son las poliméricas que son biocompatibles y biodegradables y proporcionan una mayor homogeneidad de tamaño, permiten controlar y modificar sus propiedades fisicoquímicas, favorecen la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos y presentan una mayor carga útil que el resto de las nanopartículas. Además, las nanopartículas poliméricas permiten el transporte sinérgico de varios agentes terapéuticos (material genético y fármacos), aumentar el tiempo de vida media del fármaco en el torrente sanguíneo y favorecer su estabilidad. Asimismo, la capacidad de decorar su superficie con las moléculas directoras, permite que estas nanopartículas aumenten la entrada del fármaco en las células tumorales, su especificidad y por tanto disminuyan los efectos tóxicos en las células sanas. Por último, permiten una liberación controlada del fármaco por difusión a través de la matriz polimérica o por la degradación de la nanopartícula. (7,29)

La polietilenimina (PEI) es un polímero catiónico que se puede utilizar para la síntesis de las nanopartículas poliméricas ya que presenta aminas primarias, secundarias y terciarias que pueden protonarse a pH fisiológico y unirse al DNA a través de fuerzas electrostáticas con los grupos fosfato del material genético. (13) Una de las ventajas de presentar un número elevado de aminas, es que permiten su fácil funcionalización con moléculas directoras de distinta naturaleza para la terapia dirigida. Asimismo, es fácil de fabricar, presenta una baja inmunogenicidad y permite la unión de una gran variedad de material genético. (14)

Por otra parte, para transportar los fármacos antitumorales que presentan baja solubilidad en agua, como es la doxorubicina, se pueden utilizar las nanopartículas basadas en las ciclodextrinas (CD) que son oligosacáridos cíclicos naturales que presentan una forma de cono truncado con la cara exterior hidrofílica y una cavidad interna hidrofóbica que permite la inclusión de los fármacos no hidrosolubles en su interior. (17,18) La principal desventaja de las ciclodextrinas es que debido a los numerosos grupos hidroxilo de su estructura, tienen dificultad de atravesar las membranas biológicas lipofílicas y adicionalmente, y a pesar de ser moléculas hidrofílicas, su solubilidad en agua está limitada debido a las fuertes uniones que existen en su estructura cristalina. (18)

INTRODUCCIÓN

Además, con el objetivo de mejorar y aunar la terapia dirigida y el diagnóstico del cáncer se han desarrollado los agentes teragnósticos que permiten al mismo tiempo el tratamiento y el diagnóstico de la enfermedad. Estos agentes incluyen en la nanopartícula de origen lipídico, organometálico o polimérico (I) una molécula directora para el transporte selectivo y específico, (II) un agente terapéutico que puede ser fármaco quimioterapéutico o material genético para la terapia génica y (III) un agente para el diagnóstico por imagen con propiedades ópticas, radioactivas o magnéticas (sondas fluorescentes, quantum dots, materiales paramagnéticos, radionúclidos, etc.). Cabe destacar que los propios agentes terapéuticos pueden actuar como agentes para la visualización por técnicas de imagen, como es el caso de la doxorubicina que se excita a 480 nm y emite fluorescencia a 590 nm. Además, existen nanopartículas que presentan la capacidad inherente de diagnóstico sin necesidad de unión de otras sondas (por ejemplo, Carbon Dots). (5–7)

Por tanto, el desarrollo de agentes teragnósticos pretende crear nanosistemas multifuncionales para el tratamiento y el diagnóstico específico, selectivo y personalizado del cáncer al dirigir específicamente y de forma eficiente el agente terapéutico al tejido tumoral sin afectar los tejidos sanos y permitiendo una monitorización del proceso en tiempo real. (30)

A pesar de los grandes avances en este campo, todavía quedan muchos retos por superar en la investigación y en el desarrollo de agentes teragnósticos, debido a sus limitaciones que consisten en la complejidad de su estructura lo que dificulta su elaboración, purificación y preparación a gran escala, problemas de toxicidad, comportamiento imprevisible *in vivo*, así como una reproducibilidad limitada en los ensayos y en la síntesis de las nanopartículas y problemas en la esterilización. Asimismo, es necesario identificar las moléculas directoras adecuadas y su densidad óptima en la superficie de la nanopartícula para asegurar un transporte específico y selectivo hacia el tejido tumoral. (31) El principal reto para el futuro es la selección de la mejor nanoplataforma, aumentar la eficiencia de conjugación de la molécula directora, mejorar las técnicas de síntesis, aumentar la reproducibilidad en los ensayos y disminuir el coste. (30)

En la presente tesis proponemos el desarrollo de distintas nanopartículas que sirvan como agentes teragnósticos para distintos tipos de tumores que actualmente presentan un mal pronóstico o problemas de resistencias como son el cáncer de mama triple negativo, osteosarcoma, cáncer de cérvix uterino o el carcinoma colorrectal. El cáncer de mama es la principal causa de la muerte en las mujeres y la esperanza de vida en el estadio IV del cáncer de mama triple negativo es menos de un año. (20) El osteosarcoma es el cáncer de huesos más frecuente, sin embargo, el 80% de los pacientes desarrollan metástasis en los primeros meses después de la cirugía y su tasa de supervivencia es menor del 20%. (32–34) El cáncer de cérvix uterino sigue siendo una de las principales causas de la muerte en las mujeres y la tasa de supervivencia al año del diagnóstico en los estadios avanzados es del 10-20%. (35–37) El cáncer colorrectal es el tercero más común en el mundo y se considera incurable cuando alcanza la fase metastásica. La tasa de supervivencia a 5 años es solo del 12,5%. (10–12)

Por estas razones, en esta tesis se han abordado las primeras etapas en el desarrollo de nuevas alternativas que permitan el diagnóstico y el tratamiento de estos tipos de cáncer, con el objetivo de disminuir las resistencias y mejorar la supervivencia

y la calidad de vida de los pacientes. Así, hemos desarrollado nanopartículas de distinta naturaleza: organometálicas (Carbon Dots), poliméricas (polietilenimina), oligosacáridos (ciclodextrinas) y mixtas (polietilenimina-ciclodextrina) como estrategia para un diagnóstico específico y tratamiento dirigido hacia las dianas moleculares sobre-expresadas en los tejidos tumorales.

Los Carbon Dots son nanopartículas de carbono esféricas (<10 nm) fáciles de preparar, biocompatibles, con baja toxicidad, buena estabilidad y con propiedades de excitación y fluorescencia modificables que permiten la monitorización *in vivo*. (38–40) Su superficie ha sido funcionalizada con carbohidratos como N-acetilglucosamina, manosa y lactosa con el objetivo de estudiar las interacciones específicas carbohidratos-lectinas, un tipo de receptores sobre-expresados en numerosos tipos de cáncer, como es el cáncer cervical, cáncer colorrectal, hepatocarcinoma, etc.

Asimismo, hemos sintetizado unas nanopartículas basadas en la polietilenimina ramificada de bajo peso molecular (PEI 2 kDa) como vector de transfección para la terapia génica. Con el objetivo de conseguir efectos sinérgicos para la terapia génica y la terapia dirigida específica, se han unido cuatro moléculas de β -ciclodextrinas a PEI, para favorecer la inclusión de la doxorubicina como agente quimioterapéutico. Además, estas nanopartículas podrían actuar como agentes teragnósticos gracias a la incorporación de una sonda fluorescente en el infrarrojo cercano (NIR-780) en su estructura.

La superficie de estas nanopartículas ha sido recubierta con moléculas directoras como son el ácido hialurónico o los bifosfonatos, para lograr un transporte dirigido y específico hacia las dianas moleculares sobre-expresadas en los tejidos tumorales, evitando los efectos secundarios de la quimioterapia y permitiendo reducir la dosis del agente terapéutico.

El ácido hialurónico es un polímero aniónico biodegradable, biocompatible y no inmunogénico que se une específicamente al receptor CD44 sobre-expresado en el cáncer de mama triple negativo y el cáncer cervical, entre otros. (41,42) Los bifosfonatos son análogos naturales del pirofosfato que presentan una gran afinidad por el hidroxapatito, el componente principal en los huesos, por lo que permitiría un transporte dirigido de las nanopartículas para el tratamiento del osteosarcoma y metástasis en el hueso. También es importante señalar que, en el cáncer de mama, numerosos procesos metastásicos van acompañados de una calcificación de la metástasis por lo que los bifosfonatos pueden actuar como moléculas directoras para este tipo de células metastásicas. (43)

En la investigación de nuevos fármacos antitumorales suelen existir discrepancias entre los resultados obtenidos en cultivos celulares en monocapa tradicionalmente utilizados para el cribado de nuevos compuestos y los resultados clínicos obtenidos en los pacientes. Solo un 10% de los fármacos pasan a la clínica ya que la mayoría de los compuestos fallan sobretodo en la fase III, la fase más cara de los ensayos clínicos, debido a una falta de eficacia terapéutica o una toxicidad inaceptable. Una parte de este fracaso se debe a que los resultados de los ensayos en cultivos bidimensionales no son extrapolables a los pacientes, debido a que la respuesta celular a los fármacos se ve modificada al estar en su ambiente natural. Es por ello necesario establecer sistemas que puedan reproducir mejor los comportamientos celulares *in*

INTRODUCCIÓN

vivo. Asimismo, existe la limitación de generar modelos animales de las enfermedades humanas debido a las diferencias inter-especies, la falta de predictibilidad y los problemas éticos asociados. (44,45)

Por esa razón, hemos realizado ensayos de validación de distintos fármacos quimioterapéuticos y de las nanopartículas recubiertas con el ácido hialurónico en modelos tridimensionales basados en el plasma de las pacientes (HuP3D) de cáncer de mama con el objetivo de estudiar las dosis más efectivas y las posibles resistencias. Los tejidos tridimensionales formados a partir del plasma humano, recrean el microambiente tumoral que está involucrado en la proliferación celular, las resistencias a fármacos y la evasión del sistema inmune de los tumores. Así, se representa de una forma más fiable el ambiente heterogéneo del tumor que en los cultivos celulares tradicionales y permite un tratamiento personalizado para los pacientes con quimioterapia.

3.ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

3.1. Cáncer. Definición y epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer como un conjunto de enfermedades causadas por un crecimiento descontrolado de células malignas, que puede originarse en cualquier órgano o tejido y puede invadir las partes adyacentes u otros órganos del cuerpo mediante un proceso denominado metástasis. (46)

Actualmente, el cáncer es la segunda causa de la muerte a nivel mundial. En el año 2020 se diagnosticaron aproximadamente 19,3 millones de casos nuevos en el mundo con 9,9 millones de defunciones y se espera un aumento de hasta 29,5 millones de casos nuevos para el año 2040 (Figura 3.1.). Según la última actualización de la OMS, el gasto relacionado con el cáncer en el año 2010 fue de 1,16 billones de dólares americanos. (47)

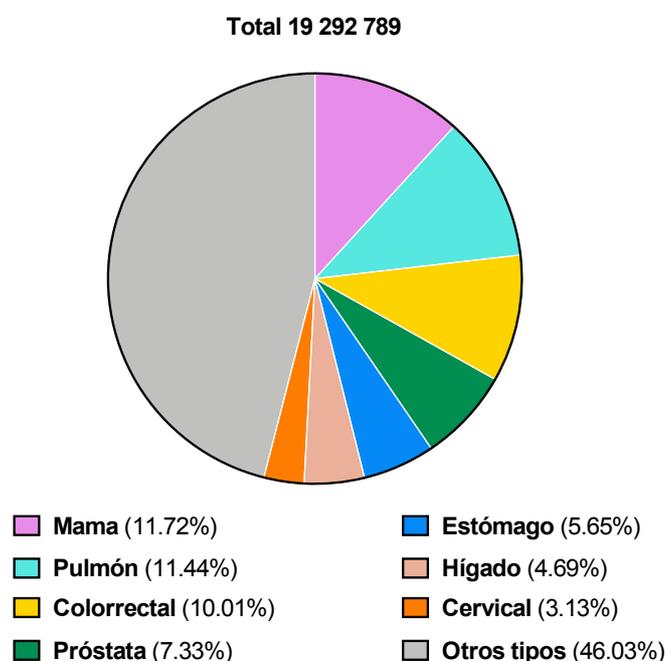


Figura 3.1. Incidencia de cáncer a nivel mundial. Gráfica adaptada de la Organización Mundial de la Salud. (47)

En España, según la Asociación Española Contra el Cáncer, la incidencia fue de 281478 casos nuevos en el año 2020 y 112075 muertes. El cáncer más frecuente en las mujeres es el cáncer de mama (29% de los casos), seguido del cáncer colorrectal (14%), de pulmón (6%), de útero (6%) y de ovario (4,3%). En los hombres, el cáncer más frecuente es el cáncer de próstata (20% de casos), seguido del de pulmón (13%), colorrectal (15%), de vejiga (9%) y de estómago (4%). (48)

3.2. Biología celular y molecular de cáncer y factores de riesgo

La carcinogénesis, es decir la formación de tumores, es un proceso complejo que empieza por la aparición de cambios moleculares y fenotípicos en las células y las alteraciones en la estructura de los tejidos, para formar nódulos pre-neoplásicos que darán lugar al desarrollo del tumor. Estos cambios fenotípicos están asociados con la transición epitelio-mesénquima (la conversión de las células epiteliales en las células mesenquimales) y la migración celular, que originan regiones de hipoxia y de angiogénesis para favorecer la supervivencia y la propagación de las células madre tumorales. (3)

Los tumores pueden originarse a partir de una única célula dañina (tumores monoclonales) o a partir de varias células (tumores policlonales). Además, cada tumor puede estar formado por diferentes sub-poblaciones celulares, ya que las células cancerosas son genéticamente susceptibles de sufrir una reprogramación y mutaciones en su material genético, lo que puede influir en la eficacia del tratamiento. (49)

Durante el desarrollo tumoral, se ven afectados los procesos de crecimiento y división celular que están regulados por numerosas vías de señalización y mecanismos encargados de mantener la homeostasis en condiciones fisiológicas. En las células sanas, el ciclo celular está controlado principalmente por dos tipos de genes, los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores, que conjuntamente participan en el mantenimiento de la estructura y el correcto funcionamiento de los tejidos y los órganos. Los proto-oncogenes codifican para las proteínas encargadas de mandar o recibir señales estimuladoras de crecimiento de las células y los tejidos. Normalmente, se trata de factores de crecimiento que se unen a sus receptores específicos en la superficie celular y estimulan las vías de señalización, favoreciendo la activación de la división celular. Cuando se encuentran mutados, dan lugar a oncogenes que originan un crecimiento y división celular descontrolados. Por otra parte, los genes supresores de tumores intervienen en la parada del ciclo celular, por lo que, cuando se origina una mutación en este tipo de genes, no se produce la inhibición de la división celular favoreciendo la multiplicación de células tumorales. (49,50)

Asimismo, existen otros sistemas que participan en mantener el correcto funcionamiento del ciclo celular como son el sistema reparador del DNA, el suicidio programado y el número limitado de divisiones celulares. El sistema de reparación del DNA es capaz de detectar y corregir los errores producidos durante la replicación o por la acción de los factores carcinógenos externos. Además, cuando se produce un daño irreversible en un componente esencial de la célula o en las vías de señalización encargadas del control, el sistema basado en el gen p53 induce el suicidio programado de la célula dañada mediante el proceso denominado apoptosis. Las mutaciones en ambos mecanismos dan lugar a una desregulación en el ciclo celular de las células tumorales y la evasión de la muerte programada, lo que favorece el crecimiento del tumor. Por último, las secuencias de DNA presentes en los extremos de los cromosomas, denominadas telómeros, limitan el número de veces que una célula es capaz de dividirse, ya que se acortan con cada replicación cromosómica hasta mandar una señal de parada de la división celular. Las células tumorales sobre-expresan la telomerasa, una enzima capaz de evitar el acortamiento de los telómeros y, por tanto, son capaces de dividirse de manera infinita. En resumen, las mutaciones y los cambios epigenéticos en

estos mecanismos en las células tumorales, originan la supervivencia, la división descontrolada y la propagación del tumor. (50)

La reprogramación y la transformación de las células sanas en las células tumorales es el resultado de una interacción de factores genéticos con factores externos físicos, químicos o biológicos, el estilo de vida y el envejecimiento. Los factores genéticos son las mutaciones que se originan en el material genético y las alteraciones en la replicación de las células afectando las vías de señalización, los mecanismos de control, el metabolismo, el fenotipo y la función celular. Estos factores pueden ser hereditarios (por ejemplo, las mutaciones en los genes BRCA1/2 en el cáncer de mama y de ovarios). (50)

Entre los factores físicos destacan las radiaciones ionizantes y ultravioleta (la exposición al sol) y entre los factores químicos, la exposición a agentes químicos tóxicos como son el arsénico, el amianto, el alcohol y el humo de tabaco. Además, existen factores biológicos como son bacterias, hongos y virus que favorecen la formación del tejido tumoral (infecciones por *Helicobacter pylori* (cáncer de estómago), *Papilomavirus humano* (cáncer de cérvix uterino) y hepatitis B y C (cáncer de hígado)). (49,50)

Otro de los factores importantes que puede favorecer la formación de los tumores es el envejecimiento, ya que con la edad se acumulan los factores de riesgo en el organismo y se altera el mecanismo de reparación celular. (50)

En definitiva, a parte de los factores genéticos que pueden ser hereditarios y son difíciles de controlar, existen factores cancerígenos externos como son la alimentación, la ocupación profesional, los hábitos y el estilo de vida que participan en el desarrollo del cáncer y la exposición a ellos puede ser controlada. (49,50)

3.3. Microambiente tumoral

Los tumores presentan un microambiente heterogéneo complejo formado por células tumorales, células estromales, matriz extracelular y otros componentes, cuyas interacciones favorecen la proliferación y la progresión tumoral. El estroma en el microambiente tumoral es esencial para proporcionar los nutrientes y dar soporte a las células cancerosas y está formado por distintos tipos celulares como son fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmune (células dendríticas, neutrófilos, células NK, linfocitos T y B, macrófagos, etc.). Asimismo, el estroma contiene factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas y anticuerpos. Las interacciones entre las células tumorales y los componentes estromales del microambiente tumoral tienen un impacto en la proliferación y la progresión del tumor (Figura 3.2.). (51–53)

La matriz extracelular (ECM) está formada por una red de macromoléculas proteicas como son las proteínas estructurales, las glicoproteínas y los proteoglicanos. Es muy dinámica y participa en varios procesos celulares como es la proliferación, la migración y el crecimiento, proporcionando un apoyo estructural para mantener la arquitectura del tejido y el soporte nutricional para las células. Además, controla la entrada de los factores de crecimiento y las citoquinas, favoreciendo la comunicación intercelular. Asimismo, participa en la formación de la membrana basal junto con las células epiteliales, endoteliales y estromales. (52,53)

ANTECEDENTES

En el microambiente tumoral, la matriz extracelular se encuentra en forma desorganizada y no regulada desde el punto de vista de propiedades bioquímicas, físicas y estructurales. Está formada por grandes cantidades de colágeno y de metaloproteasas de matriz y proteoglicanos con un mayor grado de entrecruzamiento, por lo que el estroma tumoral presenta una mayor rigidez que favorece el crecimiento celular. Asimismo, permite la transformación de las células madre en las células malignas y su posterior expansión. La degradación de la ECM por las metaloproteasas favorece la migración de los vasos sanguíneos y la liberación de los factores angiogénicos retenidos en su interior. (52,53)

Los fibroblastos son células mesenquimales del tejido conjuntivo que participan en la remodelación de la matriz extracelular, la regulación de la inflamación y la cicatrización. En el microambiente tumoral, a diferencia de los fibroblastos de los tejidos sanos, presentan un fenotipo diferente, con una elevada expresión de proteínas de la matriz y una secreción alterada de las enzimas proteolíticas que favorecen la invasividad de las células tumorales. Asimismo, participan en la proliferación, la migración, la invasión, la inmunosupresión tumoral y la secreción de los factores pro-inflamatorios. (52,53)

Por otra parte, el tejido adiposo constituye una parte importante en el microambiente tumoral en varios tipos de tumores invasivos, participando en el aislamiento térmico y como fuente de energía. Se ha demostrado que las células tumorales en presencia de los adipocitos presentan una mayor tasa de crecimiento. Los adipocitos asociados al cáncer favorecen el crecimiento y el desarrollo tumoral mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como es IL-6, TNF- α y IL-1 β que favorecen la infiltración de los macrófagos y la secreción de las sustancias para la progresión tumoral. (52,53)

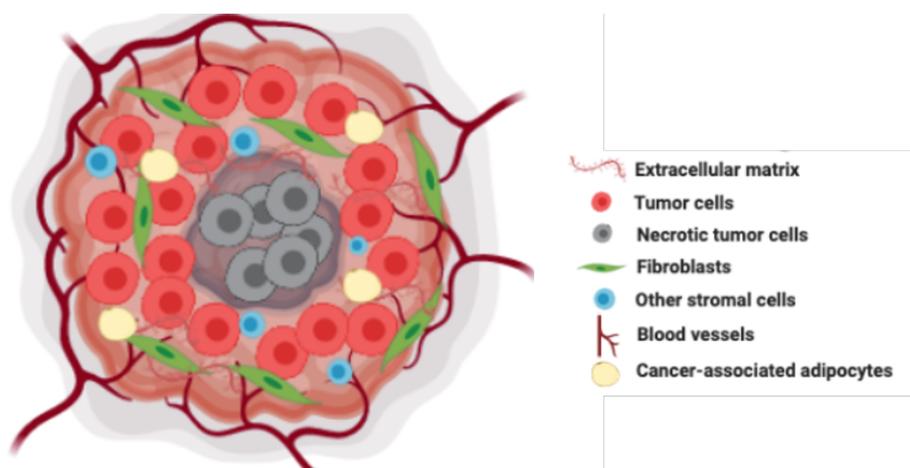


Figura 3.2. Esquema de los principales componentes del microambiente tumoral y su contribución en la progresión tumoral.

3.4. Diagnóstico del cáncer

La detección temprana del cáncer es muy importante para planificar el tratamiento y disminuir la mortalidad. El diagnóstico se basa en la identificación del sitio de origen y el tipo de malignidad de las células implicadas en su formación, ya que

ambos factores pueden determinar cómo se va a desarrollar el tumor, que síntomas se podrán originar y la posibilidad de formar metástasis. Para ello, se pueden realizar pruebas de laboratorio, estudios histológicos de biopsia, biopsia líquida o técnicas de imagen. (54) A continuación se presenta un breve resumen de las técnicas de diagnóstico, centrándonos en las técnicas de imagen que son el objetivo de la presente tesis.

3.4.1. Pruebas de laboratorio

Se basan en el análisis de sangre, orina u otros fluidos corporales y permiten la detección de sustancias propias de los tumores. Entre las pruebas de laboratorio más comunes se encuentran el análisis bioquímico de sangre, el análisis citogenético para detectar cambios en el número o en la estructura del material genético en glóbulos blancos o en las células de médula ósea, la citología de orina y de esputo para detectar la presencia de las células tumorales, las pruebas de mutaciones genéticas tumorales (BRCA1/2 en el cáncer de mama y ovario) y, por último, la detección de biomarcadores tumorales presentes en sangre, orina o en líquido cefalorraquídeo que pueden ser asociados con la presencia del tumor (p.ej. el antígeno específico de próstata (PSA), una glicoproteína cuya secreción se encuentra elevada en el cáncer de próstata). (55)

3.4.2. Biopsia

El principal objetivo de la biopsia es la extracción de una muestra de tejido tumoral que es analizada por un patólogo y permite obtener información acerca del tipo histológico de las células tumorales, la clasificación, el estadio del tumor y su potencial agresividad. La biopsia se puede realizar o bien con una aguja de aspiración de médula ósea, punción lumbar, biopsia del seno, próstata o hígado, o bien mediante una endoscopia. (54)

3.4.3. Biopsia líquida

En los últimos años, se ha desarrollado la técnica de biopsia líquida que permite la detección de las células tumorales circulantes y del DNA tumoral circulante (ctDNA) en la sangre. Durante la formación y el crecimiento de los tumores primarios y las metástasis en el cáncer de mama, colon, pulmón y próstata, existen células tumorales que se liberan al torrente sanguíneo y que pueden ser aisladas, identificadas morfológicamente y estudiadas molecularmente. Además, es posible detectar el ctDNA liberado a la circulación sanguínea durante la apoptosis y la necrosis de los tumores invasivos, gracias a las mutaciones que presenta. Ambos factores son importantes para determinar el pronóstico en muchos tipos de tumores y actúan como un indicador previo para la respuesta al tratamiento y posibles resistencias a medicamentos quimioterapéuticos. (56)

3.4.4. Técnicas de imagen

Las técnicas de imagen se han convertido en una herramienta importante en el diagnóstico, los ensayos clínicos y la investigación del cáncer, ya que permiten detectar el tumor primario y las metástasis y aportan la información morfológica, estructural, metabólica y funcional del tejido tumoral. Además, se trata de técnicas no invasivas que permiten una monitorización en tiempo real e intervienen en la determinación del estadio del tumor y la prognosis. Asimismo, sirven para el cribado de fármacos antitumorales, la planificación de las estrategias terapéuticas y en el control de la respuesta a la terapia, evitando las recurrencias y dando lugar a una medicina más personalizada. (1–3)

Actualmente, en la práctica clínica existen seis tipos de técnicas para el diagnóstico y la determinación del estadio del cáncer, que son I) la tomografía computarizada (TC) basada en rayos X, (II) la resonancia magnética nuclear (RMN) que utiliza ondas electromagnéticas, (III) la tomografía por emisión de positrones (PET) que se basa en la visualización por radionúclidos, (IV) la tomografía computerizada monofotónica (SPECT) que utiliza rayos gamma, (V) la ecografía que emplea ondas sonoras de alta energía, y por último, (VI) las técnicas de imagen óptica. (23) Las principales características, ventajas e inconvenientes de las técnicas utilizadas actualmente en la práctica clínica se recogen en la Tabla 1, centrándonos en las técnicas de imagen óptica empleadas en nuestro laboratorio.

3.4.4.1. Técnicas utilizadas en la práctica clínica

La tomografía computerizada (TC) utiliza rayos X para producir imágenes transversales del cuerpo más detalladas que con la radiografía convencional, permitiendo obtener imágenes tridimensionales de huesos, tejidos blandos y vasos sanguíneos, usando contrastes de yodo o bario. El principal inconveniente es la exposición del paciente a las radiaciones ionizantes. (23)

La resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en la aplicación de un campo magnético a una determinada frecuencia que excita los átomos de hidrógeno en los tejidos, obteniéndose una señal de radiofrecuencia cuando vuelven a su estado de equilibrio que es detectada y transformada en una imagen. El nivel de relajación de los átomos de hidrógeno es diferente en cada tejido, lo que permite observar las diferencias entre ellos. Como agentes de contraste se utilizan una gran variedad de metales paramagnéticos o superparamagnéticos como óxidos de hierro y gadolinio que interactúan con el campo magnético externo para mejorar la visibilidad de las estructuras, alterando el tiempo de relajación de los átomos en los tejidos. Esta técnica es muy utilizada en la práctica clínica, ya que tiene una alta resolución espacial y un buen contraste en los tejidos blandos sin límite de penetración. Además, aporta información funcional como la permeabilidad vascular, la oxigenación tisular y el metabolismo celular usando la espectroscopia de resonancia magnética, pero tiene un coste y un tiempo de diagnóstico elevados e imposibilidad de su uso en los pacientes con implantes metálicos. (7,57)

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica también muy utilizada debido a su alta sensibilidad sin límites de penetración, pero tiene un coste

elevado y una resolución espacial limitada comparando con la RMN. En la práctica clínica proyecta imágenes de las zonas de alto metabolismo de glucosa, como ocurre en los tumores, utilizando la glucosa radioactiva. Los radionúclidos empleados en investigación pueden ser los radioisótopos ^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{76}Br , ^{111}In y ^{90}Y . (7,57)

TÉCNICA	CONTRASTE	RESOLUCIÓN ESPACIAL	TIEMPO DE EJECUCIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
TC	Moléculas marcadas con ^{53}I	50 μm	Minutos	Alta resolución, sin límite de penetración, pacientes con implantes	Radiación ionizante
RMN	Óxidos de Fe, óxidos de Mn, Gd, ^{19}F	10-100 μm	Minutos-horas	Alta resolución, sin límite de penetración, resultados cuantitativos	Elevado tiempo y coste, solo en pacientes sin implantes
PET	^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{15}O	1-2 mm	Minutos-horas	Alta sensibilidad, sin límite de penetración, resultados cuantitativos, visualizar procesos bioquímicos	Radiación, elevado coste y baja resolución
SPECT	^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$	1-2 mm	Minutos-horas	Alta sensibilidad, sin límite de penetración, resultados cuantitativos, menor coste	Radiación y baja resolución
Ultrasonidos	Micro o nanoburbujas	50 μm	Segundos-minutos	Alta resolución, bajo coste, facilidad de manejo, no radiación	Baja penetración (cm), inaccesibilidad

Tabla 1. Principales características, ventajas e inconvenientes de las técnicas de imagen usadas en el diagnóstico clínico. (7)

La tomografía computerizada monofotónica (SPECT), basada en rayos gamma, utiliza los radionúclidos ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{201}Tl , ^{67}Ga y permite la visualización tridimensional proporcionando respuestas fisiológicas y funcionales más que detalles anatómicos. (2) Las técnicas PET y SPECT tienen una elevada sensibilidad, una penetración ilimitada en la profundidad tisular y permiten utilizar una gran variedad de sondas. El principal inconveniente es la exposición del paciente a la radiación, lo que puede limitar el número de exposiciones y presentan una baja resolución espacial y alto coste. (58)

ANTECEDENTES

La técnica de ultrasonidos se basa en el uso de sonidos de una frecuencia de 1-10 MHz para visualizar los músculos, los tendones y los órganos internos con el objetivo de conocer su tamaño, estructura y lesiones patológicas en tiempo real. Además, permite ver la elasticidad de los tejidos, que se encuentra disminuida en los tumores, por lo que es una técnica útil en el diagnóstico del cáncer de mama o el cáncer de próstata. Esta técnica tiene una alta resolución y menor precio que PET y RMN, pero una menor penetración en la profundidad de los tejidos y muchas partes del organismo son inaccesibles. (8,10)

El principal inconveniente de estas técnicas es que la mayoría deben utilizar los medios de contraste inyectados de forma intravenosa y su posterior eliminación por aclaramiento renal con los efectos secundarios asociados a ello. Los agentes de contraste utilizados tradicionalmente suelen ser poco sensibles y poco específicos. Además, las técnicas TC, RMN, PET y SPECT son las únicas que permiten la visualización tridimensional del tumor, pero tienen un elevado coste y tiempo de ejecución. (23)

3.4.4.2. Técnicas de imagen óptica

Por otra parte, las técnicas de imagen óptica se utilizan en la práctica clínica solamente en la visualización endoscópica superficial o basada en el uso de catéteres debido a la absorción y la dispersión de luz por los tejidos y los fluidos corporales y, por tanto, cobra su mayor interés en la investigación preclínica o en el estudio histopatológico de las biopsias de los tumores. (2) Existen numerosos sistemas para la visualización óptica basados o bien en la bioluminiscencia o bien en la fluorescencia, utilizando distintos tipos de marcaje y sondas que permiten observar las estructuras celulares y los procesos biológicos de interés, sin necesidad de irradiar al paciente y utilizar los contrastes que pueden ser tóxicos y poco sensibles.

a) Sistemas ópticos basados en fluorescencia

En el estudio histológico y en la investigación biomédica, las técnicas de imagen óptica de mayor interés son las técnicas basadas en fluorescencia que permiten un escaneo en el espectro visible y en el infrarrojo cercano para obtener imágenes de alto rendimiento y de alta sensibilidad gracias a que muchas biomoléculas presentan la capacidad de fluorescer cuando se excitan con luz ultravioleta o visible (aminoácidos, proteínas y lípidos). Los fotones emitidos por estas biomoléculas u otras sondas fluorescentes administradas externamente se pueden usar para la visualización mediante los sistemas ópticos basados en la detección de fluorescencia, como son los microscopios de fluorescencia (de amplio campo, de multifotones o confocal de barrido de láser) o los sistemas de detección macroscópicos. (59)

En el microscopio de fluorescencia de campo amplio, el fluoróforo en la muestra se excita mediante la luz a una determinada longitud de onda usando fuentes de mercurio, láseres o luces LED y los filtros de excitación y emisión. Se trata de una técnica de bajo coste que proporciona una buena resolución en dimensión XY, permite una rápida resolución temporal y requiere una cantidad pequeña de luz de excitación. (1)

La microscopia multifotónica permite alcanzar la profundidad de hasta 800 μm y aporta información tridimensional de la luz emitida por los objetos marcados

diferencialmente con fluorescencia, ya que presenta múltiples canales de detección y proporciona una visualización de alta resolución espacial. Además, permite una cuantificación relativa de la señal de fluorescencia *in vivo*, pero se puede usar para obtener los parámetros cuantitativos de la migración celular intravascular e intersticial como son la velocidad, el desplazamiento, el tiempo de persistencia y los índices de movilidad. (1)

La microscopía confocal de barrido láser es capaz de recolectar imágenes multispectrales de alta calidad y observar los procesos fisiológicos en las células o los tejidos vivos. A diferencia del microscopio de fluorescencia de campo amplio que recoge la luz emitida de múltiples planos focales, en la microscopía confocal existe un orificio (*pinhole*) que filtra la luz del láser y permite que solo la luz de un plano de enfoque llegue al detector, por lo que se disminuye la detección de la luz fuera del foco, mejorando la calidad de la imagen y evitando la señal propia del fondo. Además, permite una reconstrucción tridimensional debido a la exploración de diferentes planos en el eje Z y presenta un manejo fácil y menor coste que la microscopía multifotónica (Figura 3.3). (1,60)

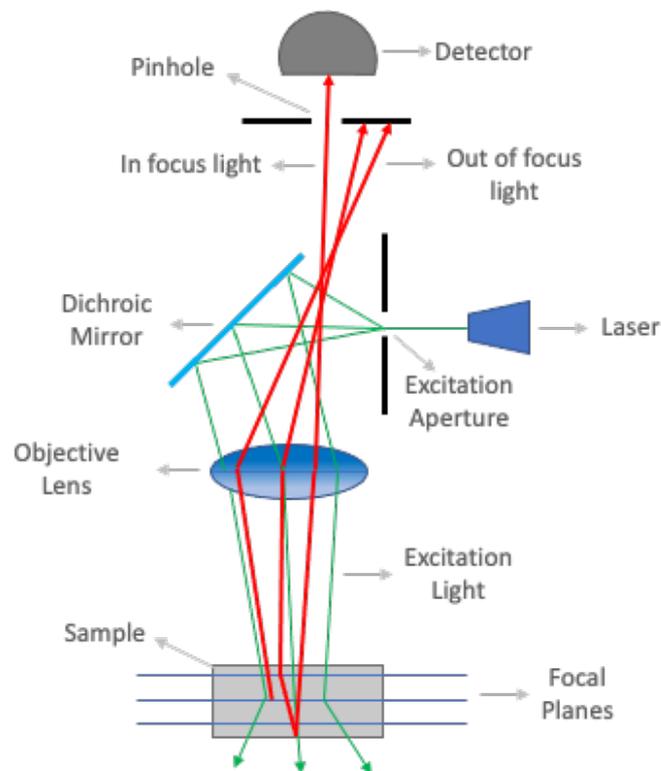


Figura 3.3. Esquema del funcionamiento del microscopio confocal. La presencia del agujero "pinhole" permite la filtración de luz procedente solamente del foco, evitando la entrada de luz fuera del foco. Además, el microscopio confocal permite el barrido de la muestra en distintos planos del eje "Z", por lo que favorece la visualización en tres dimensiones. (1,60)

Por otra parte, existen sistemas de imagen por fluorescencia macroscópicos que permiten una visualización de fluorescencia en los animales de experimentación o en los órganos extraídos marcados con sondas fluorescentes. Se trata de sistemas basados en reflectancia fluorescente o fluorescencia tomográfica. La reflectancia fluorescente

ANTECEDENTES

permite obtener imágenes bidimensionales para la visualización de eventos en la superficie de los *xenografts* y en los órganos expuestos tras la cirugía. Estos sistemas tienen una baja resolución de penetración (3-5 mm) y no son cuantitativos. Los sistemas de fluorescencia tomográficos (el sistema IVIS utilizado en la presente tesis) constituyen mapas tridimensionales de fluorocromos en base a unos algoritmos sofisticados y permiten la cuantificación de la señal. Además, reconstruyen la fluorescencia permitiendo que las proteínas fluorescentes o células modificadas genéticamente puedan ser detectadas *in vivo*. (1)

En general, las técnicas ópticas basadas en la detección de fluorescencia son técnicas de bajo coste con una buena resolución espacial en el rango de las longitudes de onda ultravioleta-infrarrojo cercano (NIR). La detección de la fluorescencia en la región visible presenta el inconveniente de una elevada señal de fondo debido a la dispersión de fotones y la autofluorescencia del tejido, la absorción de la luz por parte de las proteínas de la muestra y la interferencia de las moléculas de agua. El uso de luz a las longitudes de onda del infrarrojo cercano supera algunas de estas limitaciones *in vivo*, permitiendo la penetración en los tejidos hasta algunos centímetros y reduciendo la autofluorescencia y la dispersión tisular. (7)

La capacidad de distinguir las células sanas de las células tumorales *in vivo* mediante las técnicas de diagnóstico por imagen óptica es un proceso difícil, por lo que es necesario marcar las células y las moléculas de interés con sondas fluorescentes o sistemas reporteros. A continuación, se presenta un resumen de las principales sondas y sistemas reporteros utilizados en la presente tesis.

b) Sondas fluorescentes en el infrarrojo cercano (NIR)

En los últimos años, la investigación basada en fluorescencia en el infrarrojo cercano ha cobrado un mayor interés para el diagnóstico del cáncer en el estadio temprano debido a su alta sensibilidad. Para ello, se han desarrollado varias sondas como la indocianina green (ICG) y sus análogos (las cianinas de heptametina). Estas sondas presentan coeficientes de extinción elevados y una gran capacidad de emisión de fluorescencia en el rango entre 700 y 1000 nm, permitiendo la posibilidad de diagnóstico *in vivo*. Su estructura general está formada por cadenas polimetílicas y un átomo de nitrógeno que da lugar a un heterociclo conjugado (Figura 3.4.), aunque se han realizado varias modificaciones para optimizar y modificar sus características y su espectro. (15,16) Sus máximos de excitación y emisión se recogen en la Tabla 2.

Sonda	Peso molecular	λ_{\max}	λ_{\max}
		Absorción (nm)	Emisión (nm)
ICG	775	780	812
IR-780	667	777	823
IR-783	750	766	782

Tabla 2. Longitudes de onda máximas de excitación y de emisión de las principales sondas de infrarrojo cercano utilizadas en la presente tesis.

La indocianina green es la única sonda NIR aprobada por la FDA para su uso clínico, aunque presenta varias limitaciones como son una baja fotoestabilidad, autoagregación, una rápida descomposición en soluciones polares, un bajo rendimiento cuántico y una baja capacidad de dirigirse hacia los tumores, dando lugar a una fluorescencia de alta intensidad en los tejidos sanos. (15,16)

Por ello, se han desarrollado nuevos análogos como son las sondas de cianina de heptametina (NIR-780, NIR-783, NIR-808, NIR-820 y MHI-148). Se trata de sondas biodisponibles y bioestables que fluorescen en el infrarrojo cercano y presentan la capacidad de dirigirse específicamente y acumularse en los tumores durante periodos de tiempo extendidos sin afectar a las células sanas, lo que permite su uso para la visualización, la terapia dirigida y el transporte de fármacos en varios tipos de cáncer. Además, proporcionan una alta señal, una mínima autofluorescencia de la muestra y un alto rendimiento cuántico. (15) Asimismo, no presentan toxicidad cuando se administran por vía sistémica en los animales de experimentación en dosis apropiadas, lo que favorece su uso en investigación *in vivo*. (16)

En la internalización de estas sondas en las células tumorales intervienen varios factores como son los transportadores de polipéptidos orgánicos aniónicos (OATPs), el alto potencial de la membrana mitocondrial y la hipoxia en las células tumorales. Los OATPs son los transportadores implicados en el transporte de compuestos anfífilicos, ácidos biliares, hormonas, xenobióticos y sus metabolitos y se encuentran sobreexpresados en las células tumorales. Algunas sondas como NIR780-ioduro y NIR780-mostaza nitrogenada son capaces de acumularse en las mitocondrias de las células tumorales, lo que les confiere la capacidad citotóxica, debido a la alteración del metabolismo mitocondrial, activando la apoptosis endógena. Además, su transporte específico hacia los tumores se produce gracias a la hipoxia existente en el microambiente tumoral. (15,16)

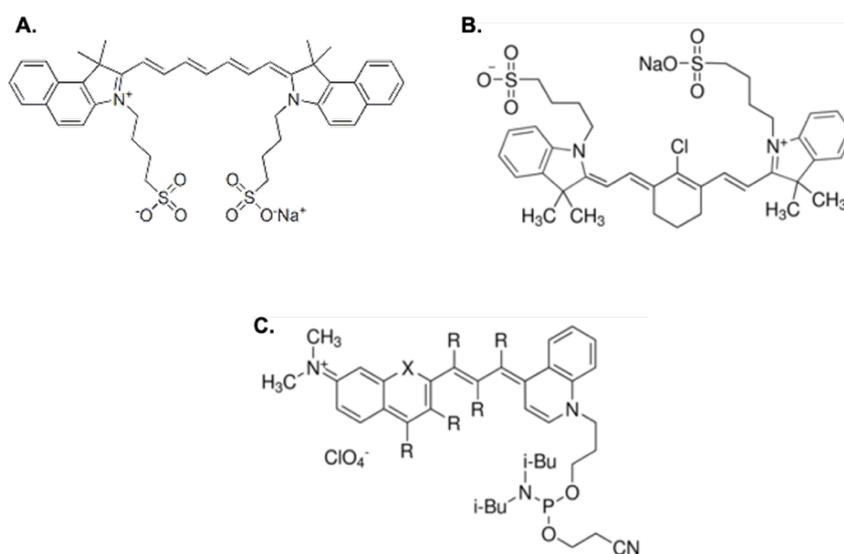


Figura 3.4. Estructura química de las sondas fluorescentes en el infrarrojo cercano. (A) ICG; (B) NIR-783 y (C) NIR-780.

ANTECEDENTES

La principal ventaja de estas sondas fluorescentes para su uso *in vivo* es su capacidad de unión a moléculas directoras específicas, nanopartículas y a agentes terapéuticos, obteniéndose así agentes teragnósticos que permiten adquirir información fisiopatológica en tiempo real. (15) Además de los tumores sólidos, las sondas NIR son capaces de detectar las células tumorales en el fluido intersticial o en las células circulantes con alta sensibilidad y especificidad. Su uso en los ratones con *xenografts* permite estudiar la eficacia terapéutica para conseguir un tratamiento personalizado, sobrellevando las limitaciones de los complejos modelos convencionales de visualización óptica basada en la luminiscencia que consumen mucho tiempo o de los estudios *in vitro* relacionados con la pérdida de las sub-poblaciones celulares y de la heterogeneidad del tumor. (16)

Además, debido a su capacidad de dirigirse hacia los tumores, las sondas NIR marcadas con radioisótopos son una buena alternativa a los contrastes utilizados en la medicina nuclear, que presentan una vida media corta, una baja resolución espacial y una entrada abundante en los tejidos con alto metabolismo basal (p.ej. el cerebro). (15)

Asimismo, permiten transportar fármacos antitumorales debido a que son fáciles de modificar químicamente para conseguir unas propiedades farmacológicas apropiadas, una elevada permeabilidad a través de las membranas celulares, una buena estabilidad química y con bajo coste. Los agentes teragnósticos marcados con los fluoróforos permiten la monitorización del transporte del fármaco y de su liberación en el sitio de acción. Asimismo, la sonda NIR-780 presenta la capacidad de su uso en la terapia fototérmica debido a que absorbe en el infrarrojo cercano emitiendo calor. (15)

c) Marcaje con sistemas reporteros

Los genes reporteros dan lugar a proteínas utilizadas principalmente en la ciencia básica, tanto en modelos celulares como en modelos animales de cáncer. Los genes reporteros son genes cuyos productos pueden analizarse fácilmente después de la transfección y pueden usarse como marcadores para cribar células transfectadas con éxito, para estudiar la regulación de la expresión génica o servir como controles para estandarizar las eficiencias de transfección.

▪ Bioluminiscencia

Existen herramientas importantes en la investigación biomédica basadas en el uso de bioluminiscencia producida por la enzima luciferasa que se expresa en las células, los tejidos o los órganos de interés. El nivel de bioluminiscencia depende de los niveles de expresión de la luciferasa, la presencia del sustrato administrado exógenamente (luciferina), el ATP, el oxígeno y la profundidad del tejido (Figura 3.5.). Se han desarrollado diferentes parejas enzima-sustrato como son (I) la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) con la luciferina, (II) la luciferasa de *Renilla reniformis* con la coelenterazina y (III) la luciferasa de *Gaussia princeps* con la coelenterazina. A diferencia de las técnicas de fluorescencia, en bioluminiscencia no se detecta la señal de fondo por lo que es una técnica más sensible, aunque no permita la cuantificación absoluta de la señal y se usa para visualizar el mismo animal de experimentación en las mismas

condiciones incluyendo la posición del cuerpo o para detectar si se expresa la luciferasa o no. (1)

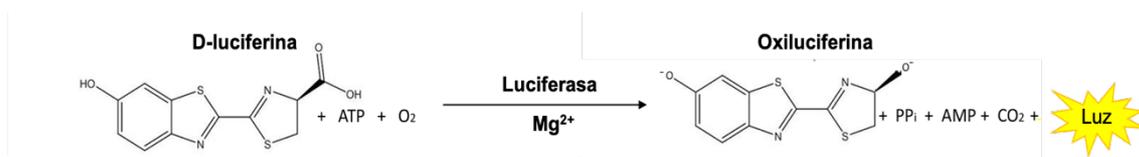


Figura 3.5. Reacción de bioluminiscencia de la luciferina catalizada por la luciferasa de *Photinus pyralis*. D-luciferina actúa como sustrato y es oxidada por la enzima luciferasa en presencia de oxígeno, ATP y iones de magnesio para formar oxiluciferina, AMP y CO₂, emitiendo bioluminiscencia.

Los ensayos con estos genes basados en luciferasa se utilizan en el estudio de la regulación de la expresión génica, tanto por factores que actúan en cis (elementos reguladores de genes) como en factores que actúan en trans (factores de transcripción o reguladores exógenos). Además, los sistemas de genes reporteros permiten la regulación de promotores de genes específicos de rutas de señalización, de tejidos o implicados en el desarrollo de un organismo. (1)

En estos ensayos, el gen reportero detectable actúa como un sustituto de la región codificante del gen que se estudia su regulación. La construcción contiene en la región promotora la secuencia de unión de uno o más elementos reguladores génicos, la secuencia del gen reportero y secuencias para la transcripción de un mRNA funcional. Al introducir la construcción en células, los niveles de expresión del gen reportero se monitorizan a través de un ensayo directo de la actividad enzimática de la proteína reportera. (1)

▪ Proteínas fluorescentes

La proteína verde fluorescente (GFP) es la proteína reportera más utilizada en biotecnología y biología molecular debido a sus numerosas ventajas. Presenta una elevada estabilidad frente al calor, pH alcalino, sales y una gran variedad de proteasas. Asimismo, se puede utilizar en ensayos *in vivo* debido a su gran estabilidad y capacidad autocatalítica. En las últimas décadas, se han desarrollado distintas formas mutadas de esta proteína, para su uso en mamíferos, plantas, levaduras y hongos. Entre sus limitaciones destaca una lenta formación post-traducciona del cromóforo, la necesidad de la presencia del oxígeno y la dificultad de distinguir entre la GFP y la fluorescencia de fondo cuando se expresa en bajos niveles. (61,62)

La GFP tiene numerosas aplicaciones, al igual que el resto de las proteínas fluorescentes, ya que se puede usar como (I) sonda de fusión, (II) gen reportero, (III) para estudiar la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), (IV) en estudios de *photobleaching* para determinar la dinámica de las proteínas, (V) como indicador de iones de calcio, haluros, metales y del pH, (VI) para estudiar las interacciones proteína-proteína, (VII) para la determinación de la localización subcelular, (VIII) como marcador de células tumorales para visualizar la progresión tumoral y para la detección de las metástasis, etc. (61)

ANTECEDENTES

La GFP fue descubierta en los años sesenta, cuando Osamu Shimomoura intentó estudiar las bases moleculares de los componentes que emitían luz en la medusa *Aequorea victoria*. Shimomoura logró aislar la aequorina, la proteína quimioluminiscente, que cataliza la oxidación del sustrato coelenterazina en una ruta dependiente de calcio y da lugar a la emisión de luz azul. Posteriormente, se dieron cuenta que existía una proteína que al excitarla con la luz ultravioleta producía luz verde, la que hoy en día se conoce como la proteína verde fluorescente. Shimomoura *et al.* la purificaron en los años setenta mediante un proceso de transferencia de energía, absorbida del estado de excitación de la aequorina. Este hallazgo constituyó una revolución en la biología celular. (62)

La GFP está codificada por una secuencia primaria de 238 aminoácidos y se forma espontáneamente sin necesidad de cofactores o componentes enzimáticos externos, mediante un plegamiento autocatalizado. El cromóforo de la GFP no necesita factores adicionales y, por tanto, se trata de una proteína autofluorescente. (62)

El cromóforo que absorbe la luz azul procedente de la aequorina se forma por la ciclación de Ser65-Tyr66-Gly67 en forma de un hexapéptido y se localiza en el centro de un cilindro casi perfecto formado por once hojas beta en forma de barril que tiene unas dimensiones de 25 x 40 Å (Figura 3.6.). Para generar el cromóforo funcional es necesaria la estructura completa de la proteína, que, al estar muy empaquetada, le proporciona una estabilidad elevada. Debido a la baja posibilidad de entrada de los ligandos pequeños como son los iones y el oxígeno, y debido a que el cromóforo está en el centro de esta estructura, la GFP tiene una fotoestabilidad extraordinaria y un elevado rendimiento cuántico. Ambos extremos de la secuencia, tanto C- como N-terminal están expuestos en la superficie del barril y se pueden usar como *linkers* para la obtención de proteínas de fusión sin afectar la integridad estructural del fluoróforo. Además, la estructura compacta de la proteína favorece la resistencia a los cambios en el pH, la temperatura, la fijación con el paraformaldehído y los agentes desnaturizantes como la urea. (61–63)

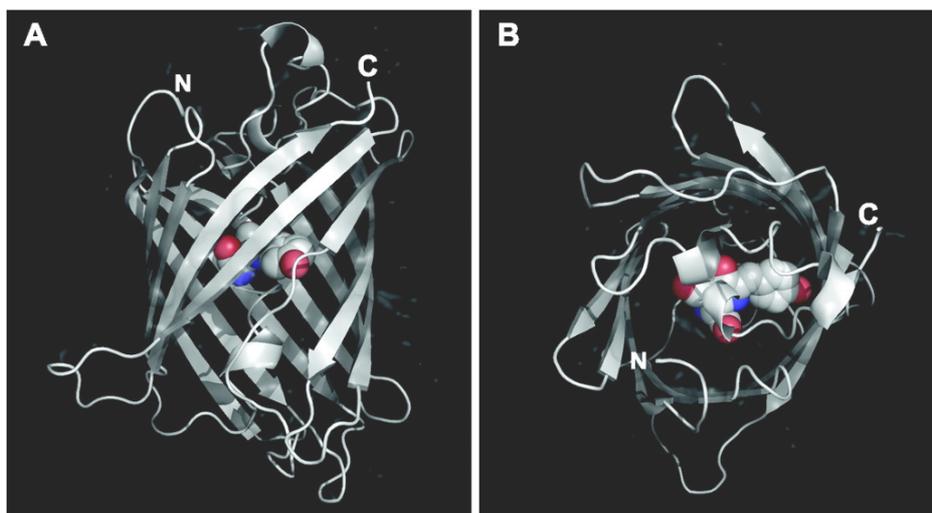


Figura 3.6. Estructura de la proteína verde fluorescente. La GFP está formada por 238 aminoácidos dispuestos en once hojas beta en forma de barril que protege a los tres aminoácidos que constituyen el cromóforo en su interior: (A) vista lateral; (B) vista desde arriba. Imagen tomada de Chudakov *et. al.* (63)

La proteína verde fluorescente de tipo silvestre (GFPwt, *wild type*) presenta el máximo de excitación a 397 nm y un pico menor a 476 nm. Desafortunadamente, su complejo espectro de absorción y su elevado coeficiente de extinción en las longitudes de onda del espectro ultravioleta cercano, acompañado por su bajo rendimiento cuántico, limitan el uso práctico de la GFPwt en la visualización celular. Tsien *et al.* descubrieron que mediante mutagénesis sitio-dirigida y al azar en el cDNA codificante de la GFP de la medusa *Aequorea* se podían variar las propiedades fluorescentes modificando la estructura tridimensional de los aminoácidos que rodeaban el cromóforo. Las mutaciones en los residuos más próximos al cromóforo afectan las propiedades espectrales de la proteína, por lo que en las últimas décadas se han generado numerosos variantes de las proteínas fluorescentes (proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente *cyan* (CFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), etc., cuyas propiedades se resumen en la Tabla 3. Además, se han realizado mutaciones sitio-específicas para mejorar el plegamiento de la proteína y su expresión en distintos sistemas heterólogos. La variante de la GFP más utilizada en biotecnología hoy en día es la EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) con una mutación en la Ser65 por una treonina (S65T) que absorbe a 489 nm y emite a 509 nm y la formación de su cromóforo es mucho más rápida y estable que en la GFPwt. (62)

Además, las proteínas fluorescentes derivadas de la GFPwt pueden formar dímeros cuando se encuentran inmovilizadas a altas concentraciones en las membranas o incorporadas como proteínas de fusión formando biopolímeros. La oligomerización de las proteínas fluorescentes es un problema sobre todo cuando se encuentran fusionadas a otra proteína dirigida a una localización sub-celular específica, ya que pueden dar lugar a localizaciones atípicas, alterar la función normal de la proteína fusionada, interferir en las cascadas de señalización, etc. Para evitar la formación de dímeros se pueden reemplazar los aminoácidos hidrofóbicos de las cadenas laterales en la superficie de dimerización por residuos cargados positivamente (por ejemplo, F223R, L221K, A206K). (62)

Proteína	Máximo de excitación/emisión	Mutación	Variantes
BFP (<i>Blue Fluorescent protein</i>)	380/448 nm	Y66H	Azurita, SBFP2 y EBFP2 Etc.
CFP (<i>Cyan Fluorescent protein</i>)	Dual: Ex: 433/445 nm Em: 475/503 nm	Y66W	ECFP Cerulean, TagCFP etc.
YFP (<i>Yellow Fluorescent protein</i>)	514/527 nm	T203Y	EYFP, Citrina, Venus, Topaz, SYFP2, etc.

Tabla 3. Propiedades de las principales variantes de la proteína verde fluorescente.

3.5. Tratamiento del cáncer

Con el objetivo de curar el cáncer o prolongar la vida del paciente, se han desarrollado diversas estrategias para frenar el crecimiento y la división descontrolada de las células tumorales, prevenir las recidivas o para aliviar los síntomas asociados mediante los cuidados paliativos. Entre los tratamientos tradicionalmente utilizados en la práctica clínica se encuentran la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. En los últimos años, la comprensión de las bases moleculares y genéticas del cáncer fueron la base para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento como son la inmunoterapia, la terapia hormonal y la terapia dirigida. La selección de una o la combinación de varias de ellas dependerá del tipo y el estadio del tumor, su agresividad, la presencia de las metástasis y las características individuales de cada paciente. A continuación, se presenta un breve resumen de los principales métodos del tratamiento del cáncer, centrándonos en la terapia dirigida.

3.5.1. Cirugía

La cirugía fue la primera técnica utilizada para el tratamiento del cáncer y sigue utilizándose en la práctica clínica con el objetivo de extraer el tejido tumoral. Desde el año 400 A.C. cuando Hipócrates describió el cáncer desde el punto de vista científico, hasta los finales del siglo XIX, el tratamiento del cáncer se basaba en la dieta saludable, la cirugía radical de los tumores superficiales y en el uso del tratamiento paliativo basado en los extractos de *Papaver somniferum*. Hoy en día, la cirugía se realiza con la ayuda de un bisturí, nitrógeno líquido o gas argón (criocirugía) o mediante el láser y es muy efectiva en el tratamiento de los tumores primarios localizados como el cáncer de mama o de colon, pero la frecuencia de las recurrencias post-operatorias es elevada por lo que normalmente se combina con la radioterapia, la quimioterapia o ambas. El principal inconveniente de la cirugía es la limitación en extirpar las zonas esenciales para el correcto funcionamiento del cuerpo y la desfiguración que produce al extirpar las zonas superficiales que pueden producir consecuencias psicológicas en el paciente. (6,24,25)

3.5.2. Radioterapia

El descubrimiento de los rayos X a finales del siglo XIX dieron las bases para el uso de la radioterapia en el tratamiento de los tumores. La radioterapia usa los rayos X a altas dosis que provocan daño en el material genético causando la muerte celular. La fuente de radiación puede ser o bien externa para el tratamiento superficial o bien interna, introduciendo cápsulas con radiación cerca del tumor en el proceso denominado braquiterapia. Además, se puede utilizar el yodo radioactivo (I-131) inyectado por la vía intravenosa para la terapia sistémica. La radioterapia se utiliza para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello en el estadio temprano, el cáncer de próstata y el linfoma de Hodgkin. Asimismo, se emplea en combinación con la quimioterapia o con la cirugía por ejemplo en la fase pre-operatoria en el carcinoma rectal o en el cáncer del esófago y en la fase post-operatoria en el cáncer de mama o del sistema nervioso central. La principal desventaja de la radioterapia es que puede originar daño local en los tejidos sanos adyacentes, lesiones cutáneas, cansancio y fatiga. (6,24,25)

3.5.3. Quimioterapia

La quimioterapia empezó a utilizarse en el tratamiento del cáncer a partir de la Segunda Guerra Mundial cuando se descubrió que los gases de mostaza nitrogenada usados en la guerra, tenían efectos tóxicos sobre la médula ósea y los glóbulos blancos. A partir de ese momento, se desarrollaron diferentes agentes quimioterapéuticos que interfieren en el ciclo celular, en el material genético o en el metabolismo celular con el objetivo de destruir las células tumorales (los agentes citotóxicos) o detener su crecimiento y división (los agentes citostáticos). (25)

Los agentes quimioterapéuticos son muy inespecíficos y, por tanto, afectan tanto a las células tumorales como a las células sanas con una alta tasa de división celular (por ejemplo, las células de la mucosa gastrointestinal y del folículo piloso), causando diversos efectos secundarios como son náuseas, vómitos, úlceras, debilidad muscular, cansancio y alopecia. Los efectos secundarios crónicos de la quimioterapia incluyen la resistencia al tratamiento, la osteoporosis, la pérdida de la fertilidad y la carcinogénesis. Además, existen problemas asociados con el mecanismo de acción de los agentes quimioterapéuticos, como son la baja solubilidad en agua, la dificultad de atravesar las barreras fisiológicas, fácil degradación *in vivo* y aclaramiento renal acelerado. (7) Por lo tanto, se administran en una única dosis o un ciclo corto de terapia en la máxima dosis tolerada con periodos de descanso para la recuperación en las células sanas. (27)

El uso combinado de los fármacos quimioterapéuticos permite alcanzar una mayor eficiencia terapéutica al combinar distintos mecanismos de acción y actuar sobre más tipos de células tumorales y, en definitiva, prevenir o disminuir las resistencias. (25)

En base a su mecanismo de acción, los agentes quimioterapéuticos se pueden clasificar en agentes alquilantes, alcaloides, antibióticos y antimetabolitos. (28)

3.5.3.1. Agentes Alquilantes

Los agentes alquilantes son derivados de los gases de mostaza nitrogenada que producen daños en el material genético, ya que se unen con sus grupos alquilo al nitrógeno presente en las guaninas, originando puentes cruzados entre las dos hebras del DNA y mutaciones debido al emparejamiento incorrecto de los nucleótidos. De esta forma impiden la duplicación del material genético e inhiben la división celular. Actualmente, entre los agentes alquilantes utilizados en la clínica está la ciclofosfamida que es capaz de interferir en el ciclo celular tanto en las células activas como en las células quiescentes. Se utiliza para el tratamiento de los cánceres relacionados con el sistema inmune (linfoma, mieloma múltiple y leucemia), cánceres sólidos (ovario, mama, carcinoma de pulmón no microcítico, neuroblastoma, sarcoma) y en el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes. Entre los agentes alquilantes están el cisplatino y sus derivados (carboplatino, oxaliplatino) utilizados para el tratamiento de melanoma, linfoma de Hodgkin, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de vejiga, ovarios, cabeza y cuello y testículos y la dacarbazina utilizada para el tratamiento del melanoma metastásico y el linfoma de Hodgkin. (25)

3.5.3.2. Antimetabolitos

Se trata de moléculas con estructuras similares a los metabolitos fisiológicos que permiten el bloqueo de los enzimas esenciales para sintetizar las bases nitrogenadas del DNA y de esta forma inhibir la división celular. Los principales antimetabolitos son los análogos del folato (metotrexato), de las purinas (mercaptopurina) y de las pirimidinas (fluoruracilo, gemcitabina, capecitabina). El metotrexato inhibe específicamente el enzima dihidrofolato-reductasa, bloqueando la síntesis de las purinas y favoreciendo la apoptosis en el tratamiento del cáncer de mama, ovario, vejiga, cabeza y cuello. La capecitabina es el precursor del 5-fluoruracilo que inhibe la timidilato-sintasa impidiendo la síntesis de la timidina y se usa en el tratamiento del cáncer colorrectal y el cáncer de mama metastásico. (25)

3.5.3.3. Antimitóticos de origen natural

Son fármacos capaces de interferir en la formación de los microtúbulos y bloquear la mitosis y la proliferación celular. Los primeros antimitóticos fueron los alcaloides de la vinca extraídos de *Catharanthus roseus* (vinblastina, vincristina) usados en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda, los linfomas, el mieloma múltiple y el cáncer de mama metastásico y constituyen una opción en los pacientes con resistencias a otros agentes quimioterapéuticos. Otro tipo de agentes antimitóticos son los derivados de *Podophyllum peltatum* (etopósido) que bloquean la topoisomerasa II, una enzima esencial para la separación de las hebras del DNA durante la replicación. Se utilizan en el tratamiento de la leucemia monoblástica aguda y en el carcinoma de testículos no seminomatoso. Asimismo, entre los agentes antimitóticos se encuentran los fármacos que inhiben la topoisomerasa I (topotecan, irinotecan) y los que favorecen la estabilización de los microtúbulos como son los derivados del taxol (paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel) utilizados en el cáncer de mama metastásico, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer de próstata y de cabeza y cuello. Estos fármacos se utilizan cuando falla el tratamiento de primera línea en los pacientes metastásicos y son la única opción en los pacientes con resistencias al tratamiento. (25)

3.5.3.4. Antibióticos citotóxicos. Doxorubicina

Existen antibióticos naturales con efectos citotóxicos, ya que forman enlaces covalentes con los ácidos nucleicos interfiriendo en la síntesis del DNA. Entre ellos, la más utilizada es la doxorubicina (Adriamycin®) que es una antraciclina extraída a partir del cultivo de *Streptomyces peucetius* con una elevada eficacia en el tratamiento de los tumores sólidos (cáncer de mama, ovarios, vesícula, cabeza y cuello, hígado, pulmón, páncreas, próstata, estómago, testículos y tiroides) y en los tumores hematológicos (leucemia, linfomas, mieloma múltiple, mesotelioma y sarcomas). Existen cuatro modelos para explicar su mecanismo de acción citotóxico como son (I) la estabilización del complejo de la topoisomerasa II con el DNA, (II) la formación de aductos con el DNA, (III) la producción de estrés oxidativo y (IV) la sobreproducción de ceramidas (Figura 3.7.). (4)

La doxorubicina estabiliza el complejo de la topoisomerasa II con el material genético durante la replicación, evitando la separación del DNA de la enzima y produciendo su rotura. Asimismo, actúa como un agente intercalante formando aductos con el DNA al establecer puentes de hidrógeno con la guanina en los sitios con numerosas guaninas-citosinas adyacentes, causando daño en el material genético. (4,64)

Además, la doxorubicina presenta una estructura en forma de quinona que puede ser reducida por la NADH reductasa del complejo respiratorio I, dando lugar a semiquinona que reacciona con el oxígeno, originando especies de oxígeno reactivo (ROS) como son el superóxido y el peróxido de hidrógeno, que causan estrés oxidativo y daño celular. Por último, la doxorubicina aumenta la formación de ceramidas, que son moléculas lipídicas involucradas en la parada del crecimiento, la apoptosis y el envejecimiento celular. (4)

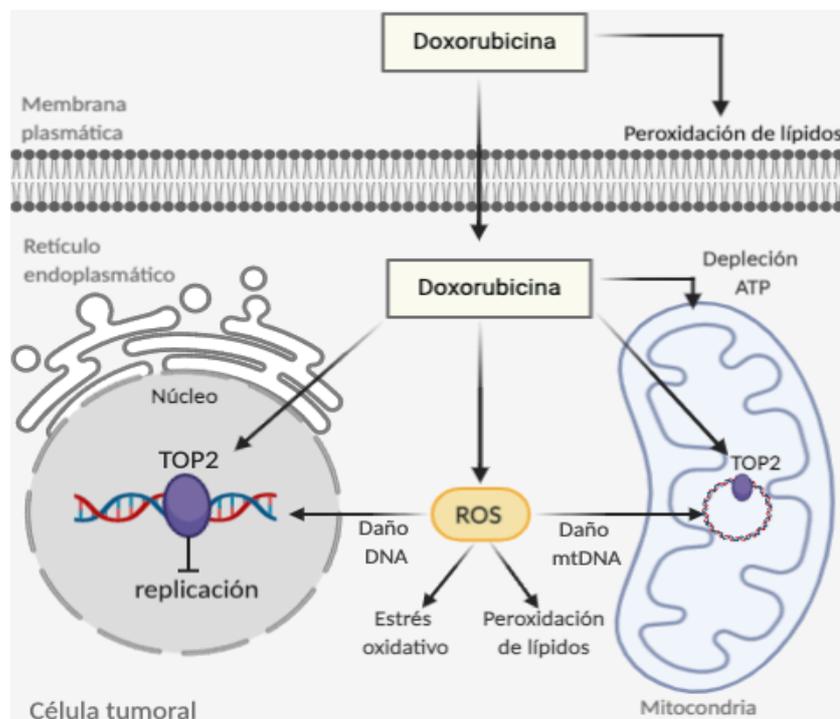


Figura 3.7. Esquema de la toxicidad de la doxorubicina en las células tumorales. TOP2: topoisomerasa II; ROS: especies de oxígeno reactivo. Imagen adaptada y traducida de Nitiss et al. 2014. (65)

La doxorubicina, al igual que otros agentes quimioterapéuticos, presenta numerosos efectos secundarios (náuseas, vómitos, úlceras, alopecia, etc.), entre los cuales el de mayor gravedad es la cardiotoxicidad. La cardiotoxicidad de la doxorubicina puede aparecer años después del tratamiento quimioterapéutico originando daño en el ventrículo izquierdo y un fallo cardíaco. El mecanismo de las alteraciones en el miocardio todavía no está del todo claro y se sugiere que puede ser causado por el estrés oxidativo en las mitocondrias, ya que el miocardio es un tejido rico en estos orgánulos. Otros estudios sugieren que la doxorubicina actúa sobre las dos isoformas de la topoisomerasa

II, la topoisomerasa II- α que se encuentra sobre-expresada en las células tumorales y la topoisomerasa II- β presente en los cardiomiocitos. (64)

Otra de las limitaciones del uso de la doxorubicina es el desarrollo de las resistencias mediante distintos mecanismos como es la sobre-expresión de los transportadores ABC (glicoproteína P (Pgp/ABCB1)), las proteínas MRPs (*multidrug resistance-associated proteins*) y BCRP (*breast cancer resistance protein*). (66) La resistencia a la doxorubicina forma parte de una resistencia combinada a varios agentes quimioterapéuticos conocida como resistencia MDR (de inglés *multidrug resistance*) que afecta a más del 70% de los tumores y favorece la progresión tumoral, la formación de las metástasis y las recidivas. (19)

3.5.3.5. Resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos (MDR)

La resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos es la capacidad de las células tumorales de sobrevivir frente a un amplio rango de fármacos antitumorales y sigue siendo el principal factor limitante para obtener un tratamiento eficiente en los pacientes con cáncer. Muchos tipos de tumores desarrollan resistencias que causan la ineficacia del tratamiento quimioterapéutico y la recidiva de la enfermedad. (67,68)

La generación de MDR en los tumores puede ser originada por varios mecanismos como son (I) el aumento en la liberación de los fármacos antitumorales hacia el exterior de la célula mediante los transportadores ABC, (II) los cambios en el metabolismo de los fármacos, (III) la modificación de las dianas terapéuticas, (IV) el aumento en la reparación del daño en el DNA, (V) la amplificación génica, (VI) los cambios epigenéticos, (VII) el microRNA y (VIII) la inhibición de la muerte celular (Figura 3.8.). (69,70)

Los transportadores dependientes del ATP (transportadores ABC, del inglés *ATP-binding cassette*) están formados por tres tipos de proteínas como son la glicoproteína P (P-gp), la proteína asociada a las resistencias a múltiples fármacos 1 (MRP1) y la proteína de resistencia en el cáncer de mama (BCRP/ABCG2). (67)

La glicoproteína P es un transportador de membrana de 170 kDa, codificada por el gen MDR-1 que se expresa en el hígado, el colon y los riñones y se encuentra sobre-expresada en numerosos tejidos tumorales. (69) Funciona como una bomba que transporta los iones cloruro hacia el exterior de las células y se puede unir a una gran variedad de agentes quimioterapéuticos como son la doxorubicina, la vinblastina y el taxol, alterándose su estructura lo que da lugar a la liberación del agente quimioterapéutico al espacio extracelular tras una hidrólisis del ATP, originando resistencias en diferentes tipos de tumores. (67)

La absorción de los fármacos antitumorales hacia el interior de las células puede verse alterada mediante una disminución de su unión a los transportadores de membrana, originada por la reducción del número de los transportadores disponibles o por las mutaciones que alteran su estructura o su funcionalidad. (67)

Por otra parte, en las células tumorales, la actividad de algunos de los enzimas encargados del metabolismo de los fármacos antitumorales puede verse alterada dando lugar a una disminución en la transformación de los pro-fármacos o un aumento de la inactivación de los agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, el aumento de la actividad

del citocromo P450 se relaciona con una mayor MDR a docetaxel en el cáncer de mama. (66)

Asimismo, la MDR puede producirse por el aumento en el mecanismo de reparación del DNA, ya que los agentes quimioterapéuticos normalmente producen daño en el material genético celular. (66,69) Además, los cambios en las dianas moleculares de los agentes quimioterapéuticos, como pueden ser las mutaciones en la topoisomerasa II, originan resistencias a la doxorubicina. (66,69)

Las alteraciones epigenéticas pueden interferir en la generación de las resistencias, ya que los genes supresores de tumores pueden ser silenciados por la metilación y, además, la hipermetilación de los oncogenes causa la inducción de su expresión. La desmetilación del gen MDR1 en las células tumorales conlleva la formación de la resistencia y disminuye la acumulación de los fármacos en el interior celular. (66)

El microRNA es un RNA de aproximadamente 22 nucleótidos no codificante que tiene un papel importante en la regulación de la expresión génica, sobre todo en los genes que codifican para las proteínas, incluyendo las que intervienen en la generación de MDR. Algunas de las células tumorales y las células del microambiente tumoral liberan exosomas, pequeñas vesículas que llevan el microRNA, como una forma de intercambio de información con otras células, que puede afectar la expresión de diferentes genes involucrados en las resistencias a los fármacos antitumorales. (67,70)

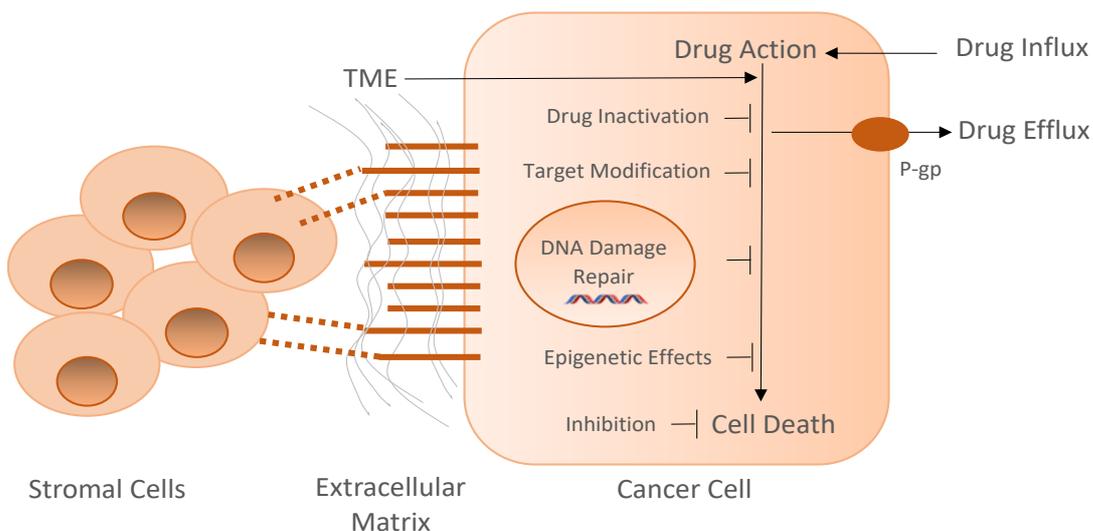


Figura 3.8. Mecanismos de resistencias a múltiples agentes quimioterapéuticos en las células tumorales. MDR se puede producir mediante la inactivación y la eliminación del fármaco del interior celular, una mayor reparación del daño en el DNA, la inhibición de la muerte celular, los efectos epigenéticos y por la influencia del microambiente tumoral. Las células estromales y las proteínas de la matriz extracelular intervienen en el proceso y la señalización para una mayor resistencia en las células tumorales. Imagen adaptada de Housman et al. 2014. (69)

Además, existen varios factores que intervienen en la generación de las resistencias como es el tamaño y el crecimiento del tumor, la heterogeneidad intratumoral (mutaciones, amplificaciones, deleciones, reorganización cromosomal,

ANTECEDENTES

transposición de los elementos génicos, translocación, etc.) y la dificultad de penetración del fármaco a través de las barreras físicas del tumor y el microambiente tumoral. (67,68)

El tamaño del tumor es muy importante durante el diagnóstico para predecir el pronóstico de la enfermedad. Los tumores más grandes se relacionan con un mayor riesgo de generar metástasis. El uso de la combinación de varios fármacos antitumorales en múltiples ciclos, que por separado producen la muerte en una fracción logarítmica de las células tumorales, permite una disminución secuencial en el tamaño del tumor hasta su completa erradicación. Este mecanismo funciona solamente en los tumores más sensibles. También influye el ratio y la cinética del crecimiento tumoral que es muy variable. Los tumores con baja tasa de crecimiento se asocian con una mayor supervivencia y por contrario, los tumores que crecen a velocidades más altas pueden ser sensibles a la quimioterapia. (68)

Otro factor importante es la heterogeneidad tumoral. Las células tumorales adquieren alteraciones genómicas mediante mutaciones generando una diversidad genética espacial y temporal. Asimismo, existe una fracción de células tumorales que presentan propiedades de células madre y normalmente son resistentes al tratamiento y pueden expandirse. (68–70)

Además, las células tumorales crean gradientes espaciales dentro de los tumores que evitan una circulación de sangre adecuada, creando un ambiente pro-tumoral de hipoxia que disminuye la exposición a los fármacos quimioterapéuticos. El microambiente tumoral es el espacio formado por las células del sistema inmune, el estroma, la matriz extracelular, los factores de crecimiento y la vasculatura que pueden originar la resistencia mediante diferentes mecanismos, incluyendo el bloqueo del ataque del sistema inmune al tumor, evitando la absorción de los fármacos y estimular los factores de crecimiento paracrino para originar señales de crecimiento celular. (67,68)

Para evitar las resistencias a los agentes quimioterapéuticos se proponen diferentes estrategias como son (I) la detección temprana cuando el tamaño del tumor es pequeño y antes de la aparición de los síntomas, por ejemplo mediante mamografía, biomarcadores, ctDNA, etc., (II) la monitorización de la respuesta terapéutica en tiempo real que permita una modificación temprana de la dosis y de los regímenes terapéuticos, (III) obtener respuestas más profundas optimizando la dosis y combinando diferentes terapias, ya que aunque tras el tratamiento queden solo pocos clones de las células tumorales, son suficientes para la recidiva del tumor. (68)

Actualmente, para combatir la MDR, se utiliza o bien la combinación de varios agentes quimioterapéuticos con distintos mecanismos de acción o bien su combinación con la radioterapia y la cirugía. Además, se aumenta la dosis del tratamiento en intervalos más cortos. En los últimos años, se ha planteado el desarrollo de la terapia dirigida hacia las dianas moleculares específicas de los tumores y la inmunoterapia para prevenir los problemas de MDR. (68)

3.5.4. Terapia Hormonal

La terapia hormonal se basa en el bloqueo de la capacidad del organismo de producir hormonas o en la modificación de su comportamiento en el organismo. Se utiliza en el tratamiento del cáncer de próstata y en el cáncer de mama. Los efectos secundarios asociados son sofocos, náuseas, fatiga, falta de libido, sequedad vaginal en las mujeres y ginecomastia en los hombres. (27)

En el cáncer de mama de tipo HR+/ERBB2-, el tratamiento consiste en la administración oral de antiestrógenos durante 5 años. El tamoxifeno es un modulador selectivo de los receptores de estrógeno que inhibe competitivamente la unión del estrógeno a su receptor. Los inhibidores de la aromatasas como son el anastrozol, el exemestano y el letrozol disminuyen los niveles circulantes de los estrógenos inhibiendo la conversión de los andrógenos en los estrógenos y solo son efectivos en las mujeres post-menopáusicas. (20)

3.5.5. Inmunoterapia

En los últimos años se ha desarrollado la inmunoterapia, una terapia biológica que ayuda al sistema inmunitario del paciente a combatir el cáncer, ya que las células tumorales han adoptado varios mecanismos para evadir el sistema inmune gracias a las modificaciones genéticas implicadas en (I) reducir la expresión de los antígenos específicos en su superficie reconocidos por las células del sistema inmune, (II) sobre-expresar las proteínas de superficie capaces de inactivar las células del sistema inmune o (III) inducir las células del microambiente tumoral a producir sustancias que suprimen la respuesta inmune. (28)

La inmunoterapia permite reforzar el sistema inmune para que actúe directamente sobre el tejido tumoral mediante la transferencia adoptiva celular, los inhibidores de los puntos de control, los anticuerpos monoclonales o mediante las vacunas terapéuticas. La transferencia adoptiva celular refuerza la capacidad natural de las células T de combatir el cáncer y consiste en aislar y re-inyectar las células T presentes en el tumor del paciente, reprogramándolas en el laboratorio favoreciendo su adherencia a la superficie de las células tumorales. Por otra parte, los inhibidores de los puntos de control inmunitario son fármacos que ayudan al sistema inmune a responder con más fuerza a las células tumorales, ya que en condiciones fisiológicas existen proteínas en la superficie de los linfocitos T o de las células tumorales que impiden que la respuesta inmune sea demasiado fuerte. Los anticuerpos monoclonales utilizados en la inmunoterapia marcan la superficie de las células tumorales para que sean fácilmente visibles para las células del sistema inmune y pueden interferir en las vías de señalización que promueven el crecimiento tumoral, favorecer la apoptosis o producir un acercamiento de los linfocitos T a las células tumorales. Las vacunas terapéuticas refuerzan las defensas naturales del organismo introduciendo en el organismo uno o más antígenos tumorales que pueden ser producidos a partir de las propias células del paciente o por ciertos tipos de tumores. (71,72)

Asimismo, existen tipos de inmunoterapia que mejoran la respuesta inmune general del organismo para combatir el cáncer como son las citoquinas y el bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Las citoquinas son proteínas producidas por los glóbulos blancos

que intervienen en las respuestas inmunitarias. Las principales citoquinas utilizadas en el tratamiento del cáncer son los interferones (por ejemplo, IFN- α) y las interleucinas (por ejemplo, IL-2). El BCG se utiliza en el tratamiento del cáncer de vejiga urinaria. (66)

Los efectos secundarios de la inmunoterapia dependen del tipo y el estadio del cáncer, el estado de salud del paciente, el tipo de terapia y de la dosis administrada. La principal desventaja de esta terapia consiste en una gran variabilidad de la respuesta interindividual debido a la heterogeneidad en el ambiente microtumoral que en algunos casos no permite la infiltración de los linfocitos T en el tumor y debido a la gran variedad de mutaciones genéticas en los distintos tipos tumorales. (71)

En comparación con la quimioterapia donde la curva dosis-respuesta es lineal, en la inmunoterapia tiene forma de campana debido a la complejidad de las interacciones moleculares. Aunque la quimioterapia es muy efectiva, no actúa sobre las células tumorales que no están en división como las células quiescentes o las células madres tumorales. La quimioterapia afecta las células sanas y tiene un efecto negativo sobre el sistema inmune mientras que la inmunoterapia favorece la respuesta inmune y evita los efectos secundarios tóxicos. Además, el sistema inmune presenta la capacidad de memoria que es importante para lograr un efecto terapéutico a largo plazo. (28)

3.5.6. Terapia dirigida

En las últimas décadas, se ha planteado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas específicas y selectivas para superar las limitaciones asociadas con la quimioterapia como son sus efectos secundarios sobre las células sanas, las resistencias al tratamiento, las dificultades en la formulación farmacéutica y los problemas farmacocinéticos. El conocimiento de las bases moleculares y genéticas del cáncer ha permitido el desarrollo de la terapia dirigida hacia las dianas moleculares que se encuentran mutadas o sobre-expresadas en los tejidos tumorales, como son los receptores, los factores de crecimiento, las moléculas de señalización, las proteínas implicadas en el ciclo celular, los moduladores de la apoptosis o las moléculas que promueven la angiogénesis. Así, la terapia dirigida permite actuar específicamente sobre las dianas moleculares tumorales, evitando los efectos secundarios sobre las células sanas y permite conseguir una medicina más personalizada. Dentro de la terapia dirigida, el uso de las nanopartículas dotadas con moléculas directoras que reconocen específicamente las dianas moleculares tumorales, es actualmente la estrategia de mayor interés en la investigación del cáncer. (6,25,28,31,57)

3.5.6.1. Tipos de nanopartículas

Las nanopartículas en la terapia dirigida son sistemas coloidales de 10-1000 nm que permiten transportar los agentes quimioterapéuticos o los ácidos nucleicos (terapia génica) hacia las células tumorales. Las ventajas que presentan las nanopartículas con respecto a la quimioterapia es que protegen el fármaco o el material genético frente a la degradación precoz en el organismo, reducen su aclaramiento renal y aumentan su vida media en el torrente sanguíneo. Además, su superficie se puede funcionalizar fácilmente con diferentes moléculas mejorando su biocompatibilidad, internalización en las células tumorales y las propiedades ópticas que hacen posible ver su localización

intracelular. Asimismo, permiten la liberación controlada del fármaco o del material genético en el sitio de acción específico y aumentan su solubilidad. (8,27,28)

Las nanopartículas pueden tener una estructura lipídica (liposomas), organometálica (nanotubos de carbono, nanopartículas de oro, magnéticas), polimérica (micelas, dendrímeros y nanopartículas poliméricas) y biológica (exosomas) (Figura 3.9.). (8,29) Además, es importante destacar el papel de las ciclodextrinas que son oligosacáridos cíclicos capaces de transportar fármacos en su interior y en las que se centra la presente tesis doctoral.

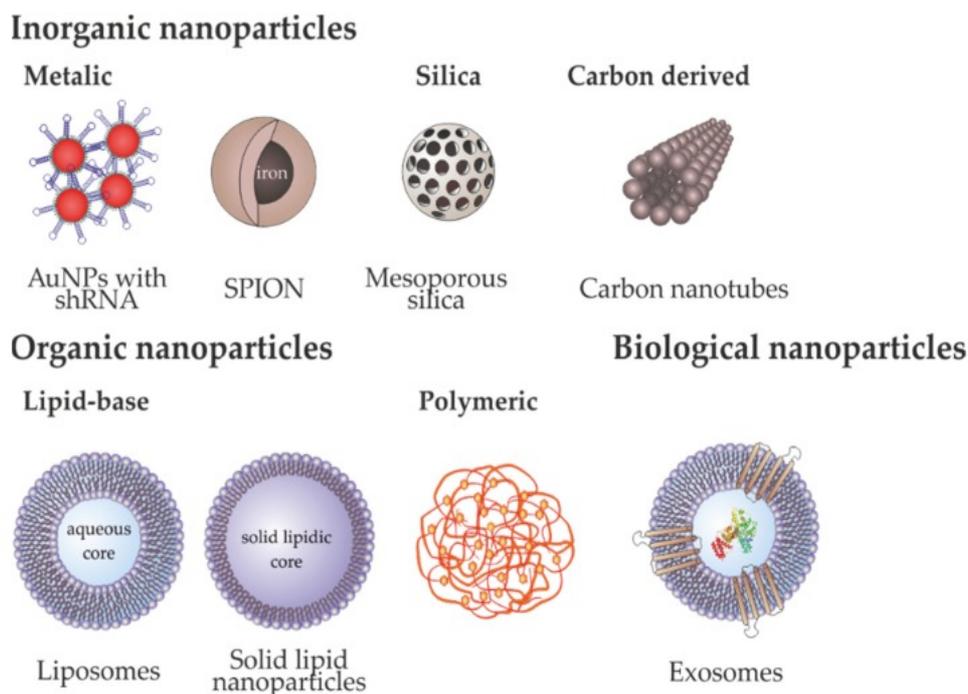


Figura 3.9. Distintos tipos de nanopartículas utilizadas actualmente en la investigación biomédica. Se muestran ejemplos de las nanopartículas inorgánicas como son las nanopartículas de oro funcionalizadas con shRNA, las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION), las nanopartículas de sílice y los nanotubos de carbono. Asimismo, se representan las nanopartículas orgánicas como son los liposomas, las nanopartículas lipídicas sólidas y las nanopartículas poliméricas. Además, en los últimos años se han desarrollado las nanopartículas biológicas, basadas en los exosomas. Imagen tomada de Roma-Rodrigues et al. 2020. (8)

a) Nanopartículas lipídicas

Los liposomas son partículas coloidales formadas por una bicapa lipídica de fosfolípidos anfifílicos que permiten el transporte de los fármacos hidrosolubles o del material genético en su interior o de los agentes liposolubles en su membrana hidrofóbica. Son las nanopartículas más usadas en la investigación farmacéutica debido a su carácter anfifílico que permite su interacción con las membranas celulares y el transporte de distintas moléculas. Se trata de nanopartículas biocompatibles e inertes, aunque presentan como inconvenientes una baja carga útil del fármaco y un control limitado de su liberación. Además, existen problemas relacionados con la estabilidad y

la reproducibilidad a nivel industrial, la oxidación de los fosfolípidos y la dificultad de esterilización. (29)

b) Nanopartículas organometálicas. Carbon Dots

Entre las nanopartículas organometálicas con propiedades fluorescentes se incluyen los nano-materiales basados en el carbono (nanotubos de carbono, Carbon Dots, etc.), las nanopartículas de metales (oro, plata, zinc, titanio) y las nanopartículas paramagnéticas o superparamagnéticas como los óxidos de hierro. (73)

La principal desventaja de las nanopartículas organometálicas es su mayor toxicidad, inmunogenicidad y una baja cinética de excreción en el organismo, por lo que las nanopartículas de mayor interés en la terapia dirigida son las nanopartículas poliméricas. (7)

Los nanotubos de carbono son redes tubulares hidrofóbicas de átomos de carbono con un diámetro de 1-4 nm y de 1-100 μm de longitud con propiedades estructurales, electrónicas, ópticas y mecánicas específicas. Son insolubles en todos los tipos de disolventes, por lo que es necesario realizar modificaciones en su estructura (por ejemplo, con grupos amino) que favorezcan su solubilidad en agua, aumentando su biocompatibilidad y disminuyendo la toxicidad. Además, es posible incluir fármacos en su superficie o en su cavidad interna con una carga útil elevada debido a su gran área superficial. (8)

Por otra parte, las nanopartículas de oro son fáciles de sintetizar mediante la reducción del tetracloroaurato, obteniendo diferentes tamaños y formas con un núcleo de oro de 1,5-10 nm. Presentan una elevada carga útil del agente terapéutico debido a su gran área superficial, una baja toxicidad y una vida media elevada. (8)

Otro tipo de nanopartículas metálicas son las nanopartículas paramagnéticas y superparamagnéticas formadas por los óxidos de hierro de magnetita o hematita, cuya distribución en el organismo puede variar aplicando un campo magnético externo. Estas nanopartículas presentan una baja toxicidad, una buena biodegradabilidad, un bajo coste y la facilidad de modificación de su superficie con grupos funcionales. Asimismo, se utilizan como agentes de contraste en la resonancia magnética nuclear y como agente terapéutico por hipertermia. (5,8)

Los Carbon Dots (CNDs) son nanopartículas de carbono esféricas con un tamaño menor de 10 nm con propiedades ópticas únicas (fuerte absorción, estabilidad y resistencia al *photobleaching*). (38) Su fluorescencia y las propiedades de excitación son modificables, por lo que pueden ser utilizados en la fotocatalisis, los dispositivos emisores de luz, la terapia fotodinámica, el diagnóstico de las enfermedades y la monitorización *in vivo*. (40,73) Además, son fáciles de preparar, tienen un bajo coste y presentan una elevada solubilidad y estabilidad en agua, una adecuada biocompatibilidad y una baja toxicidad. (39,40) Su principal ventaja, comparando con el resto de las nanopartículas organometálicas, es la ausencia de metales pesados en su estructura, por lo que son adecuadas para aplicaciones biológicas. (74)

Los CNDs pueden prepararse a partir de un amplio rango de fuentes de carbono naturales o sintéticas. (39) La síntesis puede ser de tipo *top-down* (de arriba hacia abajo) o *bottom-up* (de abajo hacia arriba). El primer tipo de síntesis se basa en la rotura de los

precursores de carbono en partículas de tamaño nanométrico mediante la ablación por láser y la oxidación química o electroquímica. Existen muchos materiales de partida simples (grafito, hollín de carbono, carbono activado, etc.) que sirven como fuentes de carbono para este tipo de síntesis, que permiten una elevada cantidad de producción, pero presentan la desventaja de necesitar tratamientos especiales y complejos para su purificación. (73) Por otra parte, la estrategia de síntesis de abajo hacia arriba incluye la pirólisis directa, la carbonización electroquímica, el tratamiento hidrotermal y la irradiación por microondas. Las fuentes de carbono en esta estrategia presentan la ventaja de la posibilidad de un control preciso de la morfología y de la distribución del tamaño de la nanopartícula y de la modificación y la funcionalización de su superficie. La estrategia más común de la preparación de los CNDs es la carbonización hidrotermal u organotermal, donde la fuente del carbono se disuelve en agua o en una solución orgánica y se produce la carbonización hidrotermal en el autoclave a elevadas temperaturas. Las fuentes de carbono comúnmente usadas son la glucosa, el ácido cítrico, el quitosán y el zumo de plátano. (73)

La fácil modificación de su superficie permite ajustar sus propiedades fisicoquímicas y fluorescentes y la adición de los distintos grupos funcionales permite mejorar la eficacia en el transporte dirigido de los fármacos y para la visualización intracelular. Las uniones covalentes de los grupos carboxilos, carbonilos, hidroxilos y aminos en la superficie se hacen mediante un proceso post-síntesis, normalmente mediante reacciones de acilación que requieren la activación de los grupos funcionales. (39,40,73)

La fotoluminiscencia de los Carbon Dots es de origen desconocido, pero está relacionada con el tamaño de la nanopartícula. Las de tamaño pequeño emiten en la región ultravioleta del espectro, las de tamaño mediano en la región visible y las de mayor tamaño en el infrarrojo. (40)

c) Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas pueden presentar diferentes estructuras como (I) micelas poliméricas formadas de co-polímeros anfifílicos, (II) dendrímeros ramificados o (III) nanopartículas formadas por polímeros, que son el objetivo de la presente tesis y, por tanto, este apartado se centra principalmente en su descripción.

Las micelas y los dendrímeros presentan un núcleo hidrofóbico para el transporte de fármacos con baja solubilidad en el medio acuoso. Aunque ambos permiten una elevada carga útil del agente terapéutico, presentan una baja estabilidad en el torrente sanguíneo y una liberación prematura del fármaco, pudiendo originar efectos secundarios. (29)

Actualmente, las nanopartículas más prometedoras y estudiadas en la investigación biomédica para una terapia dirigida de los agentes quimioterapéuticos o del material genético son las nanopartículas poliméricas que, comparando con los liposomas o con las micelas, proporcionan una mayor homogeneidad en el tamaño, permiten controlar y modificar sus propiedades fisicoquímicas, favorecen la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos y presentan una mayor carga útil. Además, permiten un transporte sinérgico de varios agentes terapéuticos, aumentan el tiempo de vida media

del fármaco en el torrente sanguíneo y favorecen su estabilidad. Asimismo, la capacidad de decorar su superficie con las moléculas directoras, permite que estas nanopartículas aumenten la entrada del fármaco en las células tumorales y disminuyan los efectos tóxicos en las células sanas. Por último, permiten una liberación controlada del fármaco por difusión a través de la matriz polimérica o por la degradación de la nanopartícula. Al tratarse de nanopartículas biocompatibles y biodegradables, se descomponen en moléculas como dióxido de carbono y agua que no suelen ser tóxicos si no se usan en dosis muy elevadas. (7,29)

Las nanopartículas poliméricas se sintetizan a partir de los polímeros biocompatibles y biodegradables de origen natural (chitosan, colágeno, alginato, heparina, albúmina, gelatina) o de origen sintético (polietilenimina (PEI), polietilenglicol (PEG), ácido poliglútamico o poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL), ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poliaspartato (PAA), etc. Los polímeros naturales pueden presentar problemas de pureza y de homogeneidad de tamaño y una rápida liberación del fármaco, por lo que los polímeros sintéticos siguen siendo de elección en la mayoría de los trabajos de investigación. (7,29)

d) Nanopartículas biológicas. Exosomas

En los últimos años, se ha descubierto la importancia de las vesículas biológicas, como son los exosomas, en la comunicación y en el transporte de la información intercelular. Los exosomas son nanovesículas sintetizadas en la vía endosómica de las células y están formados por una membrana lipídica que rodea un núcleo con proteínas y ácidos nucleicos, incluyendo el RNA mensajero y el microRNA. Su contenido depende de la célula de origen y de las condiciones fisiológicas. (8)

Una vez introducidos en la célula del destino son capaces de producir alteraciones fenotípicas dependientes de su contenido. Las células tumorales secretan mayores cantidades de exosomas que las células sanas. La manipulación del contenido de los exosomas se puede realizar mediante la ingeniería de las células parentales para secretar los exosomas modificados o modificar los exosomas una vez secretados mediante su incubación, electroporación o transfección con el objetivo de transportar el material genético, las proteínas o los fármacos, disminuyendo la respuesta inmune. La desventaja es que tienen una carga útil limitada cuando se usa la incubación, una baja eficiencia de transferencia del DNA cuando se usa la electroporación y una baja eficiencia de transfección. (8)

e) Nanopartículas funcionalizadas con ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos naturales sintetizados mediante la degradación enzimática del almidón y constituyen una posibilidad para transportar los fármacos quimioterapéuticos hacia las células tumorales. (75) Son moléculas cristalinas, homogéneas y no higroscópicas, compuestas por seis, siete u ocho unidades de D(+)-glucopiranosas unidas por los enlaces $\alpha(1-4)$, denominadas α , β o γ -ciclodextrinas, respectivamente. (76) Debido a la baja rotación libre alrededor de las uniones de la glucopiranosas, que presenta una conformación en forma de silla, las CD no son perfectamente cilíndricas sino tienen una forma de cono truncado (Figura 3.10.)

con la cara exterior hidrofílica y una cavidad interna hidrofóbica que permite la encapsulación de distintas moléculas no hidrosolubles en su interior como son algunos fármacos de bajo peso molecular, aminoácidos hidrofóbicos, enzimas y siRNA. (17,18) Las uniones entre las CD y las moléculas encapsuladas ocurren a través de interacciones electrostáticas o enlaces no covalentes como son los puentes de hidrógeno o las fuerzas de van der Waals. El complejo final oculta la molécula hidrofóbica en el interior de la cavidad de la CD, mientras que los grupos hidroxilo en la superficie externa están expuestos al ambiente, lo que permite aumentar la hidrosolubilidad de la molécula. Además, mediante estas uniones, se ven alteradas otras características físicas, químicas y biológicas de las moléculas encapsuladas aportando varias ventajas como son una mayor biodisponibilidad y estabilidad y evitar las interacciones entre los fármacos o con otras moléculas. Asimismo, se ve afectada la reactividad química del compuesto hidrofobo, su absorbancia en el espectro UV/VIS, su fluorescencia y su paso a través de las membranas biológicas. (76–78)

Las CD se descubrieron hace aproximadamente un centenar de años y gracias a estas propiedades se utilizan como excipientes para la formulación de los medicamentos, pero, además, permiten un transporte dirigido de los fármacos y del material genético. (78) Los problemas asociados a los agentes quimioterapéuticos como son su baja solubilidad en agua, la degradación gastrointestinal, la insuficiente estabilidad *in vitro*, los efectos secundarios en las células sanas, la baja biodisponibilidad y las resistencias, pueden ser sobrellevados gracias a la inclusión de estos fármacos en las ciclodextrinas. (17)

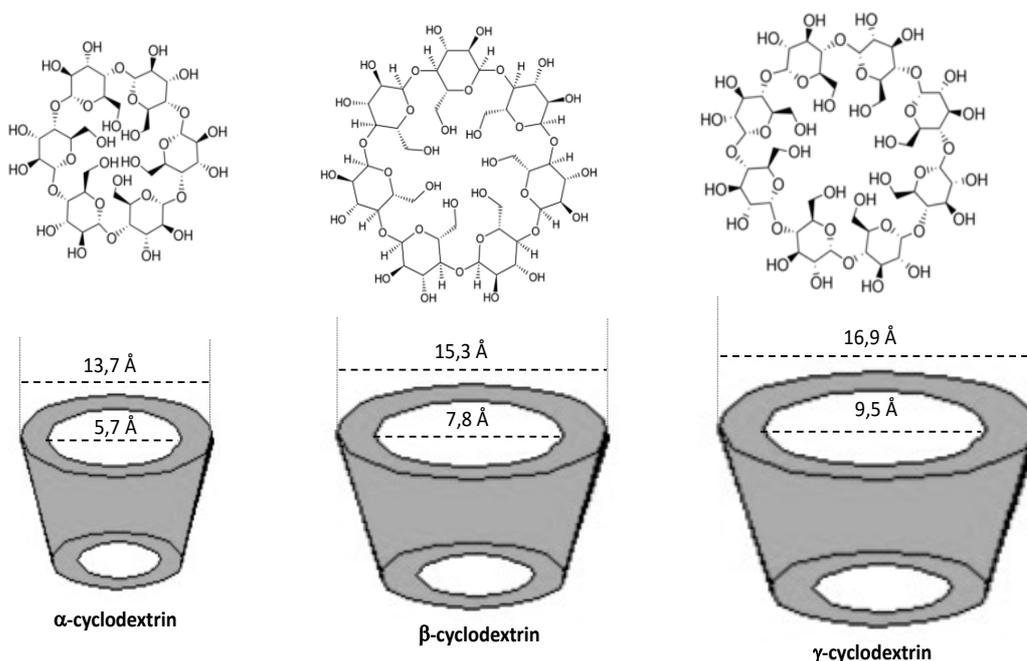


Figura 3.10. Estructura y conformación de las ciclodextrinas naturales. Las ciclodextrinas naturales tienen forma de cono truncado y están compuestas por seis (α -CD), siete (β -CD) u ocho unidades (γ -CD) de D(+)-glucopiranosas unidas por los enlaces $\alpha(1-4)$.

En concreto, la β -ciclodextrina es la más adecuada para formar complejos con los fármacos quimioterapéuticos, debido a su perfecto tamaño de la cavidad, una buena

ANTECEDENTES

capacidad de formar complejos, una buena biodisponibilidad y un coste relativamente bajo. (75) Permite formar complejos con muchos fármacos con baja hidrosolubilidad como es el paclitaxel o la doxorubicina que se unen a la CD mediante enlaces hidrofóbicos y se liberan en respuesta al pH debido a su aumento de solubilidad cuando está protonada. (76)

La principal desventaja que presentan las CD es que son moléculas relativamente grandes (1-2 kDa) con muchos grupos hidroxilos que actúan como donantes y aceptores de hidrógeno, por lo que presentan una baja capacidad de atravesar las membranas biológicas lipofílicas. Además, aunque son moléculas hidrofílicas, su solubilidad acuosa inherente está limitada, especialmente en el caso de la β -ciclodextrina, debido a las fuertes uniones que existen en su estructura cristalina. Por lo tanto, se han desarrollado distintos derivados hidrofílicos, hidrofóbicos y iónicos para mejorar sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas mediante las modificaciones químicas de aminación, esterificación y eterificación dando lugar a hidroxipropil- β -ciclodextrinas, CD metiladas al azar, CD sulfobutiléter, etc. (17,18) Las CD anfifílicas producidas por insertar las cadenas alifáticas de diferentes longitudes en su superficie mejoran su unión a las membranas biológicas. (77) Además, se han desarrollado las ciclodextrinas unidas a nanopartículas de distinta naturaleza: lipídicas, poliméricas, magnéticas, micelas, etc. para mejorar las limitaciones asociadas con la baja solubilidad. (18)

3.5.6.2. Transporte e internalización de las nanopartículas

Hoy en día, el principal reto en la terapia dirigida consiste en diseñar nanopartículas con unas características óptimas, ya que una vez administradas en el organismo deben superar numerosos obstáculos y barreras hasta llegar a su sitio de acción específico.

En el torrente sanguíneo, las nanopartículas cargadas con el agente quimioterapéutico o el material genético primero tienen que escapar del sistema fagocítico mononuclear. Asimismo, en contacto con los fluidos biológicos, la superficie de las nanopartículas se recubre por proteínas, que constituyen una corona que puede afectar la entrada de la nanopartícula en las células. Lo ideal es que el tamaño de las nanopartículas sea menor de 400 nm, ya que las nanopartículas más grandes se eliminan antes por la acción del sistema fagocítico o se atrapan en los pulmones y un tamaño menor favorece su extravasación en los tumores. Además, las nanopartículas de menos de 5 nm se eliminan rápidamente por los riñones. (79) Otro factor que influye en el transporte de las nanopartículas es su forma, ya que las nanopartículas esféricas viajan por el torrente sanguíneo sin desviarse y las no esféricas tienen tendencia a unirse a las paredes vasculares. La flexibilidad de la nanopartícula influye en su penetración en las células y en su paso a través de los vasos sanguíneos, debido a que las nanopartículas rígidas son captadas antes por los macrófagos. (29)

Además, las nanopartículas deben ser neutras o solo ligeramente negativas para no interactuar con las proteínas plasmáticas como son las opsoninas y evitar la acción de los fagocitos. La neutralización se puede llevar a cabo decorando su superficie con los polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG), los polisacáridos (chitosan), las proteínas y los lípidos, evitando así el ataque del sistema inmune. (6,29)

Antes de llegar a la membrana plasmática de las células, las nanopartículas interactúan con el microambiente celular (matriz extracelular, fibrosis, pH, etc.) que también pueden interferir en sus propiedades y sus interacciones con la membrana. En los tumores, el microambiente tumoral (TME) produce una fibrosis elevada, una matriz extracelular densa y un bajo drenaje linfático lo que aumenta la presión intersticial de los fluidos. La extravasación de las nanopartículas hacia la región distal de los tumores está restringida por una elevada presión en el TME. Además, el área de las interacciones de las nanopartículas con las células se puede ver afectada por los factores del TME como es la bradiquina, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), las prostaglandinas y las metaloproteasas de la matriz extracelular. Asimismo, el pH del TME es un factor importante en la entrada de la nanopartícula, ya que un pH ligeramente más bajo que el fisiológico (aproximadamente pH 6,8) causa que las nanopartículas pierdan su componente aniónico, dejando cargas positivas en su superficie lo que aumenta su entrada en el tumor. (80)

La entrada de las nanopartículas en las células ocurre normalmente a través de la endocitosis mediada o no por receptores. Una vez que se unen a la superficie celular son capturadas por las invaginaciones de la membrana plasmática, quedando atrapadas dentro de unas vesículas que las transportarán a los compartimentos internos de la célula. La endocitosis puede llevarse a cabo o bien mediante una fagocitosis que ocurre principalmente en las células fagocíticas o por pinocitosis que ocurre en la mayoría de los tipos celulares. La pinocitosis puede ser mediada por (I) clatrina, (II) caveolas, (III) ser independiente de clatrina/caveolas o (IV) por macropinocitosis (Figura 3.11.). (80,81)

La fagocitosis ocurre en las células fagocíticas como son los macrófagos, los monocitos, los neutrófilos y las células dendríticas, responsables de la defensa y de la eliminación de las células muertas y los restos celulares. La fagocitosis de las nanopartículas ocurre debido a su opsonización en el torrente sanguíneo que consiste en la adsorción de las opsoninas (inmunoglobulinas, proteínas complementarias u otras proteínas sanguíneas como la fibronectina) sobre su superficie, permitiendo su reconocimiento por los fagocitos y la formación de los fagosomas. En este tipo de transporte están implicados los receptores Fc, los *Scavengers* y los receptores de manosa/fructosa. Las nanopartículas susceptibles a la opsonización se acumulan en los órganos como el hígado y el bazo por lo que se podrían usar para el tratamiento del hepatocarcinoma. (80)

La endocitosis mediada por las clatrina es la principal vía de entrada de los nutrientes en las células y ocurre en las zonas de la membrana plasmática ricas en la proteína clatrina. Este proceso puede producirse a través de (I) la adsorción no específica sobre la superficie celular, (II) a través de los receptores o (III) independientemente de los receptores, cuando no se produce una unión directa con la membrana, sino que ocurren interacciones hidrofóbicas o electrostáticas no específicas entre la molécula y la superficie celular. Las nanopartículas que usan esta vía de entrada quedan atrapadas dentro de las vesículas y normalmente acaban en los lisosomas donde pueden ser degradadas. (80)

La endocitosis mediada por caveolas interfiere en los procesos biológicos como son la señalización celular, la transcitosis, la tensión de la membrana y la regulación de los lípidos, los ácidos grasos y las proteínas de la membrana. Las caveolas son pequeñas

ANTECEDENTES

invaginaciones de la membrana (50-80 nm) formadas por la caveolina, una proteína dimérica que aporta su forma en botella, y la caveolina-2 involucrada en su estabilización. Las caveolas están presentes en las células epiteliales y no epiteliales (tejido adiposo y músculo liso), donde aumentan el área superficial de la membrana en un 75%. Algunas nanopartículas que entran por esta vía pueden escapar de la degradación lisosomal y es una opción adecuada para el transporte de las moléculas degradables como son los genes o las proteínas. (80)

La endocitosis independiente de clatras/caveolas ocurre en las células con una composición específica de la membrana con ausencia de caveolas y clatras. Por ejemplo, el ácido fólico se internaliza por esta vía, por lo que las nanopartículas con el folato como molécula directora entrarán preferentemente a través de este mecanismo. (80)

Por último, en la macropinocitosis se forman un gran número de extensiones de la membrana debido a la reordenación del citoesqueleto y se forma una vesícula grande de 0,2-5 μm . Las partículas y las moléculas disueltas en la matriz extracelular son captadas dentro de la vesícula endocítica independientemente de sus receptores específicos y forman una entrada no específica que depende del tipo celular y de las condiciones experimentales. (80)

La vía preferente de entrada de las nanopartículas en las células dependerá de su forma, carga, tamaño, hidrofobicidad, etc. En general, las nanopartículas esféricas atraviesan las membranas plasmáticas con mayor facilidad que las nanopartículas con ángulos más afilados (cubos, discos, varillas, etc.). (82) Asimismo, las nanopartículas aniónicas usan la entrada dependiente de caveolas y clatras, mientras que las positivas la vía de clatras. La entrada de las nanopartículas con carga positiva es mayor debido a sus interacciones electrostáticas con la carga negativa de las membranas plasmáticas (80,81). Por otra parte, las nanopartículas con un tamaño mayor de 50 nm, se internalizan a través de los receptores y su consiguiente translocación en el citoplasma. Para llevar una internalización mantenida, estos receptores deben reciclarse, lo que conlleva tiempo y limita el ratio de internalización. Cuando tienen un tamaño mayor de 200 nm no pueden ser internalizadas a través de la vía dependiente de clatras y utilizan vías alternativas. Se ha demostrado que la endocitosis mediada por caveolas es la más utilizada en la entrada de las nanopartículas de un tamaño entre 200 y 1000 nm. Este proceso es más lento que el de la vía dependiente de clatras por lo que la eficiencia de la entrada es menor. En las nanopartículas de 1-5 μm , la vía preferente es la macropinocitosis, aunque el ratio de internalización es mucho menor debido a la necesidad de formar vesículas demasiado grandes. (83)

El grado de hidrofobicidad de las nanopartículas condiciona el paso a través de las membranas plasmáticas, ya que la entrada de las nanopartículas hidrofílicas está más limitada. Asimismo, es importante el grado de unión de la nanopartícula a las proteínas presentes en el torrente sanguíneo o en el medio de cultivo que se unen a su superficie formando una corona. Este proceso dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la nanopartícula (tamaño, forma, carga, hidrofobicidad, etc.), de la fuente y la cantidad de proteínas (humanas, suero bovino fetal, etc.) y otros factores experimentales como son la temperatura, la fuerza iónica, la osmolaridad, el tiempo de exposición, etc. (80)

Una vez dentro de la célula, las nanopartículas deben salir del endosoma y liberar el agente terapéutico en el citoplasma. El escape desde los endosomas se puede producir por (I) la desestabilización de la membrana endosomal, (II) por el efecto llamado esponja de protones o por (III) la internalización fotoquímica. La desestabilización de la membrana lisosomal se produce en el caso de los liposomas que se fusionan con la membrana liberando el contenido al citoplasma. La esponja de protones ocurre cuando las nanopartículas llevan grupos amino (p.ej. la polietiliminina) que son protonados durante la acidificación de los endosomas, aumentando la presión osmótica debido a la entrada de iones cloruro que causa la hinchazón del endosoma y la liberación de su contenido al citoplasma. En la internalización fotoquímica, las nanopartículas se funcionalizan con fotosensibilizadores, que con la fotoactivación forman moléculas de oxígeno reactivo y rompen la membrana del endosoma. (8)

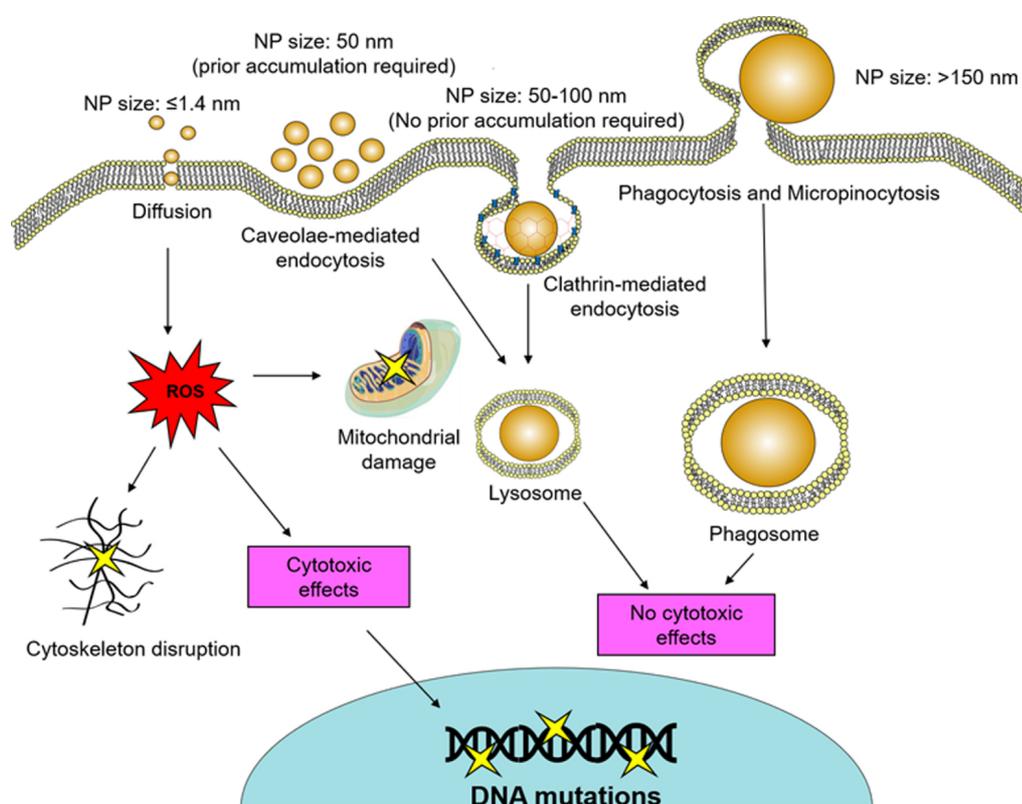


Figura 3.11. Entrada y citotoxicidad de las nanopartículas dependiente de su tamaño. Las nanopartículas (NP) de tamaño pequeño (≤ 1.4 nm) son citotóxicas debido a la formación de ROS (estrés oxidativo) que dañan el citoesqueleto, las mitocondrias y el DNA. Las nanopartículas de tamaño mediano (50–100 nm) se pueden internalizar por la vía dependiente de caveolas o clatrina, teniendo en cuenta el tipo celular y el tipo de la nanopartícula. Finalmente, las nanopartículas más grandes (150–500 nm) pueden entrar en el interior celular mediante macropinocitosis. En ambos casos no se ha observado efecto citotóxico. Imagen tomada de Villanueva-Flores et al. (82)

En general, la entrada de las nanopartículas al interior de las células es un proceso muy complejo en el que intervienen muchos factores y es importante optimizar las condiciones de los ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

ANTECEDENTES

En los ensayos *in vitro*, normalmente las nanopartículas se adicionan en suspensión sobre las células adheridas a las placas de cultivo y mediante difusión o mediante sedimentación a través del medio de cultivo llegarán a la superficie celular. Este proceso se ve afectado por varios factores como son, por una parte, la acumulación, la sedimentación y la difusión de las nanopartículas y por otra, el estado fisiológico, la adhesión, la migración de las células y la fase del ciclo celular. Como resultado, la biodistribución de las nanopartículas varía en las células individuales y se debe tener en consideración la heterogeneidad en los experimentos de internalización de nanopartículas en las células. Además, es difícil distinguir entre las nanopartículas internalizadas y las unidas a la superficie celular. Las interacciones dependerán de la afinidad de la nanopartícula por la célula y de la capacidad de unión que presenta cada célula. (84–86)

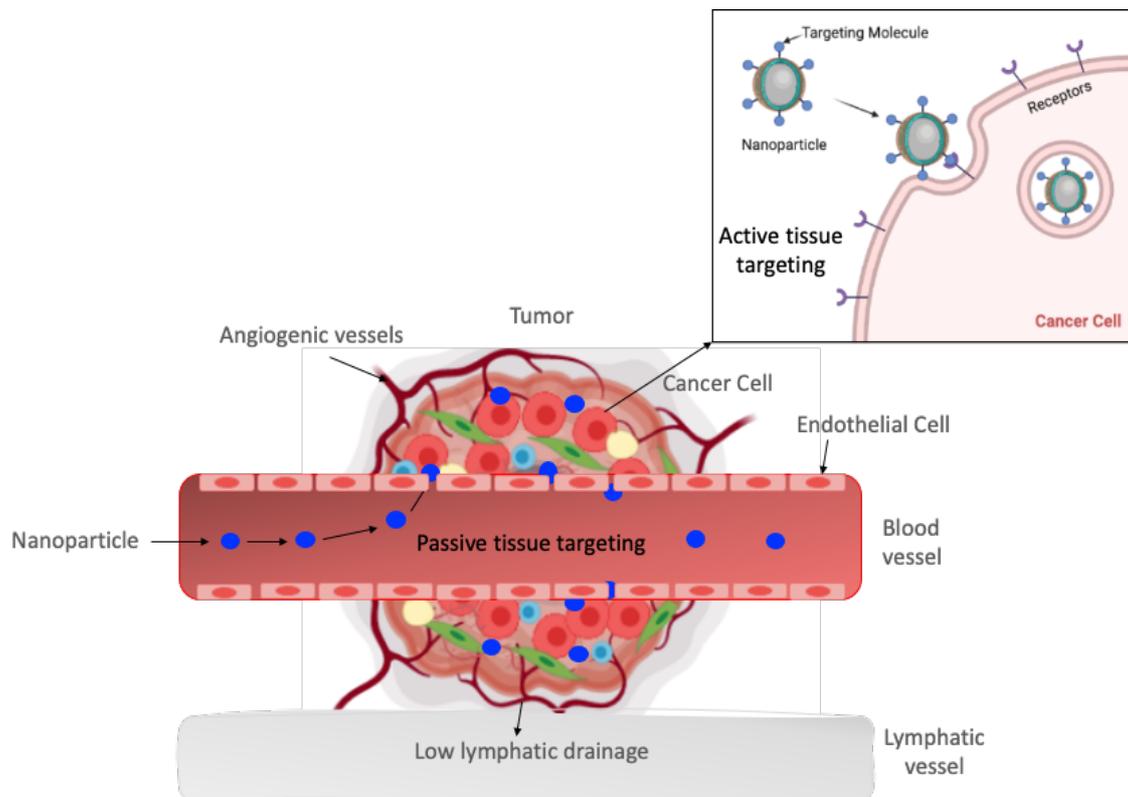


Figura 3.12. Transporte pasivo y activo de las nanopartículas hacia las células tumorales. El transporte pasivo utiliza el aumento de la permeabilidad de la vasculatura tumoral y el bajo drenaje linfático, permitiendo la liberación del fármaco en la proximidad del tumor. El transporte activo se basa en el uso de moléculas directoras en la superficie de las nanopartículas para reconocer selectivamente las dianas moleculares sobre-expresadas en la superficie de las células tumorales. Imagen adaptada de Pérez-Herrero et al. (29)

En los experimentos *in vivo*, el transporte dirigido de las nanopartículas hacia sus dianas moleculares puede ser pasivo o activo (Figura 3.12.). El transporte pasivo hacia los tejidos tumorales ocurre gracias a la angiogénesis, es decir la formación de los vasos sanguíneos con una elevada permeabilidad acompañada de un sistema linfático poco desarrollado en el microambiente tumoral, lo que favorece la acumulación de las nanopartículas y la liberación del agente terapéutico en la proximidad del tumor. (29)

Por otra parte, para favorecer un transporte dirigido activo y específico hacia el tejido tumoral, la superficie de las nanopartículas se puede decorar con moléculas directoras como son los anticuerpos monoclonales o los fragmentos de anticuerpos, péptidos, factores de crecimiento u otras moléculas que permiten un reconocimiento selectivo de los receptores o los antígenos sobre-expresados en el tejido tumoral y favorecen la endocitosis mediada por los receptores. El transporte dirigido activo aumenta la entrada del fármaco o del material genético dentro de las células tumorales, aumenta la eficacia terapéutica, favorece su liberación por estímulos, permite la combinación de los agentes terapéuticos sinérgicos, previene las resistencias y evita los efectos secundarios de la quimioterapia. (5,29)

3.5.6.3. Moléculas directoras

Las moléculas directoras favorecen el transporte activo, selectivo y específico de las nanopartículas hacia los tumores y están constituidas por ligandos de distinta naturaleza: polímeros (p.ej. ácido hialurónico), moléculas pequeñas (p.ej. bifosfonatos), carbohidratos (manosa, lactosa, N-acetilglucosamina), glicoproteínas, anticuerpos o anticuerpos de cadena sencilla (ScFv), proteínas y ácidos nucleicos (aptámeros). A continuación, se presenta una descripción de las moléculas directoras utilizadas para la síntesis de las nanopartículas en la presente tesis doctoral.

a) Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (HA) es un polímero aniónico biodegradable, biocompatible y no inmunogénico, compuesto por unidades repetidas del ácido β -1,4-D-glucurónico- β -1,3-N-acetil-D-glucosamina, cuyo peso molecular varía en un rango entre mil y millones de Daltons dependiendo de la longitud de la cadena polimérica (Figura 3.13.). (41,42) HA es una molécula natural que constituye el principal componente de la matriz extracelular y se expresa en el tejido conectivo, epitelial y neural. Tiene un papel importante en la regeneración y la reparación de tejidos, en el desarrollo embrionario y contribuye a la progresión del cáncer, ya que se encuentra sobre-expresado en el microambiente tumoral. La acumulación del HA en el estroma modula la proliferación celular del tumor, su invasividad y movilidad y actúa como un regulador durante la angiogénesis. En la práctica clínica, se utiliza para el tratamiento de la artritis, la cirugía oftálmica, la cosmética, el transporte de los fármacos y en la ingeniería tisular. (41,42)

El HA contiene en su estructura grupos carboxílicos, hidroxilos y N-acetilos que se pueden conjugar con otras moléculas químicas y debido a su naturaleza polianiónica permite formar interacciones electrostáticas con polímeros catiónicos como es la polietiliminina, lo que lo convierte en una molécula directora adecuada para desarrollar nanopartículas para el transporte dirigido. Gracias a su unión a los receptores específicos CD44 sobre-expresados en los tumores, el HA permite un transporte activo de nanopartículas unidas a fármacos quimioterapéuticos o a material genético. Además, la presencia de HA en la superficie de la nanopartícula, prolonga su vida media en el torrente sanguíneo, disminuyendo la adsorción de las proteínas plasmáticas ejerciendo un papel similar al del PEG. (41,42)

ANTECEDENTES

Este ligando se ha utilizado en la síntesis de numerosos tipos de nanopartículas como son las micelas, nanopartículas poliméricas, nanogeles, nanopartículas inorgánicas (sílice, oro, organometálicas), etc. (41) y en una conjugación directa con los fármacos quimioterapéuticos como la doxorubicina y el paclitaxel, permitiendo mejorar su biocompatibilidad, el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo y el transporte dirigido específico, evitando los efectos secundarios y las resistencias de la quimioterapia. (42)

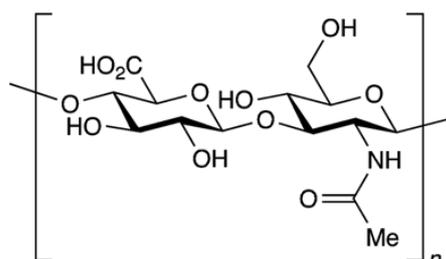


Figura 3.13. Estructura química del ácido hialurónico.

El receptor CD44 es una glicoproteína transmembrana de 85-200 kDa y está formado por una familia de glicoproteínas transmembrana con varias isoformas. La isoforma estándar de CD44 se expresa tanto en las células sanas (células hematopoyéticas, sistema nervioso central, pulmones y epidermis) como en las células tumorales y las isoformas variables CD44v (v1-v10) se expresan preferentemente en las células tumorales, aunque también en las células epiteliales y se asocian con la progresión tumoral. La isoforma CD44v6 es el principal receptor sobre-expresado específicamente en numerosos tipos de cáncer (cáncer de mama triple negativo, cáncer cervical, macrófagos, cáncer de colon, etc.). (42,87,88)

El receptor CD44 interviene en la regulación del metabolismo del ácido hialurónico, la curación de heridas y la proliferación de queratinocitos en los tejidos sanos. En el cáncer, la sobre-expresión del CD44 favorece la progresión tumoral, la invasión, la angiogénesis y la formación de las metástasis. (89)

Existen varios ligandos para el CD44 como es el ácido hialurónico, la osteopontina, los colágenos y las metaloproteasas de la matriz por lo que los efectos del CD44 en la migración celular y el crecimiento dependen de su especificidad hacia estos ligandos. El ácido hialurónico se considera el principal ligando para el receptor CD44 y su unión favorece la activación de las metaloproteasas del citoesqueleto y de la matriz que favorecen la progresión tumoral. (89)

Asimismo, se ha demostrado que el CD44 está involucrado en la señalización intracelular mediante la interacción con los receptores vecinos como son las tirosina-quinazas en muchos tipos de cáncer y la forma escindida del dominio intracelular del CD44 se transloca hacia el núcleo donde actúa como una molécula de señalización. (88)

b) Bifosfonatos

Los bifosfonatos (BP) son derivados del pirofosfato, un regulador natural de la homeostasia del calcio, que pueden ser utilizados como moléculas directoras favoreciendo el transporte dirigido específico hacia los huesos, donde la penetración de los fármacos antitumorales está muy limitada debido a la baja perfusión sanguínea. (90) Esto se debe a su gran afinidad de unión al hidroxapatito, el principal constituyente del hueso, y en menor medida a otros minerales como son el oxalato, el carbonato y el pirofosfato. (43,91)

Actualmente, los BP se utilizan en la terapia clínica para la inhibición de la calcificación en las hipercalcemias, en el tratamiento de las enfermedades degenerativas del hueso (osteoporosis y enfermedad de Paget) y en las metástasis tumorales. Los BP se unen a la matriz de hidroxapatito y bloquean la actividad de los osteoclastos, inhibiendo la resorción ósea. (90–92)

La internalización de los BP ocurre preferentemente en las zonas de alta actividad ósea y es prácticamente específica de los osteoclastos, debido a que su alta densidad de carga inhibe su paso a través de las membranas plasmáticas. La entrada en los osteoclastos se produce por la endocitosis junto con el calcio y otros productos de degradación durante la resorción ósea, induciendo su apoptosis. Además, los BP inhiben la diferenciación de los osteoclastos, lo que reduce la resorción ósea. (90,91,93)

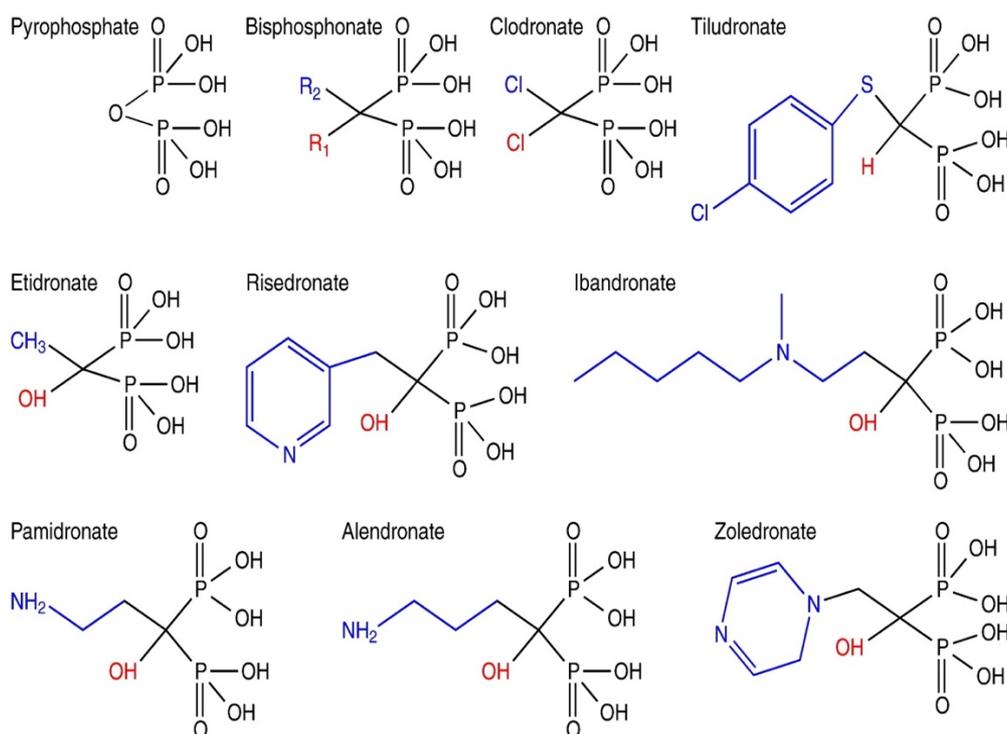


Figura 3.14. Estructura molecular del pirofosfato y de los bifosfonatos aprobados por la FDA para uso clínico. Imagen tomada de Cole et. al. (43)

Los bifosfonatos son moléculas con una estructura de fósforo-carbono-fósforo (P-C-P), resistentes a la degradación, con estructura similar al ligando natural, el pirofosfato (P-O-P). (43) En función de sus cadenas laterales (R1 y R2) unidas al carbono,

ANTECEDENTES

que interfieren en su afinidad por el hidroxapatito, se clasifican en BP no-nitrogenados y nitrogenados (amino-BP) (Figura 3.14.). Su afinidad por el hidroxapatito se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos amino de los BP y los grupos hidroxilos de la hidroxapatita. (90,91,94)

Los BP no-nitrogenados pueden ser incorporados en los análogos no hidrolizables del ATP para generar la apoptosis de los osteoclastos. Los amino-BP (ibandronato, pamidronato, alendronato, risedronato y zoledronato), afectan la función de los osteoclastos inhibiendo la prenilación de las pequeñas proteínas reguladoras de unión al GTP (proteínas G) en la ruta del mevalonato, ya que inhiben la síntesis del farnesilbifosfato y geranilgeranilbifosfato que son necesarios para la prenilación de las pequeñas proteínas G, lo que favorece el anclaje de las proteínas a las membranas plasmáticas permitiendo su participación en las interacciones proteína-proteína. (94,95)

c) Carbohidratos

La conjugación de los carbohidratos (lactosa, manosa, N-acetilglucosamina, glucosa) con nanopartículas, agentes quimioterapéuticos o sondas fluorescentes permite un transporte dirigido y un aumento en la internalización en las células tumorales que sobre-expresan receptores específicos para carbohidratos, como son los transportadores GLUT1 para la glucosa y la N-Acetil-glucosamina que contiene una molécula de glucosa en su estructura y las lectinas tipo C (las asialoglucoproteínas y los receptores de galectina-3) para el resto de los carbohidratos mencionados. (14) Además, el recubrimiento de las nanopartículas con los carbohidratos permite evitar la respuesta del sistema inmune. (96)

La lactosa se une tanto a las asialoglucoproteínas (97) como a los receptores de galectina-3 (98) y la manosa se une a sus receptores específicos CD206, un tipo de C-lectinas, sobre-expresados en los macrófagos, las células dendríticas, los fibroblastos y en el cáncer de mama. (99–102) La N-acetilglucosamina (GlcNAc) se dirige específicamente a las lectinas sobre-expresadas en los cardiomiocitos y en algunos tumores (cáncer de mama, hepatocarcinomas). (103,104) Asimismo, al contener una molécula de glucosa en su estructura, permite un transporte dirigido tanto hacia las asialoglucoproteínas como a los receptores GLUT1 sobre-expresados en los tumores de cerebro, mama, colon, hígado y pulmón. (104,105)

Los transportadores GLUT1 son proteínas localizadas en la membrana plasmática responsables de la captación basal de glucosa para el aporte de energía en las células. En 1927 Otto Warburg observó que la entrada y el metabolismo de glucosa en las células tumorales estaban aumentados en comparación con las células sanas (Figura 3.15.). Warburg descubrió que aún en la presencia de oxígeno, las células tumorales presentan una glucólisis anaeróbica (efecto Warburg), en vez de la fosforilación oxidativa. Transforman el piruvato procedente de la glucólisis en lactato en el citoplasma en vez de oxidarlo en el ciclo de Krebs como ocurre en las células sanas. La glucólisis anaeróbica produce solo dos moléculas de ATP por molécula de glucosa, mientras que la fosforilación oxidativa permite obtener 36 moléculas de ATP. (105,106)

Por lo tanto, se estudió por qué las células tumorales utilizan este mecanismo a pesar de que necesitan mayores niveles de energía que las células sanas. Esto podría ser

debido a la desregulación de las señales que aumentan la glucólisis o afectan el ciclo de Krebs en la mitocondria causando la fermentación láctica. Se activan oncogenes y el factor inducible de hipoxia (HIF-1) que aumentan la expresión de los transportadores GLUT1 y de algunos enzimas (hexoquinasa, piruvatoquinasa, lactato deshidrogenasa) y del transportador de monocarboxilatos que promueven la glucólisis en las células tumorales (Figura 3.16.). (107)

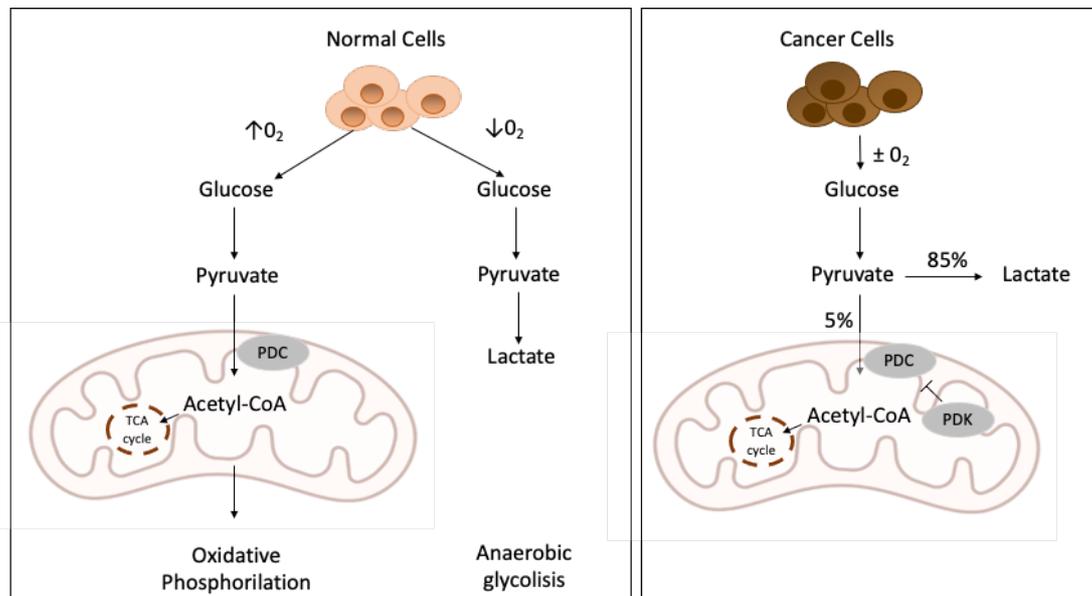


Figura 3.15. Vía metabólica de glucosa en las células sanas y en las células tumorales. Se muestran las diferencias entre la fosforilación oxidativa y la glucólisis anaeróbica. En las células sanas, en presencia de oxígeno, la glucosa es metabolizada en piruvato que se transforma en acetil-CoA mediante la piruvato deshidrogenasa (PDC) para entrar en el Ciclo de Krebs que da lugar a 36 moléculas de ATP. En el ambiente anaeróbico, el piruvato se reduce a lactato en el citosol. En las células tumorales, la sobre-expresión de las piruvato dehidroquinasaquinasa (PDKs) fosforila e inactiva la PDC, evitando la conversión del piruvato en Acetil-CoA. El 85% del piruvato en las células tumorales es fermentado en lactato. Imagen adaptada de Zhang et al. (107)

Las asialoglicoproteínas son un tipo de lectinas formadas por dos subunidades, (ASPGR-1 y 2) de 48 y 40 kDa, sobre-expresadas en la membrana de los hepatocitos y cuyos sustratos naturales son la galactosa, la lactosa, la glucosa y la N-acetilglucosamina, siendo la galactosa la que mayor afinidad presenta. (108) La unión de estos ligandos al receptor depende de la presencia de iones de Ca^{2+} , la posición de los ligandos y el pH óptimo. Además de la captación de las glicoproteínas que contienen los residuos de la galactosa o de la N-acetilgalactosamina terminal, estos receptores intervienen en el aclaramiento de IgA, de las lipoproteínas LDL y de los linfocitos activados de la circulación y en la eliminación de las células apoptóticas. (109,110)

Las galectinas son una familia de proteínas capaces de unirse a los β -galactósidos mediante una N- u O-glicosilación. Todas las galectinas presentan un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) bien definido. (111–113) Las galectinas se clasifican en función de su estructura en galectinas en tándem (dos subunidades CRD distintas), diméricas (dos subunidades CRD idénticas) y una galectina quimérica, la galectina-3, formada por una subunidad CRD unida a un dominio de tipo no-lectina.

ANTECEDENTES

(111,112) Las galectinas tienen la capacidad de unirse a los glicanos que contienen lactosa y N-acetil-lactosamina mediante interacciones de Van der Waals. Presentan una especificidad amplia dependiendo del tipo y la longitud del carbohidrato y la forma de presentar el ligando al CRD. En el interior celular se unen preferentemente a los glico-conjugados que se encuentran sobre todo en el citosol. (114,115)

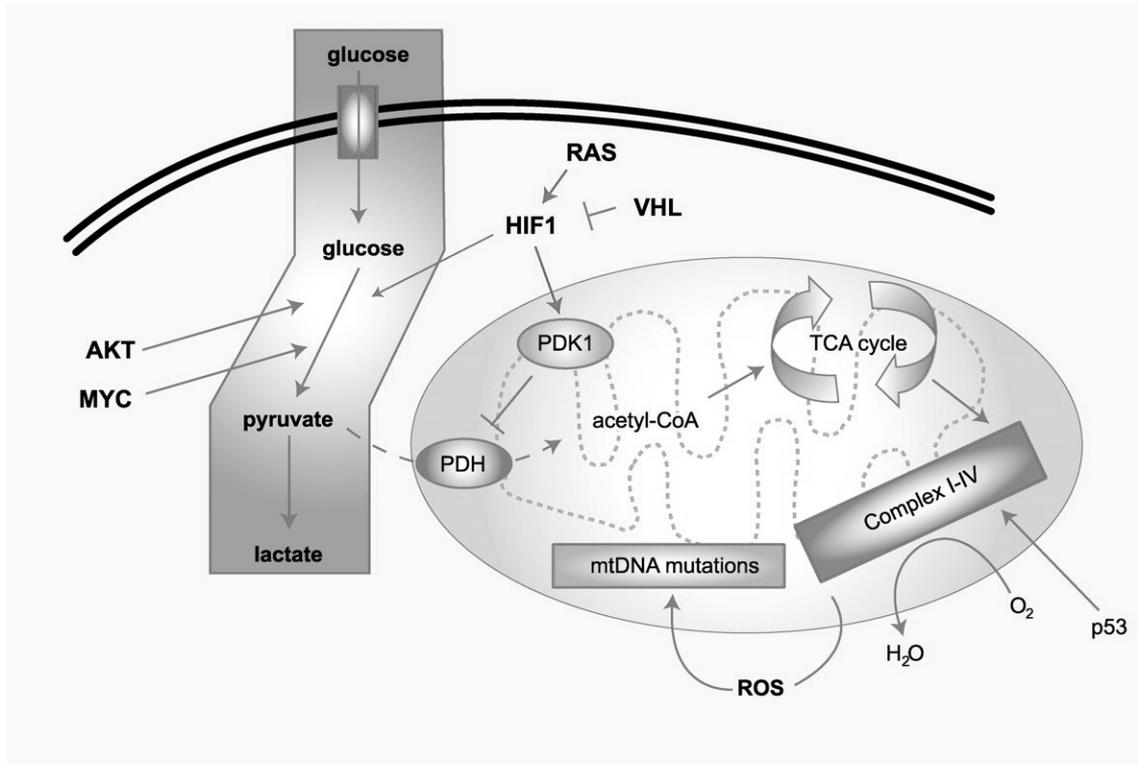


Figura 3.16. Mecanismos moleculares del efecto Warburg. Este efecto describe la conversión de la glucosa que entra en el interior celular en lactato en las células tumorales, incluso en la presencia de oxígeno, que en las células sanas se utilizaría para la fosforilación oxidativa. La activación del oncogeno AKT produce un transporte mayor de glucosa, aumentando el ratio de glucólisis. El oncogeno MYC activa los genes glucolíticos y la biogénesis mitocondrial, lo que puede dar lugar a la producción de ROS, que pueden dañar el DNA mitocondrial. Además, en la hipoxia tumoral se sobre-expresa HIF-1 que transactiva los genes glucolíticos y activa el gen PDK1, que inhibe la PDH que cataliza la conversión del piruvato al acetil-CoA, por lo que se favorece la conversión del piruvato en lactato. Imagen tomada de Kim et al. (116)

Las galectinas se sintetizan en los ribosomas citosólicos y pueden translocarse al núcleo u otros sitios sub-celulares. La mayoría de ellas se encuentran preferentemente en los compartimentos intracelulares y se excretan hacia el exterior de la célula de forma no convencional, posiblemente a través de vesículas o exosomas. El patrón de expresión puede ser diferente entre los distintos tipos celulares y entre las células sanas y las células tumorales, ya que se producen modificaciones en la localización sub-celular y en los niveles de expresión cuando ocurre una transformación maligna de las células. (114,115)

La galectina-3 es una galectina quimérica de 31 kDa, que contiene un grupo CRD unido a un dominio N-terminal de 120 aminoácidos, rico en prolina y glicinas. La galectina-3 con un solo CRD es capaz de formar homodímeros u oligómeros mediante el

dominio N-terminal, dependiendo de la concentración y la disponibilidad de los ligandos. Cuando se encuentra con su estructura oligomérica en el espacio extracelular tiene función biológica ya que se une a sus sustratos mediante el CRD e induce señales transmembrana e intracelulares mediante el entrecruzamiento de los receptores y de las proteínas superficiales. Así, contribuye a la adhesión intercelular y a la adhesión de las células tumorales a las proteínas de la matriz extracelular. (114) Un aumento de la expresión de la galectina-3 se observa en el cáncer colorrectal, gástrico, cáncer de pulmón, cabeza y cuello, páncreas, melanoma, endometrio, tiroides, hígado, mama y vejiga y en las leucemias y los linfomas, pero disminuye en la leucemia linfoblástica crónica y en el cáncer de próstata. (112,117,118) La expresión de la galectina-3 en las células tumorales está influenciada por las células del microambiente tumoral como son las células madre mesenquimales y por cambios metabólicos como es la hipoxia que se produce en el microambiente tumoral. (117)

3.5.6.4. Terapia génica

La terapia génica para el tratamiento del cáncer consiste en la introducción de los ácidos nucleicos exógenos (genes, fragmentos de genes, oligonucleótidos, miRNA o siRNA) en las células tumorales mediante un proceso denominado transfección, con el objetivo de editar los genes diana, modular su expresión o la síntesis de las proteínas. El proceso de la transfección se puede realizar *ex vivo*, mediante la recolección de las células tumorales, que se manipulan genéticamente y se vuelven a introducir en el paciente, o *in vivo* cuando el material genético se introduce directamente dentro de las células tumorales, por la vía sistémica intravenosa o por la administración local (oral, ocular, transdermal, etc.) dependiendo de la localización y de la progresión del tumor. En la introducción del material genético directamente en las células tumorales, éste presenta una vida media muy baja y además está cargado negativamente, lo que dificulta su paso a través de las membranas celulares. Cuando el material genético es administrado en el organismo por la vía sistémica debe superar las diferentes barreras biológicas, evitar la acción de las nucleasas, del sistema fagocítico, el rápido aclaramiento renal y la respuesta inmune. Por lo tanto, es necesario el uso de los vectores de transfección que actúan como un vehículo, protegiendo los ácidos nucleicos de la acción de las nucleasas circulatorias, escapan del ataque del sistema inmune y, además, favorecen un transporte dirigido hacia las células tumorales evitando los efectos secundarios sobre las células sanas. (8)

Los vectores para transportar el material genético no deben interactuar con las células del endotelio vascular y con los componentes sanguíneos, evitando su captación por el sistema fagocítico y una respuesta inmunológica fuerte. Además, deben tener un tamaño pequeño para poder atravesar las membranas celulares y alcanzar el núcleo celular y permitir una expresión regular y mantenida del material genético. Asimismo, deben permitir un transporte específico del material genético de cualquier tamaño solo hacia las células tumorales y ser fáciles de preparar a gran escala y con bajo coste. (9)

A pesar de los grandes avances en la investigación de la terapia génica, el principal reto es utilizar la cantidad adecuada del material genético y mantener la expresión génica en el periodo de tiempo deseado, por lo que es necesario el desarrollo

ANTECEDENTES

de nuevos vectores de transfección que cumplan las características mencionadas previamente y que permitan el transporte del material genético de una forma eficaz, específica y segura. (79)

a) Estrategias para la terapia génica

A lo largo de las últimas décadas, se han desarrollado diversas estrategias en la terapia génica para el cáncer, variando el tipo del vector, el material genético o la diana molecular a la que va dirigido el tratamiento.

Una de las estrategias de la terapia génica del cáncer consiste en silenciar los oncogenes con RNA de interferencia (siRNA o shRNA) que va dirigido a la secuencia complementaria específica en el mRNA de un determinado oncogén, produciendo su degradación o bloqueando la síntesis proteica. (8,9,119)

Asimismo, la terapia génica del cáncer permite el reemplazamiento de los genes supresores de tumores mutados mediante la transducción génica, manteniendo la estabilidad y la expresión completa del gen o corrigiendo las mutaciones en su forma original. En algunos tipos de tumores, los microRNA están sobre-expresados favoreciendo el desarrollo tumoral (*oncomirs*) o están suprimidos evitando el control inhibitorio sobre los oncogenes, la diferenciación celular y la apoptosis. Por lo tanto, la terapia génica consiste en la reposición del miRNA en las células tumorales. Otras de las estrategias de la terapia génica antitumoral permiten reparar el DNA dañado o inducir la apoptosis, el envejecimiento o la autofagia de las células tumorales. (8)

Además, se pueden utilizar cebos de los factores de transcripción. Se trata de pequeñas moléculas del DNA de doble hebra que presentan la misma secuencia que los factores de transcripción de un gen de interés, compitiendo con sus sitios de unión específicos. (8)

En los últimos años, se ha desarrollado una nueva estrategia de la terapia génica basada en la edición génica que consiste en la modificación del DNA intracelular de forma específica mediante la inserción, la delección, la integración o la sustitución de una secuencia, usando nucleasas específicas mediante el sistema CRISPR/Cas9. El sistema más utilizado es el de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), que reconoce las secuencias cortas 5'-NGG (secuencias PAM). Cas9 es una nucleasa guiada por el RNA guía (sgRNA) que se une a la secuencia diana en el DNA de interés. Normalmente, el sistema CRISPR/Cas9 consiste en un plásmido que codifica para la Cas9 y el RNA guía y permite una expresión génica estable y prolongada. (8)

Otra de las estrategias consiste en el uso de genes suicidas que permiten insertar en las células tumorales un gen que codifica para una proteína citotóxica mediante una estrategia directa, introduciendo un gen tóxico que reduce la viabilidad celular o indirecta, introduciendo un gen que codifica para una enzima que convierte un fármaco no tóxico en un fármaco citotóxico. (8,9,119)

Asimismo, existe una estrategia basada en la disminución de la angiogénesis en los tumores mediante la inhibición de la expresión de las señales pro-angiogénicas como es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) sobre-expresado en la hipoxia presente en los tumores y mediante el aumento de la expresión de los factores anti-angiogénicos como es la angiostatina. (8)

b) Vectores Virales

Los primeros vectores desarrollados para la terapia génica fueron los vectores virales gracias a su naturaleza que los hace atractivos para transportar el DNA o el RNA a las células humanas. Los virus normalmente entran a través de endocitosis en las células huésped y utilizan la maquinaria celular para expresar y replicar su propio material genético y posteriormente infectan a otras células. (26)

Los virus usados como vectores para el material genético están modificados por ingeniería genética, ya que se eliminan las partes patogénicas y se reemplazan por el gen terapéutico, manteniendo la estructura no patogénica del virus que permite transportar el material genético de interés hacia el interior de las células. Los vectores virales más utilizados en la terapia génica son los retrovirus, los adenovirus, los virus adeno-asociados, los lentivirus y el virus de herpes simple. Los adenovirus no son capaces de integrar su genoma en el genoma de la célula huésped, mientras que los lentivirus, los retrovirus y los virus adeno-asociados sí integran su genoma. Por lo tanto, la expresión del gen terapéutico es transitoria en los vectores virales derivados de adenovirus y disminuye en unas semanas mientras que los vectores virales integrantes permiten una expresión génica a largo plazo (meses o años). (9)

Las principales ventajas e inconvenientes de los distintos tipos de vectores virales se recogen en la Tabla 4.

En general, los vectores virales tienen una elevada capacidad de transfección *in vivo* y aseguran la expresión del material genético a lo largo del tiempo, pero presentan problemas asociados a la inmunogenicidad, una carga limitada del material genético, carcinogénesis debido a la inserción de la secuencia del gen de interés en la proximidad de los genes que controlan el crecimiento celular y la dificultad de preparación a gran escala, por lo que se ha restringido su uso en la terapia génica en busca de alternativas más seguras y baratas como son los vectores no-virales.

a) Vectores no virales

En comparación con los vectores virales, los vectores no virales son más seguros, producen una respuesta inmune menor y tienen un menor coste. Además, permiten transferir más de dos genes de interés y un material genético más largo. Asimismo, pueden almacenarse durante mayores periodos de tiempo. Sin embargo, presentan una menor eficiencia de transfección y un mayor aclaramiento renal antes de alcanzar el sitio diana cuando se administran por vía sistémica. Por lo tanto, hoy en día, el principal objetivo en la investigación biomédica es encontrar nuevos vectores de transfección eficientes que sean capaces de proteger y llevar el material genético a las células diana donde se puedan expresar. (9,26)

Los métodos de transfección no virales se basan en (I) métodos físicos que utilizan una fuerza física para introducir el material genético en las células (electroporación, ultrasonidos, microinyección, etc.), (II) encapsulación o la adsorción del DNA en nanopartículas de distinta naturaleza y (III) vectores químicos basados en derivados policatiónicos (lípidos o polímeros). (79)

ANTECEDENTES

VECTOR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> -Elevada eficiencia de transducción <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> -Capaz de introducir el material genético en muchos tipos celulares en fase proli- o no proliferativa -Fácil producción en cantidades elevadas 	<ul style="list-style-type: none"> -Permanece episomal -Expresión transitoria -Requiere la maquinaria celular de empaquetamiento -Inmunotoxicidad en administraciones repetidas -No permite transporte dirigido -Tamaño del inserto limitado: 4-5 kb
Virus adeno-asociados	<ul style="list-style-type: none"> -Integración en el cromosoma 19 humano para establecer infección latente -Expresión prolongada -La transducción no necesita división celular -Genoma pequeño 	<ul style="list-style-type: none"> -No permite transporte dirigido -Requiere la maquinaria celular de empaquetamiento -Posible mutagénesis (<i>ins</i>) -Difícil producción -Tamaño del inserto limitado: 5 kb
Virus de Herpes Simple	<ul style="list-style-type: none"> -Permite tamaño de inserto más grande: 40-50 kb -Tropismo neuronal -Expresión latente -Transducción eficiente <i>in vivo</i> -Disponibilidad de vectores replicativos 	<ul style="list-style-type: none"> -Citotóxico -No permite transporte dirigido - Requiere la maquinaria celular de empaquetamiento -Expresión transitoria -No se integra en el genoma
Lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> -Transduce células en fase de proli- o no proliferación -Transduce las células madre hematopoyéticas -Expresión prolongada 	<ul style="list-style-type: none"> -Procede del virus VIH -Fabricación y almacenamiento difícil - Tamaño del inserto limitado: 8 kb -Uso clínico limitado
Retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> -Integración en el genoma celular -Tropismo celular amplio -Expresión estable prolongada -Requiere división celular para la transducción -Tamaño de inserto más largo: 9-12 kb 	<ul style="list-style-type: none"> -Transducción ineficiente -Mutagénesis insercional -Requiere la división celular para la transfección -Requiere la maquinaria celular de empaquetamiento -No permite transporte dirigido

Tabla 4. Vectores virales usados comúnmente en la transfección, sus ventajas e inconvenientes. Tabla traducida y adaptada de Ibraheem et al. (9)

La aplicación de nanopartículas y de los vectores policatiónicos en la terapia génica son las tecnologías más prometedoras en la investigación biomédica debido a su facilidad de síntesis, la posibilidad de funcionalización con diferentes grupos y una baja inmunogenicidad y toxicidad. (8)

Los vectores de transfección deben viajar a través del sistema circulatorio, acumularse en el tumor, entrar dentro de las células tumorales mediante endocitosis y salir de los endosomas para llevar el material genético de forma satisfactoria o bien al citoplasma (ribosoma en el caso del mRNA o RISC para el shRNA o miRNA) o al núcleo (en el caso del DNA). (8) Los endosomas llevan al DNA cerca del espacio perinuclear y éste entrará dentro del núcleo mediante un mecanismo pasivo durante la división celular cuando se desintegra temporalmente la membrana nuclear o mediante un transporte activo a través de los poros del núcleo. Ambos mecanismos no son excluyentes y constituyen una barrera adicional en el transporte génico (Figura 3.17.). (13)

El material genético se puede encapsular dentro de nanopartículas orgánicas (liposomas, micelas, partículas de quitosan) o adsorberse sobre nanopartículas inorgánicas (nanotubos de carbono o partículas magnéticas), descritas en el apartado 3.5.6.1. La adsorción del material genético sobre la superficie de las nanopartículas facilita la degradación del DNA antes de llegar a su sitio de acción al estar expuesto a la acción de las nucleasas, las proteínas plasmáticas y el sistema fagocítico. (13)

Por otra parte, para el transporte del material genético hacia las células tumorales, se utilizan vectores químicos debido a su elevada eficacia de transfección y facilidad de producción a gran escala. Los vectores químicos se forman por fuerzas electrostáticas entre los derivados policatiónicos lipídicos o poliméricos con los grupos aniónicos del fosfato del DNA. Las ventajas que presentan con respecto a las nanopartículas es que son capaces de enmascarar la carga negativa del DNA, lo compactan para hacerlo más pequeño y lo protegen frente a las nucleasas. Además, al presentar cargas positivas, se unen mejor a las membranas plasmáticas de las células cargadas negativamente mediante interacciones electrostáticas y permiten mayores niveles de transfección que el resto de los vectores no virales. (13)

Los polímeros catiónicos más utilizados en la terapia génica son los polipéptidos (poli L-lisina), los polímeros sintéticos como la polietilenimina (PEI) o la poliamidoamida (PAMAM), y los polímeros naturales (chitosan, dextrano, ácido hialurónico) que contienen un elevado número de grupos aminos que se pueden protonar a pH fisiológico. (79)

La polietilenimina es uno de los vectores no virales más usados en la investigación de la terapia génica. Se trata de un polímero catiónico que presenta aminos primarias, secundarias y terciarias (Figura 3.18.) que pueden protonarse a pH fisiológico y unirse al DNA a través de fuerzas electrostáticas con los grupos fosfato del material genético. Esta unión origina complejos del polímero con el material genético empaquetado que ocupa un volumen de 10^4 - 10^6 veces menor que un DNA desnudo, lo que favorecerá su endocitosis dentro de las células a través de las vías dependientes de caveolas. Una vez en el interior de la célula, es capaz de escapar de los endosomas celulares por el efecto de esponja de protones, ya que dentro del endosoma se protona

ANTECEDENTES

y se produce la entrada de iones cloruro, causando la entrada del agua y la rotura del endosoma. (13)

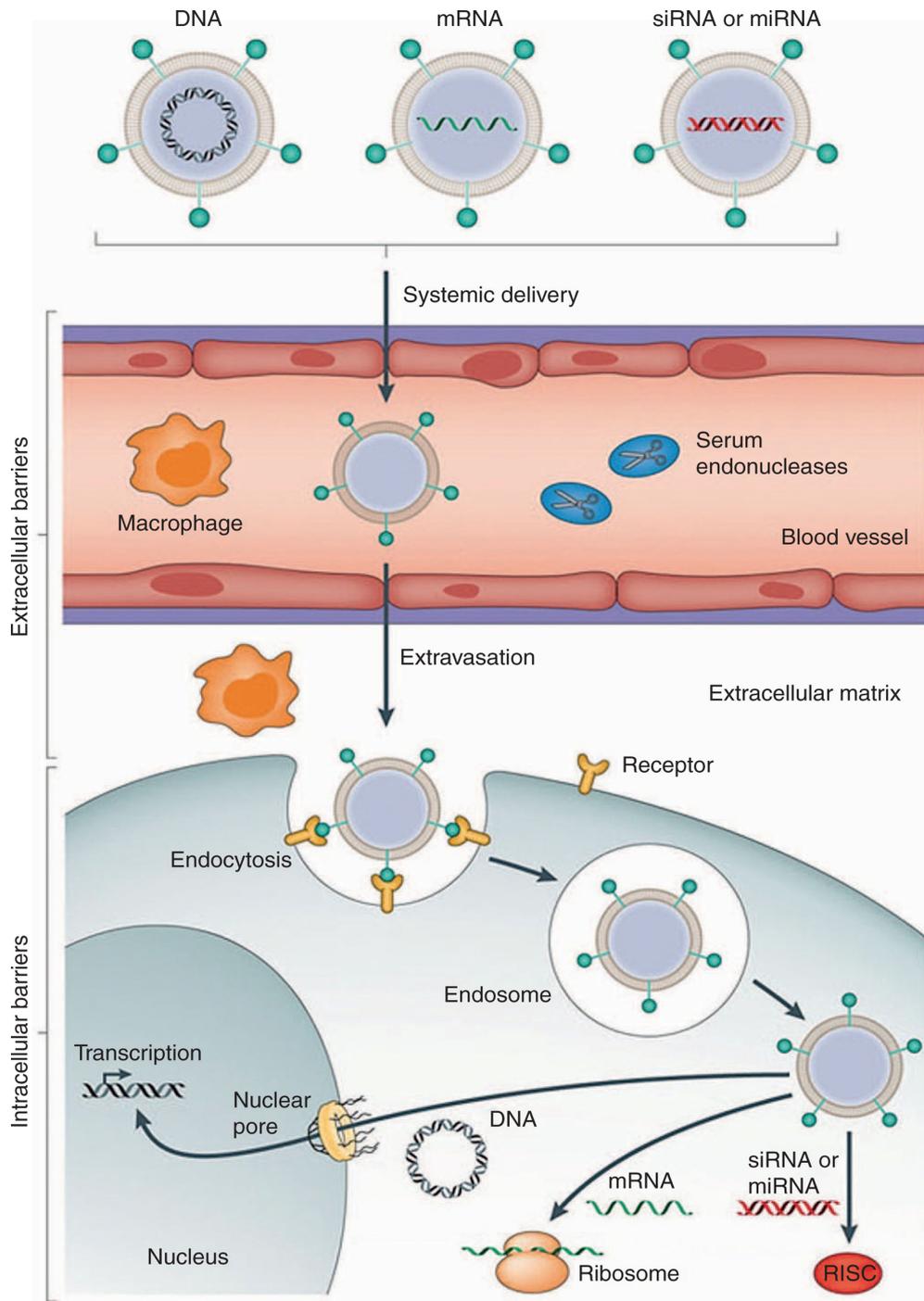


Figura 3.17. Esquema de la terapia génica basada en nanopartículas in vivo. Imagen tomada de Chen et al. (120)

Una de las ventajas de presentar un número elevado de aminas, es que existe una gran cantidad de nucleófilos que permiten su fácil funcionalización y una terapia dirigida, ya que se le pueden unir las moléculas directoras de distinta naturaleza.

Además, son fáciles de sintetizar, presentan una baja inmunogenicidad y permiten la unión de una gran variedad de material genético. (14)

La unión y la condensación del complejo PEI-DNA depende del peso molecular, el número de cargas y el ratio N/P (la proporción de los grupos amino de la PEI frente a los grupos fosfato del DNA). A menor densidad de carga y menor peso molecular del polímero, disminuye la capacidad de la condensación del DNA. (14) Los complejos con carga positiva interactúan con los proteoglicanos en la superficie celular y tienen una eficiencia de transfección mayor. Asimismo, el exceso de la carga policationica es esencial para generar una corona catiónica hidrofílica alrededor del complejo polímero-DNA para aumentar su solubilidad. (13)

Además, la composición del medio interviene en la unión del polímero al DNA, dependiendo de la fuerza iónica. El aumento de las sales en el medio, disminuye la capacidad de unión del DNA al polímero. Asimismo, el tamaño del polímero determina la eficiencia de transfección. Cuanto más largo o ramificado es el polímero, mejor es la compactación del DNA. Esto permite la protección de la degradación del DNA en el ambiente extracelular y aumenta la entrada en las células por las interacciones electrostáticas entre el polication y la superficie celular cargada negativamente. El tamaño de los complejos PEI-DNA es importante en la biocompatibilidad y la extravasación cuando se dirigen a las células fuera de los vasos sanguíneos. Las polietileniminas de alta ramificación forman complejos más pequeños, tienen mayor eficiencia de transfección, pero presentan una mayor toxicidad. La capacidad de transfección de la polietilenimina lineal es menor debido a que contiene menos grupos aminos primarios, pero presenta una menor toxicidad. (9,26)

El principal problema que presenta la polietilenimina es que los complejos cargados positivamente se agregan con el tiempo, dependiendo de la carga superficial y la fuerza iónica del medio. Los complejos a N/P bajos (2-5) tienden a formar agregados debido a interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, mientras que los N/P más altos reducen la agregación debido a las fuerzas de repulsión, pero pueden ser más tóxicos. (13)

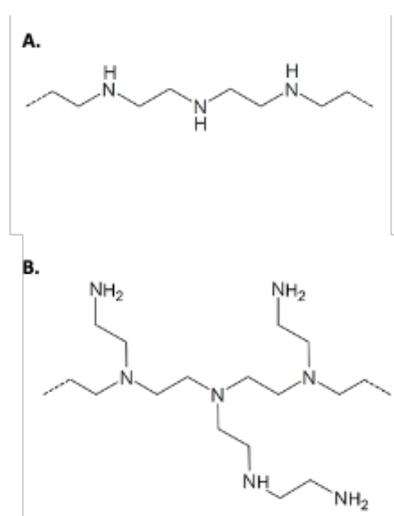


Figura 3.18. Estructura de la polietilenimina: (A) lineal y (B) ramificada.

3.5.6.5. Agentes teragnósticos

Con el objetivo de mejorar la terapia dirigida, se han desarrollado los agentes teragnósticos que permiten al mismo tiempo el diagnóstico y el tratamiento, gracias a que incluyen en la nanopartícula, de origen lipídico, organometálico o polimérico, (I) una molécula directora para el transporte selectivo y específico (descritas en el apartado 3.5.6.3), (II) un agente terapéutico (fármaco quimioterapéutico o material genético para la terapia génica) y (III) un agente para el diagnóstico por imagen con propiedades ópticas, radioactivas o magnéticas (sondas fluorescentes, quantum dots, materiales paramagnéticos, radionúclidos, etc., descritos en el apartado 3.4.4.) (Figura 3.19.). (5–7)

Cabe destacar que los propios agentes terapéuticos pueden actuar como agentes para la visualización por técnicas de imagen, como es el caso de la doxorubicina que se excita a 480 nm y emite fluorescencia a 590 nm. Además, existen nanopartículas que presentan la capacidad inherente de diagnóstico sin necesidad de unión de otras moléculas como son las nanopartículas de carbono (Carbon Dots), las nanopartículas magnéticas o las nanopartículas de oro. (5–7)

Por lo tanto, los agentes teragnósticos son nanosistemas multifuncionales para el diagnóstico y el tratamiento específico, selectivo y personalizado del cáncer para dirigir específicamente y de forma eficiente el agente quimioterapéutico al tejido tumoral sin afectar los tejidos sanos y permitiendo una monitorización en tiempo real. (30)

A pesar de los grandes avances en este campo, todavía quedan muchos retos por superar en la investigación y en el desarrollo de los agentes teragnósticos, debido a sus limitaciones que consisten en la complejidad de su estructura, lo que dificulta su preparación a gran escala. Además, pueden tener asociados problemas de toxicidad y un comportamiento imprevisible *in vivo*. Por otro lado, existen dificultades regulatorias para que puedan ser usados en la práctica clínica, ya que presentan problemas en la reproducibilidad de los ensayos y en su síntesis, purificación y esterilización. Asimismo, es necesario identificar las moléculas directoras adecuadas y su densidad óptima en la superficie de la nanopartícula para asegurar un transporte específico y selectivo hacia el tejido tumoral y determinar unos estándares regulatorios adecuados para la monitorización rutinaria y la evaluación de las nanopartículas *in vivo*. (31) El principal reto para el futuro es la selección de la mejor nanoplataforma, aumentar la eficiencia de conjugación de la molécula directora, mejorar las técnicas de síntesis, aumentar la reproducibilidad en los ensayos y disminuir el coste. (30)

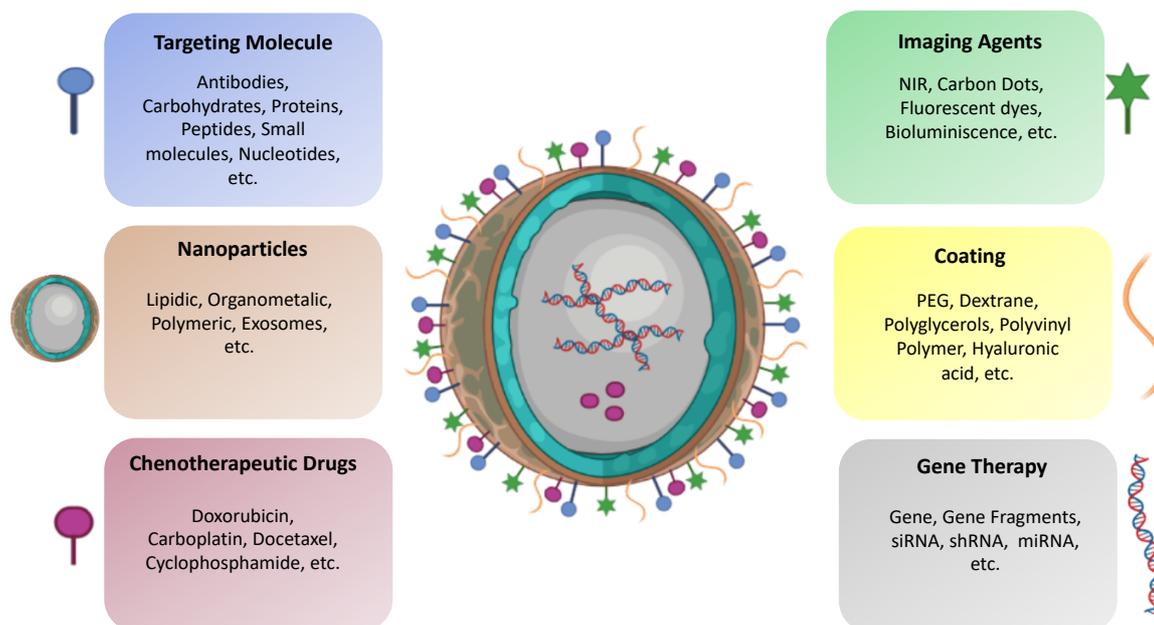


Figura 3.19. Esquema de un sistema teragnóstico. Sistemas teragnósticos pueden ser diseñados con la elección del vehículo de transporte, las moléculas directoras para un transporte dirigido hacia los tumores, las moléculas/sondas para la visualización, monitorización y diagnóstico y los agentes terapéuticos (agentes quimioterapéuticos o material genético). (31)

3.6. Tipos de cáncer y su tratamiento

Los tumores se pueden clasificar en función de su (I) malignidad en tumores malignos (crecen desproporcionadamente, con la posibilidad de generar metástasis) o benignos (no presentan un crecimiento tan descontrolado, no son invasivos y normalmente no presentan riesgo para la vida), (II) tipo del tejido que afectan en tumores sólidos (cáncer de mama, pulmón, próstata, cervical, etc.) o los tumores del sistema circulatorio (linfomas, leucemia), (III) tipo histológico (carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma y mixtos), (IV) estadio y pronóstico y (V) origen (tumores primarios o metástasis).

3.6.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer con la mayor incidencia y mortalidad en las mujeres en el mundo. (121) El 30% de las pacientes desarrollan metástasis no tratables y su esperanza de vida no es más de 3 años. (122) El cáncer de mama tiene una mayor incidencia en las mujeres con edad avanzada o que no han pasado el embarazo o la lactancia, por lo que es más frecuente en los países desarrollados. Para el diagnóstico se utilizan las técnicas de la examinación mamaria, mamografía, ultrasonidos y RMN. (123)

Existen tres tipos principales del cáncer de mama: (I) positivo para los receptores de hormonas/ERBB2-negativo (HR+/ERBB2-), (II) ERBB2 positivo (HER2+) y (III) triple negativo (Tabla 5). (20)

ANTECEDENTES

TIPO	HR+/ERBB2-	ERBB2+ (HR+ o HR-)	TRIPLE NEGATIVO
Características	Positivos para ER α o PR en >1% de células tumorales	Positivos para HER2. La mitad de tumores positivos también para HR	Negativo para ER, PR y HER2
Patogénesis Molecular	ER α activa las vías de señalización oncogénicas	Sobre-expresión de HER2	Desconocida
Porcentaje de los casos	70%	15-20%	15%
Pronóstico	$\geq 99\%$	$\geq 94\%$	$\geq 85\%$
Estadío I (supervivencia a 5 años)			
Metastásico (supervivencia)	4-5 años	5 años	10-13 meses
Terapia sistémica para el no metastásico	-Terapia endocrina en todos los pacientes (tamoxifeno, anastrozol, exemestano, letrozol) v.o. durante 5-10 a. - Quimioterapia en algunos pacientes vía i.v. 12-20 sem DOX/CYCLO DOX/CYCLO/PTX DTX, CYCLO	- Quimioterapia vía i.v. 12-20 semanas y terapia dirigida al HER2 durante 1 a. PTX/trastuzumab DOX/CYCLO/PTX/Trastuzumab \pm pertuzumab DTX/CARBO/trastuzumab \pm pertuzumab Si es HR+, terapia endocrina	Quimioterapia vía i.v. 12-20 sem. DOX/CYCLO DOX/CYCLO/PTX DTX, CYCLO

Tabla 5. Tipos de cáncer de mama, sus características y la terapia indicada. (i.v. vía intravenosa, v.o. vía oral, a. años, sem. semanas, DOX-doxorubicina, CYCLO-ciclofosfamida, PTX-paclitaxel, DTX-docetaxel, CARBO-carboplatino.) (20)

En el cáncer de mama HR+/ERBB2- la principal diana molecular es el receptor de estrógenos alfa (ER α), que se expresa aproximadamente en el 70% de los cánceres de mama invasivos. Se trata de un receptor para las hormonas esteroideas que cuando se activa por el estrógeno, activa las vías de señalización de crecimiento oncogénico en las células tumorales. Asimismo, la expresión del receptor de la progesterona (PR) es otro factor importante en el desarrollo de este tipo de cáncer de mama. Los tumores que expresan ER α o PR al menos en un 1% de las células tumorales se llaman tumores HR+. La principal terapia sistémica contra este tipo de cáncer consiste en el uso de los agentes inhibidores de la señalización a través del receptor ER α . (20)

El cáncer de mama ERBB2 positivo representa el 20% de los cánceres de mama y se caracteriza por la sobre-expresión del factor de crecimiento epidérmico 2 (ERBB2, HER2 o HER2/neu). Es un receptor tirosina quinasa transmembrana que pertenece a la familia de receptores de los factores de crecimiento epidérmicos y se asocia con un

pronóstico desfavorable en la ausencia de la terapia sistémica. Hoy en día, existen terapias dirigidas al receptor HER 2, incluyendo los anticuerpos monoclonales como son el trastuzumab y el pertuzumab y los inhibidores de la tirosina quinasa como el lapatinib y el nertinib. (20)

El cáncer de mama triple negativo representa un 15% de los casos y se origina sobre todo en las mujeres jóvenes, hispánicas o de raza negra y es el que peor pronóstico tiene. La esperanza de vida una vez alcanzado el estadio IV, es de 10 a 13 meses. Se caracteriza por la falta de expresión de los receptores ER α , PR y HER2. Tiene un alto riesgo de recidivas en los primeros 3-5 años después del diagnóstico. (20)

Las opciones terapéuticas dependen de las características biológicas específicas del tumor. Cuando está en los primeros estadios, sin metástasis en los nódulos, y es positivo para los receptores de estrógenos, se puede recomendar la terapia hormonal, pero si está en último estadio y metastásico en los nódulos, se administra primero la quimioterapia antes de la terapia hormonal. Para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de mama se utiliza la doxorubicina, la epirubicina, el paclitaxel, el docetaxel, el 5-fluoruracilo, la ciclofosfamida, el carboplatino y sus combinaciones. En el 20-30 % de las pacientes se produce un avance del estadio a pesar del tratamiento neoadyuvante. (121)

En el cáncer de mama no metastásico el tratamiento consiste en la extirpación del tumor y los nódulos linfáticos axilares y la administración de la radioterapia postoperatoria. La terapia sistémica puede ser neoadyuvante (antes de la cirugía) o adyuvante (después de la cirugía) o ambas. Se administra la terapia endocrina para los tumores HR+ (asociada a la quimioterapia en algunos casos), el trastuzumab asociado a la quimioterapia en el cáncer de mama de tipo HER 2+ y la quimioterapia para el cáncer de mama triple negativo. En el caso del cáncer de mama metastásico, se trata de prolongar la vida de la paciente y la paliación de los síntomas ya que es incurable. (20)

3.6.2. Osteosarcoma

Es el cáncer de huesos más frecuente que se origina por la proliferación de las células fusiformes malignas. Normalmente ocurre en la metáfisis de los huesos largos sobre todo en el fémur distal (43%), la tibia proximal (23%) y el húmero (10%). Afecta principalmente a niños, adolescentes y adultos jóvenes. Los pacientes con mutaciones en el gen supresor de tumores p53 y en el gen de retinoblastoma (Rb) que regula la progresión del ciclo celular tienen un mayor riesgo de padecer el osteosarcoma. En adultos, el 2% de los pacientes con la enfermedad de Paget desarrollan el osteosarcoma a lo largo de su vida. (33,34)

Los síntomas que presenta son el dolor y la inflamación en el hueso afectado y en el 15-20% de los casos se originan metástasis, de las cuales más del 85% ocurren en el pulmón o en el resto de los huesos. (33)

Actualmente el tratamiento se basa en la quimioterapia neoadyuvante, la cirugía y el tratamiento postoperatorio. Los pacientes reciben diez semanas del tratamiento quimioterapéutico, seguido de la cirugía del tumor primario. Para ello, se usa la combinación de cisplatino, doxorubicina y altas dosis de metotrexato. Después de la cirugía, reciben otras 20 semanas de quimioterapia. Este tratamiento tiene éxito

solamente en el 55-60% de los casos, mientras que el resto no responden o responden solo parcialmente a la quimioterapia. A pesar de los numerosos intentos del desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del osteosarcoma, el pronóstico en los pacientes no ha mejorado comparando con los años ochenta. El 80% de los pacientes desarrollan metástasis entre los 3 y 6 meses después de la resección primaria en la ausencia de la quimioterapia adyuvante. La supervivencia en los pacientes con metástasis es menor del 20%. (32–34)

3.6.3. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es el tercero más común en el mundo y sigue siendo una causa significativa de mortalidad. Su forma metastásica se considera incurable. La tasa de supervivencia a los 5 años es solo del 12,5% y las resistencias ocurren en el 90% de los casos metastásicos. El tratamiento depende de las características individuales de cada paciente y su estadio y se basa en el uso de cirugía, quimioterapia y terapia dirigida. Como agentes quimioterapéuticos se utilizan el irinotecan, el oxaliplatino, la capecitabina, el 5-fluoruracilo o las combinaciones de varios. Asimismo, se han desarrollado tratamientos de terapia dirigida con los anticuerpos monoclonales como el cetuximab o el panitumumab dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) o el bevacizumab para el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR). (10–12)

3.6.4. Cáncer cervical

El cáncer cervical sigue siendo una de las principales causas de la muerte en las mujeres en el mundo. El pronóstico en el cáncer cervical avanzado y recurrente es muy desfavorable y la probabilidad de supervivencia de 1 año es solo del 10-20%. La quimioterapia se basa en el cisplatino, que es el tratamiento más efectivo en el cáncer cervical recurrente y avanzado. Asimismo, se usa la terapia combinada del cisplatino con el paclitaxel para el tratamiento del cáncer recurrente y metastásico donde la tasa de supervivencia son aproximadamente 12 meses. Además, los datos clínicos, epidemiológicos y moleculares asocian el riesgo de la infección por el virus del papiloma humano con el desarrollo de este tipo de cáncer. (35–37)

3.7. Modelos tridimensionales de cultivo celular

Actualmente, en el descubrimiento de los fármacos, los ensayos empiezan en los cultivos bidimensionales, seguido de ensayos en animales de experimentación y posteriormente pasan a los ensayos clínicos. Los ensayos basados en las células cultivadas en monocapa proporcionan una herramienta simple, rápida y barata para evitar el uso de los animales de experimentación en el cribado masivo de fármacos. Sin embargo, estos ensayos no tienen en cuenta la estructura tridimensional de los tejidos *in vivo*, por lo que proporcionan a veces datos no predictivos y confusos de la respuesta terapéutica. Solo un 10% de fármacos pasan al desarrollo clínico. Muchos compuestos fallan sobretodo en la fase III, la fase más cara de los ensayos clínicos, debido a la falta de eficacia terapéutica o una toxicidad inaceptable. Una parte de este fracaso se debe a los resultados obtenidos en cultivos bidimensionales debido a que la respuesta celular

a los fármacos se ve afectada, ya que no están en su ambiente natural. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos sistemas que puedan reproducir mejor los comportamientos celulares *in vivo*. (44,45,66)

3.7.1. Diferencias entre los modelos bidimensionales y tridimensionales

En los cultivos 2D, todas las células reciben homogéneamente los nutrientes y los factores de crecimiento y las células necróticas se despegan de la placa y se eliminan durante el cambio de medio. (44,45,66)

Se ha demostrado que las células cultivadas en los tejidos 3D son diferentes morfológica- y fisiológicamente comparando con el ambiente bidimensional. Las células 2D son morfológicamente más planas y expandidas que en 3D, lo que influye en la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la expresión génica y proteica. Los ratios de proliferación de las células en 2D y 3D son diferentes y dependen de la matriz, normalmente creciendo más lentamente en 3D, representando mejor el crecimiento celular en el microambiente tumoral. (66)

Cuando las células tumorales se extraen de su ambiente natural y crecen en 2D, ocurren cambios a nivel transcripcional y traduccional para adaptarse a su nuevo ambiente. La comparación de la expresión génica en las líneas celulares tumorales incluyendo el cáncer de mama, colon, próstata y pulmón demuestran que aproximadamente el 30% de los genes se expresan de forma diferente en las células *in vitro*. (44,45,66)

También se ha observado que cuando las células cultivadas en 2D se trasladan a su ambiente *in vivo* o se cultivan en matrices que simulan la matriz extracelular, estas diferencias en la morfología, la proliferación y la expresión génica se restauran. Por lo tanto, el ambiente tridimensional es crítico para mantener la función transcripcional y traduccional de las células. (44,45,66)

Además, las técnicas 3D permiten co-cultivar varios tipos celulares para reproducir mejor las condiciones *in vivo*. Proporcionan un modelo para estudiar las células del estroma en el cáncer que tienen un papel importante, ya que su comunicación con las células tumorales se ha asociado con el crecimiento tumoral, la formación de las metástasis y la respuesta al tratamiento. (44,45,66)

Por lo tanto, el cultivo bidimensional no reproduce la anatomía y la fisiología del tejido *in vivo*, incluyendo la expresión de receptores, la expresión transcripcional, la migración celular, la apoptosis, las propiedades mecánicas, la comunicación intercelular y con la matriz extracelular y las relaciones entre los diferentes tipos celulares. Aunque existen co-cultivos bidimensionales, éstos no reproducen la función celular observada en el tejido *in vivo*. (44)

El cultivo de las células en los sistemas tridimensionales representa de una forma más realista la estructura y el microambiente del tejido como es la matriz extracelular. Aunque los cultivos tradicionales siguen siendo la elección predominante en los ensayos celulares para el cribado de fármacos, el uso de los tejidos tridimensionales está teniendo un progreso rápido en los últimos años. Comparando con los modelos animales, que son muy costosos, los tejidos tridimensionales son simples, rápidos, versátiles, de bajo coste y fácilmente reproducibles. (44)

3.7.2. La importancia de los cultivos tridimensionales en el estudio del cáncer

Durante décadas, los cultivos bidimensionales de células cultivadas sobre una superficie plana y rígida de las placas de cultivo han aportado una considerable información fundamental sobre los procesos biológicos y patológicos. A pesar de ello, no necesariamente reflejan el microambiente complejo del tejido ya que una de las mayores influencias en el comportamiento celular *in vivo* de manera tejido-específica es la matriz extracelular (ECM) y las conexiones intercelulares. Las moléculas de la ECM incluyen las proteínas de la matriz (colágeno, elastina), las glicoproteínas (fibronectina), los glucosaminoglicanos (ácido hialurónico), los proteoglicanos (perlecan, syndecan), los factores de crecimiento (TGF- β , VEGF, etc.) y otras proteínas secretadas (enzimas proteolíticas e inhibidores de proteasas). Los cambios dinámicos en estos componentes regulan la proliferación celular, la diferenciación, la migración, la supervivencia, la adhesión, la organización cito-esquelética y la señalización celular tanto en un ambiente fisiológico como en el ambiente patológico, como es el cáncer. Además, la composición de la ECM influye en la respuesta celular al tratamiento mejorando la eficacia farmacológica, alterando su mecanismo de acción e incluso induciendo resistencias. (44,124)

En el cáncer, el microambiente tumoral incluyendo las células no tumorales (fibroblastos, células endoteliales, adipocitos, células del sistema inmune) y la matriz extracelular son muy variables dependiendo del tipo del tumor, el estadio y su localización. Los cambios en la composición de la ECM pueden influir en la respuesta terapéutica mediante la alteración de la disponibilidad del fármaco, la expresión de las dianas moleculares y los cambios en los mecanismos de defensa intrínsecos de la célula (la reparación del DNA dañado o la evasión de la apoptosis) (Figura 3.20.). (44)

Además, las interacciones de las células con la ECM pueden originar una respuesta heterogénea a fármacos, teniendo en cuenta que las células en la superficie tumoral presentan resistencias y en el interior del tumor, en ausencia de la ECM, son sensibles al tratamiento. Asimismo, la adhesión de las células con las proteínas de la ECM mediante receptores transmembrana, es un factor muy importante en la modulación de la respuesta a los quimioterapéuticos y las terapias dirigidas. Además, otros componentes como el heparán sulfato, el ácido hialurónico, las metaloproteasas de la matriz, los inhibidores de las metaloproteasas tisulares (TIMP), varias citoquinas y factores de crecimiento interfieren en la respuesta al tratamiento y favorecen las resistencias. Por lo tanto, es necesario el uso de los modelos de cáncer que mimeticen mejor el microambiente tumoral. (44,45,125)

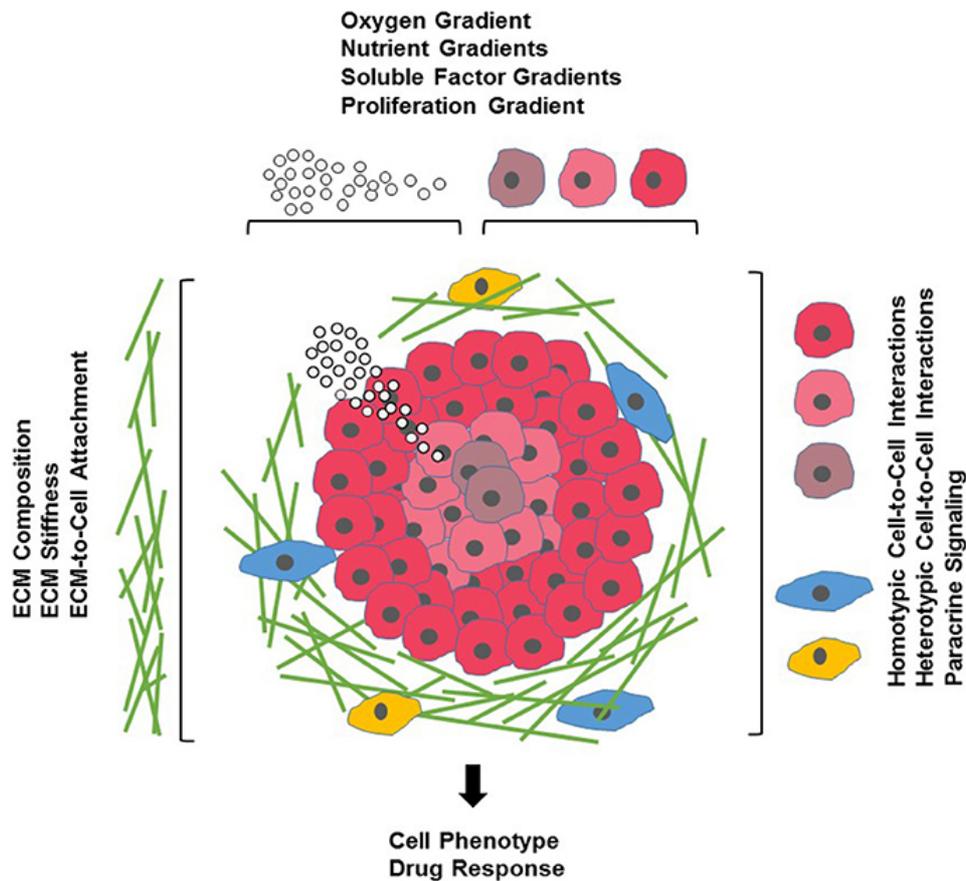


Figura 3.20. Células tumorales y su microambiente tumoral. Las células tisulares (rojas) forman un microambiente complejo con las proteínas y las glicoproteínas (verdes) de la matriz extracelular (ECM), con las células de soporte que participan en las interacciones célula-célula (azules), las células inmunes (amarillas) y los factores solubles (esferas blancas). El microambiente además está definido por la rigidez de la ECM (densidad de sus proteínas), el gradiente de oxígeno (tonalidad cambiante del rojo) y el gradiente de los nutrientes y de los factores de crecimiento (densidad de las esferas blancas). Imagen tomada de Langhans et al. (44)

Asimismo, los cambios en la ECM se asocian con cambios en la rigidez. Los tumores suelen ser más rígidos que el tejido que los rodea lo que favorece las resistencias a fármacos. Además, se generan gradientes de oxígeno, pH, nutrientes y metabolitos celulares en función de la proximidad a los vasos sanguíneos, la difusión de las moléculas a través de la ECM y su composición. En los tumores pequeños y en las metástasis si aún no hay angiogénesis, se generan gradientes de oxígeno de manera que las zonas externas están en estado proliferativo y en el núcleo, que presenta hipoxia, las células están quiescentes y son más resistentes al tratamiento. Estos gradientes no pueden ser estudiados en los cultivos bidimensionales ya que las células están expuestas homogéneamente al medio de cultivo. En los modelos *in vivo*, la hipoxia ocurre de forma natural o se puede inducir, pero son modelos caros, complejos y variables. Los cultivos tridimensionales como son los esferoides, las células cultivadas en las matrices tridimensionales y los microdispositivos representan el microambiente tumoral y permiten el estudio de los gradientes de oxígeno, factores de crecimiento y de nutrientes y su influencia en la respuesta terapéutica. (44)

Los modelos tridimensionales ideales simulan el microambiente específico del tejido tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, donde las células pueden proliferar, agregarse y diferenciarse y, además, permiten establecer las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, y simulan la rigidez específica del tejido y los gradientes de oxígeno, nutrientes y deshechos metabólicos. (44,45,125)

3.7.3. Tipos de cultivos tridimensionales

Las técnicas tridimensionales se clasifican dependiendo que usen una estructura de soporte o no en su formación (Figura 3.21.).

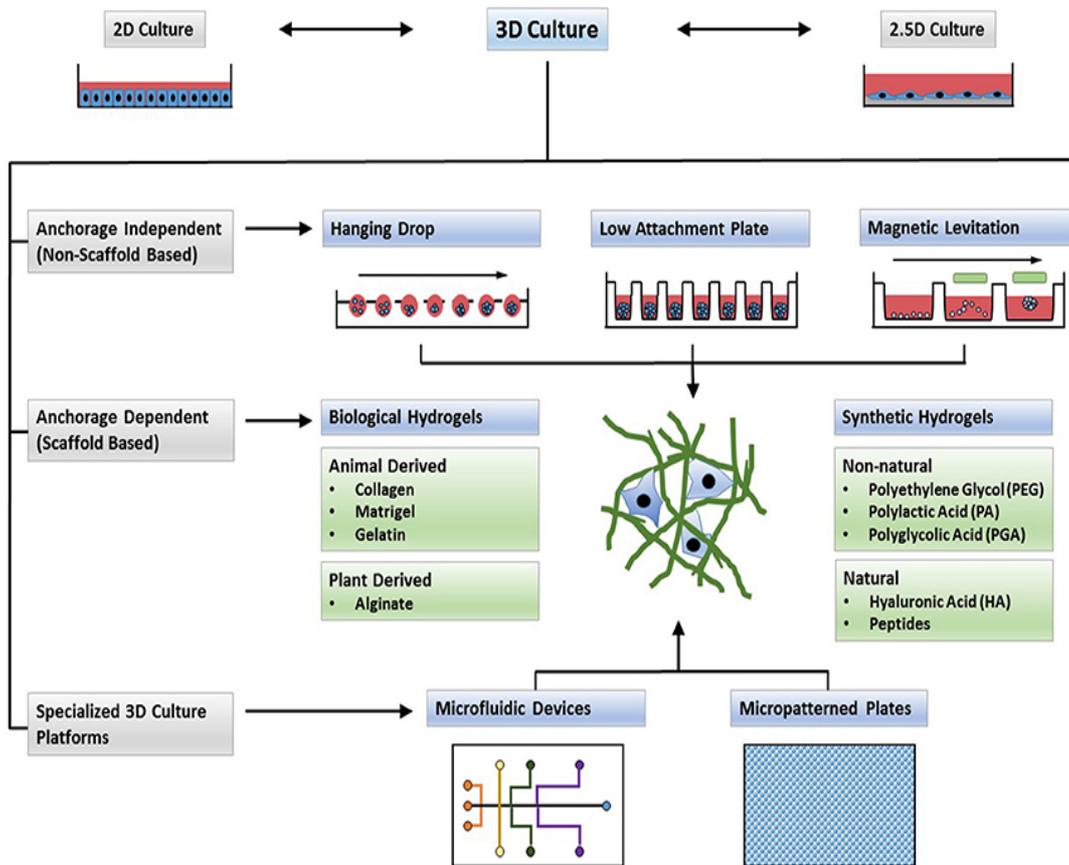


Figura 3.21. Tipos de cultivos tridimensionales. En comparación con los cultivos celulares bidimensionales o los cultivos 2.5 D, donde las células crecen sobre una capa fina de la matriz extracelular, los cultivos 3D forman estructuras complejas. Las células pueden formar esferoides o se pueden encapsular en distintos tipos de matrices que simulan la ECM o en dispositivos microfluídicos y placas con micropatrones con componentes de la matriz extracelular. Imagen tomada de Langhans et al. (44)

Los tejidos basados en estructuras de soporte permiten estudiar las interacciones de las células con la matriz extracelular, mientras que los que no necesitan estas estructuras se utilizan para estudiar gradientes celulares y fisiológicos. (44) Las ventajas y los inconvenientes de los cultivos tridimensionales actualmente disponibles se recogen en la Tabla 6.

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Esferoides en placas de baja adhesión	Simples, bajo coste, reproducibles, accesibles	Número de pases limitado, ECM autocrina, técnica laboriosa
Hanging Drop	Control de tamaño de los esferoides, bajo coste si se usan placas de 96 pocillos, tamaño uniforme y esferoides homogéneos	Caro si se usan placas especializadas, difícil cultivo a largo plazo, bajo volumen, difícil el cambio de medio
Levitación magnética	Facilidad de uso, eficiente, no requiere medio especial	Tiñe el cultivo 3D de marrón y limita ciertas aplicaciones, numerosas células se adhieren en el fondo de la placa
Dispositivos rotacionales, spinner flasks	Producción masiva, cultivo a largo plazo, simple	Requiere equipo especializado, no es posible controlar la uniformidad de los esferoides (tamaño, composición), formación de remolinos y rotura celular
Dispositivos microfluídicos	Permiten control del tamaño de los esferoides, perfusión continua de medio	Dificultad de recolectar las células para su análisis, equipamiento complejo y caro
Hidrogeles	Simulan las condiciones <i>in vivo</i> , red de señales de la ECM	Bajas propiedades mecánicas, ciertos componentes de los geles naturales son variables y no definidos, falta de vasculatura
Estructuras de soporte tipo ECM	El parecido máximo a las condiciones <i>in vivo</i> , posibilidad de control de la composición de la ECM y adición de factores de crecimiento	Caros para la producción a gran escala, dificultad en disociar las células del soporte, complejidad de uso

Tabla 6. Ventajas e inconvenientes de los modelos 3D actualmente disponibles. Tomada y traducida de Donglai LV et al. (125)

3.7.3.1. Métodos sin estructuras de soporte. Esferoides

Las técnicas sin estructuras de soporte se basan en la autoagregación de las células en (I) placas de cultivo de baja adhesión con recubrimiento de bajo anclaje que favorece la formación de los esferoides, (II) las técnicas de *Hanging Drop* y (III) la levitación magnética.

Los esferoides y en particular los esferoides multicelulares, representan las características fisiológicas de los tejidos y los tumores permitiendo las interacciones célula-célula, y si son capaces de sintetizar su propia matriz extracelular, las interacciones célula-ECM. Su tamaño depende del número de las células sembradas y, además, permiten generar un gradiente de oxígeno y de nutrientes. (44,124)

ANTECEDENTES

Se han generado esferoides derivados de líneas celulares o mediante la propagación de los tumores de los pacientes individuales *ex vivo* (organoides tumorales) que llevan el genoma del paciente para llevar a cabo el cribado de fármacos y facilitan el desarrollo de una medicina personalizada. (44) Se pueden visualizar mediante luz natural, fluorescencia o microscopia confocal y, además, se pueden incluir en las estructuras que simulan la matriz extracelular para estudiar la adhesión celular de las capas externas. (44,124)

Para el cultivo de los esferoides se utilizan placas específicas de fondo redondo o en forma de "V", con superficies de baja adherencia, tratadas con recubrimientos hidrofílicos o hidrofóbicos (polímero poli-HEMA no adherente) o polímeros naturales (agarosa) y usando medios sin suero bovino fetal, pero suplementados con los factores de crecimiento adecuados para cada línea celular, lo que favorece su crecimiento y agregación en esferoides en suspensión de un tamaño de entre 20 μm -1 mm. Su principal desventaja consiste en que no presentan la capacidad migratoria por lo que no son posibles los pases a largo plazo. Actualmente, no existen ensayos de viabilidad celular precisos en los esferoides. Asimismo, es necesaria una optimización compleja de las condiciones del cultivo para obtener esferoides uniformes en tamaño y reproducibles con el objetivo de prevenir la insuficiencia de los nutrientes y la necrosis. (44,125)

En la técnica de *Hanging Drop*, una pequeña cantidad de cultivo celular se añade sobre una placa de cultivo especial y luego se invierte para crear gotitas, ya que la adhesión micro-líquida a la superficie del sustrato es mayor que su propio peso. Las células crecen en esferoides en la interfaz líquido-aire. Se trata de un método simple y tiene un ratio de reproducibilidad aproximadamente del 90%. Las desventajas son que el volumen de la gota es de 10-20 μl por lo que no hay más de 500 células por gota, no se puede reemplazar el medio y es difícil la adición de los fármacos en el medio del cultivo. Asimismo, esta técnica presenta una baja capacidad de escalamiento y es difícil de automatizar el procedimiento. (44,45,125)

Los esferoides también se pueden obtener por levitación magnética, donde las células se unen a nanopartículas magnéticas y luego usando un campo magnético externo, flotan hacia una interfaz de aire/líquido en una placa de baja adhesión para favorecer la agregación en esferoides. (44) La ventaja de esta técnica consiste en que no necesita la presencia de sustratos o medios especiales. Para su formación se usa un biorreactor rotatorio (*NanoShuttle-PL*) que permite una agitación continua para asegurar la suspensión celular lo que impide la adhesión celular y asegura una distribución uniforme de los nutrientes y del oxígeno. La desventaja es que la formación de espuma y de remolinos por la agitación puede producir daños en las células. (125)

3.7.3.2. Métodos con estructuras de soporte

Las estructuras de soporte proporcionan una ayuda física a las células en su crecimiento, adhesión y proliferación, permitiendo la distribución espacial adecuada y las interacciones intercelulares o con la matriz extracelular. Este tipo de cultivos 3D se basa en el uso de un soporte físico que puede ser desde una estructura mecánica simple hasta un hidrogel de tipo matriz extracelular, en las que las células se pueden agregar, proliferar y migrar. Las propiedades físicas y químicas de la estructura de soporte

influyen en las características celulares. El soporte puede ser de origen biológico o sintético y mimetiza las propiedades de la ECM como son la rigidez, la carga y la adhesión. Las estructuras de soporte se preparan a partir de polímeros naturales como son colágeno, chitosan, ácido hialurónico, fibrina, agarosa, alginato y almidón, o bien de polímeros sintéticos como ácidos poliglicólico y poliláctico, poli-orto-éster y sus copolímeros y poli-éster-policaprolactona. Los polímeros naturales presentan una buena biocompatibilidad y baja toxicidad mientras que los sintéticos son más versátiles, con mayor reproducibilidad y facilidad de manejo. La desventaja de los polímeros sintéticos es que no son bioactivos, aunque en algunas matrices sintéticas se pueden incluir también factores de crecimiento, hormonas y moléculas biológicas activas para promover la proliferación celular o la diferenciación. (44)

Por último, es necesario controlar la porosidad, la fuerza mecánica, la estabilidad estructural y la cinética de degradación de la estructura de soporte. (44,125)

a) Hidrogeles naturales y sintéticos

Los soportes de hidrogeles están constituidos por redes de cadenas poliméricas entrecruzadas con propiedades y estructura definidas. Contienen un 95% de agua y son sólidos en el estado quiescente. Pueden ser de origen natural o sintético y se caracterizan porque se pueden mezclar con diferentes materiales para formar hidrogeles híbridos con nuevas propiedades físicas y biológicas. (44,125)

Los hidrogeles naturales se basan en el uso de colágeno, fibrina, alginato, gelatina o Matrigel[®], son biocompatibles, tienen propiedades adhesivas naturales y mantienen las funciones celulares fisiológicas como la viabilidad celular, la proliferación o la diferenciación controladas y el fenotipo celular observado *in vivo*. (44)

La proteína de la ECM más utilizada para generar los tejidos tridimensionales es el colágeno tipo I. Alterando las concentraciones o la temperatura de gelificación se obtienen cambios en la rigidez del hidrogel de colágeno permitiendo cambios en la proliferación celular. El colágeno y el Matrigel[®] favorecen el anclaje celular mediante los receptores de integrina que activan las vías de señalización que controlan la supervivencia celular, el crecimiento y la diferenciación y pueden modular la respuesta terapéutica a la quimioterapia, la inmunoterapia y la radioterapia. Se ha demostrado que la respuesta a los fármacos antitumorales varía entre las células crecidas en 2D y 3D como el alginato o el Matrigel[®]. (44,125)

El Matrigel[®] es una mezcla gelatinosa de proteínas y factores de crecimiento secretados por las células del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm que está mínimamente procesada, por lo que presenta una buena capacidad de mimetizar la matriz extracelular *in vivo*. En su estructura se encuentran laminina y colágeno y una fracción pequeña de entactina, una glicoproteína de membrana, conjuntamente con varios factores de crecimiento (EGF, IGF-1, TGF- β , etc.). El Matrigel[®] procede de fuentes naturales, por lo que su variabilidad entre los distintos lotes puede influir en los estudios farmacológicos de respuesta terapéutica. Debido al origen natural y su obtención a partir de los tejidos vivos, tanto los tejidos 3D de colágeno como el Matrigel[®] contienen otros componentes y no están bien definidos químicamente. Ambos favorecen la

ANTECEDENTES

interacción de las células con las proteínas de la ECM, pero debido a su diferente composición, las células pueden presentar fenotipos diferentes. (44)

La fibrina, un polímero natural formado durante la coagulación, se obtiene mediante la polimerización del fibrinógeno, una proteína plasmática. Se ha usado en los cultivos *in vitro* para estudios de angiogénesis y en células madre mesenquimales, pero su degradación por las proteasas limita su uso en los cultivos celulares a largo plazo. La gelatina es un producto de colágeno parcialmente degradado térmica- y químicamente que se puede estabilizar mediante modificaciones covalentes. La posibilidad de formación de las uniones covalentes de los grupos funcionales permite desarrollar geles de gelatina especializados, como por ejemplo los geles fotoreactivos o los geles con las concentraciones de oxígeno controladas. El alginato se aísla de las paredes celulares de las algas marrones y gelifica en presencia de los iones de calcio a temperatura ambiente, pero sus propiedades mecánicas y su degradación rápida limitan su uso en la formación de los tejidos 3D, aunque es útil en el desarrollo de tejidos vasculares, huesos y cartílagos. (44,45,125)

Los hidrogeles sintéticos son materiales ideales ya que mimetizan la ECM, pueden ser funcionalizados con estructuras adhesivas, incluyen sitios proteolíticos y factores de crecimiento. Además, presentan una estructura química- y físicamente definida y tienen propiedades mecánicas modificables para alcanzar la rigidez y la porosidad adecuadas. Los hidrogeles sintéticos se pueden formar a partir de los polímeros naturales o sintéticos. Los polímeros sintéticos como son el ácido poliláctico, poliglicólico, poliláctico-co-glicólico y policaprolactona, etc. tienen la ventaja de ser inertes, de bajo coste y con propiedades reproducibles y modificables durante su síntesis o entrecruzamiento, obteniendo resultados consistentes. (44,45)

Estos polímeros no presentan sitios de adhesión como los polímeros naturales y requieren el entrecruzamiento de péptidos biológicos en el soporte para mejorar su funcionalidad. Los polímeros naturales también presentan propiedades consistentes y modificables, pero su coste puede ser elevado debido a los requisitos complejos de su síntesis química. Uno de los polímeros naturales más usados es el ácido hialurónico, un glucosaminoglicano que se puede modificar con grupos funcionales. (44)

Las propiedades químicas del biomaterial son fundamentales para favorecer la adhesión y la propagación celular, lo que se puede conseguir modificando su superficie con las proteínas solubles, controlando la polaridad y la carga. Asimismo, se tiene que tener en cuenta su macro-, micro- y nanoestructura. A nivel macroscópico se debe tener en cuenta la forma y el tamaño de la estructura. A nivel microscópico se debe asegurar la adhesión celular para reproducir la arquitectura de un tejido teniendo en cuenta que el tamaño de la mayoría de los tipos celulares somáticos adherentes está entre 10-150 μm . Asimismo, la microestructura incluye la porosidad del tejido tridimensional para mantener el transporte de los nutrientes y para determinar las propiedades mecánicas y poder reproducir las propiedades del tejido nativo, ya que estas influyen en la función de las células. Las propiedades nanoscópicas también son importantes para determinar cómo interaccionan las células con el sustrato. (44)

Uno de los principales problemas en los cultivos tridimensionales es el aporte continuo de nutrientes y la eliminación de desechos para evitar la necrosis como pasa en los esferoides. Para ello, se han generado biorreactores con control de la

temperatura, el pH y el oxígeno y con aporte del medio de cultivo, los nutrientes y la eliminación de los desechos. (44) Además, se puede incorporar una barrera entre compartimentos dentro del dispositivo o una barrera no física como una matriz de soporte que mimetiza la ECM. Estos dispositivos permiten una aplicación continua de los fármacos u otras moléculas solubles como los factores de crecimiento y se pueden usar en los cultivos de los tumoroides a largo plazo. (44,45)

b) Arrays con micro-patrones

La microfabricación permite la producción de *arrays* con micro-patrones impresos en las placas que permiten la adhesión intercelular para la formación de microesferas sin estructuras de apoyo en una escala microscópica. Las placas con micro-patrones se pueden utilizar también para proporcionar un ambiente de cultivo tridimensional basado en la estructura de soporte para promover el anclaje celular con el objetivo de formar organoides y redes continuas cerca de la superficie de soporte. Los andamios poliméricos prefabricados como son los discos porosos, las estructuras de soporte de *electrospinning* o los polímeros en capas ortogonales son los soportes físicos que actúan como una matriz inerte diseñada para mimetizar la ECM en la que se pueden anclar las células para formar los tejidos tridimensionales. Normalmente estas estructuras se usan para la regeneración de los tejidos recreando el ambiente físico y estructural del hueso, los ligamentos y el cartílago y en los ensayos *in vitro* de los organoides tumorales. Para su síntesis se usan las técnicas como liofilización, inversión de fase, *electrospinning*, estereolitografía, sinterización selectiva por láser, impresión tridimensional, micro-ensamblaje robótico, etc. (44)

3.7.4. Organoides

Las células cultivadas en los tejidos tridimensionales pueden ser derivadas de animales de experimentación, pacientes, células cultivadas en el laboratorio o sus variedades modificadas. El principal problema que se presenta en la investigación con los tejidos tridimensionales derivados de los pacientes es la baja disponibilidad de las muestras o la incapacidad de generar muestras suficientes para estudios clínicos. (124)

El término "organoides" se refiere a una variedad de técnicas de cultivo que dan lugar a tejidos tridimensionales con capacidad de auto-organización y auto-renovación, derivados de tejidos primarios, células madre embrionarias o pluripotentes y que tienen una funcionalidad similar al tejido del que provienen. (44) Los organoides se pueden usar para modelizar una enfermedad, ensayar la toxicidad farmacológica, generar biobancos, para la terapia personalizada y los estudios de las interacciones entre el patógeno y el hospedador. (45)

La introducción de mutaciones genéticas en los modelos animales para generar enfermedades humanas monogénicas no garantiza la representación fiel de sus características clínicas. La falta de modelos preclínicos para predecir la eficacia y la toxicidad de nuevos compuestos es una de las principales limitaciones en el desarrollo de nuevos fármacos. Además, la predictibilidad de los modelos animales es dudosa debido a las diferencias inter-especies en los fenotipos de enfermedades y en las respuestas a los fármacos. La falta de predictibilidad y los problemas éticos asociados al

ANTECEDENTES

uso de animales de laboratorio han llevado al desarrollo de los cultivos tridimensionales y la generación de varias plataformas tridimensionales para el cribado de las respuestas terapéuticas en los organoides tumorales (tumoroides) para una medicina personalizada. La respuesta heterogénea de los tumores neoplásicos al tratamiento antitumoral se ha demostrado mediante el cribado de 83 agentes antitumorales autorizados y experimentales en tumoroides de tejido colorrectal obtenido de 20 pacientes. Asimismo, se han generado organoides de un número elevado de pacientes en la fase I y II de ensayos clínicos donde se observaron similitudes morfológicas entre las biopsias y los organoides derivados de pacientes. Los datos de respuestas terapéuticas sugieren que los organoides pueden ser una herramienta útil en la medicina personalizada. (45)

Por lo tanto, los organoides derivados de células humanas tienen el potencial de proporcionar modelos de condiciones fisiológicas para estudiar el desarrollo de las enfermedades humanas. Son más baratos que los modelos animales para el cribado de nuevos fármacos y constituyen modelos precisos de enfermedades humanas que no se pueden reproducir en los animales de experimentación. Los tumoroides derivados de los tejidos tumorales de los pacientes son los más avanzados para proporcionar plataformas 3D más realistas para una evaluación personalizada de la respuesta terapéutica, ya que contienen células tumorales y estroma del microambiente tumoral. Los tumoroides que mantienen la identidad del tejido con los organoides de los tejidos sanos adyacentes permiten poner la base para construir biobancos de organoides tumorales como repositorio para la detección y el desarrollo de fármacos. (44)

4.OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Esta tesis doctoral se centra en el desarrollo de nuevos agentes teragnósticos antitumorales (compuestos que permiten simultáneamente el diagnóstico y el tratamiento del cáncer) y la evaluación biológica de su biodisponibilidad, citotoxicidad y su capacidad para dirigirse hacia dianas moleculares tumorales específicas. El ensayo de estos agentes se realizará en modelos celulares en monocapa, modelos tridimensionales y en animales de experimentación.

El objetivo global es, por tanto, diseñar reactivos que puedan ser útiles para el diagnóstico y tratamiento antitumoral dirigido y específico, evitando los efectos secundarios de la quimioterapia.

Para ello, como objetivos específicos nos planteamos:

1. Diseño y evaluación biológica de nuevos agentes teragnósticos basados en polietilenimina ramificada de bajo peso molecular. Estas nanopartículas se han funcionalizado con:
 - Bifosfonatos como moléculas directoras hacia los tejidos ricos en hidroxiapatito, para el tratamiento del osteosarcoma (células MG-63) y las metástasis óseas producidas por algunos cánceres (células MDA-MB-231).
 - Ácido hialurónico como molécula directora hacia los receptores CD44 sobre-expresados en células de cáncer de mama triple negativo (células MDA-MB-231) y cáncer cervical (células HeLa).
2. Estudio de citotoxicidad y respuesta terapéutica de fármacos comúnmente utilizados en quimioterapia en modelos tridimensionales de plasma humano (HuP3D) de 5 líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-453, ZR-75-1, MCF7, SK-BR-3).
3. Evaluación de la internalización y citotoxicidad de las nanopartículas recubiertas con el ácido hialurónico en cultivos tridimensionales de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231). Realizar una comparación con los resultados obtenidos en modelos bidimensionales.
4. Evaluación biológica de nanopartículas funcionalizadas con carbohidratos como moléculas directoras hacia receptores específicos como GLUT1, CD206 y el receptor de galectina-3 en líneas celulares que sobre-expresan estos receptores.

5.MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Instrumentación

Se han utilizado los siguientes equipos para el cultivo, manipulación y análisis de resultados en:

- a) Bacterias:
 - Estufa Memmert 500.
 - Incubador Gallenkamp con termostato y agitación orbital.
 - Termociclador Perkin-Elmer 9700.
 - Mechero Bunsen.
 - Electroporador ECM830 de onda cuadrática.
 - Espectrofotómetro UVmini-1240 Shimadzu.
- b) Células eucariotas:
 - Campana de flujo laminar Microflow MDH.
 - Incubador de CO₂ Memmert INC 153.
 - Microscopio confocal Leica DMI 6000.
 - Microscopio óptico invertido Olympus CK2.
 - Microscopio óptico invertido para fluorescencia Olympus CKX41.
 - Cámara digital refrigerada CCD Olympus XC30.
 - Fluorímetro Shimadzu RF-5301 PC.
 - Fluorímetro Jasco FP-8300.
 - Luminómetro Sirius L Tube Luminometer de Berthold Detection Systems.
 - Citómetro de flujo BD Acurri flow C6 plus cytometer de BD Biosciencias.

Para la purificación de ácidos nucleicos y su análisis se ha empleado:

- Cubetas Mini-Sub para electroforesis horizontal de Bio-Rad.
- Transluminador de luz ultravioleta New Brunswick Scientific.
- Termociclador Perkin-Elmer 9700.
- Secuenciador de DNA 373 *Strect* de Applied Biosystems.
- Cámara fotográfica Canon PC1234.

En la purificación y el análisis de proteínas se han utilizado los siguientes dispositivos:

- Equipo para transferencia Trans-Blot Turbo Transfer System de Bio-Rad.
- Cubeta para electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell de Bio-Rad.
- Detector de quimioluminiscencia y fluorescencia ChemiDoc MP de Bio-Rad.

Para la medida de tamaño de nanopartículas se ha empleado:

- Zetasizer μ V Malvern.
- Cubetas UV-Transparent Disposable cuvette de 50 μ l de Sarstedt.

Asimismo, se incluyen otros instrumentos de uso general empleados en el desarrollo de los experimentos descritos en la presente tesis:

- Termobloque Multiplaces de Selecta.
- Autoclave Selecta.
- Agitador magnético con calefactor Benchmark Scientific H4000-HSE.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Agitador tipo vortex Reax Top de Heidolph.
- Medidor de pH XS Instruments pH 510.
- Baño de agua con termostato Precistern de Selecta.
- Lector de placas Sunrise de Tecan.
- Espectrofotómetro Beckman DU 640.
- Centrífuga de sobremesa Eppendorf 5415 D.
- Centrífuga de sobremesa refrigerada Axyspin R de Axygen.
- Centrífuga de sobremesa Heraeus Megafuge 16 R.
- Centrífuga J2-21 de Beckman.
- Homogeneizador ultrasónico UP 100H de Hielscher Ultrasound Technology.
- Homogeneizador mecánico Heidolph Comecta
- Rotador de tubos VWR.
- Balanzas de precisión Uni Bloc Shimadzu
- Micropipetas Gilson y Eppendorf.
- Cámara fría a 4 °C y congeladores de -20 °C y de -80 °C.

5.1.2. Líneas celulares

a) Procariotas

En la presente memoria, se han empleado las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

- **XL1-Blue** (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proABlacIqZΔM15* Tn10(Tetr)]) es una cepa resistente a tetraciclina que permite la clonación de plásmidos recombinantes. Presenta mutaciones en los genes *endA1* y *hsdR* que codifican para endonucleasas y en el gen *recA* que participa en la recombinación de DNA, por lo que garantiza la integridad y la estabilidad del plásmido clonado. Asimismo, incluye los genes *lacIq* y *ZΔM15* en el episoma F'. El gen *ZΔM15* es una mutación del gen *LacZ* para expresar el enzima β-galactosidasa sin la subunidad α, por lo que constituye un sistema de selección por color azul-blanco de los clones, basado en la α-complementación.
- **STBL3** (F'*mcrBmrrhsdS20*(rB⁻,mB⁻)*recA12supE44ara-14galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(StrR) *xyl-5-λ-leumtl-1*) es una cepa de *E.coli* químicamente competente derivada de la cepa HB101 y diseñada para el clonaje de secuencias con repeticiones que se encuentran principalmente en los vectores de expresión lentivirales. Estas células reducen la frecuencia de la recombinación homóloga de las repeticiones largas terminales (LTR). Además, presenta una capacidad de clonaje aumentada (*mcrB,mrr*) consiguiendo altos rendimientos.

b) Eucariotas

- **CHO-K1** (ECACC 85050302), línea celular epitelial de ovario de hámster.

- **HEK-293** (ECACC 85120602), línea celular epitelial de riñón de embrión humano.
- **HeLa** (ECACC 93021013), línea celular epitelial de carcinoma humano de cérvix.
- **CT26.WT** (ATCC-CRL-2638), fibroblastos de carcinoma de colon de ratón.
- **H9c2(2-1)** (ATCC CRL-1446), mioblastos de miocardio de rata con propiedades de músculo esquelético.
- **MDA-MB-231** (ATCC HTB-26), células epiteliales adherentes de adenocarcinoma de mama de mujer de raza caucásica de 51 años.
- **MG-63** (ATCC CRL-1427), fibroblastos de osteosarcoma humano.
- **MC-3T3-E1** (ECACC 99072810), línea celular osteoblástica de ratón con morfología similar a los fibroblastos.
- **Raw 264.7** (ECACC TIB-71), macrófagos-monocitos de ratón.
- **SK-BR-3** (ATCC HTB-30) células epiteliales adherentes de efusión pleural de adenocarcinoma humano de mama.
- **MCF7** (EACC 86012803) células epiteliales de efusión pleural de adenocarcinoma humano de mama.
- **ZR-75-1** (ATCC CRL-1500) células epiteliales de efusión ascítica de carcinoma ductal de mama.
- **MDA-MB-453** (ATCC HTB-131) células epiteliales de efusión pleural de carcinoma metastásico de mama.

5.1.3. Animales de experimentación

- **Ratones NSGTM** (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJl). Son ratones inmunodeficientes que carecen de linfocitos T maduros, linfocitos B y células NK (*Natural Killers*) y, por tanto, son el modelo de elección para realizar modelos de *xenografts*.

5.1.4. Material para el cultivo de células

a) Medios de cultivo para bacterias

El medio Luria Bertani (LB) (126) se ha utilizado como medio de cultivo para el crecimiento de las distintas cepas de *E.coli*, formado por 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de triptona y 5 g/l de NaCl. Para el crecimiento de bacterias en medio sólido, se ha añadido 1,5% (p/v) de agar bacteriológico. Los reactivos han sido proporcionados por *Scharlau Microbiology S.L.* y *Panreac Química SLU*. Los medios de cultivo se han esterilizado antes de su utilización por calor húmedo a 120°C y 1 bar de presión durante 30 minutos.

Para seleccionar las bacterias resistentes a determinados antibióticos, se han preparado soluciones stock de ampicilina (50 mg/ml en agua destilada, *Sigma-Aldrich*), kanamicina (25 mg/ml en agua destilada, *Sigma-Aldrich*), tetraciclina (15 mg/ml en metanol, *Amresco*) y cloranfenicol (30 mg/ml en etanol, *Sigma-Aldrich*) y se han adicionado al medio de cultivo en una proporción 1:1000. Las soluciones de ampicilina y kanamicina se han esterilizado previamente por filtración.

Para la preparación de células competentes se han utilizado los siguientes medios de cultivo: Solución A (Medio LB suplementado con 0,2% (p/v) glucosa y 10 mM

MgSO₄·7H₂O) y Solución B (Medio LB con 36% (v/v) glicerol, 12% (p/v) PEG 7500, 12 mM MgSO₄·7H₂O).

b) Medios de cultivo para líneas celulares eucariotas

Para el cultivo de las células MC-3T3-E1 se ha empleado el medio de cultivo MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*), para las células ZR-75-1 el medio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) y para el resto de líneas celulares eucariotas el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), todos suplementados con 100 U/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomina, 2 mM L-glutamina y 10% (v/v) de suero bovino fetal (*Sigma-Aldrich*).

Para la transfección de las células eucariotas se ha utilizado el medio DMEM suplementado con 2mM L-glutamina y el reactivo de transfección *Lipofectamine 2000* (*ThermoFisher*).

En el lavado de las células se ha empleado PBS 1x estéril pH 7,4 (*Phosphate Buffered-Saline, Sigma-Aldrich*). El material fungible utilizado (placas de cultivo y pipetas estériles) ha sido suministrado por *Cultek S.L.* y *VWR Inc.*

5.1.5. Material para la manipulación de ácidos nucleicos

5.1.5.1. Plásmidos comerciales

a) pEGFP-N2 (*Clontech*)

Es uno de los tres tipos de vectores pEGFP-N en función de la pauta de lectura. Estos vectores permiten la expresión de los fragmentos de DNA fusionados en el extremo amino de la proteína verde fluorescente en las células eucariotas. La expresión de la proteína está bajo el control de un promotor de citomegalovirus que permite su expresión constitutiva en las células eucariotas de mamíferos. Además, en el extremo 3' se incluyen secuencias de poliadenilación de SV-40 que promueven el procesamiento del mRNA. El vector incluye genes de resistencia a kanamicina y neomicina (Figura 5.1.).

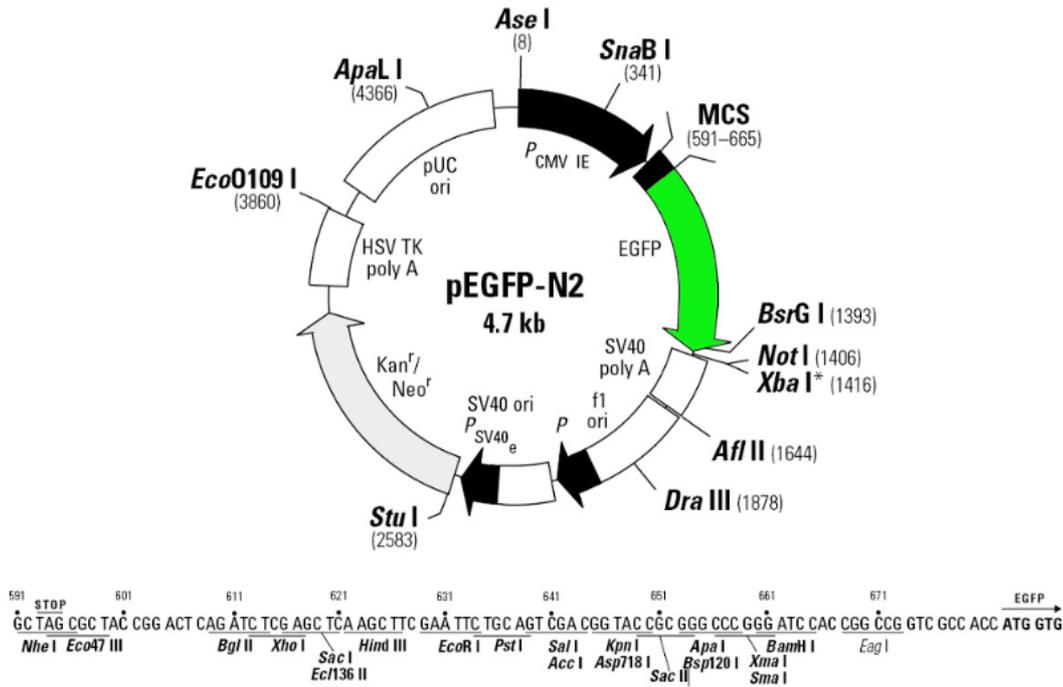


Figura 5.1. Mapa de restricción del plásmido pEGFP-N2.

b) pGL3-Control (Promega)

Los vectores pGL3 proporcionan la base para el análisis cuantitativo de los factores reguladores de la expresión génica en células de mamíferos y para monitorizar la actividad transcripcional en células eucariotas transfectadas con estos vectores. El vector pGL3-Control contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) precedido del promotor de SV40, lo que proporciona un nivel de expresión elevado. La familia de vectores pGL3 presenta en el extremo 3' secuencias potenciadoras de SV-40 para favorecer la transcripción de la luciferasa (Figura 5.2.).

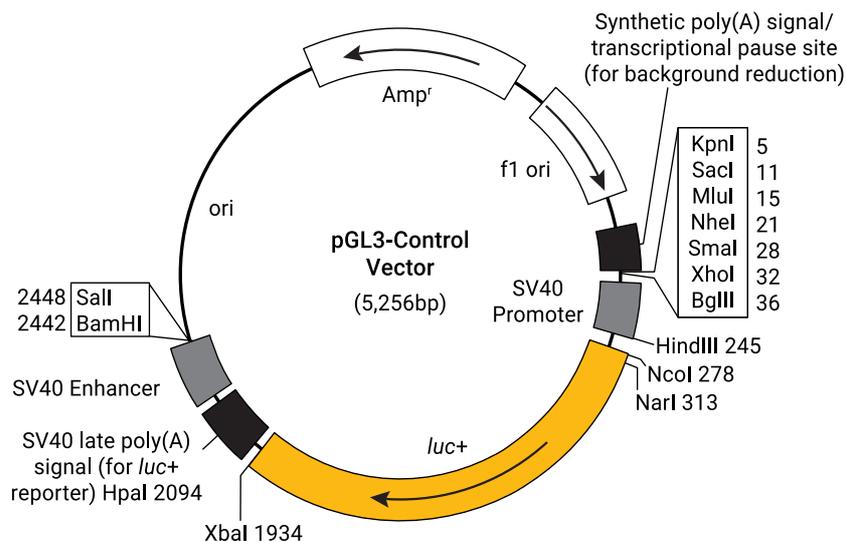


Figura 5.2. Mapa del plásmido pGL3-Control con las enzimas de restricción en el sitio de múltiple clonación.

c) pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene)

Es un vector sintético de aproximadamente 9300 pb para el silenciamiento de genes mediante el sistema CRISPR/cas9 de *Streptococcus pyogenes* gracias a que codifica para la nucleasa Cas9 y permite el clonaje de la secuencia guía mediante los sitios de restricción BbsI (equivale a Bpil) bajo el promotor U6 para la RNA polimerasa III. Además, codifica para el resto del RNA guía como una estructura no variable inmediatamente después del sitio de clonaje y para la proteína verde fluorescente, para la visualización de fluorescencia en las células eucariotas que han incorporado el plásmido (Figura 5.3) (127)

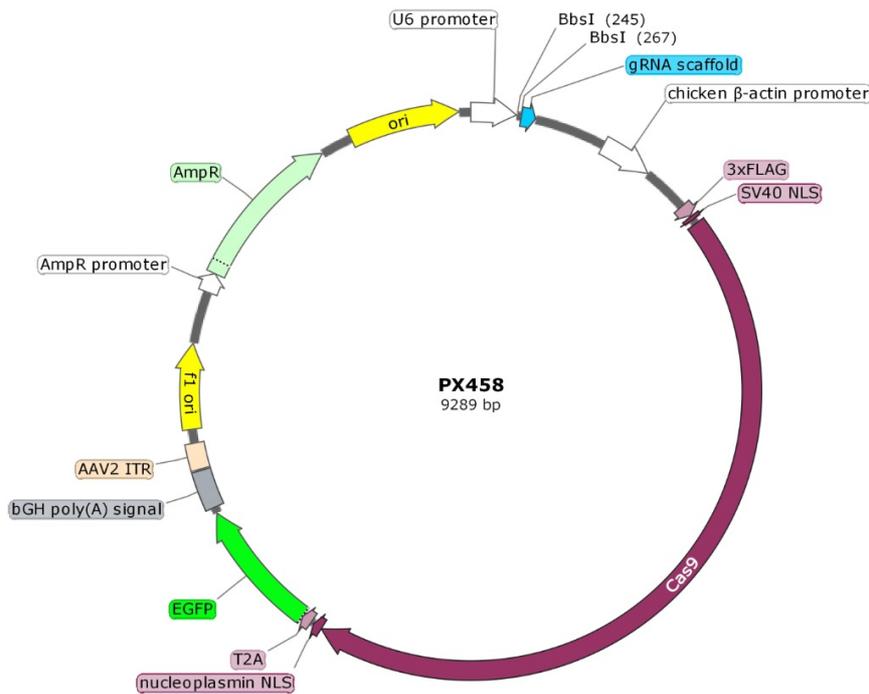


Figura 5.3. Mapa de la secuencia del plásmido PX458.

d) pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (Addgene)

Es un vector sintético de aproximadamente 9200 pb para el silenciamiento de genes mediante el sistema CRISPR/cas9 de *Streptococcus pyogenes* gracias a que codifica para la nucleasa Cas9 y permite el clonaje de la secuencia guía mediante los sitios de restricción BbsI (equivale a Bpil) bajo el promotor U6 para la RNA polimerasa III. Además, codifica para el resto del RNA guía como una estructura no variable inmediatamente después del sitio de clonaje y para la resistencia a puomicina como método de selección de las células eucariotas que han incorporado el plásmido (Figura 5.4.). (127)

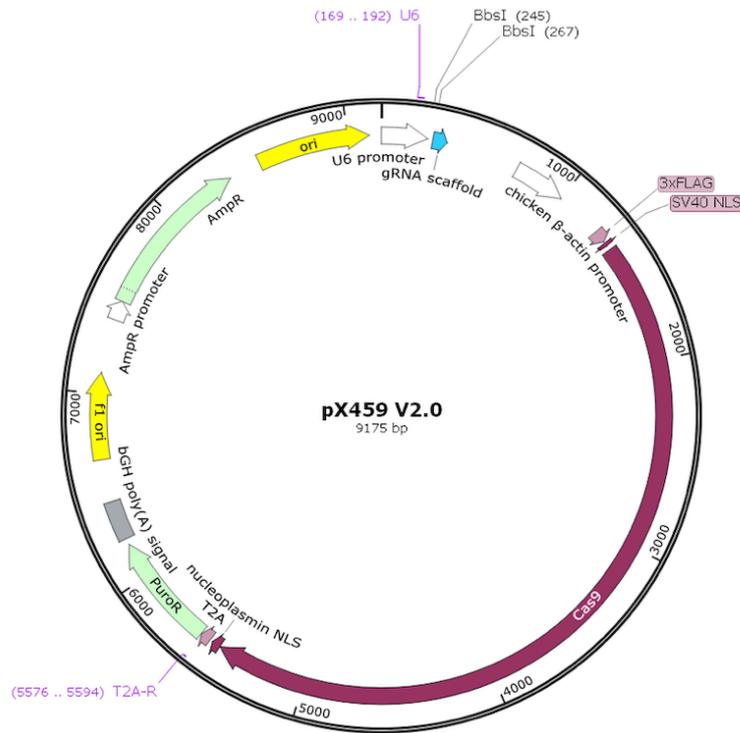


Figura 5.4. Mapa de la secuencia del plásmido PX459.

5.1.5.2. Oligonucleótidos

En la Tabla 7. se detalla la secuencia de los oligonucleótidos diseñados para realizar el silenciamiento del gen CD44 humano mediante el método CRISPR/Cas9.

Nombre	Secuencia 5'-3'
gCD44 forward (f)	CACCGTCGCTACAGCATCTCTCGGA
gCD44 reverse (r)	AAACTCCGAGAGATGCTGTAGCGAC
U6 seq forward	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en el silenciamiento CRISPR/Cas9 del gen CD44.

5.1.5.3. Reactivos

Los reactivos para la manipulación de los ácidos nucleicos como *Pfu* y *Taq* polimerasa, T4 DNA ligasa, marcadores de peso molecular *100 bp DNA Ladder* y *Lambda DNA/EcoRI+HindIII*, endonucleasas de restricción y el kit para la extracción de DNA plasmídico *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* han sido proporcionados por *ThermoFisher Scientific*. Otros reactivos utilizados en los experimentos con ácidos nucleicos fueron los siguientes: bromuro de etidio, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, acetato potásico, ácido acético, agarosa, alcohol isoamílico, cloroformo, cloruro de litio, cloruro sódico, EDTA, etanol, fenol, Hoechst 33258, isopropanol, 2-mercaptoetanol, PEG 8000, SDS, y Tris. Todos ellos han sido proporcionados por las siguientes casas comerciales: *Amresco*, *Bio-Rad*, *Invitrogen*, *Lonza*, *Merck*, *Panreac*, *Scharlau* y *Sigma-Aldrich*.

5.1.6. Material para la manipulación de proteínas

Para la electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de acrilamida y su tinción posterior se han empleado los siguientes reactivos: acrilamida, TEMED, SDS, persulfato amónico, Tris (*Sigma-Aldrich*), ácido clorhídrico (VWR), glicerol (*Panreac*), β -mercaptoetanol (*Merk*), azul de bromofenol (*Beckman*), *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Fluka), ácido acético (*Scharlau*), metanol (VWR) y marcadores de peso molecular (*BioRad*). En la realización de Western blot se han utilizado membranas de nitrocelulosa (*GE Healthcare*), albúmina de suero bovino, luminol, ácido p-cumárico, DMSO, Tris, glicina, metanol, NaCl, Tween-20, H₂O₂ (*Sigma-Aldrich*), anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón y conejo (*Bio-Rad*) y los anticuerpos primarios descritos en la Tabla 8.

Nombre	Casa comercial y referencia
Akt	Santa Cruz Biotechnology sc-8312
pAkt (Ser 473)	Santa Cruz Biotechnology sc-33437
Citocromo C	Santa Cruz Biotechnology sc-13156
GAPDH humano	Santa Cruz Biotechnology sc-47724
HCAM (DF1585)	Santa Cruz Biotechnology sc-7297
ERK 1/2	Santa Cruz Biotechnology sc-292838
p-ERK 1/2	Santa Cruz Biotechnology sc-16982

Tabla 8. Anticuerpos empleados en el desarrollo de la presente tesis

5.1.7. Programas informáticos

Para el desarrollo de este trabajo y el análisis de los resultados, se han empleado los siguientes programas informáticos:

- GraphPad Prism 8 (*GraphPad Software*) para la elaboración de las gráficas de esta memoria y el análisis estadístico de los resultados.
- Mendeleev Reference Manager para la administración de las referencias bibliográficas.
- Kodak Digital Science 1D para el procesamiento de las imágenes de electroforesis de ácidos nucleicos obtenidas con la cámara fotográfica Kodak DC-120.
- Serial cloner 2.6.1 (*Serial Basics*) para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos.
- AnalySIS getIT 5.1. (*Olympus Soft Imaging Solutions*) para la captura y tratamiento de imágenes de células fluorescentes.
- LAS AF Lite 2.6.0 (*Leica Microsystems*) para el procesamiento de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia.
- ImageJ 1.47 (*National Institutes of Health, USA*) para la cuantificación de la intensidad de las bandas de las imágenes de Western blot, microscopía confocal en HuP3D y en los ensayos de protección frente a la DNAsal.
- Living Image Software 4.7.2 (*IVIS Imaging Systems*) para la captura y el procesamiento de las imágenes en el IVIS.
- Zetasizer software para determinar el tamaño de las nanopartículas.
- NIS Elements (*Nikon Instruments, Melville, NY, USA*) para el procesamiento de las imágenes de microscopía confocal.

- FlowJo v10 (BD *Lifesciences*, Ashland, OR, USA) para el procesamiento de los datos obtenidos en citometría de flujo.
- Programa R para el análisis estadístico y elaboración de las gráficas de los resultados de los cultivos 3D.
- GR calculator (<http://www.grcalculator.org>) para la determinación de los parámetros de respuesta terapéutica en los cultivos 3D.

5.2. Métodos

5.2.1. Métodos de cultivo y manipulación de bacterias

5.2.1.1. Obtención de bacterias competentes

En la preparación de células competentes se ha seguido el protocolo descrito por Nishimura *et al.* (1990). (128) Brevemente, se ha inoculado un cultivo bacteriano saturado de *E.coli* en 50 ml de medio A (apartado 5.1.4.) en una proporción 1:100 (v/v) y se ha incubado en agitación a 200 rpm a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente una densidad óptica de 0,6 medida a una longitud de onda de 600 nm). A continuación, la suspensión bacteriana se ha mantenido en hielo durante 10 min, se ha centrifugado 10 min a 1500 x g y se ha re-suspendido el precipitado en 0,25 ml de medio A. Posteriormente, se han añadido 1,25 ml de medio B, se ha mezclado bien y se han hecho alícuotas de 0,1 ml por tubo de células competentes que se han conservado a -80°C mínimo durante 4 horas antes de su uso. Todos los procedimientos se han realizado a 4°C.

5.2.1.2. Transformación bacteriana por choque térmico

Para la transformación de células competentes con DNA plasmídico se ha seguido el protocolo de Hanahan (1983). (129) Para ello, 50-100 ng del DNA de interés se han añadido a 0,1 ml de bacterias competentes parcialmente descongeladas y se han incubado en hielo durante 1 hora. Pasado este tiempo, se ha realizado un choque térmico a 42°C durante 1,5 min y se ha incubado en hielo durante 10 minutos. A continuación, se ha añadido medio LB y se ha incubado a 37°C en la estufa. Finalmente, se han sembrado las bacterias transformadas en medio LB-agar suplementado con los antibióticos de selección correspondientes al DNA plasmídico y a la cepa bacteriana y se han dejado creciendo a 37°C en la estufa durante mínimo 24 horas.

5.2.2. Métodos de cultivo, manipulación y observación de células eucariotas

Todos los procesos de cultivo y manipulación de células eucariotas descritos a continuación se han llevado a cabo en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, utilizando medios de cultivo y material fungible estéril.

5.2.2.1. Cultivo de células eucariotas y tripsinización

Las células eucariotas utilizadas en el desarrollo de esta tesis se han cultivado adheridas en placas de poliestireno estériles con medio de cultivo DMEM, MEM o RPMI-1640 (apartado 5.1.4.) en la estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Para la separación de las células de las placas, necesaria para su recuento, siembra o para su almacenamiento, se ha utilizado la tripsinización. Para ello, se ha retirado el medio de cultivo y las células se han lavado dos veces con PBS 1x estéril, se ha añadido la solución de 0,25% tripsina-EDTA hasta recubrir la superficie de la placa y se ha incubado a 37°C hasta la separación de las células de la placa. Posteriormente, se ha neutralizado la tripsina añadiendo 5-10 ml de medio de cultivo suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal.

5.2.2.2. Recuento de células

Para el recuento de células eucariotas, se ha tripsinizado el cultivo (apartado 5.2.2.1.) y se ha añadido el medio DMEM completo en una proporción 1:10. A continuación, se ha obtenido una suspensión celular homogénea y se han contado las células vivas en la cámara de Neubauer en las cuatro zonas de recuento (zonas sombreadas en la Figura 5.5.).

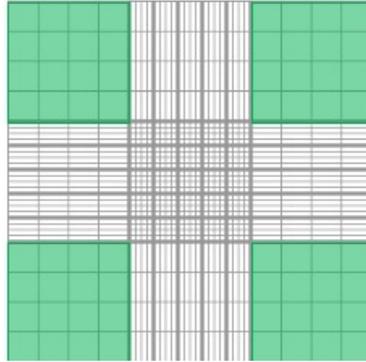


Figura 5.5. Esquema de las zonas de recuento (verde) en la cámara de Neubauer.

El número de células por mililitro se ha calculado aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Número de células por ml} = \frac{\text{Número total de células contadas} \times 10.000}{\text{Número de cuadros contados (4)}}$$

5.2.2.3. Congelación y almacenamiento de líneas celulares

Tras la tripsinización, se han añadido 5 ml de medio DMEM suplementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal a las células, y se han centrifugado a 800 rpm durante 5 min, descartando el sobrenadante. El precipitado de células se ha re-suspendido en 1 ml de la mezcla de congelación (5% (v/v) de DMSO y 95% (v/v) de suero bovino fetal) y se ha distribuido en los crio-viales. Para la congelación adecuada de las células eucariotas se ha utilizado un contenedor de congelación *CoolCell (Biocision)* que permite disminuir la temperatura progresivamente 1°C/min cuando se introduce en el congelador a -80°C.

5.2.2.4. Transfección de células eucariotas

Se han sembrado $1,6 \times 10^4$ células/pocillo en una placa de 48 pocillos y se han incubado a 37°C durante 24 h en una atmósfera de 5% de CO₂. Al día siguiente, se ha preparado, por un lado, la suspensión de 0,3 µg/pocillo de DNA plasmídico de interés (generalmente pEGFP-N2 que codifica para la proteína verde fluorescente) y, por otro lado, la suspensión de los reactivos de transfección a ensayar en medio de transfección (DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina (apartado 5.1.4.)). Cabe destacar, que el medio de transfección carece de antibióticos y de suero bovino fetal, ya que estos podrían interferir negativamente en el proceso de transfección.

Posteriormente, se ha adicionado la suspensión de DNA plasmídico sobre la suspensión del reactivo de transfección y se ha incubado durante 20 min a temperatura

ambiente para formar el complejo DNA plasmídico-reactivo de transfección. Las células eucariotas se han lavado dos veces con PBS 1x estéril, se les ha añadido 0,2 ml/pocillo de medio de transfección y a continuación, se ha añadido la mezcla de DNA-reactivo de transfección durante 3-4 horas a 37°C, y se ha sustituido el medio de transfección por medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml estreptomina. Como control positivo de transfección se ha utilizado el reactivo comercial *Lipofectamine 2000* (*ThermoFisher Scientific*) según las instrucciones del fabricante.

Transcurridas mínimo 24 horas de la transfección con vectores que codifican para la proteína verde fluorescente, las células se han observado en el microscopio de fluorescencia Olympus CKX41 para comprobar la eficiencia y el éxito de la transfección.

5.2.2.5. Ensayo de internalización de reactivos fluorescentes en células

Para los ensayos de internalización en células eucariotas, se han sembrado $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 24 pocillos siguiendo el protocolo descrito previamente (apartado 5.2.2.1.). Al día siguiente, se han lavado dos veces con PBS y se han incubado con las concentraciones a ensayar de los reactivos fluorescentes de interés (derivados de doxorubicina o de NIR-780) durante 1-2 horas a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo empleado para realizar las disoluciones varía en función del ensayo y de las células empleadas (apartado 5.1.4.). Además, para estudiar las vías de internalización de los compuestos en el interior celular, las células han sido pre-incubadas durante 30 min con distintos inhibidores de endocitosis, descritos en la Tabla 9.

Vía de inhibición	Inhibidor	Concentración	Referencia
Clatrin	Clorpromazina	50 µM	(130)
Clatrin	Sacarosa	0,45 M	(131)
Caveolas	Filipina	5 µg/ml	(130)
Caveolas	Genisteína	400 µM	(130)
Fagocitosis Macropinocitosis	Citocalasina D	2 µM	(130,132,133)
Difusión pasiva	Azida sódica	0,1% p/v	(130,132,133)
OATPS	Bromosulfoftaleína	250 µM	(134)

Tabla 9. Inhibidores de las distintas vías de endocitosis de las nanopartículas en el interior celular.

5.2.2.6. Determinación de la fluorescencia

Para determinar la fluorescencia en células eucariotas transfectadas con el plásmido pEGFP-N2 o en los ensayos de internalización de reactivos fluorescentes, se han lavado las células tres veces con PBS 1x y se han lisado con el tampón de lisis comercial *Cell Culture Lysis Reagent 5x*, (*Promega*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se ha realizado una dilución 1:1 o 1:2 del lisado celular con PBS 1x y se ha medido la fluorescencia en el fluorímetro *Shimadzu RF 5301 PC* o *Jasco FP-8300* a longitudes de onda correspondientes para cada fluoróforo a ensayar (Tabla 10), a una sensibilidad media y respuesta de 1s.

Fluoróforo	Máximo de excitación (nm)	Máximo de emisión (nm)	Ancho de ventanas
GFP	450	510	5-10
Doxorubicina	499	555	5-10
NIR-780	690	780	5-10
Carbon Dots	326	454	5-10

Tabla 10. Longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia de los fluoróforos y sus derivados empleados en la presente tesis.

5.2.2.7. Microscopía confocal de fluorescencia

Para la observación de las células eucariotas en cultivo mediante microscopía confocal de fluorescencia, se han sembrado 9×10^4 células en cubreobjetos de cristal de 18 mm y tras 24 h, se ha realizado o bien la transfección (apartado 5.2.2.4) o bien ensayos de internalización (apartado 5.2.2.6). Posteriormente, se han lavado tres veces con PBS 1x y se han fijado durante 15 min a temperatura ambiente con 2% (p/v) de p-formaldehído en PBS 1x. A continuación, se han lavado las células dos veces con PBS 1x y se han montado los cubreobjetos sobre un portaobjetos de vidrio en el que se han depositado 10 μ l de líquido de montaje (*Vectashield mounting media*, Vector Laboratories, Inc.). Para la visualización de las células se ha empleado el microscopio confocal multifotón Leica TCS-SP5 II (Servicios Centrales de la Universidad de Granada), utilizando el modo de adquisición secuencial para obtener imágenes de canales aislados para el análisis de color. Se ha utilizado un *pinhole* de 1 *Airyunit*. Las imágenes se han adquirido a una resolución de 1024x1024 píxeles y las series en modo *xyz*. Los datos se han procesado usando el software Leica LAS AF.

Para la visualización de cultivos 3D, se han sembrado $3-5 \times 10^4$ células primarias/pocillo en tejidos HuP3D (apartado 5.2.2.10.) en portaobjetos con 8 pocillos de *Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ II Chambered Coverglass*. Para la visualización se ha empleado el microscopio confocal Ti2-A1TR (objetivo 10x, 2,5 de amplificación) y el análisis de imágenes se ha realizado en el software NIS Elements (*Nikon Instruments*, Melville). Las células marcadas con DiO se han excitado con 488 nm y se ha recogido la emisión a 500-530 nm. Las nanopartículas cargadas con doxorubicina se han excitado a 480 nm y se han recogido a 550-560 nm y las nanopartículas con sonda fluorescente en el infrarrojo cercano, NIR-780, se han excitado a 680 nm y se ha recogido la emisión a 740-760 nm. Se ha empleado una profundidad del eje z de 0,5 mm a 1 mm con paso de 2 mm. Se han adquirido imágenes a una resolución de 512x512 píxeles, tomadas en un ratio de 1 ms/píxel.

5.2.2.8. Ensayo de viabilidad y proliferación celular basados en MTT

Para determinar la viabilidad y la proliferación celular se ha utilizado el método de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol), que es capaz de convertirse en formazán por la acción de la succinato deshidrogenasa en las mitocondrias de las células vivas, un compuesto de color violeta, con el máximo de absorbancia a 570 nm. Para llevar a cabo este ensayo, se han sembrado $1,6 \times 10^4$ células/pocillo en una placa de 48 pocillos y al día siguiente se les han añadido las soluciones de reactivos a ensayar en medio DMEM completo y se ha incubado durante 24-48 horas a 37°C, dependiendo del ensayo. Para los compuestos cargados con

doxorubicina, se ha incubado durante 48 horas, renovando el medio con el agente quimioterapéutico a las 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se ha retirado el medio y se ha adicionado la solución de 0,5 mg/ml de MTT en medio DMEM con 2 mM de L-glutamina sin suero bovino fetal y sin antibióticos y se ha incubado durante 1-3 horas, en función del tipo celular, a 37°C. Posteriormente, se ha retirado el reactivo MTT y se han añadido 40 mM de HCl en isopropanol para extraer el formazán del interior de las células. Tras una leve agitación, se ha medido la absorbancia a 570 nm. Los resultados de citotoxicidad se han expresado en porcentaje (0% para las células no tratadas), sustrayendo al 100% el valor de viabilidad obtenido con cada uno de los tratamientos.

5.2.2.9. Ensayo hemolítico de Carbon Dots

Con el objetivo de determinar las propiedades hemolíticas de los Carbon Dots (CNDs), una disolución 1:10 de sangre humana en PBS 1x estéril se ha centrifugado durante 10 min a 1000 x g a 4°C para aislar los hematíes. Posteriormente, se ha lavado cinco veces con PBS en las mismas condiciones de centrifugación hasta obtener un sobrenadante transparente. A continuación, se ha preparado una suspensión al 20% (v/v) de glóbulos rojos en PBS 1x que se ha incubado con concentraciones crecientes de los CNDs a ensayar (0, 250 y 500 µg/ml) durante 24 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se ha centrifugado 5 min a 2000 x g y se ha medido la densidad óptica en el sobrenadante a 570 nm. Como control negativo se ha utilizado la suspensión de glóbulos rojos en PBS 1x y como controles positivos de hemolisis la suspensión de los mismos en agua o en Triton X-100.

5.2.2.10. Síntesis de cultivos tridimensionales HuP3D

Método protegido por la patente (US20170232146A1) realizado en el laboratorio de la Dra. Pilar de la Puente en Sanford Research Center, Sioux Falls, USA. (135,136). En resumen, se ha preparado una suspensión de 3-5 x 10⁴ células primarias/pocillo marcadas con marcadores fluorescentes de superficie celular DiO (484/501 nm) o DiD (644/665 nm) (*ThermoFisher Scientific*), según las instrucciones del fabricante, en medio de cultivo RPMI-1640 o DMEM completo con el plasma humano, ácido tranexámico (4 mg/ml en medio DMEM) y CaCl₂ (1 mg/ml en medio DMEM) en una ratio de volumen 4:4:1:1, respectivamente. La suspensión se ha distribuido en placas de 96 pocillos y se ha incubado a 37°C en 5% de CO₂ durante 3 h para favorecer el entrecruzamiento del fibrinógeno presente en el plasma. Posteriormente, se ha añadido medio DMEM o RPMI-1640 en la superficie de la matriz para prevenir su secado. Se ha renovado el medio cada 2-3 días. Los cultivos 3D así formados, se han tratado con fármacos quimioterapéuticos y nanopartículas de interés durante 24-48 h. Se ha medido la viabilidad celular y la entrada de los compuestos mediante la citometría de flujo en BD *Acurri flow* C6 plus cytometer (BD *Biosciencias*).

5.2.2.11. Ensayos de cribado de fármacos en HuP3D

Cinco líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-453, ZR 75-1, MCF7 y SK-BR-3), marcadas con el marcador de superficie celular DiD (644/665 nm) (*ThermoFisher Scientific*), se han incorporado en los cultivos HuP3D (apartado 5.2.2.10.). Seis horas después de la siembra, las células se han tratado con DMSO (γ_{ctrl}) y con

concentraciones crecientes (0,1 nM-300 μ M) de siete fármacos quimioterapéuticos comúnmente usados, incluyendo el metotrexato (MTX), el paclitaxel (PTX), la capecitabina (CAP), la ciclofosfamida monohidrato (CYCLO), el carboplatino (CARBO), la epirubicina hidrocloreuro (EPI) y el docetaxel (DTX). Los tratamientos se han adicionado en la superficie de los cultivos HuP3D para simular la difusión del fármaco en el interior tumoral. Los tratamientos se han renovado cada 48 horas y se ha analizado la internalización y la viabilidad celular el día 0,5 y 7 del ensayo.

Para los ensayos con las nanopartículas HA-PEI-NIR-780 y HA-PEI-NIR-780- β CD-DOX, se han incubado las células crecidas en HuP3D durante 24 y 48 h, respectivamente.

5.2.2.12. Análisis de internalización y viabilidad celular por citometría de flujo

Se ha preparado una suspensión en PBS 1 x de células, previamente cultivadas y tratadas en los cultivos HuP3D, para la medida de fluorescencia por citometría de flujo, adicionando las microesferas de conteo (*Counting Beads*, 424902, *Biolegend*).

Posteriormente, se ha añadido el marcador de muerte celular *Sytox Green* (504 nm/523 nm) (S7020, *ThermoFisher Scientific*) para determinar la viabilidad celular en cada muestra. Las células de cáncer de mama se han identificado mediante *gating* de células vivas con señal positiva para DiD (664/665 nm) usando los canales FL1 y FL4, en el citómetro de flujo *BD Accuri C6 instrument* (*BD Biosciences*).

Para el análisis de la internalización de nanopartículas, se ha realizado *gating* de células vivas mediante el canal BV421-A, marcadas con DiO mediante el canal FITC-A, tratadas con nanopartículas con NIR-780 mediante el canal APC-Cy7-A o con doxorubicina mediante el canal PE-A.

En todos los ensayos se han recogido 5000 eventos/muestra y los datos se han analizado en el software *FlowJo v10* (*BD Lifesciences*).

5.2.2.13. Determinación de los parámetros de respuesta terapéutica en HuP3D

Se ha empleado la herramienta online *GR calculator* (137) para determinar 10 parámetros de medida de la respuesta terapéutica basada o bien en el recuento celular relativo (IC_{50} , EC_{50} , E_{max} , AUC, E_{inf}) o bien en el ratio de crecimiento (GR_{50} , GEC_{50} , GR_{max} , GR_{AOC} , GR_{inf}), siguiendo las instrucciones del fabricante, usando como variables de agrupación las líneas celulares y los tipos de tratamientos. Para ello, se ha calculado el promedio de cuatro réplicas de cada condición (línea celular, fármaco y concentración de fármaco) y se ha determinado el recuento celular relativo mediante la fórmula $\gamma_{(c)}/\gamma_{ctrl}$, donde $\gamma_{(c)}$ y γ_{ctrl} representan el número de células vivas en presencia de la concentración de fármaco (c) o de DMSO (ctrl), respectivamente. Todas las condiciones requeridas (línea celular, fármaco, concentración, recuento celular a la concentración c, recuento celular inicial sin tratamiento y recuento celular en presencia de DMSO) se han cargado en la herramienta online *GR calculator* y se han calculado y analizado los 10 parámetros de la respuesta terapéutica.

Para evaluar la asociación entre las distintas variables, se han realizado ensayos de correlación usando el paquete del programa R *ggpubr*. La correlación de Pearson se ha calculado para medir la dependencia lineal entre dos variables, después de la

confirmación de una distribución normal de los datos. Las concentraciones clínicas efectivas (*steady state concentration*, C_{ss}) de los fármacos ensayados, obtenidas a partir de la búsqueda bibliográfica, se han comparado con IC_{50} de los fármacos en cultivos bidimensionales, otros modelos 3D y el modelo HuP3D.

5.2.3. Técnicas para el análisis de ácidos nucleicos

5.2.3.1. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

a) Método Miniprep

Para realizar este método se ha utilizado el kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific)* con el fin de obtener DNA plasmídico de alta pureza y libre de RNA. En resumen, se han centrifugado 3 ml de cultivo saturado de bacterias transformadas con el plásmido de interés durante 5 min a 7000 x g a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante. El precipitado se ha lisado con los tampones proporcionados por la casa comercial. Posteriormente, se ha centrifugado a 12 000 x g durante 5 min, se ha transferido el sobrenadante a una columna de sílica (*Thermoscientific GeneJet spin column*) y se ha lavado dos veces para eliminar los restos de componentes celulares, sales y metabolitos. Finalmente, el DNA se ha eluido con agua miliQ.

b) Método Midiprep

Este método se ha empleado con el objetivo de obtener grandes cantidades de DNA plasmídico de gran pureza y libre de endotoxinas. Para ello, se ha inoculado 1 ml de cultivo saturado de bacterias transformadas con el plásmido de interés en 500 ml de medio LB suplementado con los antibióticos de selección y se ha incubado a 37°C en agitación a 200 rpm. Pasadas 24 h, se ha centrifugado el cultivo a 7000 rpm durante 10 min a 4°C y se ha re-suspendido el pellet en solución I (25 mM TRIS pH 8, 10 mM EDTA). A continuación, se han lisado las bacterias con la solución de lisis (0,4 M NaOH, 0,1% (p/v) SDS), se ha neutralizado el lisado con acetato potásico (5 M, pH 4,8) y se ha centrifugado a 7000 rpm durante 15 min. Pasado el tiempo, se ha filtrado el sobrenadante, se han añadido 0,6 volúmenes de isopropanol y se ha vuelto a centrifugar 15 min a 10 000 rpm. El precipitado se ha re-suspendido en solución I con LiCl 5 M para eliminar las toxinas y se ha centrifugado. Posteriormente, se ha incubado con 20 µg/ml de RNasa A durante 30 min a 37°C y se ha añadido 13% PEG 8000 en NaCl 1,6 M y se ha centrifugado a 13 500 rpm durante 20 min a 4°C. El precipitado de DNA se ha re-suspendido con solución I y se ha extraído dos veces con solución fenol-cloroformo (1:1) a pH 8 y una vez con cloroformo. A la fase acuosa se le ha adicionado acetato amónico 7,5 M y dos volúmenes de etanol absoluto y se ha centrifugado 15 min a 13 500 rpm a 4°C. Finalmente, el DNA plasmídico se ha lavado con etanol al 70% y se ha diluido en agua MiliQ.

5.2.3.2. Cuantificación de DNA

a) Método por fluorescencia

Para medir la concentración de DNA por fluorescencia se ha empleado el reactivo comercial Hoechst 33258, que actúa como agente intercalante emitiendo fluorescencia de forma proporcional a la cantidad de DNA presente en la muestra. Para ello, se ha disuelto el DNA en tampón TNE (0,2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) suplementado con 1 µg/ml de Hoechst 33258 y se ha medido la fluorescencia, ajustando el máximo de excitación a 336 nm y de emisión a 460 nm. Para conocer la concentración de DNA de interés, se ha realizado una curva patrón con concentraciones conocidas y crecientes de DNA de espermatozoos de salmón (1 mg/ml), en la que se han interpolado los valores de fluorescencia de la muestra de DNA plasmídico.

b) Método por espectrofotometría

Para determinar la concentración de DNA de una forma rápida y sencilla, se ha utilizado el aparato *NanoVue Plus* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se han depositado 2 µl de la muestra en el equipo y se ha medido su densidad óptica a 260 nm.

5.2.3.3. Hibridación y fosforilación de los oligonucleótidos en el silenciamiento de genes por CRISPR/Cas9

Con el objetivo de sintetizar la secuencia guía de RNA diseñada para el silenciamiento del gen CD44, se ha realizado la hibridación y la fosforilación de los oligonucleótidos *gCD44f* y *gCD44r*, preparando una mezcla de 100 µM de ambos oligonucleótidos, ATP 10 mM, PNK *reaction A Buffer* 10x y 20 U de T4 *Polynucleotide kinase* (Fermentas). A continuación, se ha realizado la fosforilación en el termociclador mediante un ciclo de 30 min a 37°C y la hibridación mediante un gradiente de temperatura de 5°C /min desde 95°C hasta 25°C y se ha congelado a -20°C para cortar la reacción.

5.2.3.4. Digestión con enzimas de restricción

Para digerir el DNA con enzimas de restricción se han seguido las instrucciones del fabricante (*ThermoFisher Scientific*). Usualmente, se han utilizado 0,1- 0,5 µg de DNA, 1 µl de tampón de digestión *Fast Digest* 10x y 10 U/µg de DNA del enzima de restricción en un volumen final de 10 µl. Las digestiones se han realizado incubando a 37°C en el termobloque durante 30-90 min.

En la digestión asociada a la des-fosforilación de los plásmidos PX458 y PX459 en el silenciamiento del gen CD44 por el método CRISPR/Cas9, se ha preparado una mezcla de 5 µg del plásmido con tampón de digestión *FastDigest* 10x y 20 U de la enzima de restricción Bpil (*Fermentas*) que equivale a BbsI y se ha incubado a 37°C durante 2 h. A continuación, se han adicionado 2 U de fosfatasa alcalina *Fast AP* (*ThermoFisher*) y se ha incubado a 37°C durante 1 h. Se ha inactivado la fosfatasa a 75°C durante 15 min.

5.2.3.5. Ligación

Para la reacción de ligación de los fragmentos de DNA, obtenidos mediante la PCR o mediante la digestión con enzimas de restricción, se ha utilizado la enzima T4 DNA ligasa (*Fermentas*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Normalmente, se ha preparado una mezcla del plásmido lineal y el inserto en una proporción molar 1:3, *Ligation Buffer* 10x y 5 U de T4 DNA ligasa (*ThermoFisher Scientific*) en un volumen final de 10 μ l y se ha incubado durante 24 horas. Todo el procedimiento se ha llevado a cabo a 4°C.

En el método de silenciamiento del gen CD44 por CRISPR/Cas9, se ha realizado una ligación de 200 μ g de los plásmidos PX458 y PX459 digeridos con el enzima de restricción Bpil y des-fosforilados con 1 μ g (equivalente a 0,1 pmoles) de los oligonucleótidos hibridados y fosforilados con tampón de ligación 10x y 5 U de T4 DNA ligasa durante 24 h a 4°C.

5.2.3.6. Electroforesis en horizontal de DNA

La electroforesis de DNA se ha llevado a cabo en geles de agarosa al 0,8 o 3% (p/v) preparados en tampón TAE (40 mM Tris, 0,11 % (v/v) ácido acético glacial, 1 mM EDTA-Na₂, pH 8). Los geles se sumergieron en el mismo tampón y la electroforesis se ha realizado a 90 V durante 30 min.

Las muestras se han preparado mezclando el DNA con el tampón de carga 6x *Loading Dye* (*Fermentas*) en una proporción 5:1 (v/v). Para visualizar la muestra, una vez realizada la electroforesis, los geles se han teñido por inmersión en bromuro de etidio (1,5 μ g/ml en tampón TAE), se han observado bajo la luz ultravioleta (aprox. 300 nm) y se han tomado imágenes. El tamaño de los fragmentos se ha determinado utilizando marcadores de peso molecular como *Lambda DNA/EcoRI+ Hind III Marker* o *100 pb DNA Ladder* (*ThermoFisher Scientific*).

5.2.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa se ha llevado a cabo utilizando el termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (*Perkin Elmer*). Generalmente, las reacciones de amplificación se han realizado preparando una mezcla en un volumen final de 50 μ l de 10x *Pfu Buffer* o *Dream Taq Buffer*, 0,2 mM de desoxiribonucleótidos, 0,1 μ M de los oligonucleótidos *forward* y *reverse*, 50 pg-1 μ g de plásmido de interés y 1,25 U de DNA polimerasa *Pfu* o *Taq*.

La reacción se ha llevado a cabo en cinco fases detalladas a continuación: un ciclo inicial de activación de la polimerasa a 94°C durante 5 min, seguido de un número variable de ciclos (aproximadamente treinta) formado cada uno por tres etapas: I) desnaturalización a 94°C durante 20 s, II) hibridación durante 30 s y III) amplificación a 72°C. Finalmente, se ha realizado un último ciclo de extensión a 72°C para asegurar la síntesis de todos los fragmentos iniciados.

La temperatura de hibridación se ha fijado en función de la temperatura media de fusión de los cebadores usados, calculada con la ayuda del programa informático Serial Cloner 2.6.1. y la duración de la etapa de extensión, en función de la longitud del fragmento a amplificar, aplicándose como norma general 1 minuto/kb.

5.2.3.8. Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se ha llevado a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC Granada) utilizando un secuenciador modelo 373 STRECHT (*Applied Biosystems*). En la reacción de extensión se ha empleado la enzima *AmpliTaq*[®] FS DNA polimerasa y didesoxinucleótidos marcados diferencialmente con cromóforos fluorescentes. En cada reacción de secuenciación se han empleado 300-500 ng de DNA puro y 6,4 pM de cebadores en un volumen final de 12 µl.

5.2.3.9. Ensayo de retardo en geles

Para conocer la capacidad que presentan los reactivos de transfección de unir el DNA plasmídico, 0,5 µg del plásmido pEGFP-N2 se han incubado durante 30 min a temperatura ambiente con 1,5-30 µg/ml del reactivo de transfección para obtener los valores de N/P de 0,086-1,730. Posteriormente, se ha realizado una electroforesis en el gel de agarosa al 0,8% (apartado 5.2.3.5.), se ha teñido en bromuro de etidio y se han tomado imágenes bajo la luz ultravioleta. La cuantificación de la intensidad de las bandas se ha realizado con el software NIH ImageJ.

5.2.3.10. Ensayo de protección frente a DNAsas

Con el objetivo de ensayar la capacidad de los reactivos de transfección de proteger el DNA frente a la acción de las DNAsas, 1 µg del plásmido pEGFP-N2 se ha incubado durante 30 min a temperatura ambiente con el reactivo de transfección en un ratio N/P de 0,25; 0,5 y 1. Una vez pasado el tiempo, se ha añadido 0,05 mg/ml de DNasa I disuelta en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 8) y se ha incubado a 37°C durante una hora. Posteriormente, se ha adicionado 20% (p/v) de SDS para desnaturalizar la DNasa y se ha incubado a 65°C durante 15 min.

Para comprobar la integridad del DNA de interés se ha dissociado su unión con el reactivo de transfección añadiendo 30 µg de heparina y se ha realizado una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (apartado 5.2.3.5.). La muestra de DNA en ausencia de la DNasa se ha usado como control negativo. Para la cuantificación de la intensidad de las bandas se ha empleado el software NIH ImageJ.

5.2.4. Técnicas para el análisis de proteínas

5.2.4.1. Preparación de extractos proteicos

Para extraer la fracción proteica de las células eucariotas, se han sembrado 1 x 10⁶ células en placas de 60 mm. Pasadas las 24 h, se han lavado dos veces con PBS 1x y se han lisado con 100 µl de tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0,1% (p/v) SDS, 1% (p/v) desoxicolato sódico, 5 mM EDTA, 1mM PMSF) con ayuda de un raspador. A continuación, la suspensión de las células lisadas se ha sonificado 20 pulsos a 0,5 ciclos y 50% de amplitud y se ha centrifugado a 13 000 rpm durante 15 min a 4°C, descartando el sedimento con los restos celulares. En el sobrenadante se ha medido la concentración de proteínas (apartado 5.2.4.2).

5.2.4.2. Cuantificación de proteínas

En la determinación de la concentración de proteínas se ha seguido el método de ácido bicinconínico descrito por Smith *et al.*, 1985. (138) Para ello, 2-20 µl de la muestra a determinar se han incubado durante 30 min a 37°C con 1% (p/v) de ácido bicinconínico (*Sigma-Aldrich*) disuelto en una mezcla 50:1 (v/v) de solución A (2% (p/v) Na₂CO₃·H₂O, 0,16% (p/v) C₄H₄Na₂O₆, 0,4% (p/v) NaOH, 0,95% (p/v) NaHCO₃, pH 11,25) y solución B (4% (p/v) CuSO₄·5 H₂O). Pasado el tiempo, se ha medido la densidad óptica a 595 nm. Los valores se han interpolado en la curva patrón construida con concentraciones crecientes y conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) que se ha tratado de la misma forma que las muestras.

5.2.4.3. Electroforesis vertical de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Con el objetivo de separar las proteínas en función de su peso molecular por electroforesis SDS-PAGE, se han mezclado 10-40 µg de extracto proteico (apartado 2.2.4.1.) con tampón de carga 5x (200 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,1% (p/v) azul de bromofenol) y se han calentado a 95°C durante 5 min para favorecer la desnaturalización proteica.

Pasado el tiempo, se ha realizado la electroforesis durante 60 min a 150 V en un gel de poliacrilamida formado por dos fases: fase de resolución (8-15% (p/v) de acrilamida) y fase de *stacking* (4% (p/v) de acrilamida). La composición de ambas se detalla en la Tabla 11.

El gel se ha sumergido en vertical en el tampón de electroforesis de proteínas 1x TGS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% (p/v) SDS, pH 8,3).

Componente	Fase de resolución	Fase de <i>stacking</i>
Acrilamida/Bisacrilamida	8-15% (p/v)	4% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M	-
Tris-HCl pH 6,8	-	0,125 M
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
TEMED	0,05% (v/v)	0,05% (v/v)
APS	0,05% (p/v)	0,05% (p/v)

Tabla 11. Composición detallada de los geles de poliacrilamida empleados en la presente tesis.

5.2.4.4. Western Blot

Con el propósito de determinar la expresión de proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos, se ha realizado una electroforesis SDS-PAGE (apartado 5.2.4.3.) y las proteínas separadas en función de su peso molecular se han transferido del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo *Trans-Blot Turbo Transfer System* (*Bio-Rad*) a 25V/1A durante 30 min con la ayuda del tampón de transferencia (25 mM Tris pH 8,3, 0,2 M glicina, 20% (v/v) metanol).

Una vez concluida la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se ha incubado durante 1 h en rotación con la solución de bloqueo de 5% (p/v) de albúmina de suero bovino en TBS-Tween (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20).

Posteriormente, se ha incubado durante 24 horas en rotación a 4°C con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo.

A continuación, se ha lavado 3 veces con TBS-Tween durante 5 min y se ha incubado durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario ligado a la peroxidasa.

Finalmente, se ha vuelto a lavar tres veces con TBS-Tween y una vez con TBS y se ha revelado la membrana en el equipo *ChemiDoc MP (Bio-rad)*, utilizando un reactivo de revelado preparado en nuestro laboratorio, siguiendo el protocolo de Mruk y Cheng, 2011 (139).

5.2.5. Síntesis de nanopartículas

Las nanopartículas evaluadas en la presente tesis (PEI-BP, PEI- β CD \subset DOX, PEI-NIR-780, NIR-783-carbohidratos y Carbon Dots glico-conjugados) han sido sintetizadas por el grupo del profesor Dr. Francisco Santoyo González, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada.

5.2.6. Determinación del tamaño de las nanopartículas

Se ha determinado el tamaño de las nanopartículas en el aparato *Zetasizer micro V (Malvern)*. Para ello, se ha preparado una suspensión de 0,1 mg/ml de nanopartículas en PBS 1x y se han empleado las cubetas *UV-transparent Disposable cuvettes* de 50 μ l (*Sarsted*). Se ha realizado la medida a 25°C con un índice de refracción de la muestra de 1,53 y A=0, con 3 ciclos de 15 mediciones de 10 s.

5.2.7. Extractos mitocondriales

Para extraer la fracción mitocondrial de un cultivo celular se ha utilizado el método de centrifugaciones diferenciales. Para ello, 3×10^6 de células MG-63 han sido incubadas durante 2 h con doxorubicina 1 μ M o cantidades equimolares de doxorubicina ocluida en las nanopartículas PEI-BP. Pasado el tiempo, se han lavado las células dos veces, se han raspado con PBS 1x estéril y se han centrifugado a 800 x g durante 10 min. El precipitado de células se ha lisado con el tampón de extracción mitocondrial (50 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA) en el homogeneizador automático a máxima velocidad durante 20 pases. El lisado celular se ha centrifugado 10 min a 800 x g para precipitar los restos y los núcleos celulares y posteriormente, el sobrenadante se ha centrifugado a 10000 x g durante 10 min para precipitar la fracción mitocondrial. Todo el procedimiento se ha llevado a cabo a 4°C y todas las fracciones celulares (lisado total, citosol, núcleos y mitocondrias) se han almacenado a -20°C para su posterior análisis.

5.2.8. Ensayos en modelos *in vivo*

5.2.8.1. Manipulación de animales de experimentación

Para realizar los ensayos *in vivo*, se han utilizado ratones hembras inmunodeficientes NSGTM de 6-8 semanas de edad, 25-30 g de peso, criados y manipulados en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Instrumentación Científica en la Universidad de Granada de acuerdo con lo establecido en la Directiva 2012/707/UE y con la aprobación de la Consejería de Agricultura, Pesca y desarrollo Rural de la Junta de Andalucía con el número 15/11/2017/154.

5.2.8.2. Generación de modelos de *xenografts*

Con el fin de generar los modelos de ratones con células tumorales humanas, se han tripsinizado las células de interés cultivadas al 90% de confluencia (apartado 5.2.2.1.) y se han lavado tres veces con PBS estéril mediante centrifugación a 800 rpm durante 10 min.

A continuación, se han inyectado por vía sub-cutánea 5×10^6 de células MG-63 en el muslo posterior o 1×10^6 células MDA-MB-231 en la mama del ratón. El crecimiento de los tumores se ha evaluado dos veces a la semana y el tamaño del tumor se ha calculado como $0,5 \times d_1^2 \times d_2$, donde el d_1 y d_2 son el diámetro mayor y menor, respectivamente.

Finalmente, cuando los tumores han alcanzado unas dimensiones de 3-5 mm, se han inyectado las nanopartículas con los fluoróforos a ensayar (NIR-780 o ICG) por vía intravenosa en la cola de los ratones. Para ensayar la capacidad y la eficiencia de transfección *in vivo* de las nanopartículas basadas en la polietilimina, 50 μ g del plásmido control pGL3-Control se han incubado con el reactivo de transfección de interés en un ratio N/P=28, durante 20 min y se ha inyectado por vía intravenosa en la cola del ratón. Pasadas las 24 h, se han administrado 150 mg/kg de D-Luciferina (*Melford Laboratories*) por vía intraperitoneal.

5.2.8.3. Captura de imágenes

La detección de la localización específica mediante quimioluminiscencia o fluorescencia de los compuestos inyectados *in vivo* se ha realizado usando el equipo *IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences)* inmediatamente, 15 min y 24 horas tras la administración. Las imágenes se han tomado y analizado con el software *Living Image 2.6 (Xenogen)*.

5.2.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se ha utilizado el programa informático *GraphPad Prism 6.1*. mediante ANOVA unidireccional o bidireccional y, a continuación, un análisis de Tukey. Los resultados se han expresado como media \pm error estándar de la media (SEM) y el valor de $p < 0,05$ se ha considerado significativo.

6.RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Nanopartículas poliméricas basadas en polietilenimina

La polietilenimina (PEI) es un polímero catiónico que se utiliza como reactivo de transfección para introducir el material genético de interés (DNA, miRNA, siRNA) en el interior de las células diana, con el objetivo de modular la expresión génica o reemplazar genes defectuosos. Gracias a las aminas primarias, secundarias y terciarias presentes en su estructura, es capaz de formar complejos con las cargas negativas del DNA mediante interacciones electrostáticas. (13,14)

La formación del complejo PEI-DNA depende del peso molecular, el número de cargas y el ratio N/P (la proporción de los grupos amino del PEI frente a los grupos fosfato del DNA). Así, a menor densidad de carga y menor peso molecular del polímero, disminuye la capacidad de condensación del DNA y la entrada en el interior celular. (14) Asimismo, el tamaño del polímero determina la eficiencia de transfección. Cuanto más largo o ramificado es el polímero, mejor es la compactación del DNA. Esto permite evitar la degradación del material genético en el ambiente extracelular y aumentar la entrada en el interior de las células a través de las interacciones electrostáticas entre el polímero y la superficie celular cargada negativamente. (9,26)

En nuestro laboratorio disponemos de distintos reactivos de transfección basados en la polietilenimina ramificada de 2 kDa (PEI2kDa), sintetizados por el grupo de investigación del profesor Francisco Santoyo González, que podrían actuar como agentes teragnósticos para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, por su capacidad de unión al material genético para la terapia génica y, además, porque llevan incluidas sondas fluorescentes en el infrarrojo cercano (*near infrared*, NIR-780) en distintas proporciones (PEI-NIR-780 (1:1) y PEI-NIR-780 (1:2)) a través de un enlace de vinilsulfona.

Previamente, el grupo del profesor Santoyo ha demostrado que la adición de Michael de las vinilsulfonas con los nucleófilos constituye una estrategia de síntesis simple con ausencia de sub-productos y origina enlaces estables en las soluciones acuosas. (140) Esta estrategia ha sido empleada para la unión de NIR al polímero de PEI de bajo peso molecular. Las sondas NIR permiten el diagnóstico y la monitorización a tiempo real *in vitro* e *in vivo*, son bioestables y generan una señal sensible y de alto rendimiento cuántico. Además, a las longitudes de onda del infrarrojo cercano, las muestras presentan una baja autofluorescencia, por lo que se evita la señal de fondo. (15,16)

Para determinar la capacidad de unión del PEI al DNA y la influencia del tamaño del polímero en la formación del complejo PEI-DNA, en presencia o ausencia de NIR-780, se han realizado ensayos de retardo en geles de agarosa con PEI de 2 kDa, 25 kDa y PEI-NIR-780 (Figura 6.1. A-C). Para ello, los reactivos de transfección han sido incubados durante 30 min en presencia del plásmido pEGFP-N2, que codifica para la proteína verde fluorescente, en rangos de N/P crecientes (0-1,770). Se ha calculado el porcentaje relativo de unión a partir de la intensidad de las bandas correspondientes al plásmido pEGFP-N2 en ausencia de PEI, comparada con la intensidad en la presencia del polímero (Figura 6.1.D).

RESULTADOS

Los reactivos de transfección basados en PEI de bajo peso molecular (PEI 2 kDa) han presentado la máxima capacidad de unión al DNA (100%) a partir del ratio N/P=1,038, mientras que el PEI de alto peso molecular (PEI 25 kDa) lo hace a partir del ratio N/P=0,692. Esto es debido a que los polímeros de PEI más largos presentan un mayor número de aminas cargadas positivamente, que les permiten establecer fuerzas electrostáticas con los grupos fosfato del material genético. Además, se ha observado que la sonda NIR-780 unida a PEI de 2kDa aumenta su capacidad de unión al DNA (N/P=0,692). Probablemente esto es debido a que la incorporación de una molécula de naturaleza hidrofóbica como el NIR-780 permite el establecimiento de interacciones adicionales con las bases nitrogenadas de la molécula de DNA, aumentando su afinidad por el mismo.

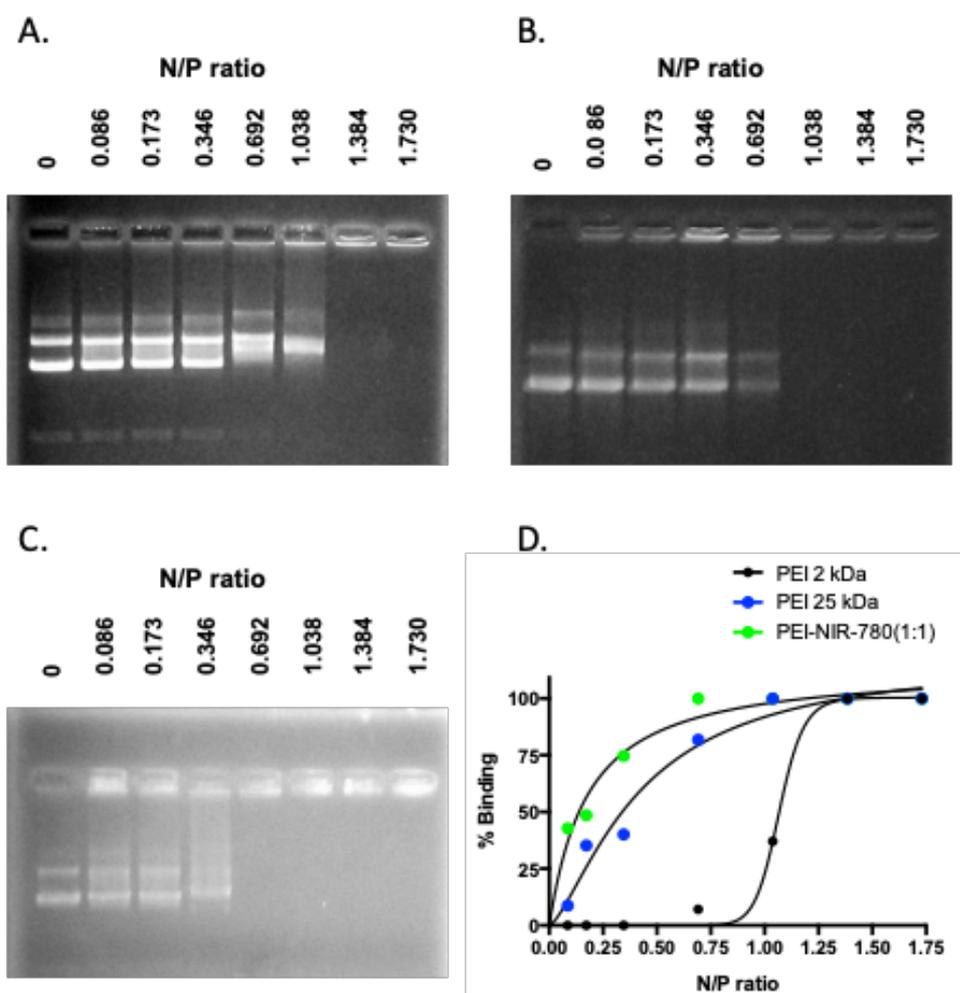


Figura 6.1. Capacidad de unión de polietilenimina al DNA mediante ensayos de retardo en geles de agarosa. (A) PEI 2 kDa, (B) PEI 25 kDa y (C) PEI-NIR-780 (1:1) han sido incubados durante 30 min con pEGFP-N2 en ratios de N/P crecientes (0-1,730) y (D) se ha calculado el porcentaje relativo de unión a partir de la intensidad de las bandas correspondientes al plásmido pEGFP-N2 libre con respecto al pEGFP-N2 unido a PEI (100%).

A continuación, para comprobar la capacidad del PEI para proteger el material genético de la degradación por DNAsas y evitar su rotura precoz durante el transporte hacia el núcleo celular, la sonda NIR-780 libre y los distintos reactivos de transfección (PEI 2 kDa, PEI-NIR-780 (1:1) y (1:2)) se han incubado durante 30 min con el plásmido

pEGFP-N2 en ratios N/P= 1, 2 o 5 en presencia de la DNAsa I (Figura 6.2.). Se han utilizado como controles, el plásmido pEGFP-N2 en presencia (+) y en ausencia (-) de la DNAsa I y se ha realizado la electroforesis en geles de agarosa.

Se ha observado que los reactivos de transfección derivados de PEI 2 kDa protegen el material genético a partir del ratio N/P=2, mientras que el compuesto NIR-780 libre no protege el DNA de la acción de las DNAsas, ya que se trata de una sonda fluorescente incapaz de establecer interacciones electrostáticas con el DNA a través de los enlaces fosfodiéster que permitan su compactación y protección.

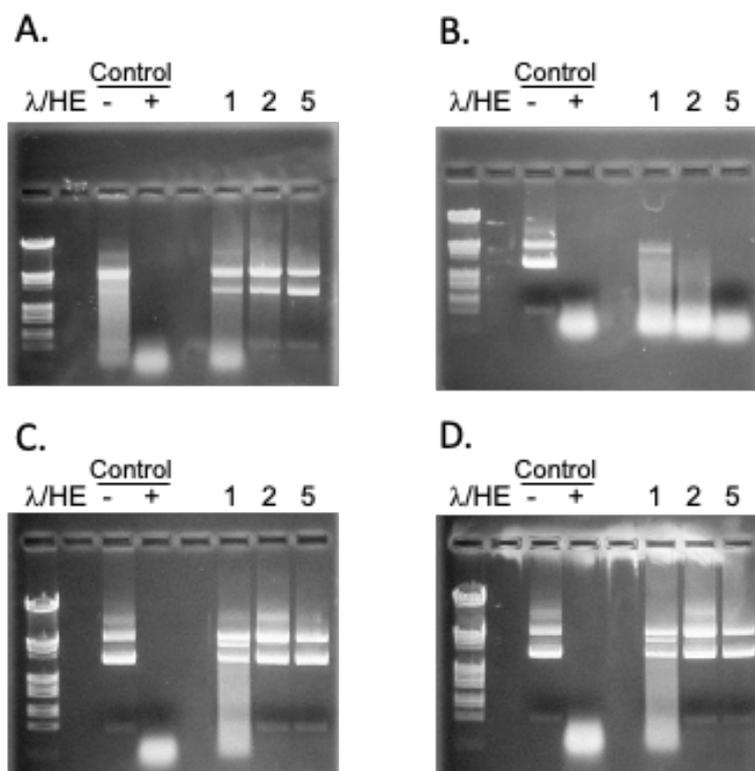


Figura 6.2. Ensayos de protección del material genético frente a la acción de la DNAsa I. Geles de agarosa que muestran el plásmido pEGFP-N2 incubado en presencia (+) o ausencia (-) de la DNAsa I. Las calles 1, 2 y 5 corresponden a las muestras de pEGFP-N2 pre-incubadas con cantidades crecientes (N/P= 1, 2 y 5) de diferentes reactivos de transfección antes de su tratamiento con la DNAsa I: (A) PEI 2 kDa, (B) NIR-780, (C) PEI-NIR-780 (1:1) y (D) PEI-NIR-780 (1:2).

Además, con el objetivo de determinar la citotoxicidad de estos reactivos de transfección, se han realizado ensayos de viabilidad celular mediante el método MTT en células CHO-k1 (Figura 6.3.). Para ello, las células han sido transfectadas con PEI 25 kDa, PEI 2 kDa, PEI-NIR-780 (1:1) y PEI-NIR-780 (1:2) en ratios N/P=7, 14 y 28 para PEI 25 kDa y N/P=42, 56 y 70 para PEI 2 kDa, PEI-NIR-780 (1:1) y PEI-NIR-780 (1:2) con el plásmido pEGFP-N2. Como control positivo de transfección se ha utilizado el reactivo comercial Lipofectamina 2000. Tras 24 horas, se ha evaluado la citotoxicidad en las células tratadas con los compuestos de interés y los resultados se han expresado en porcentaje (0% para las células no tratadas), sustrayendo al 100% el valor de viabilidad obtenido con cada uno de los tratamientos.

El PEI 2 kDa y el compuesto de transfección PEI-NIR-780 (1:1) han presentado una baja citotoxicidad, sin embargo, los reactivos PEI 25 kDa y PEI-NIR-780 (1:2) han

RESULTADOS

causado un 40-70% de muerte celular en las concentraciones ensayadas. Se ha descrito que los polímeros de alto peso molecular tienen la capacidad de agregación y adherencia a la superficie celular, causando mayor muerte celular por la desestabilización de la membrana plasmática. (141,142) Asimismo, la presencia de dos moléculas de NIR-780 incrementa la toxicidad del reactivo de transfección PEI-NIR-780 (1:2) debido al carácter lipofílico de la sonda fluorescente y probablemente su capacidad de acumulación en las mitocondrias, aumentando la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la desestabilización de la membrana mitocondrial. (16) Por tanto, hemos seleccionado el reactivo PEI-NIR-780 (1:1) como el más adecuado para los siguientes ensayos.

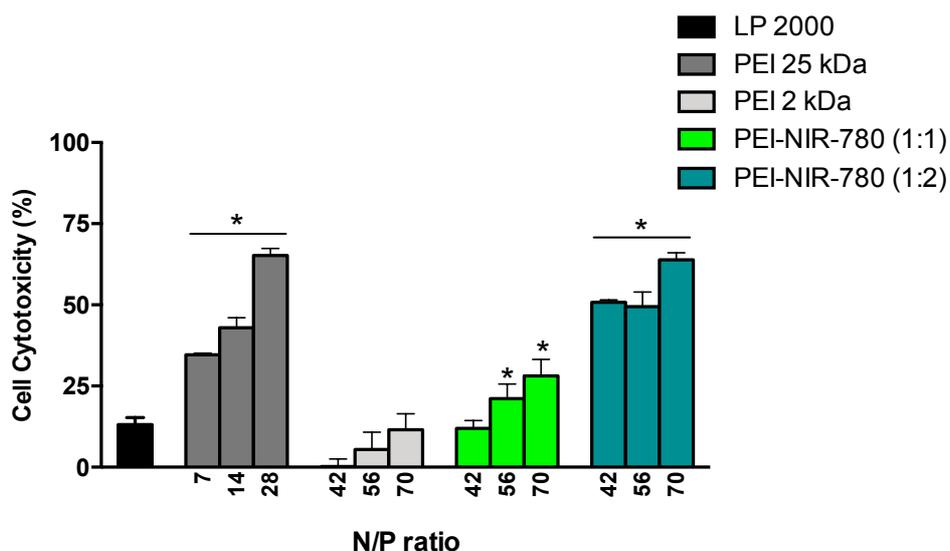


Figura 6.3. Ensayos de citotoxicidad de los reactivos de transfección basados en la polietilenimina. Células CHO-k1 han sido transfectadas con PEI 2 kDa, PEI-NIR-780 (1:1) y PEI-NIR-780 (1:2) (ratios N/P= 42, 56 y 70) y con PEI 25 kDa (ratios N/P= 7, 14, 28) con pEGFP-N2. La viabilidad celular se ha evaluado 24 horas tras la transfección mediante el ensayo MTT. Como control positivo de transfección se ha utilizado el reactivo comercial Lipofectamina 2000 (LP 2000). Los resultados de citotoxicidad se han expresado en porcentaje (0% para las células no tratadas), sustrayendo al 100% el valor de viabilidad obtenido con cada uno de los tratamientos (Media \pm SEM, n=4). * $p < 0.05$ vs células control.

Se han realizado ensayos de transfección en las células CHO-k1 con el reactivo PEI 25 kDa (ratios N/P= 0,7; 1,4; 2,8; 7; 14; 28) y los reactivos PEI 2 kDa, PEI-NIR-780 (1:1) y PEI-NIR-780 (1:2) (ratios N/P= 14, 28, 42, 56, 70, 84) con el plásmido pEGFP-N2. Se han utilizado ratios N/P más bajos para PEI 25 kDa, debido a su mayor citotoxicidad y su mayor capacidad de unión al DNA. Como se ha mencionado previamente, los polímeros de bajo peso molecular (PEI 2 kDa) presentan menor densidad de carga y menor capacidad de unión al DNA, por lo que se necesitan ratios N/P más altos para obtener unos niveles de transfección significativos. (13) Tras 24 horas, se ha medido la fluorescencia de la proteína verde fluorescente en el lisado celular y los resultados se han normalizado con la concentración de proteínas en cada muestra. Como control positivo se ha utilizado el reactivo de transfección comercial Lipofectamina 2000 (Figura 6.4.).

Mientras que el compuesto PEI 2 kDa libre ha demostrado unos niveles de transfección muy bajos, los compuestos de PEI 2 kDa unida a una o dos moléculas de

NIR-780 (PEI-NIR-780 (1:1) y (1:2)) han alcanzado unos niveles de transfección dos o tres veces más altos que Lipofectamina 2000. Esto podría ser debido, en parte, a que la sonda NIR-780 aporta hidrofobicidad al vector, favoreciendo su paso a través de las membranas biológicas (140), al mismo tiempo que como se ha indicado arriba presenta una mayor capacidad de compactación de DNA. El compuesto PEI 25 kDa también ha presentado una mayor eficiencia de transfección con respecto al reactivo comercial, aunque en ratios N/P más bajos que los derivados de PEI 2 kDa.

Por tanto, en una primera etapa, en estos ensayos preliminares, hemos demostrado que los compuestos basados en la polietilenimina ramificada de 2 kDa unida a la sonda fluorescente NIR-780 permiten formar complejos con el DNA de interés y lo protegen frente a la acción de las DNAsas, por lo que se podrían usar como vectores de transfección en la terapia génica. Asimismo, se ha comprobado que el tamaño del polímero influye en la eficiencia de transfección y en su citotoxicidad.

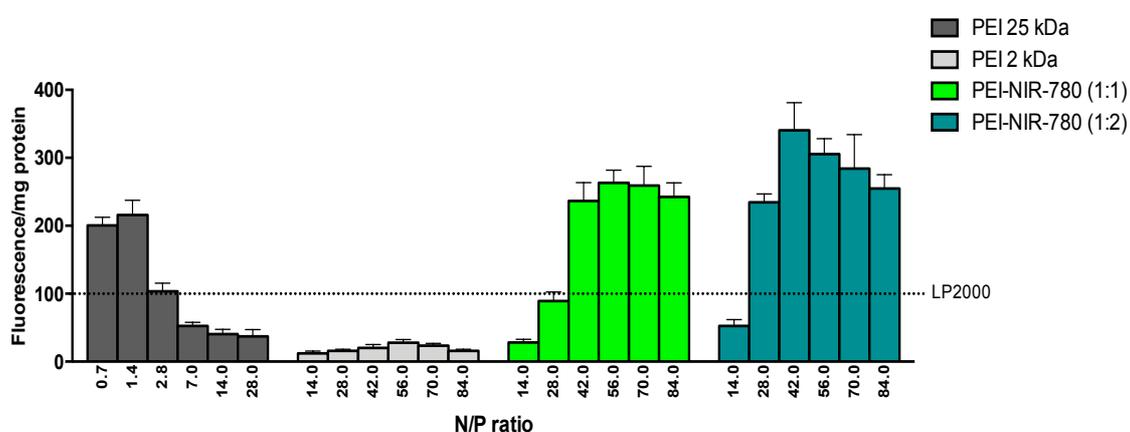


Figura 6.4. Niveles de transfección de los reactivos basados en la polietilenimina. Células CHO-k1 han sido transfectadas con PEI 25 kDa (ratios N/P= 0,7; 1,4; 2,8; 7; 14; 28) y PEI 2 kDa, PEI-NIR-780 (1:1) y PEI-NIR-780 (1:2) (ratios N/P= 14, 28, 42, 56, 70, 84) con el plásmido pEGFP-N2. Después de 24 h, se ha determinado la fluorescencia de la EGFP en el lisado celular y se ha normalizado por la concentración de proteínas en cada muestra. Se ha usado Lipofectamina 2000 (LP2000) como control positivo de transfección. Los valores se presentan como media \pm SEM (n=4).

Además de su posible uso como reactivos de transfección, nuestros resultados de baja citotoxicidad hacen que los derivados de PEI de bajo peso molecular conjugados con una molécula de NIR-780 constituyan una atractiva plataforma para el desarrollo de agentes teragnósticos mediante la incorporación de moléculas directoras y moléculas que permitan el transporte de fármacos. La presencia de aminas secundarias y terciarias en la estructura de PEI, posibilita su funcionalización con moléculas directoras de distinta naturaleza que permiten un transporte específico hacia las dianas moleculares sobre-expresadas en las células tumorales (14,140,143) y con β -ciclodextrinas (β CD) que pueden ocluir agentes quimioterapéuticos, como la doxorubicina. (17,18) Las β CD son oligosacáridos cíclicos con forma de cono truncado que presentan una cavidad hidrofóbica y una superficie hidrofílica, gracias a lo que permiten formar complejos de inclusión con fármacos poco solubles, como es la doxorubicina, aumentando su solubilidad y favoreciendo su liberación controlada. En los últimos años, las β CD han sido funcionalizadas con distintos bioligandos para el transporte dirigido de distintos agentes quimioterapéuticos. El principal problema de las ciclodextrinas es que

presentan numerosos grupos hidroxilo en su superficie, lo que dificulta su paso a través de las membranas plasmáticas cargadas negativamente. Su unión a PEI favorece la internalización celular ya que aporta cargas positivas que permiten su interacción con la membrana plasmática cargada negativamente. (17,18)

La doxorubicina es un antibiótico utilizado tanto para el tratamiento de los tumores sólidos como hematológicos, cuyos efectos antitumorales se basan en el daño en el DNA, la inhibición de la topoisomerasa II, la inducción de estrés oxidativo, el metabolismo alterado de Ca^{2+} y la activación del sistema inmune contra el tumor. Su eficacia está limitada por la cardiotoxicidad y el desarrollo de resistencias debido a la sobre-expresión de los transportadores de unión al ATP (transportadores ABC). (19)

En esta tesis, las nanopartículas de PEI- β CD se han funcionalizado bien con bifosfonatos o con ácido hialurónico como moléculas directoras, para originar agentes teragnósticos para el tratamiento y diagnóstico del osteosarcoma y el cáncer de mama triple negativo, respectivamente.

6.2. Bifosfonatos como moléculas directoras hacia el osteosarcoma y metástasis óseas

El osteosarcoma es el cáncer de hueso más frecuente y que afecta principalmente los huesos largos en los niños, los adultos jóvenes y las personas con enfermedad de Paget. Su tratamiento clínico consiste en la cirugía combinada con la quimioterapia basada en la administración de doxorubicina con cisplatino y metotrexato. Sin embargo, en las últimas décadas, no se ha visto una mejora en la supervivencia de los pacientes con osteosarcoma, ya que la quimioterapia es ineficaz en aproximadamente la mitad de los casos, debido a la aparición de resistencias a los agentes quimioterapéuticos, originadas principalmente por la sobre-expresión de la glicoproteína P y la baja perfusión sanguínea en los huesos, lo que dificulta la entrada y biodisponibilidad de los fármacos. Además, los quimioterapéuticos presentan efectos secundarios graves, como es la cardiotoxicidad causada por la administración de la doxorubicina. (32–34,90)

Asimismo, existen tumores, como son el cáncer de mama y el cáncer de próstata, que originan metástasis en el tejido óseo en sus estadios avanzados y que originan un mal pronóstico. Por ello, sería deseable desarrollar nuevas estrategias que permitan el transporte dirigido de los diferentes agentes terapéuticos y para evitar los efectos secundarios indeseados en estas patologías óseas. (43)

Los bifosfonatos (BP) son análogos inorgánicos del pirofosfato que presentan una gran afinidad por el hidroxiapatito, el principal constituyente de los huesos, por lo que podrían actuar como moléculas directoras hacia los tumores óseos, las metástasis generadas en el tejido óseo o para las microcalcificaciones en los tejidos blandos. (43)

Con el objetivo de estudiar el papel de los bifosfonatos en el transporte dirigido de fármacos quimioterapéuticos hacia las células tumorales relacionadas con el hueso, se ha sintetizado por el grupo de investigación del profesor Santoyo, mediante química de vinilsulfonas, nanopartículas basadas en la polietilenimina unida a distintos derivados de bifosfonatos y 4 moléculas de β -ciclodextrina (Figura 6.5.). (144,145) Además de los bifosfonatos como moléculas directoras, las aminas cargadas positivamente de PEI

presentan una atracción inherente hacia el hidroxiapatito, que tiene una carga superficial ligeramente negativa estableciéndose interacciones electrostáticas. Debido a que el tamaño del polímero influye en su citotoxicidad, se ha seleccionado la polietiliminina ramificada de bajo peso molecular (bPEI 2 kDa).

Se ha demostrado que la afinidad de unión de los bifosfonatos al hidroxiapatito se ve afectada por su estructura, por lo que es necesario elegir el ligando más apropiado para conseguir el transporte dirigido hacia hueso. Asimismo, el número de los ligandos de bifosfonatos unidos a la nanopartícula afecta a la capacidad de unión al hidroxiapatito. (43) Por ello, se han diseñado bifosfonatos con grupos tioles que se diferencian entre sí por la estructura de unión entre los dos grupos fosfonatos unidos mediante un carbono (P-C-P), denominados derivados "B" (Figura 6.5.A) o mediante una cadena carbono-nitrógeno-carbono (P-C-N-C-P), denominados derivados "BF" (Figura 6.5.B). Además, se ha sintetizado un compuesto monofosfonato derivado de N-piperazina, como control negativo para el transporte dirigido hacia los huesos, llamado "MF". (Figura 6.5.C) Posteriormente, se han unido una o dos moléculas de estos derivados de bifosfonatos funcionalizados con una vinilsulfona a la nanopartícula PEI-βCD.

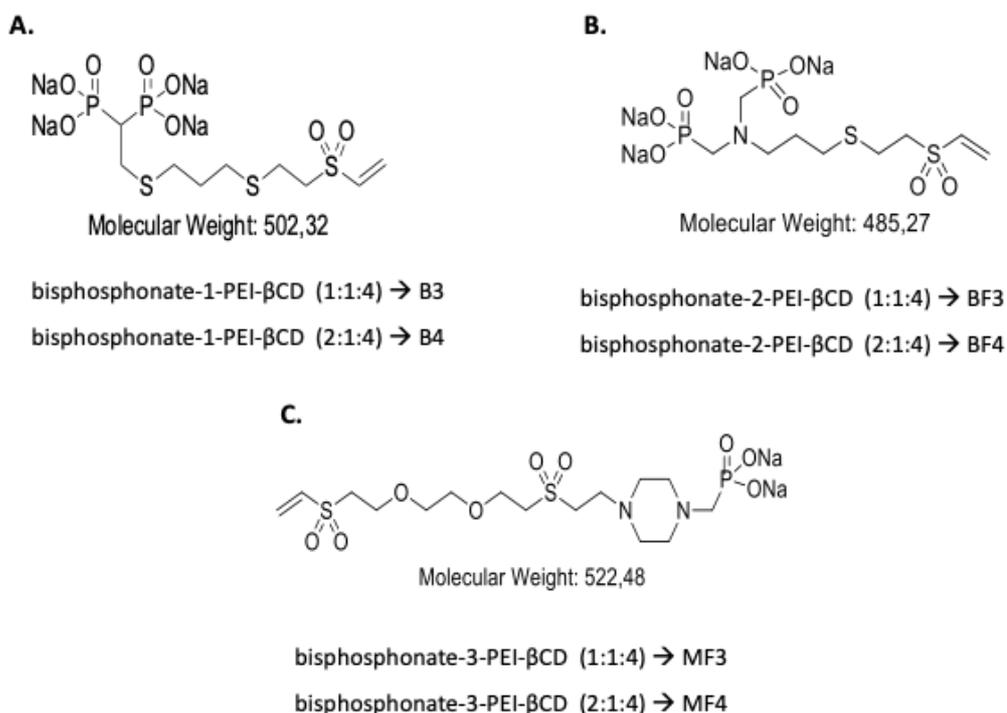


Figura 6.5. Estructura de los derivados de bifosfonatos. Una o dos moléculas de los derivados de bifosfonatos formados por dos grupos fosfonatos unidos mediante (A) un carbono (P-C-P) o (B) mediante una cadena carbono-nitrógeno-carbono (P-C-N-C-P) se han funcionalizado con una vinilsulfona y se han unido a la nanopartícula PEI-βCD mediante una adición de Michael. Asimismo, se ha desarrollado un monofosfonato derivado de N-piperazina por el mismo método como control negativo del transporte dirigido.

RESULTADOS

Se ha medido el tamaño de las nanopartículas PEI-BP y los resultados se muestran en la Tabla 12. Se ha observado que estas nanopartículas presentan un tamaño de aproximadamente 450-550 nm.

Reactivo	Tamaño (nm)	SD (nm)
PEI- β CD	474,63	\pm 35,66
B3	445,86	\pm 111,13
B4	450,86	\pm 31,53
BF3	533	\pm 91,14
BF4	402,76	\pm 58,78
MF3	529,76	\pm 44,14
MF4	560,3	\pm 54,96

Tabla 12. Tamaño de las nanopartículas PEI-BP medido en Zetasizer microV (Malvern). SD (desviación estándar)

6.2.1. Derivados de bifosfonatos como reguladores de la viabilidad celular

Los bifosfonatos inhiben la resorción ósea, ya que favorecen la apoptosis de los osteoclastos mediante distintos mecanismos moleculares en función de su estructura. Así, los BP no-nitrogenados pueden ser incorporados como análogos no hidrolizables del ATP para inducir apoptosis en osteoclastos, mientras que los BP nitrogenados actúan bloqueando la vía de señalización del mevalonato y evitando la prenilación de las proteínas de unión al GTP, como son Ras, Rab o RhoA. Esto favorece los procesos apoptóticos, la detención del ciclo celular y evitan la migración, la invasión y la angiogénesis. (91,146–148) Es por ello por lo que estudios preclínicos recientes han demostrado que los bifosfonatos pueden tener efecto antitumoral y se podrían usar para el tratamiento de los tumores óseos. (43,91)

Hemos ensayado los efectos de los compuestos derivados de bifosfonatos sobre la viabilidad celular en distintas líneas: células de cáncer cervical (HeLa) como control negativo no relacionado con hueso, precursores de osteoblastos (MC3T3-E1) y células de osteosarcoma (MG-63). Las células MC3T3-E1 son un modelo reconocido de la funcionalidad de los osteoblastos en los cultivos celulares. Además, en las células MG-63 se ha confirmado previamente la internalización activa de los derivados de los bifosfonatos y del ácido zolendrónico. (148,149)

Para realizar los ensayos de citotoxicidad de los bifosfonatos, se han incubado las células mencionadas con concentraciones crecientes de PEI-BP y de alendronato como control (1, 15 y 30 μ M) durante 48 horas y se ha medido la citotoxicidad celular mediante el ensayo MTT. Los resultados se han expresado en porcentaje (0% para las células no tratadas), sustrayendo al 100% el valor de viabilidad obtenido con cada uno de los tratamientos.

La citotoxicidad de los derivados PEI-BP se ha comparado con la toxicidad causada por el alendronato, ya que éste es un derivado nitrogenado de los bifosfonatos, comercializado bajo el nombre Fosamax[®], utilizado para el tratamiento de la osteoporosis y la enfermedad de Paget. El alendronato presenta unos niveles de internalización biológica más altos en comparación con otros bifosfonatos orales debido a su grupo amino terminal capaz de establecer puentes de hidrógeno con los grupos

hidroxilos del hidroxiapatito. Asimismo, previamente se había demostrado que el alendronato es citotóxico en las células MG-63. (150)

En estos ensayos, se ha observado que los derivados B3, B4, BF3 y BF4, presentan una citotoxicidad significativamente mayor en las células de osteosarcoma (Figura 6.6.C) que en las células HeLa y MC3T3-E1 (Figura 6.6.A y B). En las células MG-63, la citotoxicidad de los compuestos BF3 y BF4 ha sido incluso mayor que la del alendronato. Por lo tanto, la elevada citotoxicidad de estas nanopartículas en las células MG-63 y su baja toxicidad en las células MC3T3-E1 y HeLa sugieren una especificidad hacia las células de cáncer de hueso.

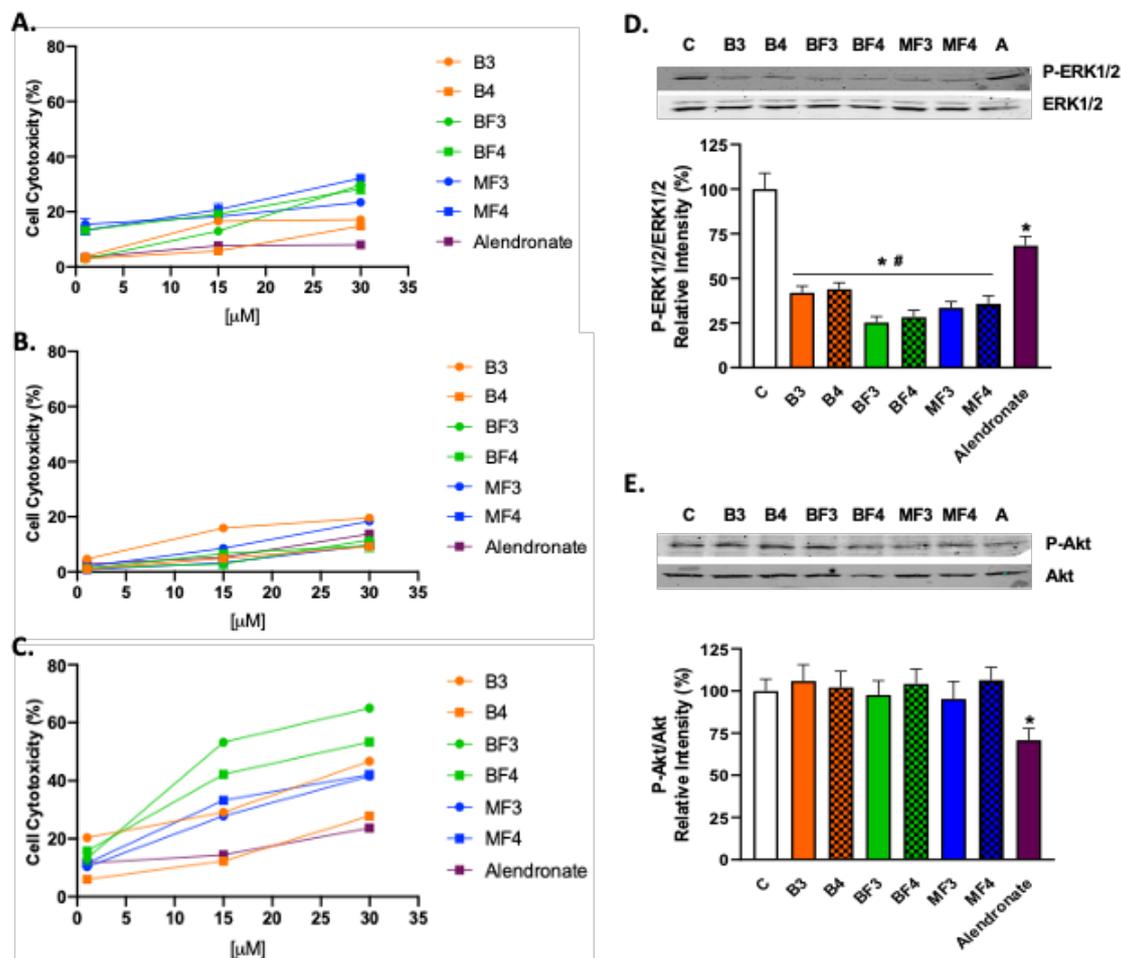


Figura 6.6. Citotoxicidad de los derivados PEI-BP en diferentes líneas celulares. Células HeLa (A), MC3T3-E1 (B) y MG-63 (C) han sido incubadas con 1, 15 y 30 μM de alendronato o derivados de PEI-BP durante 48 horas y se ha determinado la citotoxicidad celular (expresada en porcentaje (0% para las células no tratadas), sustrayendo al 100% el valor de viabilidad obtenido con cada uno de los tratamientos) mediante el ensayo MTT. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=5$). Células MG-63 se han incubado durante 30 min en presencia o en ausencia de 15 μM alendronato o de los derivados de bifosfonatos. El estado de fosforilación de ERK1/2 (D) y de Akt (E) se ha medido mediante Western Blot. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=4$). * $p<0.05$ vs células no tratadas y # $p<0.05$ vs células tratadas con alendronato.

Además, los bifosfonatos producen su efecto citotóxico mediante la inhibición de vías de señalización que favorecen la proliferación celular. Así, la activación de las quinasas Akt y ERK 1/2 se ha relacionado con una mayor tasa de proliferación, ya que presentan la capacidad de promover el crecimiento celular y disminuir la apoptosis en

las células tumorales y en los osteoclastos. En estas células, el alendronato 100 μM inhibe la activación de la vía PI3K-Akt-NF κ B. (94,95) Asimismo, la inhibición específica de la señalización derivada de ERK1/2 en las células MG-63 por alendronato puede prevenir su proliferación y diferenciación. (151)

Por lo tanto, hemos ensayado los efectos de los compuestos PEI-BP sobre la fosforilación de las quinasas Akt y ERK1/2 mediante Western blot en las células de osteosarcoma que han sido incubadas durante 30 min en presencia o ausencia del alendronato o de los derivados PEI-BP (15 μM) (Figura 6.6.D.). Se ha observado que estos compuestos son capaces de bloquear la activación de ERK1/2 en las células MG-63, siendo los derivados BF3 y BF4 los que más efecto producen. Esta inhibición ha sido significativamente más alta que la detectada con el alendronato 15 μM . Sin embargo, cuando se ha ensayado la fosforilación de Akt en Ser473, mientras que se ha detectado una inhibición moderada de la activación de esta quinasa por alendronato, no se ha puesto de manifiesto ningún efecto inhibitorio debido a la incubación con los derivados PEI-BP. (Figura 6.6.E)

Por tanto, estos resultados sugieren que los derivados de bifosfonatos actúan como moléculas directoras específicas hacia las células de osteosarcoma, disminuyendo su viabilidad celular, y que ese efecto podría deberse a la inhibición de la vía de señalización de las MAP quinasas, medida por la inhibición de la fosforilación de ERK1/2. Además, estos PEI-BP son significativamente más eficientes comparados con el alendronato.

6.2.2. Internalización celular de los derivados de bifosfonatos

A pesar de que los derivados PEI-BP presentan una toxicidad significativa en las células MG-63 y más elevada que la del alendronato, tal y como hemos descrito en el apartado anterior, los efectos son significativos solo a concentraciones elevadas (15-30 μM), mientras que las concentraciones de bifosfonatos normalmente utilizadas (1 μM) cuando se emplean como moléculas directoras no presentan una toxicidad significativa en las células de osteosarcoma. Como una estrategia para potenciar el efecto citotóxico de los derivados de PEI-BP, se ha incluido en su estructura cuatro moléculas de β -ciclodextrinas como vehículo para el transporte de los fármacos poco solubles, como es la doxorubicina. De esta manera, se potenciaría la citotoxicidad de estos compuestos, al mismo tiempo que se reducirían los efectos secundarios de la doxorubicina.

El uso crónico de los bifosfonatos para el tratamiento de las enfermedades y las metástasis óseas está relacionado con la aparición de diversos efectos secundarios graves como son la irritación gastrointestinal, las fracturas en el fémur y la necrosis de la mandíbula. La combinación de la especificidad que aportarían los bifosfonatos hacia las células óseas con la eficacia de un fármaco antitumoral permitiría reducir la dosis terapéutica de estos compuestos y estos efectos secundarios indeseados. (91,152)

Por ello, hemos ocluido la doxorubicina (DOX) en las cuatro moléculas de β -ciclodextrinas unidas a los derivados PEI-BP, mediante una incubación durante 24 h de la suspensión acuosa de las nanopartículas con la solución acuosa de la DOX en un ratio molar 1:0,9 ($\beta\text{CD}:\text{DOX}$) para formar los complejos de inclusión $\text{DOX}\subset\text{B3}$, $\text{DOX}\subset\text{B4}$, $\text{DOX}\subset\text{BF3}$, $\text{DOX}\subset\text{BF4}$, $\text{DOX}\subset\text{MF3}$ y $\text{DOX}\subset\text{MF4}$. La oclusión de DOX en la βCD se garantiza

por una parte usando un defecto de DOX con respecto a la capacidad de oclusión de la β CD y por otra parte por la modificación de los espectros de emisión de la DOX ocluida en la β CD o en los derivados PEI-BP (Figura 6.7.) Se ha observado el máximo de excitación a 499 nm y el de emisión a 555 nm.

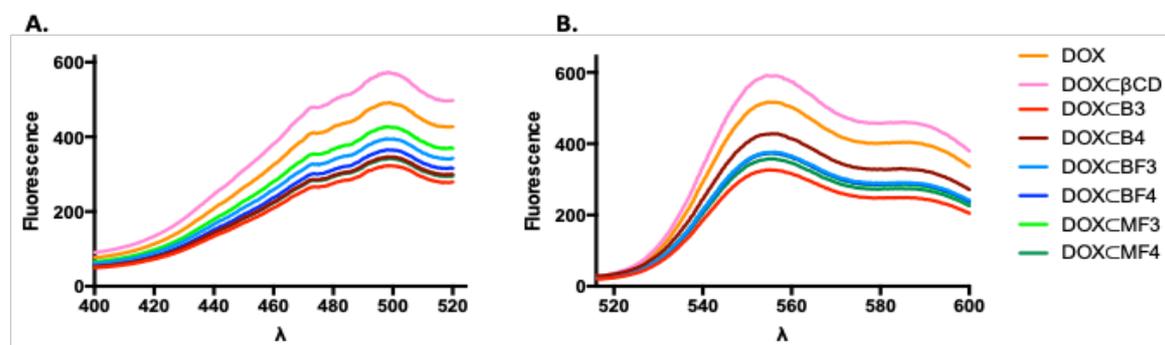


Figura 6.7. Espectros de excitación (A) y de emisión (B) de la doxorubicina libre y ocluida en la β CD y en los derivados PEI-BP.

Con el objetivo de determinar la entrada específica de las nanopartículas en las células óseas, se han realizado ensayos de internalización en las células de osteosarcoma MG-63, los precursores de osteoblastos MC3T3-E1 y las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, en las que se ha demostrado la captación de bifosfonatos como el ácido zolendrónico y el ibandronato. (153,154) Como control negativo, se han utilizado células HeLa no relacionadas con el tejido óseo. Las células han sido incubadas durante dos horas con doxorubicina 1 μ M o cantidades equivalentes de DOX incluida en DOX- β CD, DOX-B3, DOX-B4, DOX-BF3, DOX-BF4, DOX-MF3 y DOX-MF4 y se ha evaluado la entrada de las nanopartículas en el interior celular midiendo la fluorescencia intrínseca de la doxorubicina a 499/555 nm. Los resultados se expresan como pmol DOX/mg proteína.

Tal y como se muestra en la Figura 6.8., la entrada de la doxorubicina ocluida en la β CD ha sido mayor que la de la doxorubicina libre, en todas las líneas celulares. En las células de osteosarcoma (MG-63), la internalización de DOX ha aumentado con las nanopartículas cuya superficie se ha funcionalizado con los bifosfonatos, siendo mayor para los derivados funcionalizados con dos moléculas de BP, tal y como se esperaba. Este efecto ha sido menor en las células HeLa no relacionadas con el hueso y en los precursores de osteoblastos. Teniendo en cuenta la diferente estructura química, los compuestos B y BF han presentado una mayor entrada en comparación con los compuestos MF, que presentan un grupo monofosfonato incapaz de dirigir las nanopartículas hacia el hueso. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los ensayos de viabilidad celular. Así, la doxorubicina ocluida en los compuestos de tipo B y BF ha presentado una mayor entrada en las células MG-63, sugiriendo una especificidad hacia las células tumorales relacionadas con el hueso y la capacidad de mediar el transporte dirigido en esas células.

Se ha descrito que la entrada de los bifosfonatos funcionalizados (por ejemplo, el pamidronato marcado con fluoróforos de infrarrojo cercano) (155) depende de sus propiedades fisicoquímicas como son la carga neta, la hidrofobicidad y la polaridad,

RESULTADOS

permitiendo su uso como agentes de imagen específicos en la detección de los tumores relacionados con el tejido óseo. (91) La entrada preferente de los derivados B y BF en los osteosarcomas podría explicarse mediante los cambios en sus propiedades fisicoquímicas debido a la incorporación de las cargas positivas proporcionadas por la polietilenimina. Esto permiten establecer interacciones electrostáticas con el hidroxapatito y con la membrana plasmática cargada negativamente y al mismo tiempo la modulación de la hidrofobicidad debido a la presencia de las β -ciclodextrinas en su estructura. Como se ha mencionado previamente, las β CD presentan una superficie hidrofílica gracias a los numerosos grupos hidroxilo en la cara externa del cono truncado, lo que dificulta su paso a través de las membranas plasmáticas también cargadas negativamente. Su unión a PEI favorece su internalización celular, ya que aporta cargas positivas que permiten su interacción con la membrana plasmática. (17,18)

El transporte dirigido de PEI-BP a las células óseas ricas en hidroxapatito podría permitir la acumulación de altas dosis del agente terapéutico, por lo que estos resultados son prometedores ya que el aumento en la entrada de doxorubicina en los osteosarcomas gracias al uso de las nanopartículas, podría disminuir la dosis del fármaco sin perder la eficacia terapéutica, y por tanto disminuir la toxicidad y los efectos secundarios en los pacientes con tumores óseos.

Asimismo, nuestros resultados indican que los derivados de bifosfonatos tienen una buena capacidad de entrada en las células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231), caracterizadas por la falta de receptores específicos para una terapia dirigida. (20) En los últimos estadios de la enfermedad, estas células son capaces de originar metástasis en el tejido óseo. (91) La capacidad de algunos bifosfonatos (B4) para aumentar la entrada en las MDA-MB-231 podría ser una alternativa para el tratamiento específico de estos tumores y de las metástasis óseas que originan. Algunos compuestos antitumorales funcionalizados con el bifosfonato (fenilacetato-bifosfonato) han sido ensayados en los modelos animales de cáncer de mama, teniendo efectos pro-apoptóticos y anti-angiogénicos. (156) Asimismo, el uso de los bifosfonatos unidos a las sondas fluorescentes permitiría su transporte dirigido hacia el hidroxapatito aumentando la especificidad y la sensibilidad de las técnicas de imagen como es el caso de la mamografía para la detección del cáncer de mama.

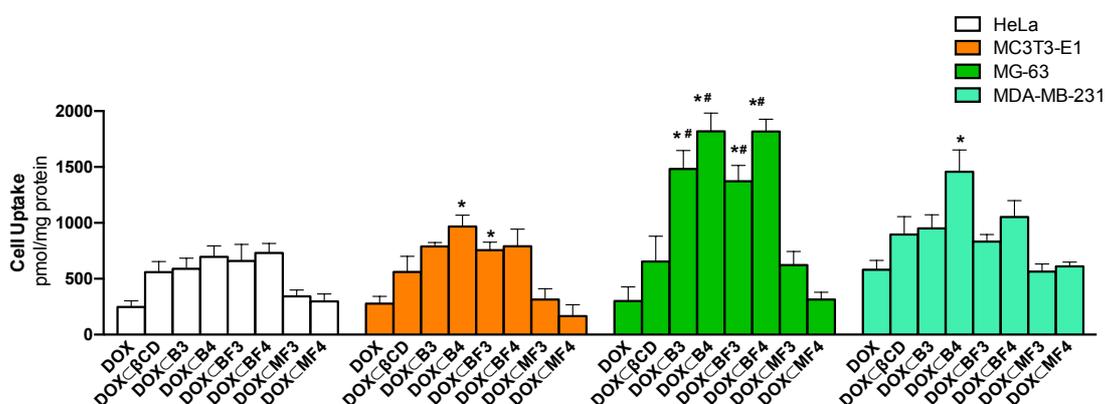


Figura 6.8. Ensayos de internalización celular de los derivados PEI-BP en distintas líneas celulares. Células HeLa, MC3T3-E1, MG-63 y MDA-MB-231 se han incubado durante 2 h en presencia de la doxorubicina 1 μ M o su concentración equivalente oculta en la β CD y los derivados B, BF y MF. Los resultados se expresan como pmol DOX/mg proteína (media \pm SEM (n=6)). * p <0.05 vs células tratadas con Dox; # p < 0.05 vs células tratadas con Dox β CD.

6.2.3. Vías de entrada de los derivados de bifosfonatos

Hasta aquí, hemos demostrado que la entrada de doxorubicina ocluida en las nanopartículas PEI-BP es mayor en las células de osteosarcoma comparando con las células no relacionadas con el hueso. Con el objetivo de determinar si la mayor internalización en las células de cáncer óseo se debe al tropismo del bifosfonato hacia las células ricas en hidroxiapatito o a vías alternativas, debidas a las modificaciones químicas en las nanopartículas, se han utilizado distintos inhibidores de internalización ya que está descrito que las nanopartículas pueden entrar por distintas vías en el interior celular: por difusión pasiva, macropinocitosis, fagocitosis o vías dependientes de clatras o caveolas. (157)

Así, células MG-63 y HeLa han sido preincubadas durante 30 min con clorpromazina (50 μ M) y sacarosa (0,45 M) como inhibidores de la vía dependiente de clatras, filipina (5 μ g/ml) y genisteina (400 μ M) como inhibidores de la vía dependiente de caveolas, citocalasina D (2 μ M) como inhibidor de la macropinocitosis o con bromosulfoftaleina (BSP) (250 μ M) como inhibidor de los OATPs (transportadores de aniones orgánicos). Posteriormente, las células se han incubado durante 2 h con el compuesto DOX-BF4 (1 μ M) y se ha medido la entrada mediante la fluorescencia de la doxorubicina en el interior celular. Los resultados se han normalizado con el valor de entrada de DOX-BF4 en ausencia de inhibidores al que se le ha asignado el valor 100% (Figura 6.9.).

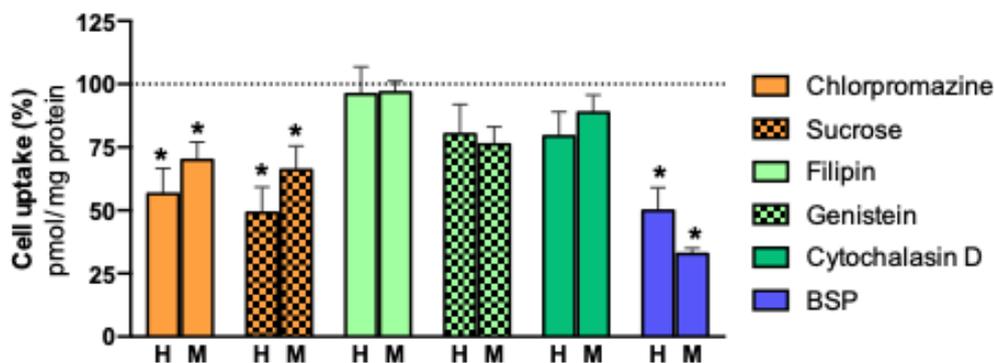


Figura 6.9. Efectos de los inhibidores de las vías de internalización en la entrada de la nanopartícula DOX-BF4. Células HeLa (H) y MG-63 (M) se han preincubado con clorpromazina (50 μ M), sacarosa (0,45 M), filipina (5 μ g/ml), genisteina (400 μ M), citocalasina D (2 μ M) o bromosulfoftaleina (BSP) (250 μ M) durante 30 min antes de la incubación durante 2 horas con DOX-BF4 (1 μ M). Se ha determinado la entrada de la doxorubicina en el lisado celular y los resultados se han expresado como valores de entrada relativa normalizada al 100% del valor en la ausencia de los inhibidores para cada línea celular y se ha representado la media \pm SEM (n = 6). * p <0.05 vs células tratadas con DOX-BF4.

Nuestros resultados indican que la internalización celular de DOX-BF4 en ambos tipos celulares, HeLa y MG-63, esta mediada parcialmente por la vía dependiente de clatras, ya que se ha observado una disminución significativa tras la preincubación con clorpromazina y sacarosa. Por el contrario, la entrada no cambia por la preincubación con genisteina y filipina, que inhiben la vía dependiente de caveolas. Además, hemos

RESULTADOS

ensayado los efectos de citocalasina D, un inhibidor de la macropinocitosis y la fagocitosis y se ha observado que no ha tenido efecto en la internalización de la nanopartícula, confirmando que la ruta de entrada preferida es la de clatrina en ambas líneas celulares.

Más interesante, dado que los derivados de bifosfonatos presentan grupos aniónicos, hemos estudiado el papel de los péptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs) en la internalización de los PEI-BP. (134) Los OATPs son transportadores de membrana que se expresan en los tejidos tumorales y en numerosos órganos (hígado, riñones, corazón, tracto gastrointestinal, etc.) y están implicados en el transporte de las moléculas de naturaleza aniónica como son las moléculas naturales (sales biliares, bilirrubina, hormonas tiroideas, etc.) y algunos fármacos, sondas orgánicas (NIR), toxinas y otros xenobióticos. (134)

La bromosulfoftaleína (BSP) es su inhibidor competitivo, (15,16,158) por lo que se ha ensayado su efecto en la internalización en ambos tipos celulares y se ha observado que la entrada de DOX-βCD ha disminuido significativamente (70%) en los osteosarcomas y solo un 50% en las células de cáncer cervical. Esto sugiere que la entrada de las nanopartículas en el osteosarcoma es mediada preferentemente por endocitosis dependiente de clatrina y por los OATPs. Si consideramos que OATPs se encuentran sobre-expresados en células tumorales, esta vía de internalización es responsable del transporte dirigido de estos **compuestos frente a líneas tumorales**.

6.2.4. Citotoxicidad de la doxorubicina ocluida en los derivados PEI-BP

Una vez comprobadas la especificidad y la selectividad de la entrada de la doxorubicina ocluida en los derivados DOX-βB3, DOX-βB4, DOX-βBF3 y DOX-βBF4 en las células de osteosarcoma y de cáncer de mama, se han determinado sus efectos sobre la viabilidad celular. Para ello, las células HeLa, MG-63, MC3T3-E1 y MDA-MB-231 han sido incubadas durante 48 h con DOX 1 μM o concentraciones equivalentes de DOX ocluida en βCD (DOX-βCD) y en los derivados PEI-BP y se ha determinado su efecto sobre la viabilidad celular mediante el ensayo MTT (Figura 6.10.). Los resultados de citotoxicidad se han expresado en porcentaje (0% para las células no tratadas), sustrayendo al 100% el valor de viabilidad obtenido con cada uno de los tratamientos.

Se observa que los resultados de citotoxicidad están de acuerdo con los datos obtenidos en los ensayos de internalización celular. DOX o DOX-βCD presentan una elevada citotoxicidad en todas las líneas celulares, lo que se debe a la falta de selectividad y la toxicidad del fármaco. Por el contrario, DOX ocluida en los derivados de bifosfonatos produce una citotoxicidad menor comparada con DOX libre o DOX-βCD en las células HeLa y MC3T3-E1, mientras que en las células tumorales relacionadas con el hueso (MG-63 y MDA-MB-231), la oclusión de DOX en los derivados PEI-BP aumenta su citotoxicidad. Estos resultados son significativos en el caso de los compuestos DOX-βB3 y DOX-βBF4 en los osteosarcomas y los compuestos DOX-βB3 y DOX-βB4 en las células MDA-MB-231. Finalmente, los derivados DOX-βMF no presentan un efecto significativo en el aumento de la citotoxicidad ya que no incrementaban en el transporte dirigido hacia las células diana.

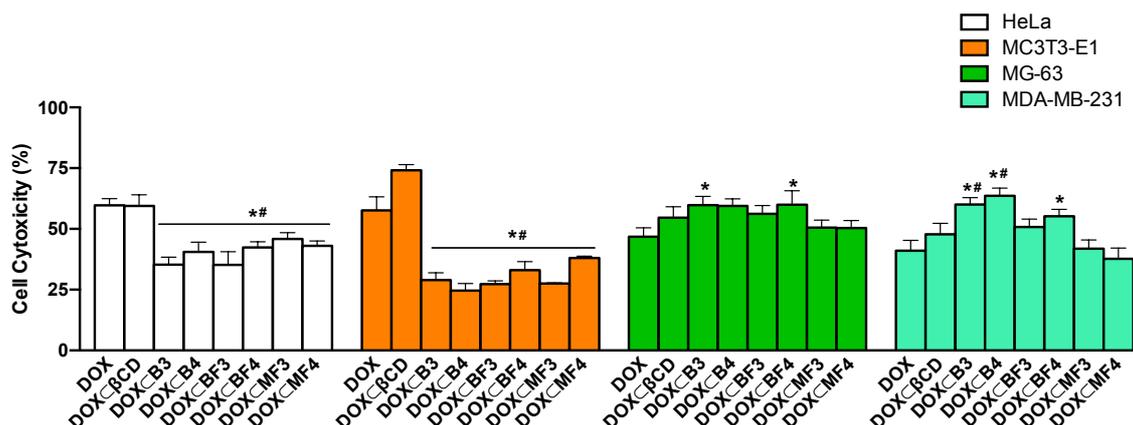


Figura 6.10. Citotoxicidad de la doxorubicina libre y ocluida en β CD y en los derivados PEI-BP. Células HeLa, MC3T3-E1, MG-63 y MDA-MB-231 han sido incubadas durante 48 horas en presencia de doxorubicina $1 \mu\text{M}$ o su concentración equivalente ocluida en β CD o en los derivados B, BF o MF. La citotoxicidad celular (expresada como en el porcentaje (0% para las células no tratadas), sustrayendo al 100% el valor de viabilidad celular de las células tratadas) se ha determinado mediante el ensayo MTT. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=10$). * $p<0.05$ vs células tratadas con DOX; # $p<0.05$ vs células tratadas con DOX β CD.

6.2.5. Distribución sub-celular de los derivados PEI-BP

Con el objetivo de conocer la localización sub-celular de los derivados de bifosfonatos, se ha aprovechado la fluorescencia intrínseca de DOX ocluida en ellos. Así se ha realizado un análisis por microscopía confocal de células MG-63 que han sido incubadas durante 1 hora con el compuesto DOX β B3, que previamente había presentado la mayor entrada en este tipo celular. Como controles se han utilizado la DOX libre y DOX β CD (Figura 6.11.).

Las células incubadas con DOX libre y DOX β CD han presentado una fluorescencia localizada mayoritariamente en el núcleo de acuerdo con lo descrito en la bibliografía. (159) Por el contrario, cuando se ha estudiado la localización sub-celular de DOX β B3 se ha observado una distribución perinuclear en forma de punteado y en menor cantidad en el núcleo celular. (Figura 6.11.A).

Para determinar la localización sub-celular de la nanopartícula DOX β B3 de forma más precisa, las células MG-63 se han pre-incubado durante 30 min con un marcador de mitocondrias Mitotracker[®] Green FM o con la toxina colérica unida a Alexa 488 como marcador de endosomas dependientes de caveolas (Figura 6.11.B.). Posteriormente, las células se han incubado durante 1 hora con DOX β B3 ($1 \mu\text{M}$).

En las imágenes de microscopía confocal se observa un elevado nivel de co-localización entre DOX β BF3 y Mitotracker[®] Green FM en las mitocondrias mientras que la fluorescencia de DOX β BF3 no coincide con la distribución de la toxina colérica-Alexa488. Un efecto similar se ha detectado para los compuestos DOX β B4 y DOX β BF4 en las células MG-63 y HeLa. Adicionalmente, las imágenes de microscopía confocal confirman que la entrada de DOX β B4 y DOX β BF4 es menor en las células HeLa (Figura 6.12.). Por último, no se observan diferencias en la entrada del DOX β MF4 en ambos tipos celulares puesto que es el control negativo del transporte dirigido.

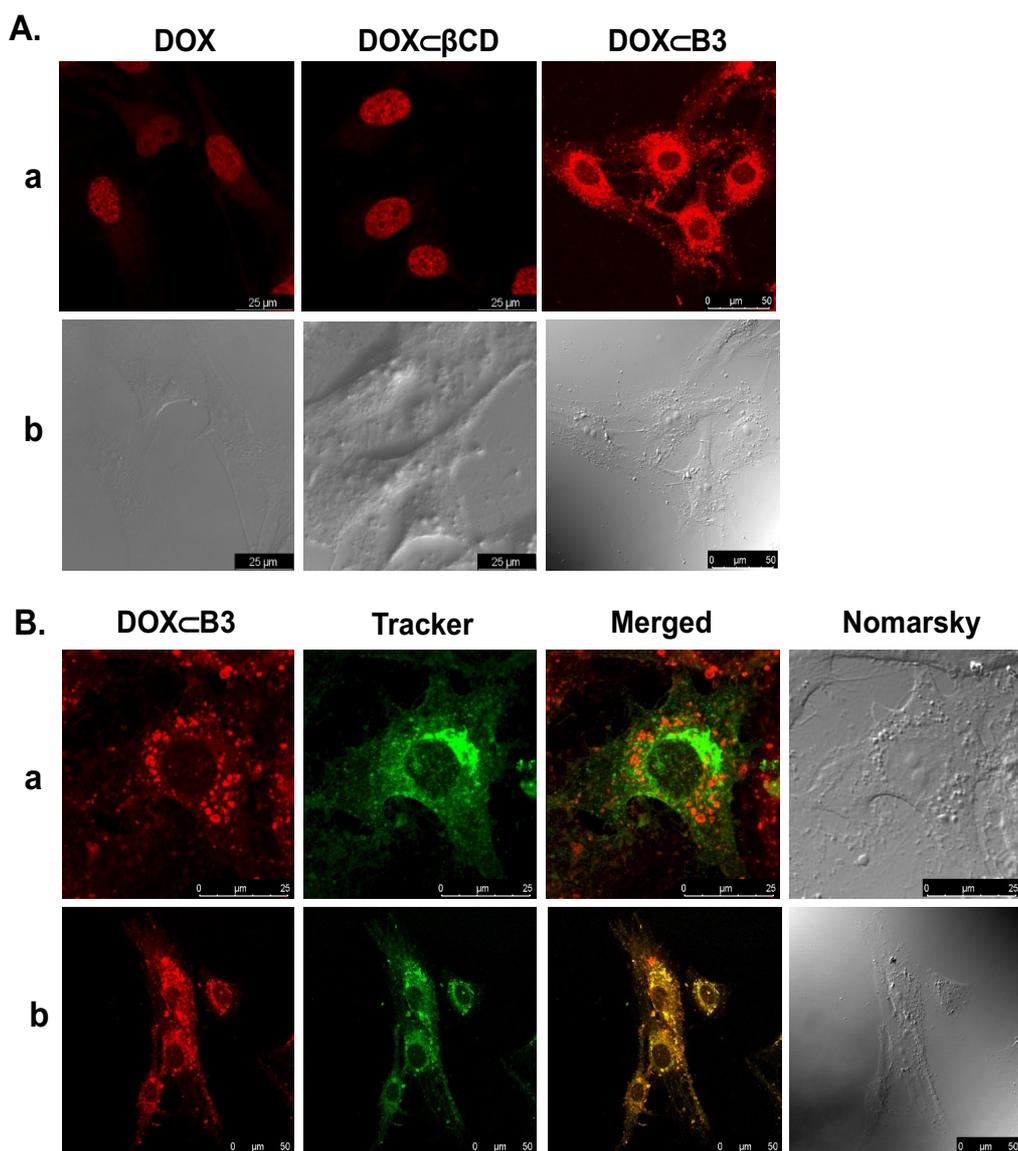


Figura 6.11. Distribución sub-celular del compuesto DOX-βCD. (A) Células MG-63 se han incubado durante 1 hora con DOX libre y las cantidades equivalentes de DOX oculta en el βCD y el derivado B3 (1 μM) y se han observado por microscopía confocal. Se presentan imágenes de (a) fluorescencia y (b) Nomarsky. (B) Células MG-63 han sido preincubadas durante 30 min con (a) la toxina colérica marcada con Alexa 488 como marcador de endosomas o (b) Mitotracker® Green FM como marcador de mitocondrias. Posteriormente, las células han sido incubadas durante 1 h con DOX-βCD y se han obtenido imágenes de fluorescencia y Nomarsky.

La distribución sub-celular de las nanopartículas puede ser relevante desde el punto de vista terapéutico y por ello, para confirmar la localización sub-celular de DOX-βCD, células MG-63 se han incubado durante 24 horas con DOX o DOX-βCD (1 μM) y se ha realizado un fraccionamiento celular. Posteriormente, se ha determinado la concentración de DOX en las distintas fracciones celulares (lisado celular, citosol, mitocondrias y núcleo) mediante fluorimetría (Figura 6.13.A.).

Tras la incubación durante 24 h, DOX libre se localiza mayoritariamente en el núcleo celular coincidiendo con los resultados obtenidos en la microscopia confocal. Al

contrario, la incubación con DOX-BF3 ha producido un incremento de su concentración principalmente en las mitocondrias y en el núcleo. Por tanto, podemos suponer que la nanopartícula DOX-BF3 se internaliza preferentemente en las células MG-63 con una localización mitocondrial. Además, probablemente, debido a una disociación parcial de las nanopartículas en la fracción citosólica, la doxorubicina liberada se dirigirá al núcleo celular como se muestra en las imágenes de microscopía confocal.

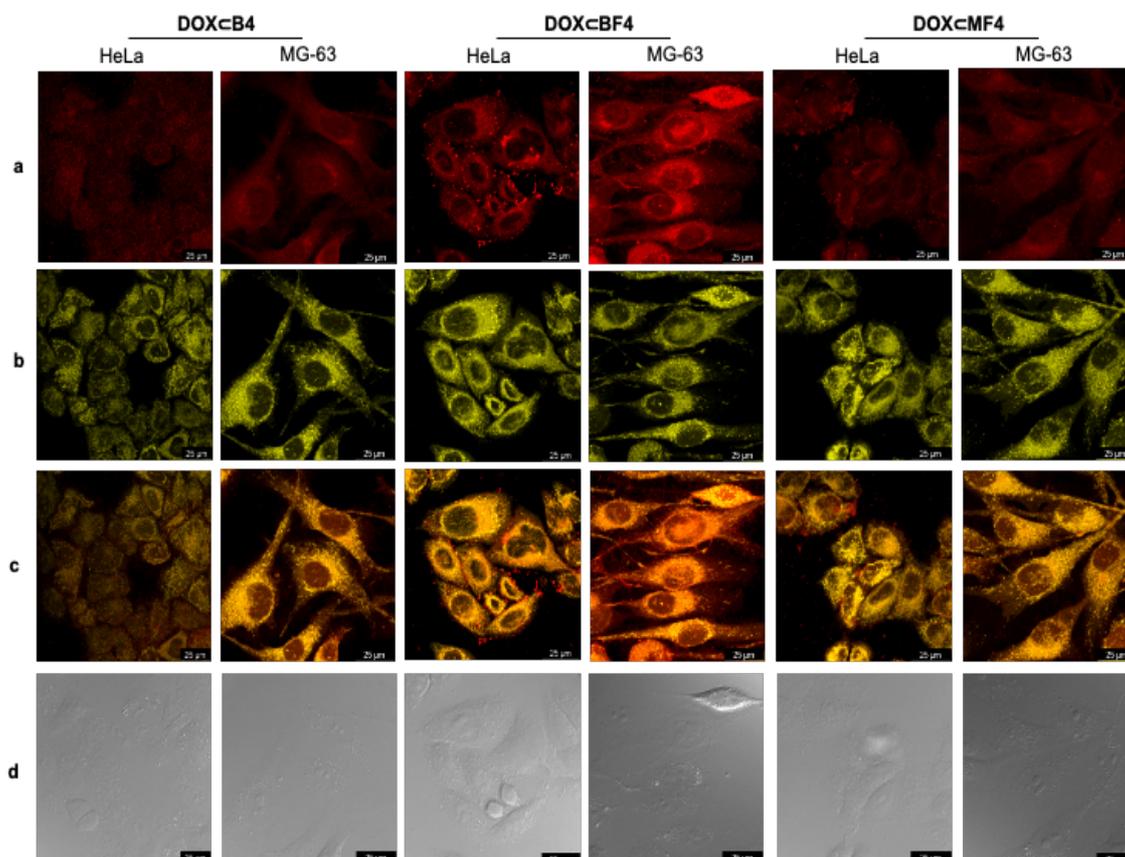


Figura 6.12. Distribución sub-celular de los compuestos DOX-B4, DOX-BF4 y DOX-MF4. Células HeLa y MG-63 se han incubado durante 1 hora con la doxorubicina ocluida en los derivados de bifosfonatos B4, BF4 y MF4 (1 μ M) y se han observado por microscopía confocal. Se presentan imágenes de (a) fluorescencia de DOX, (b) Mitotracker® Green FM como marcador de mitocondrias, (c) combinada y (d) Nomarsky.

Recientemente, se ha propuesto el transporte dirigido hacia las mitocondrias de las células del osteosarcoma como una estrategia terapéutica efectiva para evitar la resistencia a fármacos en células tumorales. Riganti *et al.* (2013) diseñaron una doxorubicina modificada mediante su unión a óxido nítrico denominada NitDOX como forma de dirigirla a la mitocondria. (19) La toxicidad de la NitDOX se basa en su efecto sobre la respiración mitocondrial, una disminución del flujo a través del ciclo de Krebs y un bloqueo de la actividad del complejo I de la cadena de transporte electrónico y consecuentemente una disminución de la síntesis del ATP. Además, NitDOX estimula la liberación del citocromo C hacia el citosol lo que induce la apoptosis. Sin embargo, los derivados de DOX dirigidos a la mitocondria al carecer de especificidad celular pueden

RESULTADOS

tener efectos citotóxicos en el corazón, un órgano basado en el metabolismo aeróbico mitocondrial. (32)

Por tanto, hemos ensayado dos parámetros asociados con los efectos de DOX ocluida en los derivados PEI-BP en la mitocondria. Así hemos comparado el efecto de la DOX 1 μM y cantidades equivalente de DOX como DOX \subset BF3 en la síntesis del ATP mitocondrial y la liberación de citocromo C hacia el citosol (Figura 6.13.B y C).

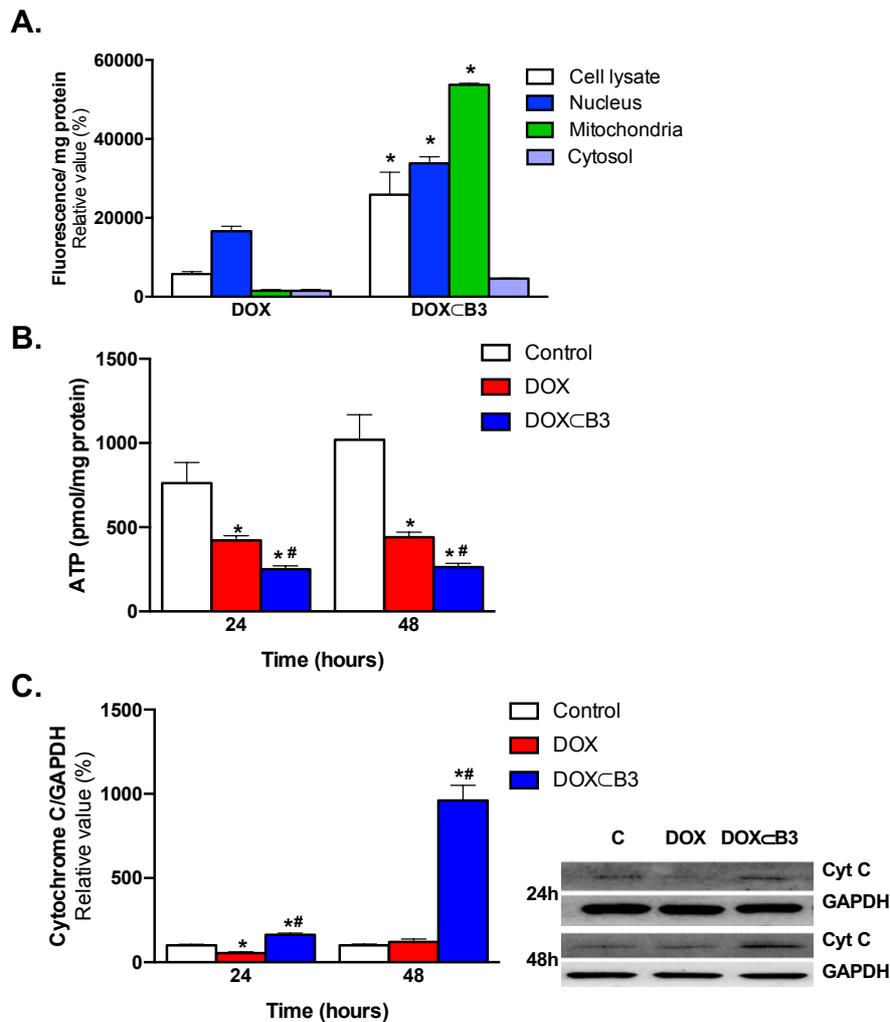


Figura 6.13. Efectos de los derivados PEI-BP en la función mitocondrial. Células MG-63 se han incubado durante 24 horas en presencia o ausencia de la doxorubicina 1 μM o su concentración equivalente ocluida en el compuesto DOX \subset B3. (A) Se ha realizado el fraccionamiento sub-celular de las células de osteosarcoma y se ha medido la fluorescencia de la doxorubicina en cada fracción. Los resultados se presentan como media \pm SEM (n=4). *p<0.05 vs células tratadas con doxorubicina. (B) Células MG-63 han sido tratadas en las mismas condiciones durante 24 y 48 horas y se ha determinado los niveles de ATP en la fracción mitocondrial. (C) Se ha medido la liberación del citocromo C al citosol mediante Western blot de la fracción citosólica. Los resultados se presentan como media \pm SEM (n=4). *p<0.05 vs células no tratadas; # p<0.05 vs células tratadas con DOX.

Se ha observado que la DOX ha producido una disminución en los niveles del ATP en las células tratadas, pero esta disminución es significativamente más alta tras el tratamiento con DOX \subset BF3, confirmando que los derivados PEI-BP ejercen su acción en

la mitocondria. Además, se ha ensayado la liberación del citocromo C al citosol, y en las células tratadas con DOX- β CD se ha observado una mayor liberación del citocromo C, mientras que, en las células tratadas con DOX libre, la liberación del citocromo C fue menor y similar a las de células no tratadas. Estos resultados sugieren que existe un transporte dirigido de los derivados PEI-BP hacia las mitocondrias y que podría tratarse de un mecanismo de citotoxicidad alternativo basado en la apoptosis.

Los compuestos PEI-BP presentan una serie de ventajas comparando con NitDOX. Primero, el agente antitumoral no se ha tenido que modificar químicamente para dirigirse hacia la mitocondria, lo que podría disminuir la eficacia del fármaco. Segundo, los derivados PEI-BP pueden transportar cualquier agente quimioterapéutico que sea capaz de ocluirse en la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas, por lo que es un sistema versátil. Finalmente, nuestros ensayos han demostrado la especificidad de las nanopartículas PEI-BP basada en su mayor internalización y citotoxicidad en las células de osteosarcoma (MG-63) o en las células capaces de generar metástasis en el hueso (MDA-MB-231), aportándole selectividad a los fármacos antitumorales ocluidos en estos derivados.

6.2.6. Transporte dirigido de los derivados de bifosfonatos *in vivo*

Como se ha indicado en la introducción de esta tesis, el paso de un sistema de ensayo de los compuestos en cultivos celulares a determinaciones en modelos animales es relevante para determinar el posible desarrollo de fármacos a partir de estos compuestos modelo. Por ello, se ha ensayado la capacidad de los derivados PEI-BP para dirigirse hacia los tumores en modelos animales. Para ello, y puesto que los espectros de excitación y emisión de DOX no son adecuados para la visualización del compuesto en modelos animales, se ha utilizado indocianina green (ICG) ocluida en ICG- β CD o en ICG-B3 y se ha inyectado en la vena de la cola de ratones NGS portadores de xenografts de células de osteosarcoma (MG-63) y se ha observado la fluorescencia de la ICG 30 min tras su administración (Figura 6.14.). ICG se ocluye eficientemente en β CD y sus propiedades espectrales permiten su detección por su emisión infrarroja en los animales de experimentación. (160)

Se ha detectado una mayor señal en el área tumoral (línea discontinua) en los animales tratados con ICG-B3 en comparación con aquellos inyectados con ICG- β CD. Además, la captación hepática de los compuestos es inferior en el caso de los animales tratados con ICG-B3. Para confirmar estos resultados, se han sacrificado los ratones y se ha determinado la fluorescencia en los tumores aislados (Figura 6.14.B), observándose un patrón de fluorescencia similar al obtenido en las imágenes de los animales. Estos resultados indican que el derivado B3 es capaz de dirigir *in vivo* específicamente su carga hacia los osteosarcoma y permitiría su uso terapéutico.

Además, debido a la capacidad del cáncer de mama triple negativo de producir metástasis en el hueso, se ha realizado un experimento similar en los modelos animales con xenografts de células MDA-MB-231 (Figura 6.15.).

Los resultados concuerdan con los que se han obtenido en los modelos animales con xenografts de osteosarcomas, observándose la fluorescencia específicamente en los xenografts de los animales inyectados con ICG-BF4. Así, los resultados *in vivo* confirman

RESULTADOS

la capacidad de los derivados de bifosfonatos B y BF para el transporte dirigido específico hacia el tumor o las metástasis óseas y para el transporte selectivo de los fármacos antitumorales. Además, podrían ser empleados en las técnicas de diagnóstico por imagen y monitorización *in vivo* en los pacientes con osteosarcoma y cáncer de mama triple negativo.

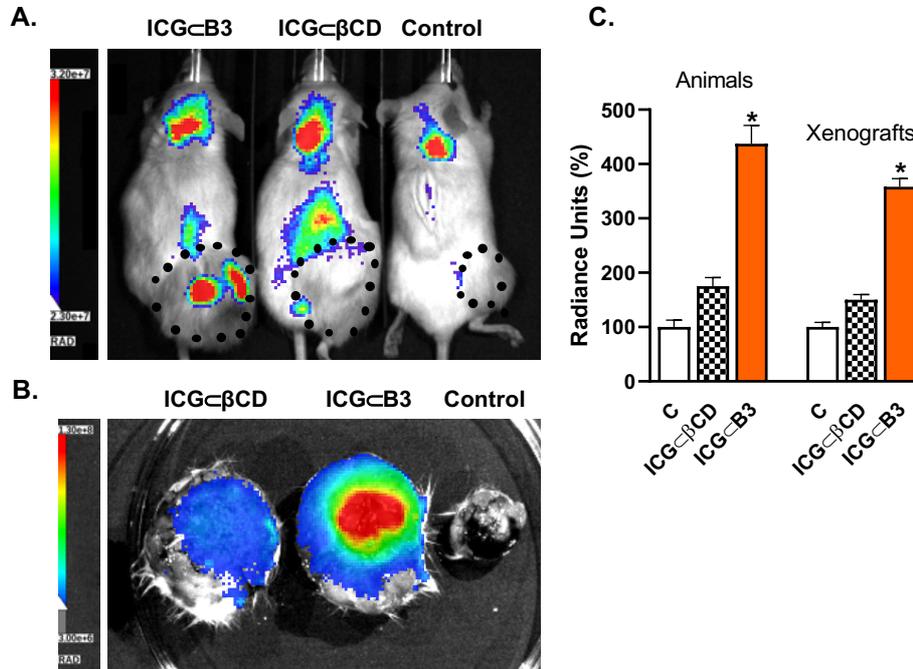


Figura 6.14. Visualización *in vivo* de los ratones con xenografts de las células MG-63. Indocianina green ocluida en β CD o en B3 (ICG- β CD o ICG- β B3) se ha inyectado por vía intravenosa en la cola de ratones NGS con xenografts de células de osteosarcoma (MG-63) y se ha medido fluorescencia a los 30 min mediante IVIS. Se presentan (A) las imágenes de fluorescencia de ICG *in vivo* (el tamaño del tumor está indicado mediante la línea discontinua), (B) las imágenes de fluorescencia de los tumores aislados, (C) el promedio de la fluorescencia *in vivo* y de los tumores aislados. Los datos se representan como media \pm SEM (n=4); *p < 0.05 vs animales control.

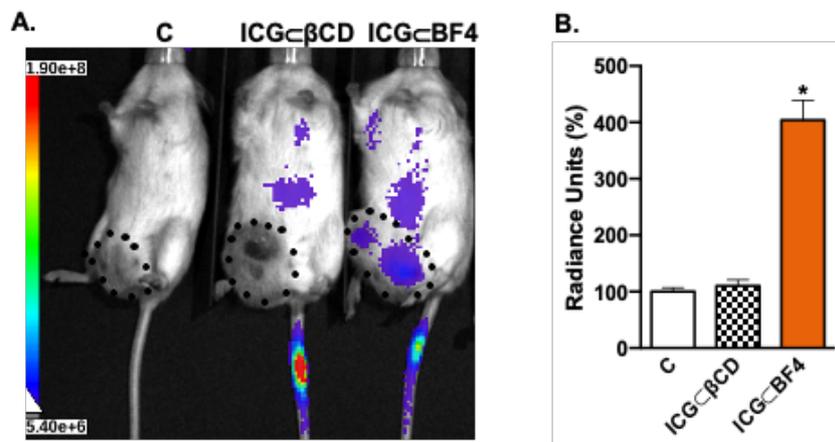


Figura 6.15. Visualización *in vivo* de los ratones con xenografts de las células MDA-MB-231. Indocianina green ocluida en β CD o en BF4 (ICG- β CD o ICG- β BF4) se ha inyectado por vía intravenosa en la cola de ratones NGS con xenografts de células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) y se ha medido fluorescencia a los 30 min mediante IVIS. Se presentan (A) las imágenes de fluorescencia de ICG *in vivo* (el tamaño del tumor está indicado mediante la línea discontinua) y (B) la cuantificación de la fluorescencia de ICG en los tumores. Los datos se representan como media \pm SEM (n=4); *p < 0.05 vs animales control.

6.3. Ácido hialurónico como molécula directora hacia el cáncer de mama triple negativo

6.3.1. Diseño y síntesis de las nanopartículas HA-PEI-NIR-780

El ácido hialurónico (HA) es un polímero natural presente en la matriz extracelular del tejido epitelial, conectivo y neural, que en condiciones fisiológicas está implicado en la regeneración y la reparación tisular y en el desarrollo embrionario. Su sobre-expresión en el estroma tumoral, modula la proliferación celular y la invasividad tumoral y actúa como un regulador durante la angiogénesis. (41,42)

Asimismo, el HA es el ligando natural de los receptores CD44, una familia de glicoproteínas transmembrana que presentan varias isoformas (s y v1-10), dentro de las cuales la isoforma CD44v6 se sobre-expresa en varios tipos de tumores (cáncer de mama triple negativo, cáncer cervical, cáncer colorrectal, etc.). Por tanto, el HA podría actuar como molécula directora para el transporte dirigido y específico de nanopartículas hacia células tumorales que sobre-expresen los receptores CD44. Además, el recubrimiento de nanopartículas con HA puede prolongar su vida media en el torrente sanguíneo, disminuyendo la adsorción de las proteínas plasmáticas sobre la superficie de las nanopartículas, evitando así su degradación precoz por fagocitosis. (41,42,87,88)

El HA es una molécula aniónica, que contiene en su estructura grupos carboxílicos, hidroxilos y N-acetilos, lo que favorece su unión a polímeros catiónicos como es la polietilenimina mediante interacciones electrostáticas. (41,42,87,88) Esto ofrece una posibilidad de generar nanopartículas mediante interacciones electrostáticas combinando ambos tipos de moléculas.

En esta tesis, hemos desarrollado nanopartículas (Figura 6.16.) basadas en PEI cuya superficie se ha decorado con el ácido hialurónico como molécula directora hacia los receptores CD44 sobre-expresados en el cáncer de mama triple negativo, que es el tipo de cáncer de mama con peor prognosis una vez que alcanza el estadio IV. (20) Mediante el uso de PEI-NIR (sintetizado por el grupo de investigación del profesor Santoyo), tal y como se ha descrito al principio de la sección de resultados de esta memoria, es posible sintetizar nanopartículas que además de estar decoradas con HA, sean fáciles de visualizar gracias a la sonda NIR-780, que fluoresce en el infrarrojo cercano, para permitir un diagnóstico específico de este tipo de cáncer. Gracias a la capacidad de PEI para actuar como un vector de transfección para la terapia génica y la presencia de la sonda NIR-780 para el diagnóstico específico, estas nanopartículas HA-PEI-NIR-780 pueden ser consideradas agentes teragnósticos, que permiten el tratamiento y el diagnóstico al mismo tiempo.

Para la síntesis de las nanopartículas PEI-NIR-780 se ha utilizado la polietilenimina ramificada de bajo peso molecular (bPEI 2 kDa) por su baja citotoxicidad y debido a que permite, en comparación con PEI lineal, un mayor número de interacciones electrostáticas tanto con el ácido hialurónico como con el DNA. La sonda NIR-780 se ha unido covalentemente a través de una vinilsulfona en una proporción 1:1.

Posteriormente, se ha incubado durante 20 min la solución acuosa de PEI-NIR-780 con el DNA de interés (plásmido pEGFP-N2 que codifica para la proteína verde fluorescente) en ratio N/P=28, para formar complejos PEI-NIR-DNA mediante

RESULTADOS

interacciones electrostáticas entre las aminas de la polietilenimina y los fosfatos del DNA. Para decorar la superficie de la nanopartícula con el ácido hialurónico, se ha incubado durante 20 min la solución de PEI-NIR-780-DNA con la solución acuosa del HA de distintos pesos moleculares (8-15 kDa, 10-50 kDa o 40-50 kDa), en relación de porcentaje de carga/masa entre HA/PEI a ensayar. De esta forma se ha generado el complejo HA-PEI-NIR-780-DNA mediante interacciones electrostáticas entre los grupos aniónicos de HA y las aminas de PEI, cuya bioespecificidad y citotoxicidad se ha ensayado en las células de cáncer de mama triple negativo (CD44+).

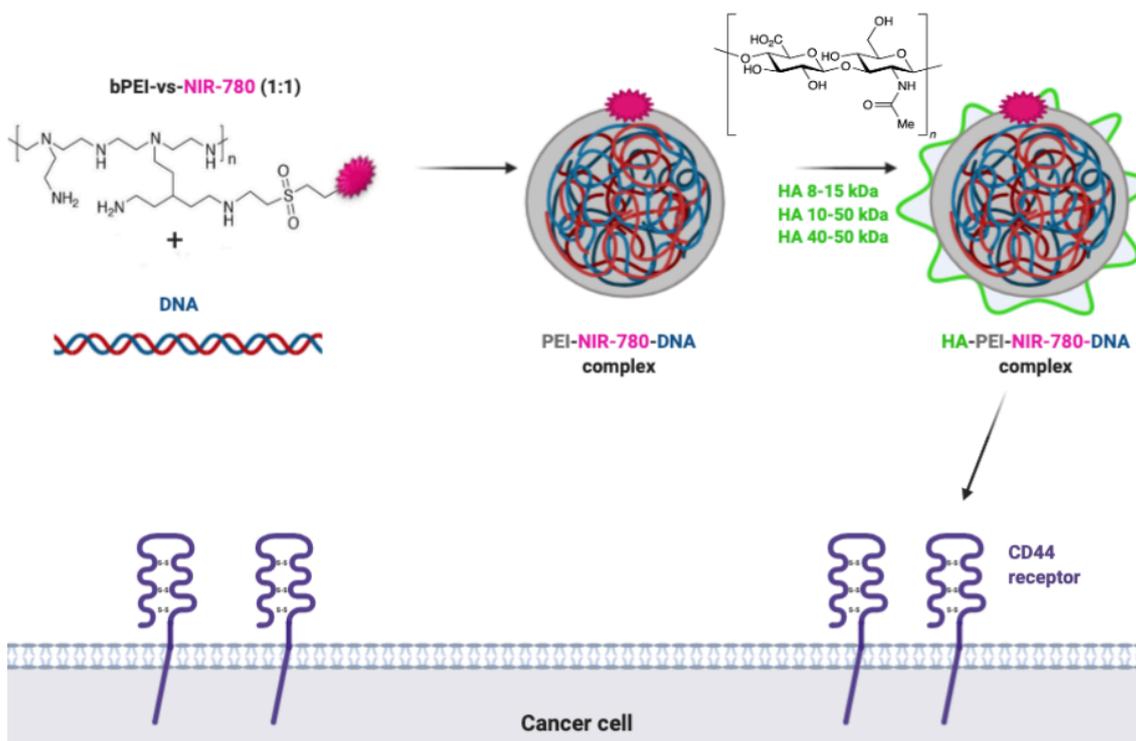


Figura 6.16. Desarrollo de las nanopartículas de polietilenimina con ácido hialurónico. Los grupos amino de la polietilenimina ramificada (bPEI) de 2 kDa unida a la sonda NIR-780 interactúan electrostáticamente con los grupos fosfato del DNA de interés dando lugar al complejo PEI-NIR-780-DNA. Su posterior incubación con el ácido hialurónico, que presenta cargas negativas, decora la superficie del complejo con esta molécula directora hacia los receptores CD44 sobre-expresados en las células de cáncer de mama triple negativo y de cáncer cervical.

6.3.2. Optimización de las condiciones de uso de las partículas HA-PEI-NIR-780 como reactivos de transfección

Como se ha mencionado previamente, la capacidad de PEI para el transporte del material genético y su citotoxicidad dependen de su peso molecular. Por ello, se debe considerar un balance entre la eficiencia de transfección y la citotoxicidad. Así, la PEI de alto peso molecular (25 kDa) presenta una elevada eficiencia de transfección, pero una gran citotoxicidad, mientras que la de bajo peso molecular (800-2000 Da) tiene una baja toxicidad, pero también una baja eficiencia de transfección. (9,26)

Para comprobar el efecto del tamaño de PEI en la eficiencia de transfección de estas nanopartículas, se han realizado ensayos de transfección en las células de cáncer de mama triple negativo, que sobre-expresan los receptores CD44 (MDA-MB-231), utilizando como vectores de transfección PEI 2 kDa, PEI-NIR-780 y PEI 25 kDa. Se ha utilizado un ratio N/P=28, ya que es el que mejor eficiencia de transfección y menor citotoxicidad presentó para los tres compuestos en los ensayos preliminares. Su superficie se ha decorado con 0; 2,5; 5; 7,5; 10 y 12,5% (carga/masa de HA/PEI) del ácido hialurónico de 40-50 kDa (Figura 6.17.). En todos los ensayos de transfección se ha utilizado el plásmido pEGFP-N2 que codifica para la proteína verde fluorescente y como control positivo de transfección se ha empleado el reactivo comercial Lipofectamina 2000.

Se ha observado que el compuesto PEI-NIR-780 presenta mayores niveles de transfección que PEI 2 kDa y PEI 25 kDa, debido a que como se ha demostrado previamente, la presencia de NIR-780 aumenta la eficiencia de transfección, aportando hidrofobicidad a la nanopartícula y favoreciendo su paso a través de las membranas biológicas. (140) Además, el compuesto PEI-NIR-780 cuya superficie se ha decorado con el HA de 40-50 kDa presenta mayores niveles de transfección que el reactivo sin él, ya que la presencia del HA aumenta la entrada y la eficiencia de transfección en las células que sobre-expresan los receptores CD44, alcanzándose un aumento significativo de la transfección a una relación del 7,5% (carga/masa) del HA.

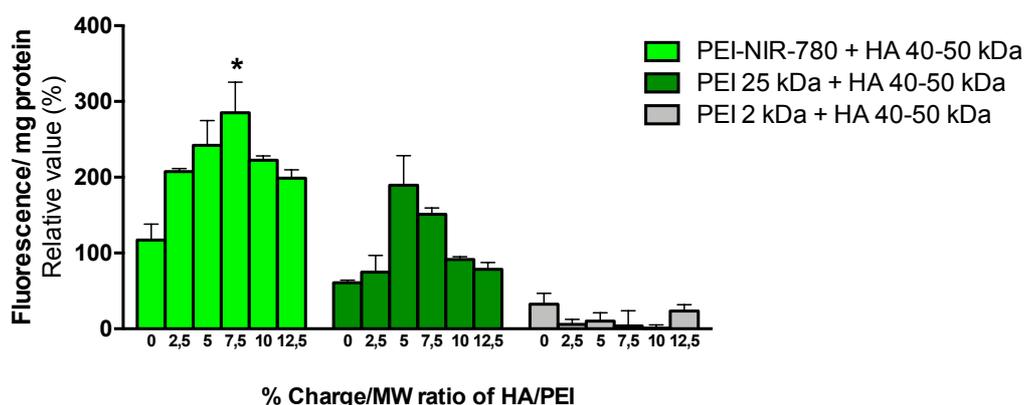


Figura 6.17. Efecto del tamaño de la polietilenimina y de la concentración del ácido hialurónico en la eficiencia de transfección. Células MDA-MB-231 han sido transfectadas con PEI 2 kDa, PEI-NIR-780 y PEI 25 kDa con el plásmido pEGFP-N2 que codifica para la proteína verde fluorescente en un ratio N/P=28. La superficie de las nanopartículas ha sido decorada con la sal sódica del ácido hialurónico de 40-50 kDa en proporciones carga/masa de HA/PEI de 0; 2,5; 5; 7,5; 10 y 12,5%. Se ha determinado la fluorescencia de la EGFP en el lisado celular. Los datos se representan como valor relativo en porcentaje de fluorescencia de la Lipofectamina 2000 al que se ha asignado el valor 100%, normalizada por la cantidad de proteínas en cada muestra. Los datos se representan como media \pm SEM, n=4. *p<0.05 vs PEI-NIR-780.

El HA es un polímero compuesto por unidades repetidas del ácido β -1,4-D-glucurónico- β -1,3-N-acetil-D-glucosamina y su peso molecular puede variar en un rango entre mil y millones de Daltons dependiendo de la longitud de la cadena polimérica. (41,42) Se ha demostrado que el tamaño del polímero influye en diversas funciones fisiológicas y en su capacidad de dirigir las nanopartículas hacia los receptores CD44. (161) El HA de bajo peso molecular favorece la inflamación y la angiogénesis, mientras

RESULTADOS

que el de alto peso molecular es anti-angiogénico y no inmunogénico. Además, al aumentar el peso del HA, aumenta su afinidad hacia el receptor. (162)

Para determinar el efecto del tamaño del polímero del HA en los niveles de transfección, se ha decorado la superficie de PEI-NIR-780-DNA con HA de distinto tamaño (8-15 kDa, 10-50 kDa y 40-50 kDa) en proporciones crecientes de masa/carga de HA/PEI (1,25; 2,5; 5; 7,5; 10 y 12,5%). Se han realizado ensayos de transfección en las células MDA-MB-231 que sobre-expresan los receptores CD44 específicos para el HA y en células controles HEK-293 (CD44-). Los datos se han referido a los niveles de transfección del compuesto PEI-NIR-780 sin el HA, al que se le ha asignado el valor 100%.

En las células de cáncer de mama triple negativo (Figura 6.18.A), se ha producido un aumento en los niveles de transfección con 2,5% del HA de 10-50 kDa y con 7,5% del HA de 40-50 kDa. En las células CD44- (Figura 6.18.B), no se han observado cambios en la eficiencia de transfección cuando las nanopartículas se han decorado con el HA.

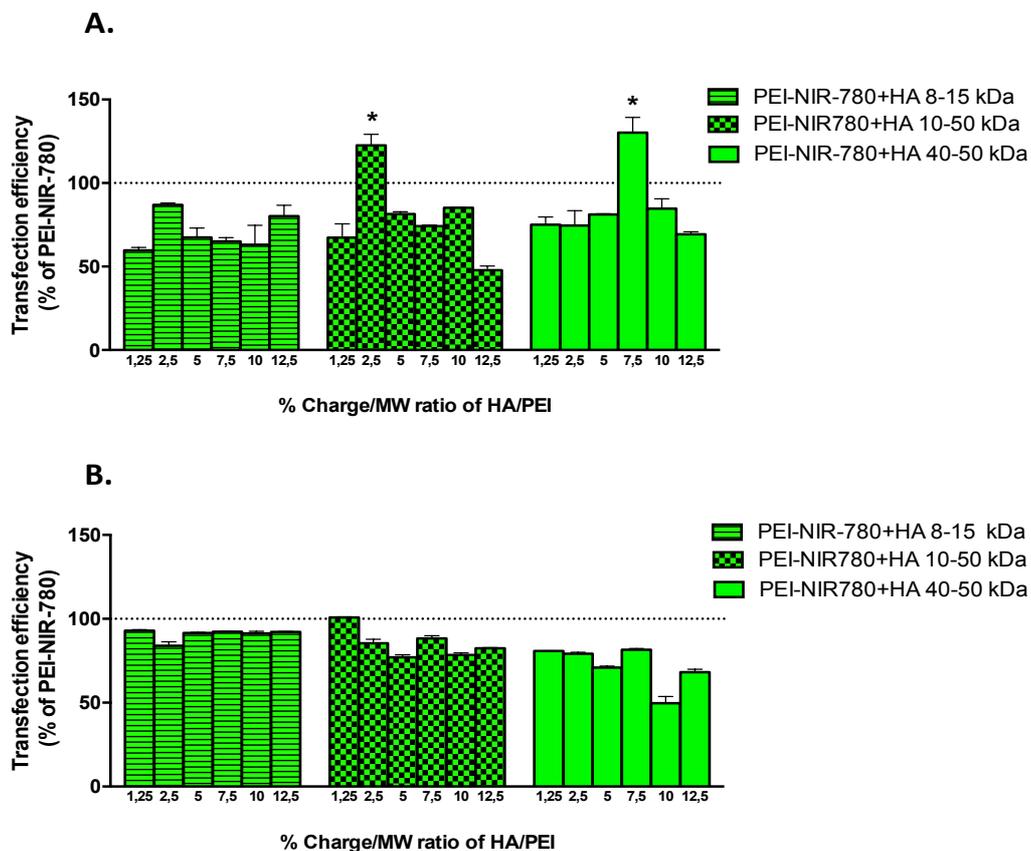


Figura 6.18. Influencia del tamaño del ácido hialurónico en los niveles de transfección. Células MDA-MB-231 (A) y HEK-293 (B) se han transfectado con el complejo PEI-NIR-780 y el plásmido pEGFP-N2 en un ratio N/P=28. La superficie de las nanopartículas ha sido decorada con la sal sódica del ácido hialurónico de 8-15 kDa, 10-50 kDa y 40-50 kDa en proporciones carga/masa de HA/PEI de 0; 1,25; 2,5; 5; 7,5; 10 y 12,5%. Se ha determinado la fluorescencia de la EGFP en el lisado celular. Los datos han sido normalizados en función de los niveles de transfección de Lipofectamina 2000 y representados como el porcentaje de la eficiencia de transfección de PEI-NIR-780 no decorado con el HA al que se le ha asignado el valor 100%. Los datos se representan como media±SEM, n=4. *p<0.05 vs PEI-NIR-780.

En estos ensayos hemos demostrado que las nanopartículas decoradas con el ácido hialurónico son capaces de llevar a cabo un transporte específico del material genético hacia las células de cáncer de mama triple negativo que sobre-expresan los receptores CD44 a diferencia de las células controles (CD44-). Mientras que las cargas positivas de PEI favorecen su entrada en las células al interactuar con las cargas negativas de la membrana plasmática, al decorar la superficie de PEI con el HA que tiene cargas negativas, se neutraliza la carga neta de la nanopartícula, e incluso, le aporta un carácter aniónico, por lo que se disminuye su entrada en el interior celular para aquellas células que no presenten los receptores CD44 en su superficie.

Además, hemos observado que el tamaño del HA condiciona la eficiencia de transfección en las células que sobre-expresan su receptor específico, siendo el HA de 40-50 kDa con el que se obtiene una mejor eficiencia de transfección. Asimismo, hemos comprobado que la concentración de HA tiene efecto en la entrada de la nanopartícula en el interior celular, alcanzándose los mejores niveles de transfección con 7,5% de carga/masa del HA de 40-50 kDa.

Por otro lado, para determinar el efecto de la carga del HA en la formación de las nanopartículas HA-PEI-NIR-780 y en su eficiencia de transfección, se ha comparado el efecto de la suplementación con la sal sódica del HA disponible comercialmente con el efecto que ejerce la suplementación con la forma ácida preparada en nuestro laboratorio. Para prepararla, se ha añadido HCl 1 M a la solución acuosa de la sal sódica de ácido hialurónico (3 mg/ml) hasta alcanzar un pH=3. Posteriormente, se ha dializado frente a agua destilada y se ha liofilizado.

Se han realizado ensayos de transfección en las células MDA-MB-231 (CD44+) con PEI-NIR-780 recubierto con HA de 40-50 kDa (0; 2,5; 5; 7,5 y 10%) en su forma de sal sódica y su forma ácida (Figura 6.19.).

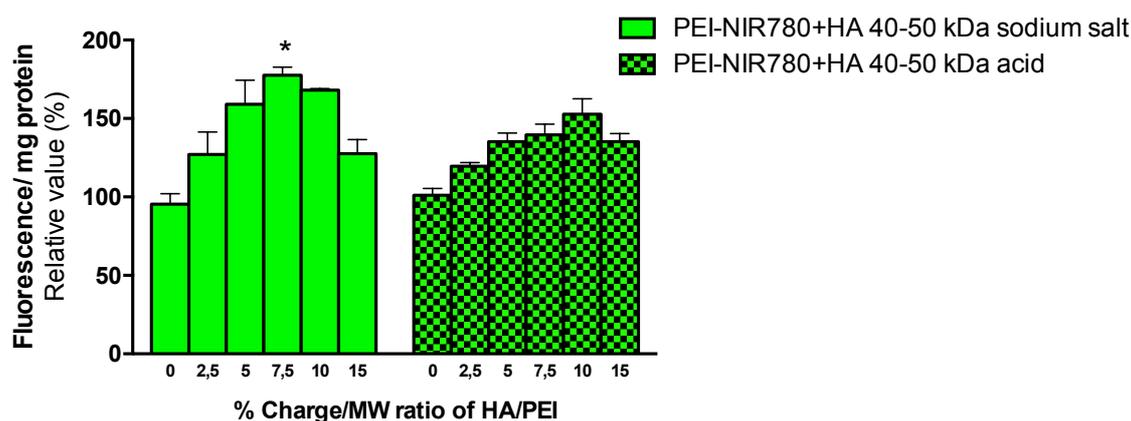


Figura 6.19. Efecto de las formas de sal sódica y ácida del ácido hialurónico en la eficiencia de transfección. Células MDA-MB-231 se han transfectado con el complejo PEI-NIR-780 y el plásmido pEGFP-N2 en un ratio N/P=28. La superficie de las nanopartículas ha sido decorada con el ácido hialurónico 40-50 kDa en su forma de sal sódica o ácida en ratio de carga/masa de HA/PEI de 0; 2,5; 5; 7,5; 10 y 15%. Se ha determinado la fluorescencia de la EGFP en el lisado celular. Los datos han sido normalizados en función de los niveles de transfección de Lipofectamina 2000 y la concentración de proteínas en cada muestra. Los datos se representan como media±SEM, n=4. *p<0.05 vs PEI-NIR-780.

RESULTADOS

Se ha observado que la sal sódica aumenta moderadamente la entrada de las nanopartículas en las células. La forma ácida presenta un menor grado de ionización, por lo que probablemente disminuye la eficiencia de formación de los complejos HA-PEI, que se basa en las interacciones electrostáticas entre las cargas negativas del HA y las cargas positivas de la polietilenimina. Además, se ha confirmado que la cantidad del ácido hialurónico con el que se decora la superficie del compuesto regula los niveles de transfección, alcanzándose los mayores niveles con 7,5% de HA de 40-50 kDa. Por lo tanto, en los siguientes experimentos se ha utilizado la forma de sal sódica del ácido hialurónico de 40-50 kDa.

Con el objetivo de confirmar la especificidad que confiere el HA hacia los receptores CD44, se ha medido el grado de internalización de las partículas PEI-NIR-780 en ausencia de DNA aprovechando la fluorescencia intrínseca del NIR-780. Para ello se han incubado las células MDA-MB-231 (CD44+) y las células control HEK-293 (CD44-) durante 2 h con cantidades crecientes (0, 25, 75, 150, 250 y 500 μM) de la nanopartícula PEI-NIR-780 decorada con 7,5% del ácido hialurónico de 40-50 kDa y se ha medido la internalización usando la fluorescencia de la sonda NIR-780 (690 nm/780 nm) (Figura 6.20.). A diferencia de las células control (HEK-293), se observa un aumento en la entrada de las nanopartículas PEI-NIR-780 a una concentración 500 μM (equivale a N/P=28) con 7,5% (carga/masa) de HA de 40-50 kDa en las células que sobre-expresan los receptores CD44 (MDA-MB-231), por lo que se ha confirmado la capacidad de estas nanopartículas de transporte dirigido y diagnóstico específico en las células que presentan receptores CD44 en su membrana plasmática.

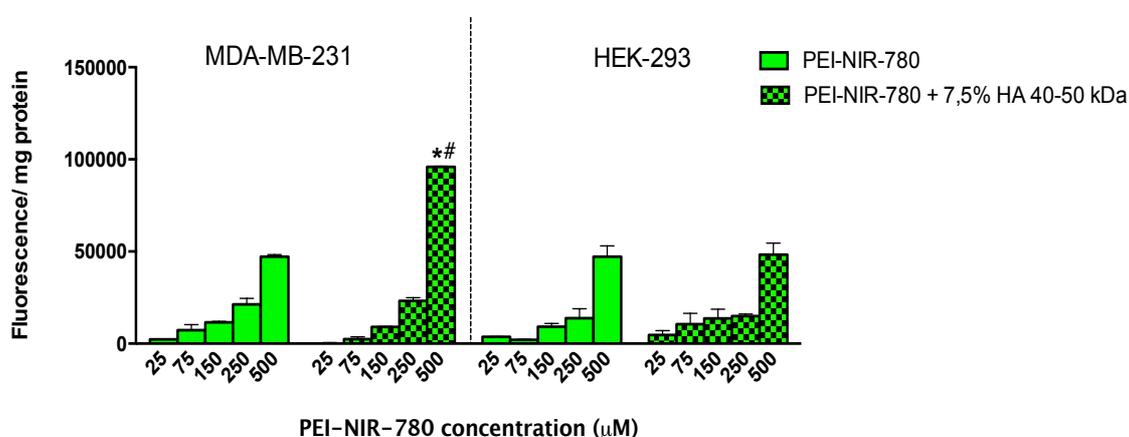


Figura 6.20. Entrada específica de las nanopartículas HA-PEI-NIR-780 en células con receptores CD44. Células MDA-MB-231 (CD44+) y HEK293 (CD44-) se han incubado durante 2 horas con cantidades crecientes (0, 25, 75, 150, 250 y 500 μM) de la nanopartícula PEI-NIR-780 cuya superficie se ha recubierto con 7,5% (carga/masa de HA/PEI) del ácido hialurónico de 40-50 kDa. Se ha medido la fluorescencia de la sonda NIR-780 (690/780 nm) en el lisado celular y se ha normalizado con la cantidad de proteínas en cada muestra. Los datos se representan como media \pm SEM, n=4. * $p < 0.05$ vs PEI-NIR-780 y # $p < 0.05$ vs HEK-293.

A continuación, se ha estudiado la localización sub-celular de las nanopartículas mediante microscopía confocal. Para ello, células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) y células de cáncer cervical (HeLa) que sobre-expresan los receptores CD44 han sido transfectadas con PEI-NIR-780 y PEI-NIR-780 recubierto con 7,5 % de HA de 40-50 kDa con el plásmido pEGFP-N2 en ratio N/P=28 (Figura 6.21.A y B).

La especificidad de la transfección que proporciona la incorporación de HA a las nanopartículas se ha comprobado de nuevo usando una línea celular adicional (Hela) que sobre-expresa el receptor CD44. Así, se han medido los niveles de transfección de estos compuestos mediante la fluorescencia de la EGFP, producto de la transfección, en el lisado celular de las células MDA-MB-231 y HeLa. Los datos han sido normalizados en función de los niveles de transfección de Lipofectamina 2000 a la que se le ha asignado el valor 100% y la concentración de proteínas en cada muestra. Se ha demostrado que, en ambas líneas celulares, que sobre-expresan los receptores CD44, aumentan los niveles de transfección, cuando las nanopartículas se recubren con 7,5% de HA de 40-50 kDa (Figura 6.21.C).

Mediante microscopía confocal, se identifican las células transfectadas por presentar fluorescencia verde en el núcleo asociada a la EGFP. En estas células adicionalmente se detecta la fluorescencia correspondiente al NIR-780, que indica que esas nanopartículas tienen en parte una localización compatible con una distribución mitocondrial. Esto es debido a la incorporación de la molécula del NIR-780 en la estructura de la PEI, tal y como ha sido demostrado previamente por nuestro grupo de investigación. (16)

Teniendo en cuenta las mejores condiciones para los ensayos de transfección e internalización *in vitro*, se ha realizado un ensayo de transfección *in vivo* con el plásmido pGL3-control que codifica para la luciferasa de luciérnaga. Como vector de transfección se ha utilizado PEI-NIR-780 (500 μ M, N/P=28) cuya superficie se ha decorado con 7,5% (masa/carga de HA/PEI) de HA de 10-50 kDa o HA de 40-50 kDa. Como control negativo se ha empleado el vector PEI-NIR-780 sin HA. Los complejos se han inyectado por vía intravenosa en la cola de ratones NSG en los que se había inducido el crecimiento de xenografts de células MDA-MB-231. A las 24 horas, se ha detectado la fluorescencia de la sonda NIR-780 incluida en las nanopartículas como agente de diagnóstico por imagen y la bioluminiscencia como reportero de la transfección tras inyectar D-luciferina como sustrato de la luciferasa por vía intraperitoneal (Figura 6.22.).

Al igual que en los experimentos en cultivos celulares, se ha observado una entrada específica y transfección de la nanopartícula decorada con el HA de 40-50 kDa en el interior tumoral (CD44+) y unos niveles menores con el HA de 10-50 kDa. La nanopartícula sin HA ha presentado una localización hepática y no se ha observado transfección intratumoral.

Por tanto, podemos concluir que nuestras nanopartículas recubiertas con el ácido hialurónico actúan como agentes diagnósticos *in vivo*, permitiendo un diagnóstico específico de células tumorales con receptores CD44, gracias a la sonda NIR-780 que llevan incorporada, y un transporte dirigido del agente terapéutico (DNA) como terapia génica. Esta especificidad se debe al ácido hialurónico que actúa como molécula directora hacia los receptores CD44 sobre-expresados en el cáncer de mama triple negativo.

RESULTADOS

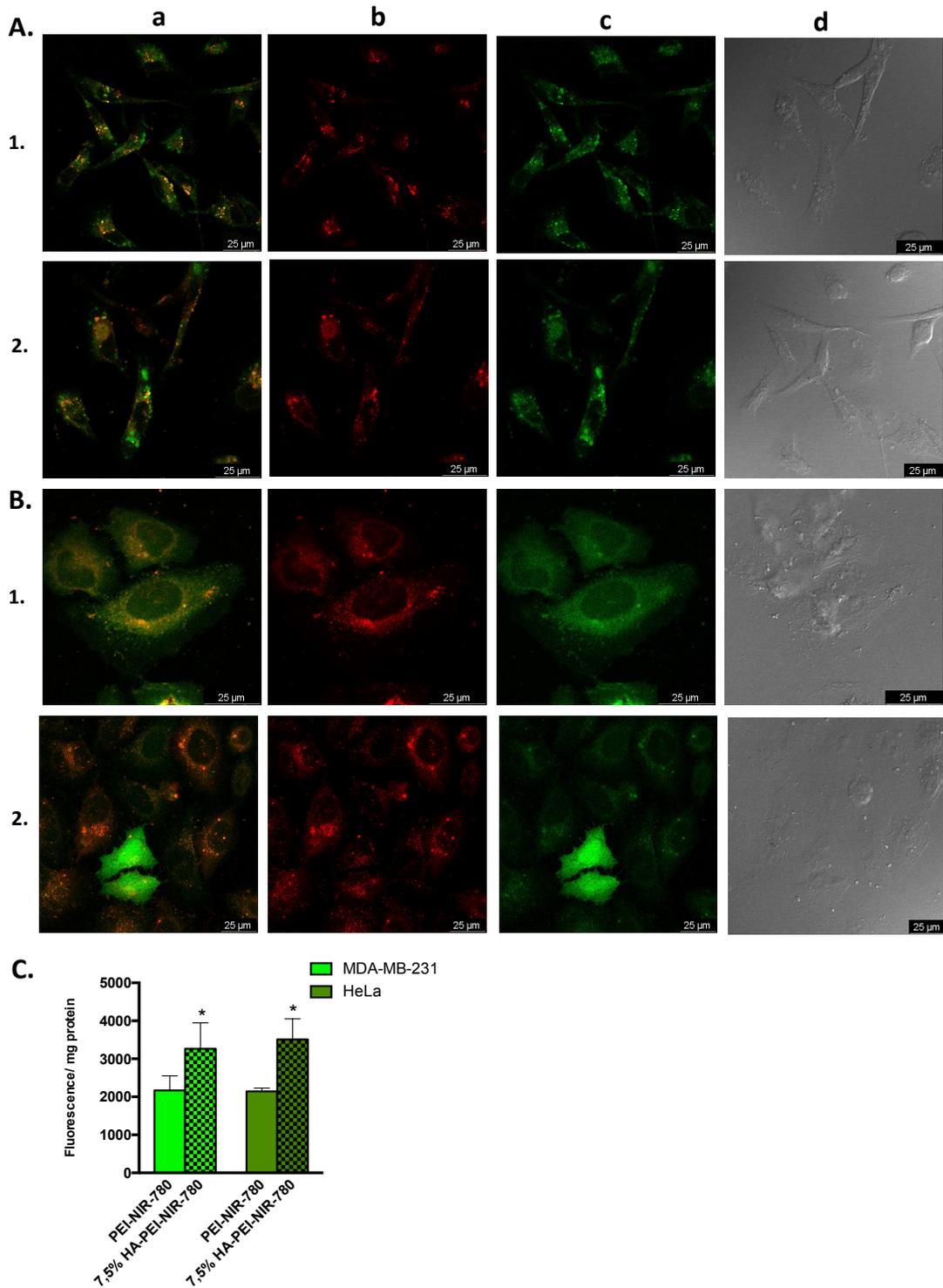


Figura 6.21. Imágenes de microscopía confocal de la transfección con PEI-NIR-780 y HA-PEI-NIR-780. Células MDA-MB-231 (A) y HeLa (B) han sido transfectadas usando (1) PEI-NIR-780 o (2) PEI-NIR-780 decorado con 7,5% de masa/carga de HA de 40-50 kDa con el plásmido pEGFP-N2 en un ratio N/P=28. Se presentan imágenes de microscopía confocal de canales (a) combinados, (b) NIR-780, (c) EGFP y (d) Nomarsky. (C) Se ha determinado la fluorescencia de la EGFP en el lisado celular. Los datos se representan como media±SEM, n=4. *p<0.05 vs PEI-NIR-780.

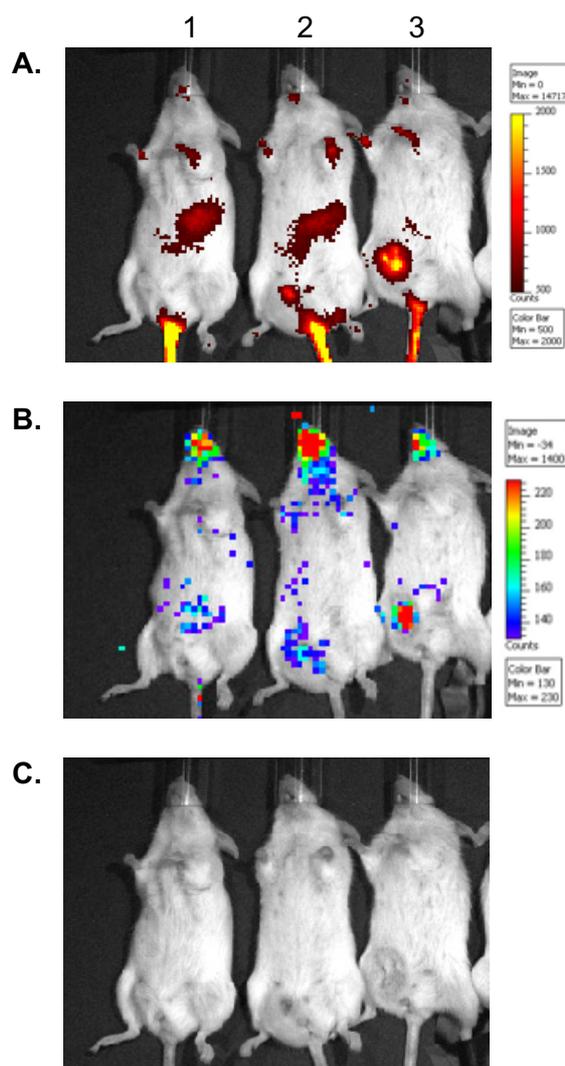


Figura 6.22. Transporte dirigido y diagnóstico específico de los agentes teragnósticos HA-PEI-NIR-780 *in vivo*. Se ha inyectado la nanopartícula PEI-NIR780 (500 μ M) (1), PEI-NIR-780+7,5% (carga/masa de HA/PEI) del HA de 10-50 kDa (2) y PEI-NIR-780+7,5% (carga/masa de HA/PEI) del HA de 40-50 kDa (3) con 15 μ g (N/P=28) del plásmido pGL3-control que codifica para la luciferina de luciérnaga por vía intravenosa en la cola de los ratones NGS con xenografts del cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231). Pasadas las 24 horas, se han tomado imágenes de fluorescencia del NIR-780 (A), bioluminiscencia (B) y visible (C) en el IVIS.

6.3.3. HA-PEI-NIR-780- β CD como nanopartículas para el transporte de fármacos

Las nanopartículas PEI-NIR-780 con 7,5% (masa/carga) del HA de 40-50 kDa actúan como vectores de transfección efectivos para la terapia génica y permiten el diagnóstico específico y la monitorización *in vivo*. Para potenciar su capacidad terapéutica antitumoral se ha diseñado una estrategia que, en adición a la capacidad de transfección, dote a estas partículas de la capacidad de transportar fármacos. Para ello, se han adicionado cuatro β -ciclodextrinas (β CD) unidas covalentemente a la polietilenimina con el objetivo de permitir la inclusión de DOX como agente quimioterapéutico (Figura 6.23.).

RESULTADOS

Para ello, el grupo de investigación del profesor Santoyo ha sintetizado la nanopartícula PEI-NIR-780- β CD (1:1:4) que permite la inclusión de 4 moléculas de DOX (PEI-NIR-780- β CD \subset DOX). Se ha incubado una solución acuosa de DOX con la suspensión de las nanopartículas (ratio molar 1:0,9) durante 24 horas a 4°C y se ha liofilizado. Además, la superficie de estas nanopartículas puede recubrirse con el ácido hialurónico mediante las interacciones electrostáticas entre los grupos amino de PEI y los grupos aniónicos de HA, formando el complejo HA-PEI-NIR-780- β CD \subset DOX para mediar el transporte específico de DOX hacia las células tumorales.

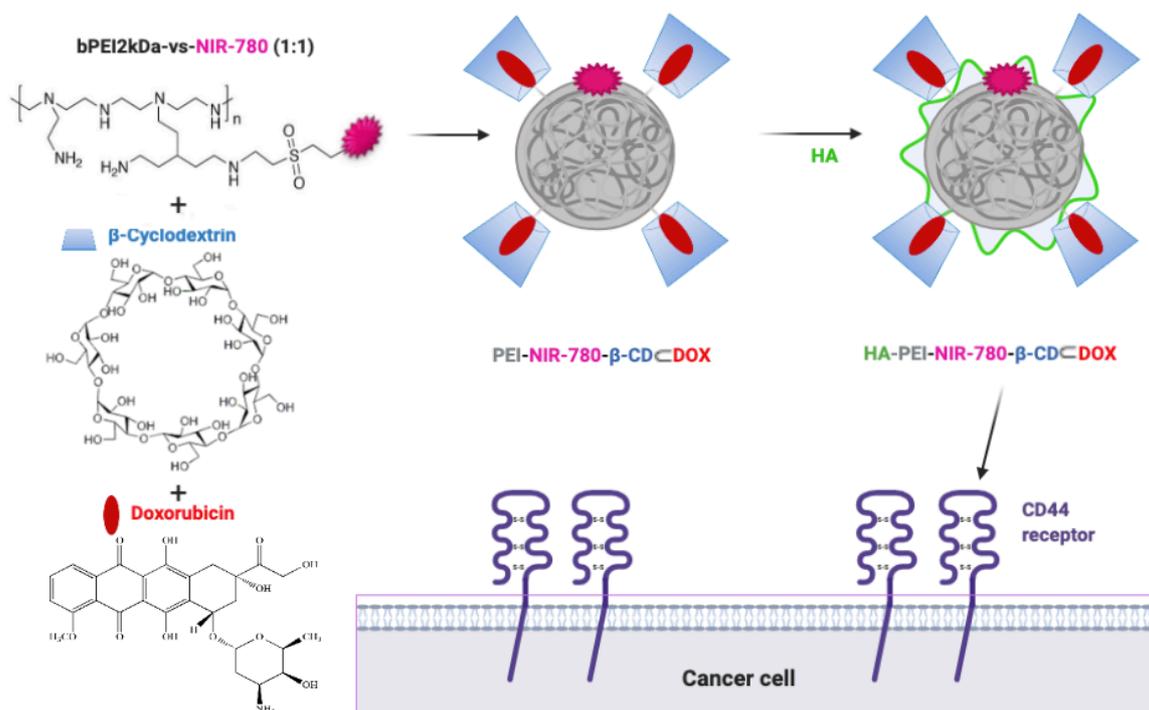


Figura 6.23. Inclusión de la doxorubicina en la nanopartícula PEI-NIR-780- β CD (1:1:4). Se ha sintetizado la nanopartícula PEI-NIR-780- β CD (1:1:4), mediante la unión covalente de 4 moléculas de β -ciclodextrina a la polietiliminina del compuesto PEI-NIR-780. Posteriormente, se ha ocluido la doxorubicina (DOX) en las 4 moléculas de β -CD (ratio molar 1:0,9) mediante una incubación de 24 h a 4°C y se ha liofilizado. La superficie de estas nanopartículas ha sido decorada con la sal sódica de ácido hialurónico formando el complejo HA-PEI-NIR-780- β CD \subset DOX que dirigirá la nanopartícula hacia los receptores CD44.

Estas nanopartículas HA-PEI-NIR-780- β CD podrían actuar como agentes teragnósticos, gracias a la sonda NIR-780 que permitiría el diagnóstico específico de los tumores que sobre-expresan los receptores CD44 (cáncer de mama triple negativo, cáncer cervical, etc.) al mismo tiempo que permitirían el transporte dirigido del material genético unido a la PEI y de fármacos quimioterapéuticos como la DOX ocluido en la cavidad de la β CD.

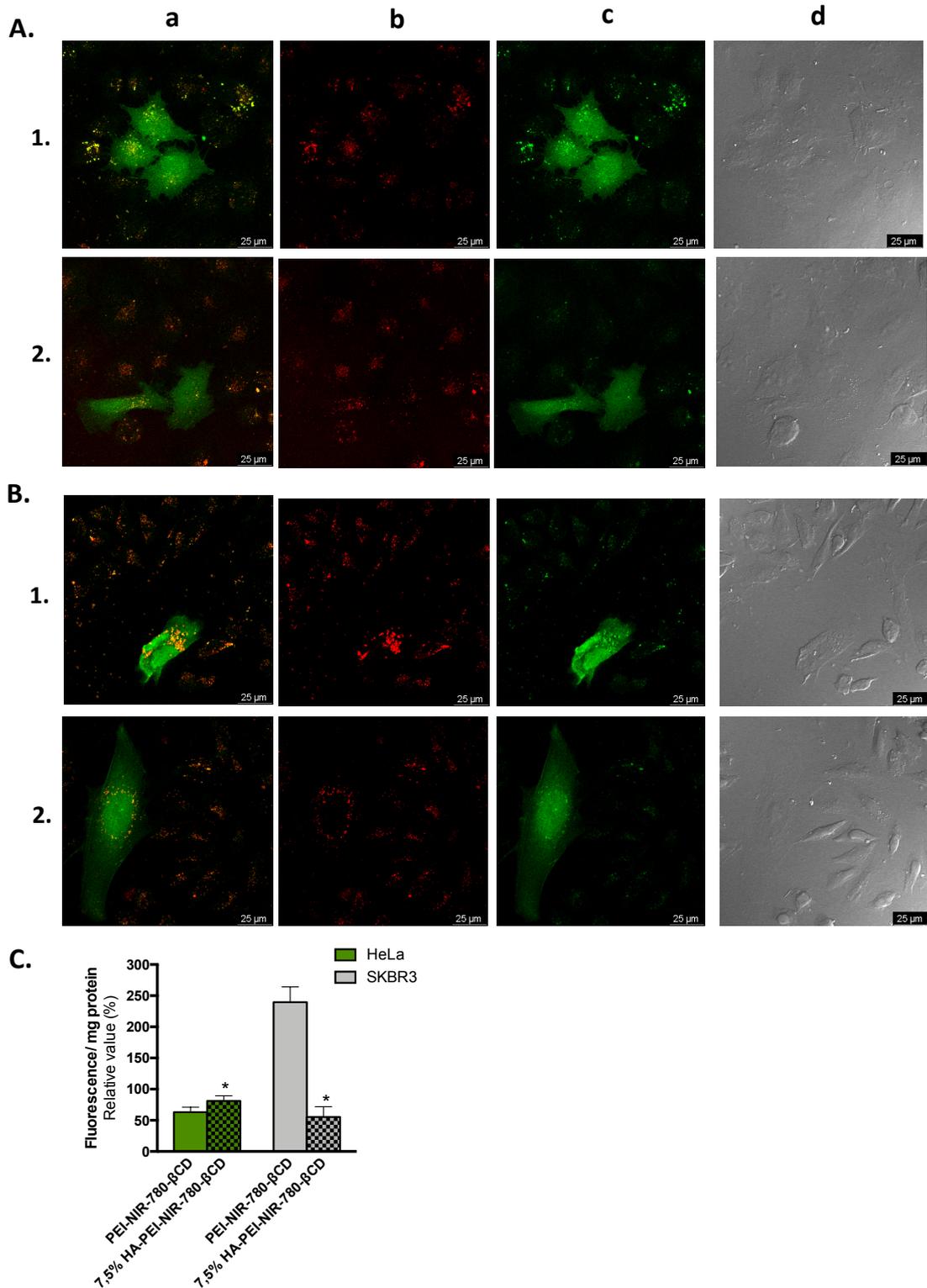


Figura 6.24. Imágenes de microscopía confocal de la transfección con PEI-NIR-780-βCD y HA-PEI-NIR-780-βCD. Células HeLa (A) y SKBR3 (B) han sido transfectadas con (1) PEI-NIR-780-βCD y (2) PEI-NIR-780-βCD recubierto con 7,5% masa/carga de HA de 40-50 kDa. Se presentan imágenes de microscopía confocal en canales (a) combinado, (b) NIR-780, (c) EGFP y (d) Nomarsky. (C) Se ha medido la fluorescencia de la EFGP en el lisado celular y los resultados han sido normalizados por los niveles de transfección de Lipofectamina 2000 a la que se le ha asignado el valor 100% y por la concentración de proteínas en cada muestra. Los datos se representan como media±SEM, n=4. *p<0.05 vs PEI-NIR-780-βCD.

RESULTADOS

Primero y con el objetivo de determinar la capacidad y la eficiencia de transfección de estos agentes teragnósticos, se han realizado ensayos de microscopía confocal (Figura 6.24.). Células HeLa (CD44+) y SKBR3 (CD44-) han sido transfectadas con los compuestos PEI-NIR-780- β CD y PEI-NIR-780- β CD decorado con el 7,5% de HA de 40-50 kDa con el plásmido pEGFP-N2 en un ratio N/P=28. Al igual que con las nanopartículas PEI-NIR-780 y HA-PEI-NIR-780, se ha observado una transfección a nivel del núcleo y un punteado en el espacio perinuclear debido al NIR-780, probablemente a nivel mitocondrial.

Para cuantificar los niveles de transfección se ha medido la fluorescencia de la EGFP en el lisado celular de las células HeLa y SKBR3 y los resultados han sido normalizados en función de los niveles de transfección de Lipofectamina 2000 a la que se le ha asignado el valor 100% y la concentración de proteínas en cada muestra (Figura 6.24.C.). Se ha observado que la eficiencia de transfección aumenta cuando las nanopartículas PEI-NIR-780- β CD se recubren con el HA de 40-50 kDa en las células que sobre-expresan los receptores CD44 (HeLa). En las células SKBR3 (CD44-), la eficiencia de transfección con PEI-NIR-780- β CD es cuatro veces mayor y la decoración con el HA provoca una disminución en la eficiencia de transfección.

A continuación, y con el propósito de estudiar el transporte específico de las nanopartículas con el agente quimioterapéutico hacia los receptores CD44, células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 (CD44+) y células epiteliales no tumorales HEK-293 (CD44-) se han incubado durante 2 horas con DOX 1 μ M y cantidades equivalentes de la misma ocluida en las nanopartículas de PEI-NIR-780- β CD (1:1:4), denominada a continuación PEI-NIR-780- β CD \subset DOX. Su superficie se ha decorado con 2,5; 5; 7,5 y 10 % (carga/masa de HA/PEI) de la sal sódica del HA de 40-50 kDa mediante una incubación durante 20 min. Se ha medido la fluorescencia correspondiente a la DOX en los lisados celulares con un máximo de excitación a 499 nm y un máximo de emisión a 555 nm como marcador del proceso de internalización (Figura 6.25.).

Se ha observado que las nanopartículas PEI-NIR- β CD \subset DOX presentan una entrada mayor que la DOX libre en ambos tipos celulares. Esto puede ser debido a que la PEI presenta cargas positivas por la protonación de sus grupos amino que favorecen las interacciones con la membrana plasmática cargada negativamente. (81) Además, se ha visto que existe un aumento significativo en la entrada de las nanopartículas con 7,5% del ácido hialurónico en las células CD44+ (MDA-MB-231) a diferencia de las células epiteliales HEK-293 (CD44-), donde el HA incluso dificulta la entrada de las nanopartículas al interior celular debido a que neutraliza las cargas de PEI y, por tanto, disminuyen las interacciones con la superficie celular y su internalización.

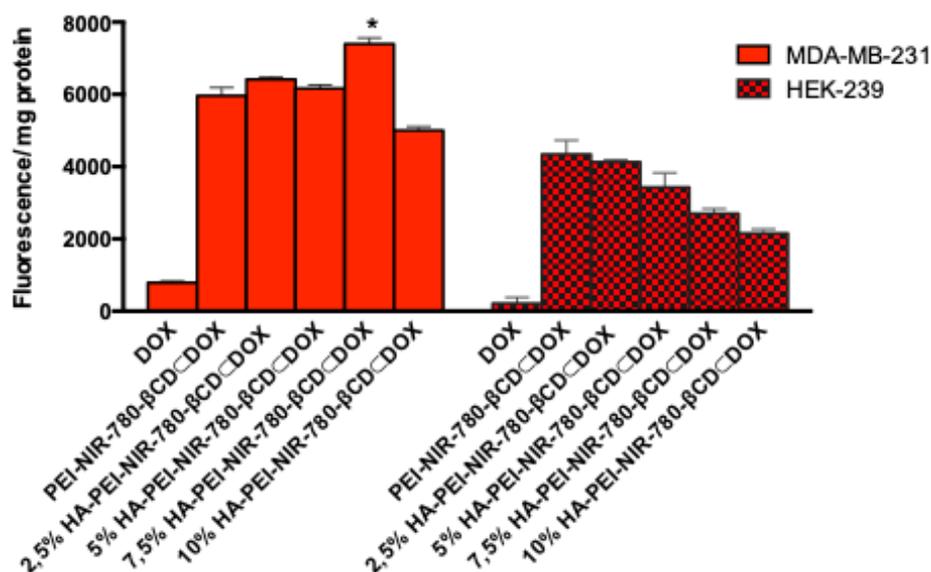


Figura 6.25. Transporte dirigido y entrada específica de las nanopartículas cargadas con la doxorubicina en las células CD44+. Células MDA-MB-231 (CD44+) y HEK-293 (CD44-) se han incubado durante 2 h con 1 μ M doxorubicina y las concentraciones equivalentes DOX oculta en las nanopartículas PEI-NIR-780- β CD-DOX (1:4:4) cuya superficie se ha decorado con el ácido hialurónico de 40-50 kDa en concentraciones crecientes (2,5; 5; 7,5 y 10 % (carga/masa del HA/PEI)). Se ha medido la fluorescencia de la doxorubicina en el lisado celular (499/555 nm) y se ha normalizado por la concentración de proteínas en cada muestra. Los datos se representan como media \pm SEM, n=4. *p<0.05 vs PEI-NIR-780- β CD-DOX.

Por otra parte, con el objetivo de conocer la vía de entrada de las nanopartículas con el ácido hialurónico como molécula directora al interior celular, las células MDA-MB-231 (CD44+) y HEK-293 (CD44-) se han pre-incubado durante 30 min con distintos inhibidores de las diferentes vías de entrada implicadas en la endocitosis de las nanopartículas: ácido hialurónico libre 0,5 mg/ml como inhibidor competitivo de la unión al receptor CD44, bromosulfoftaleína (BSP) 0,25 mM como inhibidor de los OATPs (transportadores de aniones orgánicos), clorpromazina 100 μ M y sacarosa 0,45 M como inhibidores de la vía de internalización dependiente de clatrina, genisteína 400 μ M y filipina 10 μ g/ml como inhibidores de la vía de internalización dependiente de caveolas, citocalasina D 2 μ M como inhibidor de la macropinocitosis y azida sódica 0,1% p/v como inhibidor de la difusión pasiva. (130–133,157,163) Las células han sido tratadas posteriormente con el compuesto PEI-NIR-780- β CD-DOX (1 μ M) decorado con 7,5% (carga/masa) del HA de 40-50 kDa durante 2 horas y se ha medido la fluorescencia de la doxorubicina en el lisado celular. Los resultados se han representado como el porcentaje de inhibición de la entrada de la nanopartícula HA-PEI-NIR-780- β CD-DOX en las células no pre-incubadas con los inhibidores, a la que se le ha asignado el valor 100% (Figura 6.26.).

Se ha observado que en las células que sobre-expresan los receptores CD44 (MDA-MB-231) se ha producido una inhibición de la entrada de aproximadamente 25% con la pre-incubación con el HA libre, por lo que el receptor CD44 probablemente participa en la entrada de estas nanopartículas al interior celular en las células del cáncer de mama triple negativo, ya que en las células CD44- no se ha observado esta disminución. Asimismo, se ha producido una inhibición en ambos tipos celulares con BSP, que inhibe los OATPs. Como se ha mencionado previamente, se trata de una familia

RESULTADOS

de receptores que están sobre-expresados en algunos tejidos tumorales y que intervienen en el transporte de varios fármacos, xenobióticos y sondas NIR. (134)

Por otra parte, se ha producido una inhibición significativa de entrada en las células MDA-MB-231 pre-incubadas con clorpromazina, por lo que podemos concluir que estas nanopartículas entran por la vía dependiente de clatrin asociada a los receptores CD44 en este tipo celular. En las células CD44- se ha producido una inhibición de entrada tanto por los inhibidores de la internalización mediada por clatrin (clorpromazina, sacarosa) como por la de caveolas (genisteína, filipina) y por la citocalasina D. Asimismo, se ha observado que las nanopartículas no entran por difusión pasiva en ningún tipo celular y la entrada no está asociada a un receptor específico en las células CD44-.

Se ha demostrado que las nanopartículas aniónicas usan la entrada dependiente de caveolas y clatrin mientras que las nanopartículas cargadas positivamente usan preferentemente la vía dependiente de clatrin. Asimismo, la entrada de las nanopartículas con carga positiva es mayor debido a sus interacciones electrostáticas con la carga negativa de las membranas plasmáticas. (80,81)

Por lo tanto, podemos observar diferencias entre los dos tipos celulares y concluir que el transporte específico de las nanopartículas cargadas con DOX y decoradas con el ácido hialurónico se debe a la interacción de la molécula directora con el receptor CD44.

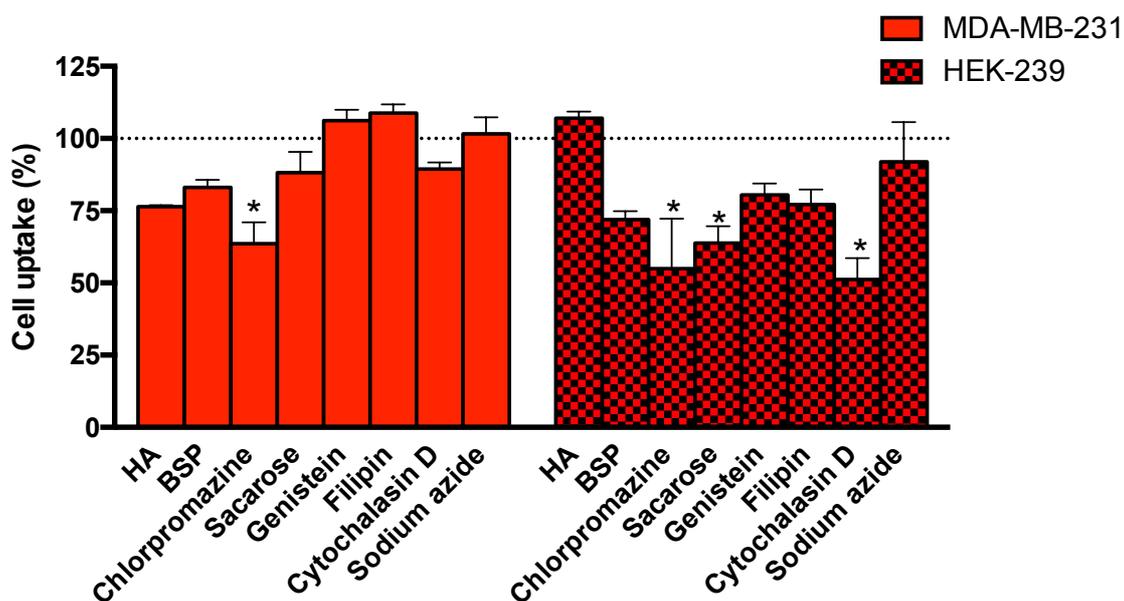


Figura 6.26. Inhibición de la entrada de las nanopartículas HA-PEI-NIR-780-βCD-DOX. Células MDA-MB-231 (CD44+) y HEK-293 (CD44-) se han pre-incubado durante 30 min con distintos inhibidores de la endocitosis: ácido hialurónico libre (HA) 0,5 mg/ml, bromosulfoftaleina (BSP) 0,25 mM, clorpromazina 100 μM, sacarosa 0,45 M, genisteína 400 μM, filipina 10 μg/ml, citocalasina D 2 μM y azida sódica 0,1% p/v. Posteriormente, se han incubado durante 2 horas con la nanopartícula HA-PEI-NIR-780-βCD-DOX (1 μM) decorada con 7,5% (carga/masa) del ácido hialurónico de 40-50 kDa. Se ha medido la fluorescencia de la doxorubicina en el lisado celular y se ha normalizado por la concentración de proteínas en cada muestra. Los datos se representan como porcentaje de inhibición de la entrada de la nanopartícula HA-PEI-NIR-780-βCD-DOX en las células sin tratamiento con los inhibidores. Los datos se representan como media ± SEM, n=4. *p<0.05 vs HA-PEI-NIR-780-βCD-DOX.

El tratamiento clínico de cáncer de mama triple negativo consiste en la cirugía asociada a la quimioterapia con DOX en combinación con ciclofosfamida y/o paclitaxel. (20) No obstante, la principal limitación de la DOX es su cardiotoxicidad que puede originar daños en el ventrículo izquierdo y fallo cardíaco. (64)

Con el propósito de conocer la cardiotoxicidad y la citotoxicidad específica de las nanopartículas HA-PEI-NIR-780-βCD◻DOX, se han realizado ensayos de citotoxicidad celular en las células MDA-MB-231 (CD44+), SKBR3 (CD44-) y en una línea celular de cardiomiocitos (H9c2) mediante el método MTT tras 48 h de incubación con DOX 1 μM y las cantidades equivalentes de la misma ocluida en las nanopartículas PEI-NIR-780-βCD◻DOX cuya superficie se ha decorado con 2,5; 5; 7,5% (carga/masa) del ácido hialurónico de 40-50 kDa. Los resultados de citotoxicidad se han expresado en porcentaje (0% para las células no tratadas), sustrayendo al 100% el valor de viabilidad obtenido con cada uno de los tratamientos (Figura 6.27.).

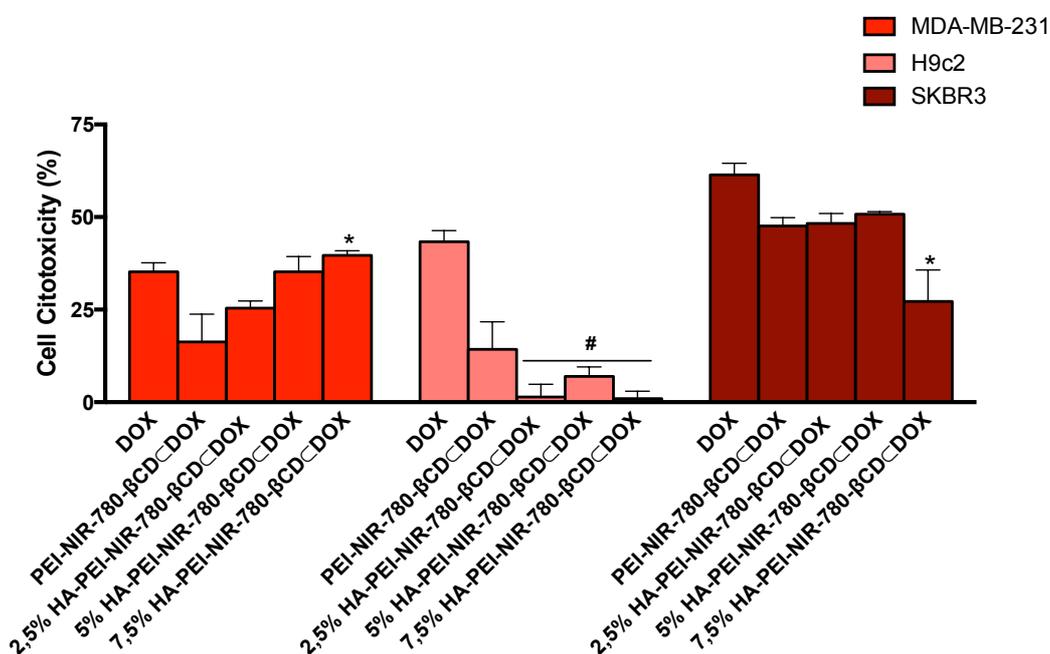


Figura 6.27. Citotoxicidad de las nanopartículas HA-PEI-NIR-780-βCD◻DOX. Células MDA-MB-231, SKBR3 y H9c2 han sido incubadas durante 48 horas con doxorubicina 1 μM y cantidades equivalentes de doxorubicina ocluida en PEI-NIR-780-βCD◻DOX cuya superficie se ha decorado con 0; 2,5; 5 y 7,5% del HA de 40-50 kDa y se han realizado ensayos de citotoxicidad. Los resultados se han expresado en porcentaje (0% para las células no tratadas), sustrayendo al 100% el valor de viabilidad obtenido con cada uno de los tratamientos (media±SEM, n=4). *p<0.05 vs PEI-NIR-780-βCD◻DOX; # p<0.05 vs células tratadas con DOX.

Se observa que la DOX incluida en la nanopartícula no decorada con HA produce una menor muerte celular que la DOX libre en todos los tipos celulares. Por el contrario, el recubrimiento de la nanopartícula con 7,5% del HA produce una mayor citotoxicidad en las células MDA-MB-231 (CD44+) comparada con la nanopartícula sin la molécula directora, alcanzando unos niveles similares de citotoxicidad que el tratamiento con la DOX libre. Asimismo, en los cardiomiocitos en la concentración ensayada no se ha detectado citotoxicidad asociada a estas nanopartículas, por lo que nuestras nanopartículas podrían evitar la cardiotoxicidad asociada a la DOX. En las células SKBR3 (CD44-), el recubrimiento de las nanopartículas con 7,5% de HA ha provocado una menor muerte celular que la nanopartícula PEI-NIR-780-βCD◻DOX, por lo que, de

RESULTADOS

nuevo, se podrían disminuir los efectos secundarios asociados a la quimioterapia en las células que no sobre-expresan los receptores CD44.

Con el fin de determinar la localización sub-celular y el efecto del ácido hialurónico en la entrada de las nanopartículas cargadas con doxorubicina 1 μM , se han realizado ensayos de su internalización por microscopía confocal. Para ello, las células MDA-MB-231 (CD44+), SKBR3 (CD44-) y H9c2 (CD44-) han sido incubadas durante 2 horas con la doxorubicina 1 μM ocluida en la nanopartícula PEI-NIR-780- βCD -DOX decorada o no con el 7,5% del HA de 40-50 kDa. Las células se han fijado y se han tomado imágenes por microscopía confocal. (Figura 6.28.)

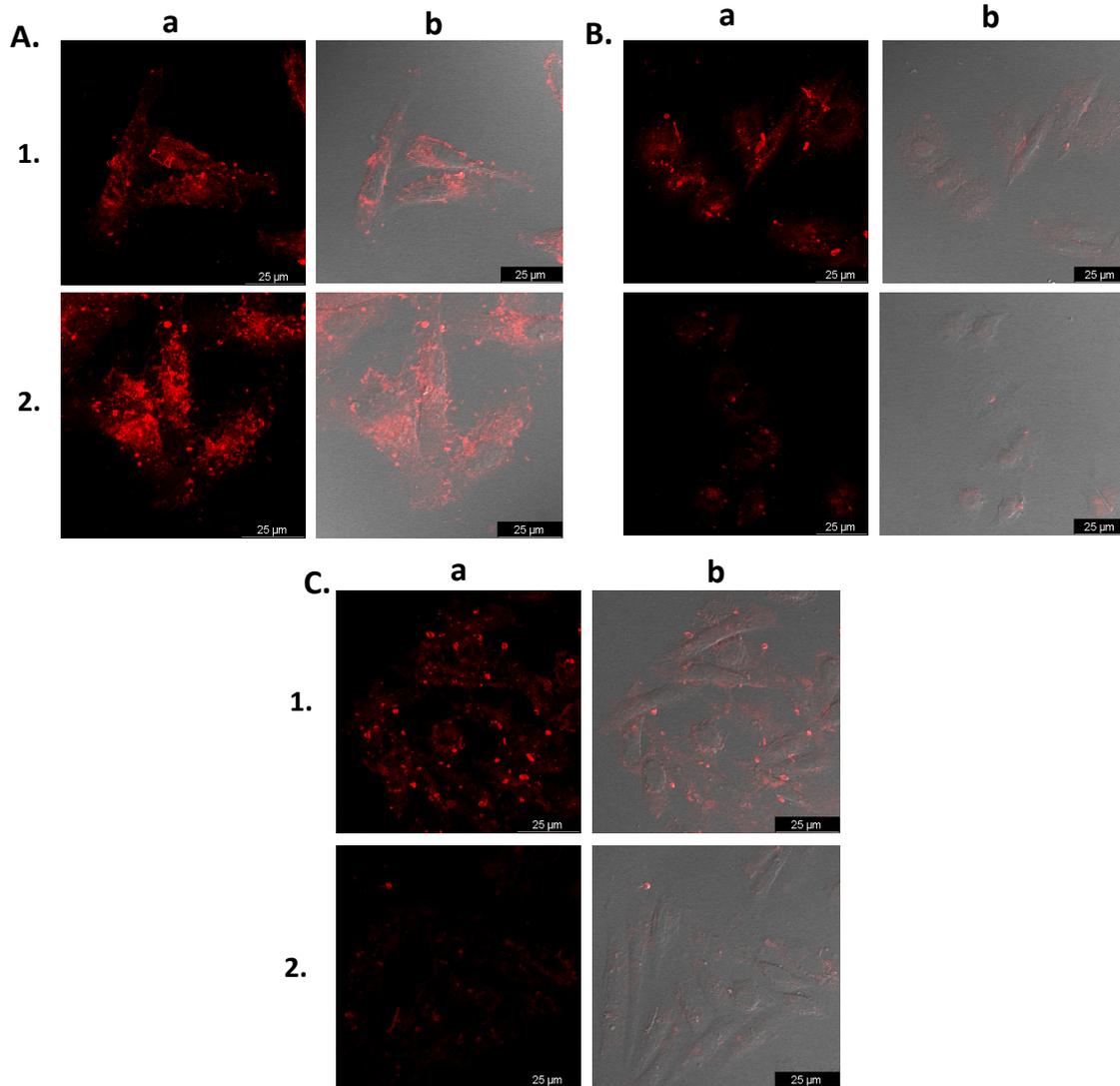


Figura 6.28. Internalización y localización sub-celular de las nanopartículas HA-PEI-NIR-780- βCD -DOX. Las células (A) MDA-MB-231, (B) SKBR3 y (C) H9c2 han sido incubadas durante dos horas con doxorubicina 1 μM ocluida en (1) PEI-NIR-780- βCD -DOX y (2) PEI-NIR-780- βCD -DOX decorado con 7,5 % del HA de 40-50 kDa. Se representa (a) la imagen de fluorescencia de la doxorubicina y (b) la combinación de Nomarsky con la imagen de fluorescencia de la doxorubicina.

Se ha observado que en las células MDA-MB-231, que sobre-expresan los receptores CD44, la entrada de las nanopartículas PEI-NIR-780- β CD \subset DOX ha aumentado cuando se han recubierto con el 7,5% del HA de 40-50 kDa y ha originado una mayor muerte celular (se observan células con signos de apoptosis), mientras que en las células CD44- (SKBR3 y H9c2), el recubrimiento con HA ha producido una disminución en la internalización de las nanopartículas y no se ha observado apoptosis celular significativa, aunque **ensayos *in situ* de apoptosis serán necesarios para confirmar este extremo.** Estos resultados confirman que nuestras nanopartículas recubiertas con HA permiten un transporte dirigido y específico del agente quimioterapéutico hacia los receptores CD44 sobre-expresados en el cáncer de mama triple negativo y podrían evitar la cardiotoxicidad y los efectos secundarios de la DOX en las células que no los sobre-expresan. Además, se ha observado una distribución sub-celular en forma de punteado perinuclear, por lo que sospechamos que estas nanopartículas, al igual que los derivados de los bifosfonatos PEI-BP, presentan una localización mitocondrial y pueden originar la apoptosis celular desencadenada por mitocondrias y podrían ser utilizadas como una estrategia alternativa de tratamiento en las células resistentes a DOX.

6.3.4. Transporte dirigido de fármacos en células de cáncer de cérvix usando HA como molécula directora

El cáncer cervical sigue siendo una de las principales causas de la muerte en las mujeres en el mundo y la tasa de supervivencia de 1 año en el estadio avanzado es del 10-20%, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para su tratamiento y evitar las recurrencias relacionadas con el mal pronóstico. (35–37) Debido a los resultados satisfactorios obtenidos en las células HeLa (CD44+), nos planteamos realizar ensayos con las nanopartículas HA-PEI-NIR-780 y HA-PEI-NIR-780- β CD \subset DOX similares a los realizados en las células MDA-MB-231 en esta nueva línea celular.

Se han realizado ensayos de internalización, mediante la incubación durante 2 horas de las células de cáncer de cérvix HeLa (CD44+) con DOX libre 1 μ M y la DOX ocluida en las nanopartículas PEI-NIR-780- β CD \subset DOX recubiertas con 2,5; 5; 7,5 y 10 % (carga/masa) del HA de 40-50 kDa (Figura 6.29.).

Se ha observado, que al igual que en las células MDA-MB-231, se produce un aumento de la entrada de la DOX cuando está ocluida en las nanopartículas PEI-NIR-780- β CD \subset DOX, debido a las cargas positivas de los grupos amino de la PEI, que favorecen las interacciones con la membrana plasmática de las células tumorales, cargada negativamente. Además, el recubrimiento de estas nanopartículas con 7,5% de HA favorece significativamente su internalización, ya que actúa como molécula directora hacia los receptores CD44 sobre-expresados en las células HeLa.

Con el objetivo de comprobar el papel del receptor CD44 en la internalización de las nanopartículas, hemos generado células HeLa (CD44-) mediante la técnica CRISPR/Cas 9, siguiendo el protocolo de Zhang *et al.* (127) y utilizando los vectores pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) que presenta el gen codificante para la proteína verde fluorescente y el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) que presenta el gen codificante para la resistencia a la puromicina.

RESULTADOS

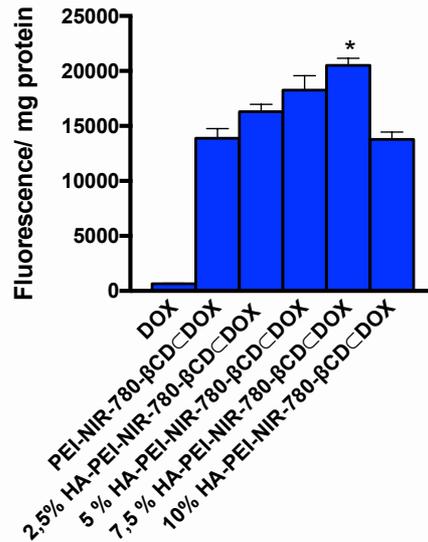


Figura 6.29. Internalización de las nanopartículas en el cáncer cervical. Células HeLa han sido incubadas durante 2 h con la doxorubicina 1 μ M libre y DOX ocluida en las nanopartículas PEI-NIR-780- β CD-DOX, cuya superficie se ha decorado con 0; 2,5; 5; 7,5 y 10% del HA de 40-50 kDa. Se ha medido la fluorescencia de DOX en el lisado celular (499/555 nm) y se ha normalizado por la concentración de proteínas en cada muestra. Los datos se representan como media \pm SEM, n=4. *p<0.05 vs PEI-NIR-780- β CD-Doxo.

En primer lugar, se ha diseñado la secuencia guía que incluye una secuencia PAM (-NGG- o -NCC-), que debe existir para el adecuado silenciamiento mediante este sistema. Se ha utilizado la herramienta online CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) para diseñar el RNA guía del gen CD44 humano (NM_000610.4) y se ha seleccionado la secuencia guía de 23 nucleótidos (TCGCTACAGCATCTCTCGGACGG) localizada en chr11:35176627, con un contenido de GC del 55%, una eficiencia del 68.43%, que además no presenta auto-complementariedad ni sitios inespecíficos de silenciamiento. Utilizando la herramienta online *blastn* (NIH) (164), se ha determinado que esta secuencia ("Query 253-275") se encuentra en el exón 2 (201-366) del gen CD44 humano (Figura 6.30.).

A.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
42.8 bits(46)	4e-10	23/23(100%)	0/23(0%)	Plus/Plus

```

Query 253 TCGCTACAGCATCTCTCGGACGG 275
          |||
Sbjct 1   TCGCTACAGCATCTCTCGGACGG 23
    
```

B.

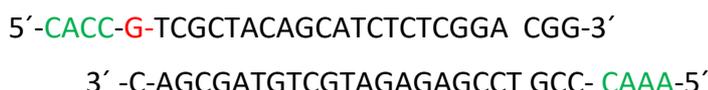
>NM_000610.4:201-366 Homo sapiens CD44 molecule (Indian blood group) (CD44), transcript variant 1, mRNA
 ATTTGAATATAACCTGCCGCTTTGCAGGTGTATTCCACGTGGAGAAAATGGTCGCTACAGCATCTCTCGGACGGAGGCCGCTG
 ACCTCTGCAAGGCTTTCAATAGCACCTTGCCCAATGGCCAGATGGAGAAAGCTCTGAGCATCGGATTTGAGACCTGCAG

Figura 6.30. (A) Resultado de la alineación de la secuencia diana obtenida del programa CHOPCHOP con la secuencia del gen CD44 humano (NM_000610.4) mediante la herramienta online *blastn* (NIH). (164) **(B)** La secuencia completa del exón 2 del gen humano CD44 (201-366) con la secuencia guía en rojo.

Además, se le ha incluido un linker CACC en la secuencia guía 5'-3' y AAAC en la reversa 3'-5' (en verde) que contienen medio sitio de restricción para la enzima Bpil que corta en la siguiente secuencia:



Y, por tanto, el RNA guía tendría la siguiente secuencia:



Asimismo, se le ha incluido una guanina (en rojo) en la secuencia 5'-3' después del linker para favorecer una eficiente transcripción por el promotor U6 en los plásmidos PX458 y PX459.

En segundo lugar, se han diseñado los oligonucleótidos, cuya secuencia se muestra en la Tabla 13., que son complementarios entre sí y no incluyen la secuencia PAM.

Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'
gCD44 forward (f)	CACCGTCGCTACAGCATCTCTCGGA
gCD44 reverse (r)	AAACTCCGAGAGATGCTGTAGCGAC

Tabla 13. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para formar la secuencia guía del sistema CRISPR/Cas9.

Posteriormente, se ha realizado, por una parte, la hibridación y la fosforilación de ambos oligonucleótidos y, por otra parte, la des-fosforilación y la digestión de los plásmidos PX459 y PX458 con la enzima de restricción Bpil. A continuación, se ha puesto una ligación de los plásmidos digeridos y des-fosforilados con los oligonucleótidos hibridados y fosforilados que constituyen la secuencia guía para el exón 2 del gen CD44 y se han transformado las células competentes de *E.coli* XL-1 Blue. Se ha aislado el DNA mediante una miniprep y se ha realizado un PCR para confirmar la clonación de la secuencia guía en el vector utilizando los oligonucleótidos **U6 seq forward y reverse** y se ha realizado una electroforesis en un gel de agarosa al 3% esperando una banda de 265 pb (Figura 6.31.A). Se ha seleccionado el DNA de las calles 2 y 7 positivas y se han digerido con *Bpil* y *KpnI* para comprobar que no hay deleciones. Se ha secuenciado el DNA de la miniprep de la calle 7 con el primer U6 seq forward y se ha observado que la secuencia es correcta. Por tanto, se han transformado las bacterias competentes *E.coli* STL3, que evitan la recombinación de las secuencias repetidas en el RNA guía para que no se produzcan deleciones y se ha realizado una midiprep.

RESULTADOS

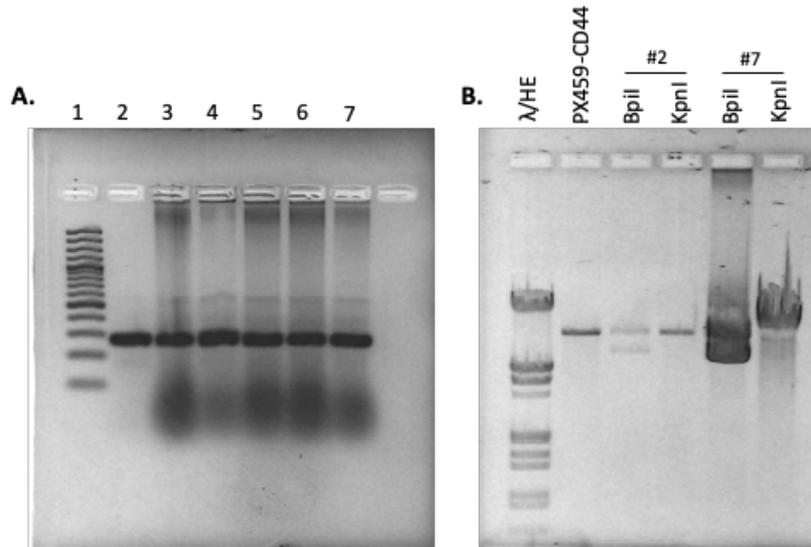


Figura 6.31. Electroforesis en geles de agarosa. (A) Se ha realizado una electroforesis en gel de agarosa al 3%, utilizando como marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (A1) y el DNA de la secuencia guía aislado por miniprep y amplificado por PCR (A2-7). (B) Se ha realizado una digestión de las minipreps 2 y 7 con Bpil y KpnI y posteriormente, una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% usando como marcador Lambda DNA/EcoRI+HindIII.

Finalmente, se han transfectado las células HeLa con los plásmidos PX459-CD44 y PX458-CD44 usando *Lipofectamine* 2000 y pasadas las 24 horas se han observado los niveles de transfección mediante el microscopio de fluorescencia en las células transfectadas con PX459, ya que codifica para la proteína verde fluorescente y se han seleccionado las células positivas para el plásmido PX459-CD44 añadiendo 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina al medio de cultivo durante 7 días. Se han aislado los clones de las células HeLa y se han crecido en medio DMEM con 10% FBS sin puromicina y se ha realizado Western Blot para confirmar el silenciamiento del gen CD44 (Figura 6.32.). Se ha observado el silenciamiento del gen CD44 en ambos clones HeLa CD44-.

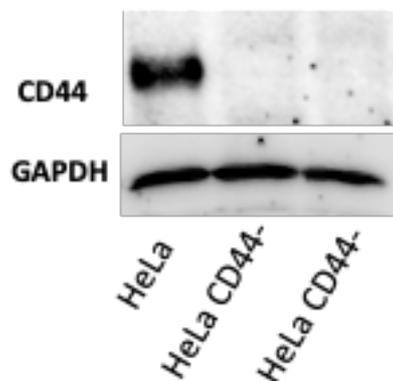


Figura 6.32. Western blot de las células HeLa y HeLa CD44-. Tras la selección con puromicina, se ha realizado Western blot de las células HeLa controles (CD44+) y las células HeLa transfectadas con el plásmido PX-459-CD44 (CD44-).

A continuación, se han realizado ensayos de internalización durante 2h con DOX 1 μM y DOX ocluida en las nanopartículas PEI-NIR-780- βCD -DOX recubiertas con 0;2,5; 5 y 7,5% (carga/masa) del HA de 40-50 kDa en las células HeLa CD44+ y HeLa CD44- (Figura 6.33.).

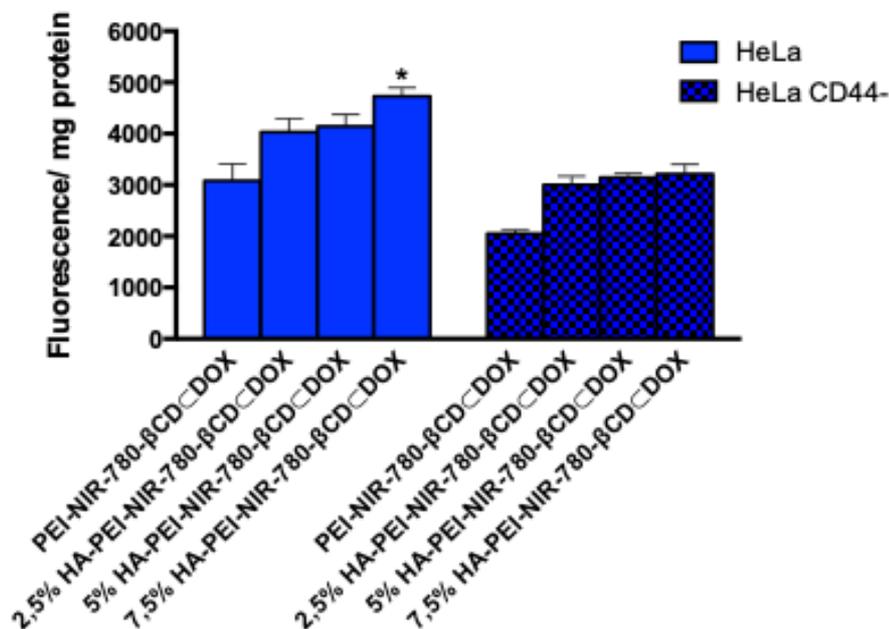


Figura 6.33. Internalización de las nanopartículas HA-PEI-NIR-780- βCD -DOX en las células HeLa CD44+ y CD44-. Células HeLa control (CD44+) y HeLa (CD44-) han sido incubadas durante 2 horas con DOX ocluida en PEI- βCD -DOX recubierta con 0; 2,5; 5 y 7,5% de HA de 40-50 kDa y se ha medido la fluorescencia de DOX en el lisado celular (499/555 nm). Los resultados han sido normalizados por la concentración de proteínas en cada muestra. Los datos se representan como media \pm SEM, n=4. * $p < 0.05$ vs PEI-NIR-780- βCD -DOX.

Se ha observado, que mientras que en las células que sobre-expresan el receptor CD44, el recubrimiento de las nanopartículas con el 7,5% del HA de 40-50 kDa origina un aumento en la entrada de la doxorubicina en el interior celular, en las células HeLa CD44- no se ha observado este efecto, por lo que podemos concluir que el ácido hialurónico actúa como molécula directora hacia los receptores CD44 sobre-expresados en el cáncer de mama triple negativo y el cáncer cervical y permite un transporte específico del agente quimioterapéutico y del material genético para la terapia génica. Asimismo, al llevar incluida la sonda NIR-780, permite un diagnóstico específico y monitorización en tiempo real tanto *in vitro* como *in vivo* y por tanto constituye un agente teragnóstico prometedor para ambos tipos de cáncer.

6.4. Ensayos en modelos 3D de cáncer de mama derivados de plasma humano (HuP3D)

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que se clasifica en función de la expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y factor de crecimiento epidermal 2 (HER2) en diferentes sub-tipos moleculares (HR+/HER2-, HER2+ y triple negativo) relacionados con la prognosis y la tasa de supervivencia de las pacientes. A

RESULTADOS

pesar de esta heterogeneidad molecular, las pacientes normalmente reciben el mismo tratamiento quimioterapéutico. (21,22)

Además, el descubrimiento y el diseño de nuevos fármacos constituyen un proceso complejo, lento y costoso y el 80% de nuevas moléculas fracasan en las fases II y III de los ensayos clínicos debido a la falta de eficacia terapéutica y problemas de seguridad. (44,45) Los modelos tradicionales basados en los cultivos celulares en monocapa siguen siendo una herramienta útil en los ensayos preclínicos y en la ciencia básica para realizar el cribado de fármacos y estudiar su eficacia y citotoxicidad, ya que son modelos de bajo coste y de fácil manejo. Sin embargo, no representan de forma adecuada la organización celular, la arquitectura tisular, las propiedades mecánicas, las conexiones intercelulares y con la matriz extracelular, la migración celular, la angiogénesis, la apoptosis y la expresión génica *in vivo*. (44,45)

En los cultivos bidimensionales, las células reciben de forma homogénea el oxígeno, los nutrientes y los fármacos, mientras que en el microambiente tumoral se originan gradientes de estas moléculas, creando un centro necrótico más resistente al tratamiento (Figura 6.34.). Esto puede originar discrepancias entre los datos obtenidos en los monocultivos bidimensionales y los ensayos *in vivo* debido a las resistencias mediadas por el microambiente tumoral que influye en la eficacia terapéutica. (44,45,66)

Se ha demostrado que los cultivos tridimensionales son capaces de mimetizar el microambiente tumoral, las interacciones intercelulares, la matriz extracelular, los gradientes y el transporte de fármacos, nutrientes y factores de crecimiento *in vivo* y su influencia en la respuesta terapéutica y, además, permiten el cribado masivo de fármacos. (44) Actualmente, existen diferentes tipos de cultivos 3D (organoides, esferoides, soportes de tipo matriz extracelular, microdispositivos, etc.) y es importante elegir el más adecuado según el tipo de estudio que se desee realizar. (44)

En la presente tesis, se ha utilizado el modelo tridimensional de cáncer de mama derivado de plasma humano (HuP3D) para formar la matriz de soporte, basada en el entrecruzamiento del fibrinógeno presente en el plasma para formar fibrina. Este modelo tridimensional permite un crecimiento eficiente y división de los cultivos celulares de cáncer de mama y de los tumores primarios, siendo la tasa de crecimiento de las células en HuP3D menor que en monocapa, por lo que mimetiza mejor el crecimiento tumoral *in vivo*. (136,165)

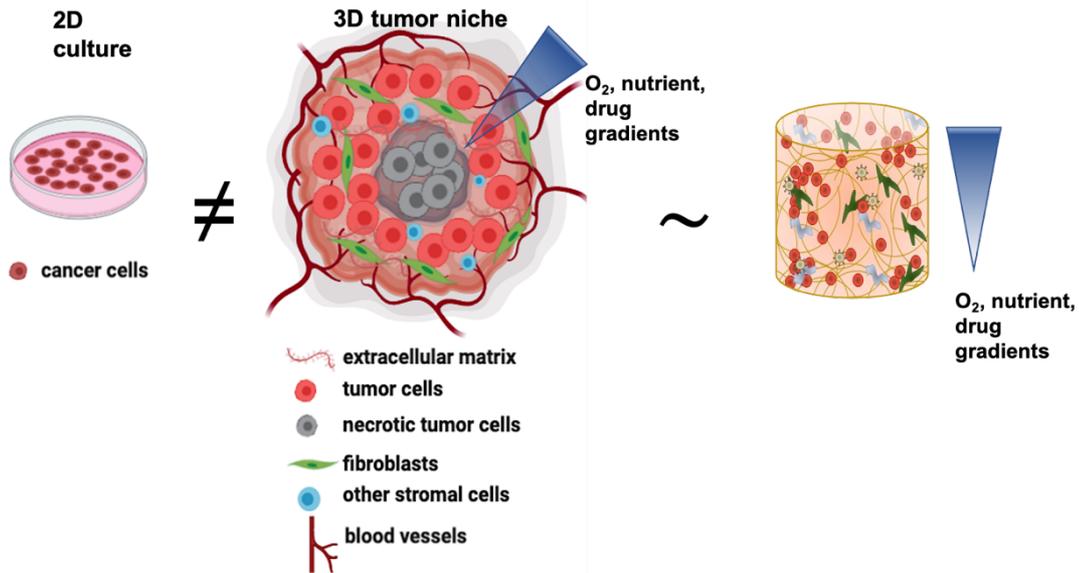


Figura 6.34. Los cultivos tridimensionales derivados del plasma humano mimetizan mejor el microambiente tumoral *in vivo* que los cultivos bidimensionales. Los cultivos tradicionales 2D reciben el oxígeno, los nutrientes y los fármacos de forma homogénea, mientras que en los cultivos tridimensionales al igual que en el microambiente tumoral se generan gradientes de estas moléculas, lo que puede dar lugar a resistencias y dificultar la entrada de los fármacos en el interior celular.

6.4.1. Generación de modelos HuP3D de cáncer de mama

Se han creado los modelos HuP3D mediante el entrecruzamiento del fibrinógeno, una proteína plasmática responsable de la coagulación de sangre cuando se convierte en fibrina. Para ello, se ha realizado una suspensión 4:4:1:1 (ratios en volumen) de plasma humano con células de cáncer de mama en medio de cultivo, con CaCl₂ 1 mg/ml que favorece el entrecruzamiento en 4 min y ácido tranexámico (ácido trans-4-(aminometil)-ciclohexan-carboxílico) (5 mg/ml) como agente anti-fibrolítico que evita la degradación y la lisis de los coágulos de fibrina y mantiene la integridad estructural del modelo 3D. Así, se ha formado una matriz gelatinosa de 3 mm en una placa de cultivo de 96 pocillos para los ensayos de cribado de fármacos o en un portaobjetos con 8 pocillos para la microscopía confocal y se ha adicionado el medio de cultivo encima para evitar el secado (Figura 6.35.).

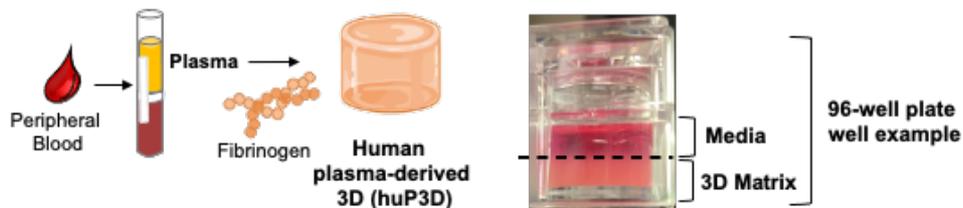


Figura 6.35. Esquema de generación de HuP3D. La matriz derivada del plasma humano se forma mediante el entrecruzamiento del fibrinógeno (una proteína plasmática) en fibrina en presencia de CaCl₂ (1 mg/ml) y ácido tranexámico (ácido trans-4-(aminometil)-ciclohexan-carboxílico) (5 mg/ml). Estas matrices pueden incluir células tanto de líneas celulares convencionales como de biopsias. Se forma una matriz gelatinosa de 3 mm y se añade medio en la superficie para evitar que se seque.

RESULTADOS

Con el objetivo de conocer la influencia de los sub-tipos moleculares de cáncer de mama en la respuesta terapéutica, se han realizado estudios de cribado de distintos fármacos en 5 tipos celulares (Tabla 14.) que se han incorporado en los cultivos HuP3D.

Línea celular	Tiempo de duplicación (h)	Origen	Patología	Sub-tipo	ER	PR	HER2
MDA-MB-231	38	Efusión pleural	Adenocarcinoma	Triple negativo	-	-	-
MDA-MB-453	38	Efusión pleural	Adenocarcinoma	HER2 +	-	-	+
ZR-75-1	54	Ascitis	Carcinoma ductal invasivo	Luminal A	+	-/+	-
MCF7	48	Efusión pleural	Carcinoma ductal invasivo	Luminal A	+	+	-
SK-BR-3	30	Efusión pleural	Adenocarcinoma	HER2+	-	-	+

Tabla 14. Líneas celulares utilizadas para crear los modelos HuP3D. El tiempo de duplicación representa el tiempo necesario para duplicar la población de las células de cáncer de mama en el cultivo bidimensional. El origen y la patología indican las propiedades clínicas y de donde proviene cada línea celular. La categorización molecular de las líneas celulares de cáncer de mama (luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo) se basa en su expresión de los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2).

6.4.2. Cribado de fármacos quimioterapéuticos en HuP3D y determinación de parámetros de eficacia terapéutica

En el cáncer, el microambiente tumoral incluyendo las células no tumorales (fibroblastos, células endoteliales, adipocitos, células del sistema inmune) y la matriz extracelular (ECM) son muy variables dependiendo del tipo de tumor, el estadio y su localización. Los cambios en la composición de la ECM pueden afectar la respuesta de las células tumorales al fármaco debido a que pueden alterar la disponibilidad y la difusión del quimioterapéutico, la expresión de las dianas moleculares y originar cambios en los mecanismos de defensa intrínsecos de la célula (la reparación del DNA dañado o la evasión de la apoptosis). (44) Se ha demostrado que las células cultivadas en los modelos 3D presentan una sensibilidad disminuida a los agentes quimioterapéuticos comparando con los cultivos tradicionales. (125)

Por lo tanto, se han realizado ensayos de citotoxicidad para comprobar la sensibilidad de las 5 líneas celulares de cáncer de mama cultivadas en HuP3D a agentes quimioterapéuticos comúnmente utilizados en el tratamiento clínico del cáncer de mama. Para ello, se han seleccionado siete fármacos quimioterapéuticos: ciclofosfamida (CYCLO), carboplatino (CARBO), metotrexato (MTX), capecitabina (CAP), docetaxel (DTX), paclitaxel (PTX) y epirubicina (EPI).

Ciclofosfamida y carboplatino son agentes alquilantes que originan enlaces entre el grupo alquilo presente en su estructura y el nitrógeno de las guaninas en la molécula de DNA e impiden la duplicación del material genético y la división celular. Capecitabina

y metotrexato son fármacos que pertenecen al grupo de los antimetabolitos que interfieren en la síntesis del DNA. Metotrexato es un análogo de folato que inhibe el enzima dihidrofolato-reductasa en la síntesis de las purinas y capecitabina es el precursor de 5-fluoruracilo, que inhibe la timidilato-sintasa impidiendo la formación de la timidina. Paclitaxel y docetaxel son agentes antimitóticos derivados del taxol que estabilizan los microtúbulos en las células tumorales y evitan la mitosis. Se utilizan cuando falla el tratamiento de primera línea en los pacientes metastásicos y son la única opción en los pacientes con resistencias al tratamiento. La epirubicina, al igual que la doxorubicina utilizada en el desarrollo de nuestras nanopartículas, pertenece al grupo de los antibióticos citotóxicos de tipo antraciclinas que forman enlaces covalentes con los ácidos nucleicos interfiriendo en la síntesis del DNA. Entre sus efectos secundarios más graves destaca la cardiotoxicidad. (25)

En los ensayos de citotoxicidad, se han administrado soluciones (DMSO) de los agentes quimioterapéuticos en nueve concentraciones crecientes (0,1 nM-300 μ M) en 5 líneas celulares de cáncer de mama teñidas con el marcador de superficie celular DiD (644/665 nm). Los fármacos han sido administrados sobre la superficie de los cultivos 3D para simular su difusión en el interior tumoral. Como control se han usado las células tratadas con DMSO (γ_{ctrl}). Se ha renovado la solución de los fármacos y el medio de cultivo cada 48 h. Se ha analizado la viabilidad celular mediante citometría de flujo 6 horas después de la siembra (población inicial γ_0) y tras 7 días de tratamiento con los agentes quimioterapéuticos y DMSO. Las células de cáncer de mama se han identificado como DiD+, confirmando la supervivencia celular mediante el marcador de viabilidad *Sytox Green*. Los datos se han normalizado frente a un control de microesferas de conteo (*Counting beads, Thermofisher*).

Posteriormente, se han calculado 10 parámetros de respuesta terapéutica basados en el recuento relativo de células (IC_{50} , E_{max} , AUC, EC_{50} y E_{inf}) y en el ratio de crecimiento (GR_{50} , GR_{max} , GR_{AOC} , GEC_{50} , GR_{inf}) usando la herramienta online *GR calculator* desarrollada por Hafner *et al.* (Figura 6.36.A.) (137) En la Figura 6.36.B. se muestran los cambios en todos los parámetros cuando se comparan los fármacos citostáticos y citotóxicos. Los fármacos con efectos citostáticos producen una disminución o inhibición del crecimiento de las células tumorales y de su diseminación, pero no las destruyen y no provocan una reducción del tamaño del tumor. Los fármacos citotóxicos provocan la muerte celular, impiden su división y su crecimiento y reducen el tamaño del tumor. (137)

IC_{50} es el parámetro más utilizado en la medida de la respuesta y la eficacia terapéutica y representa la concentración inhibitoria del fármaco necesaria para reducir la población celular a la mitad. EC_{50} es la concentración efectiva del fármaco que causa la mitad de la respuesta máxima. E_{max} es el efecto máximo del fármaco o el número de células vivas cuando se usa la mayor concentración del fármaco en el ensayo y AUC es el área bajo la curva de la viabilidad, que representa el efecto acumulativo del fármaco. E_{inf} indica el efecto a una concentración infinita del quimioterapéutico.

Los valores GR representan el efecto de inhibición parcial del fármaco cuando alcanza los valores GR entre 0 y 1, el efecto citostático cuando el valor GR es igual a 0 y el efecto citotóxico cuando el valor está entre 0 y -1. GR_{50} es la concentración del fármaco que reduce el ratio de crecimiento a la mitad, pero para su cálculo, es necesario

RESULTADOS

que las células estén en crecimiento exponencial ($\gamma_{\text{final}}/\gamma_0 > 2$). GEC_{50} indica la dosis de fármaco que produce la mitad del efecto máximo en el crecimiento celular y GR_{max} es el efecto máximo en el ratio de crecimiento producido por la mayor concentración ensayada del fármaco. GR_{AOC} es el área sobre la curva GR que representa la variación de la eficacia y la potencia del fármaco y GR_{inf} el efecto máximo en el ratio de crecimiento causado por el fármaco a una dosis infinita.

El recuento celular relativo (Figura 6.37.A) y los valores GR (Figura 6.37.B.) han revelado una respuesta heterogénea en todas las condiciones. Por ejemplo, el docetaxel y el paclitaxel han sido citotóxicos en cuatro líneas celulares en la curva de recuento celular relativo, mientras que se ha observado un leve efecto citostático en las células ZR-75-1. En la curva GR para el docetaxel y el paclitaxel, el efecto citostático se ha producido solo en las células MDA-MB-231. La capecitabina ha presentado un efecto citostático en las concentraciones ensayadas y la ciclofosfamida ha demostrado que las células ZR-75-1 son resistentes para todas las dosis del fármaco ensayadas. El metotrexato y el carboplatino han presentado también una respuesta heterogénea en las líneas celulares de cáncer de mama siendo MDA-MB-231 la más sensible al carboplatino y MCF7 siendo la más resistente al metotrexato. Los parámetros para la epirubicina han sido consistentes tanto en las curvas del recuento celular como en las curvas GR y han mostrado la línea MDA-MB-231 como la más resistente. Los distintos parámetros de la respuesta farmacológica (Figura 6.38.) han demostrado una elevada heterogeneidad entre las distintas líneas celulares, los fármacos e incluso entre los mismos parámetros. Los parámetros que determinan la concentración del fármaco (IC_{50} , EC_{50} , GR_{50} y GEC_{50}), la escala en el eje de ordenadas va desde 0,1 nM hasta 300 μM , mientras que en los parámetros GR_{max} y GR_{inf} están entre 1 y -1.

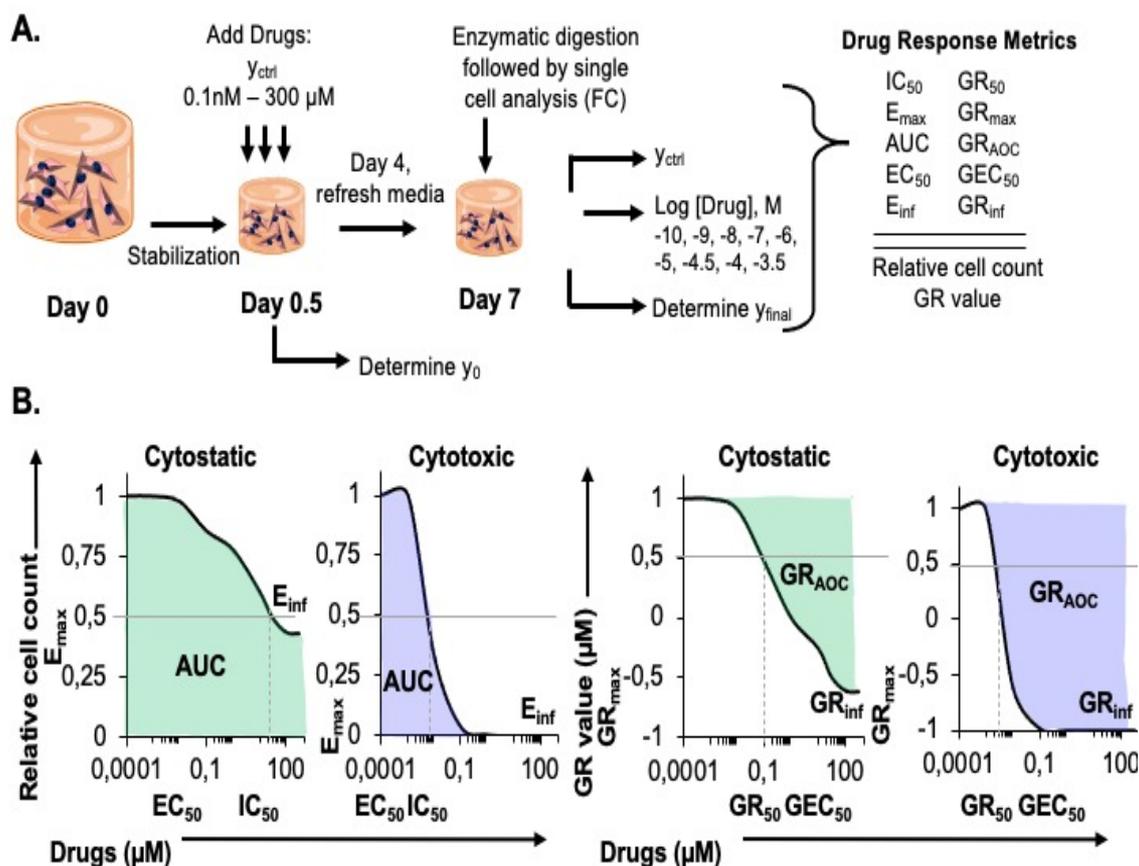


Figura 6.36. Esquema de los ensayos de citotoxicidad de los agentes quimioterapéuticos en HuP3D y la determinación de 10 parámetros de respuesta terapéutica (A) y la representación de las diferencias entre los parámetros de respuesta terapéutica entre los fármacos citotóxicos y citostáticos (B).

Los parámetros IC_{50} y EC_{50} y sus respectivas parejas de ratio de crecimiento GR_{50} y GEC_{50} han demostrado que los fármacos docetaxel, paclitaxel, epirubicina y metotrexato han sido muy efectivos a bajas dosis en las 5 líneas celulares. Todos los parámetros de la ciclofosfamida han demostrado una gran variabilidad de respuesta terapéutica en las distintas líneas celulares. E_{max} y E_{inf} indican que la línea celular ZR-75-1 es una de las líneas celulares más resistentes a todas las terapias, seguida por las células MCF7. Estos resultados confirman que existe la necesidad de usar distintos parámetros de respuesta terapéutica para predecir la eficacia terapéutica de forma precisa.

RESULTADOS

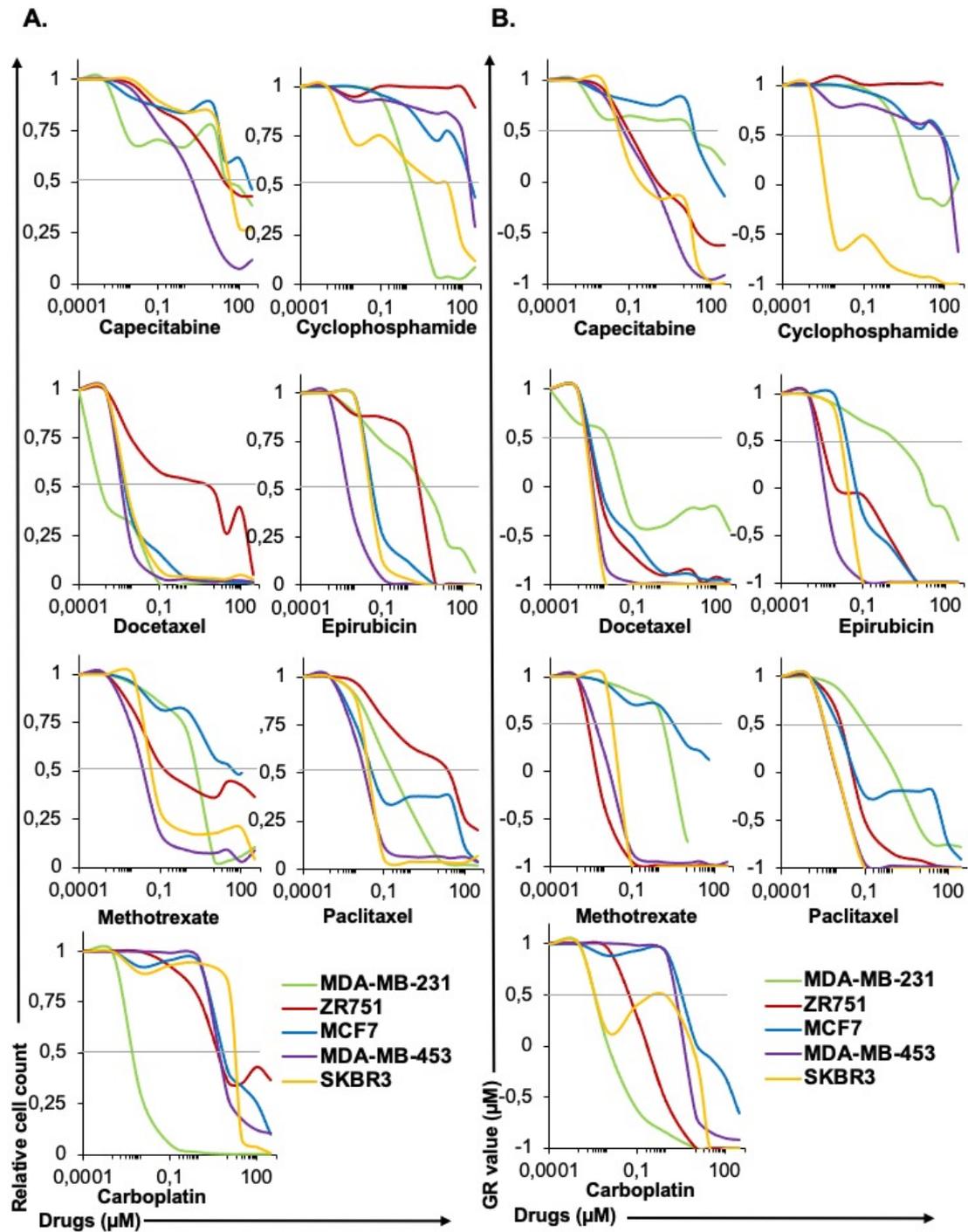


Figura 6.37. Cribado de fármacos quimioterapéuticos en los cultivos de las células de cáncer de mama en los tejidos HuP3D. Los resultados muestran el efecto de las concentraciones crecientes (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 30; 100 y 300 µM) de capecitabina, ciclofosfamida, docetaxel, epirubicina, metotrexato, paclitaxel y carboplatino mediante (A) el recuento relativo de células (media, n=4) y (B) los valores de ratio de crecimiento (GR) (media n=4).

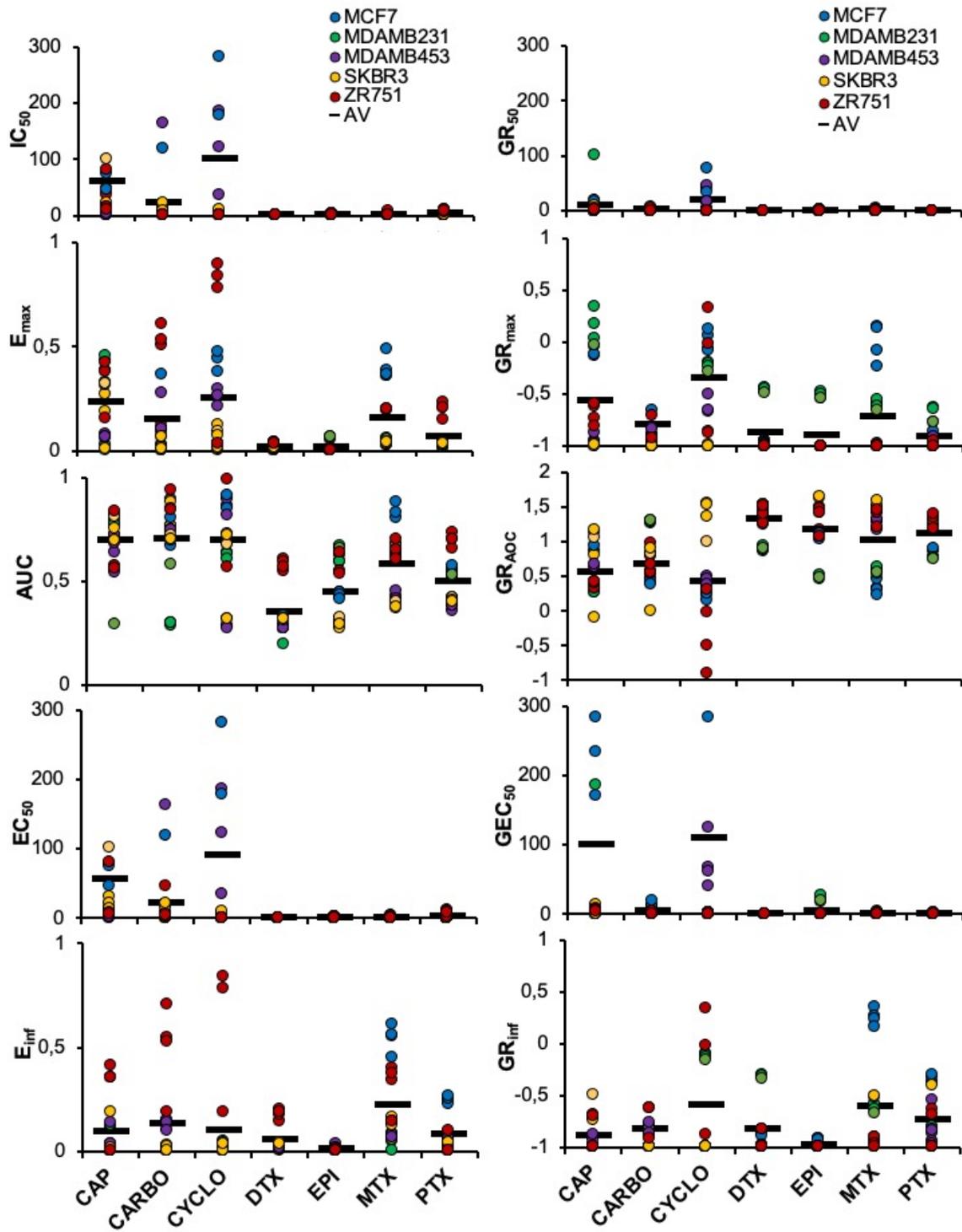


Figura 6.38. Determinación de los parámetros de respuesta terapéutica en modelos HuP3D. Los resultados muestran IC_{50} , E_{max} , AUC, EC_{50} , E_{inf} , GR_{50} , GR_{max} , GR_{AOC} , GEC_{50} , GR_{inf} en los cultivos tridimensionales de plasma humano de 5 líneas celulares de cáncer de mama ($n=4$ /línea celular) y la media de las 5 líneas celulares para capecitabina (CAP), carboplatino (CARBO), ciclofosfamida (CYCLO), docetaxel (DTX), epirubicina (EPI), metotrexato (MTX) y paclitaxel (PTX).

6.4.3. Comparación de los parámetros de respuesta terapéutica en HuP3D con otros modelos 2D, 3D y humanos

La validación de los parámetros de respuesta terapéutica obtenidos en los ensayos *in vitro*, como herramientas predictivas del tratamiento clínico efectivo en los pacientes, supondría una mejora en la selección del tratamiento más eficaz, evitando las resistencias, y permitiría una medicina más personalizada. (136)

Para comprobar el valor predictivo de los parámetros de respuesta terapéutica de nuestros ensayos en HuP3D, se han comparado con los parámetros obtenidos a partir de la búsqueda bibliográfica en modelos bidimensionales (IC_{50}), otros modelos tridimensionales (IC_{50}) y con las concentraciones efectivas en pacientes en ensayos clínicos en fase I y II que estudian la farmacocinética de los quimioterapéuticos ensayados (*steady state concentration*, C_{ss}). Se han determinado los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los modelos *in vitro* 2D y la C_{ss} y se ha observado una correlación positiva muy débil ($r=0,11$). Por otro lado, cuando se ha comparado la C_{ss} con otros modelos 3D descritos en la literatura y con el modelo HuP3D, se ha obtenido una correlación moderada ($r=0,42$) y fuerte ($r= 0,82$), respectivamente. (136) (Figura 6.39.)

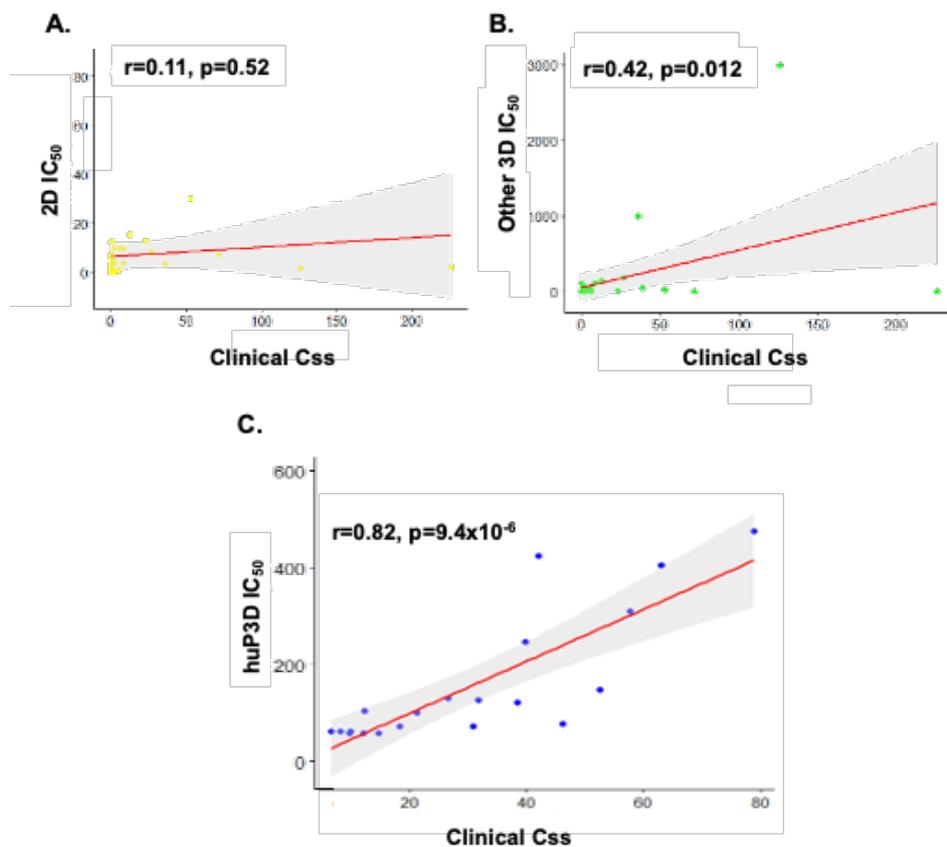


Figura 6.39. Los parámetros de la respuesta terapéutica de los cultivos 3D de plasma humano correlacionan mejor que otros modelos *in vitro* con los datos clínicos. (A) Correlación de Pearson (r) y los valores de significancia (p) de (A) IC_{50} de literatura de modelos 2D con C_{ss} ; (B) IC_{50} de otros modelos 3D con C_{ss} , (iii) IC_{50} de nuestro modelo HuP3D con C_{ss} .

Cuando se han comparado los coeficientes de correlación de Pearson de los 10 parámetros obtenidos en HuP3D con C_{ss}, se ha demostrado una buena correlación, revelando el potencial de algunos parámetros de nuestros ensayos en HuP3D para evaluar las respuestas terapéuticas efectivas relevantes para los pacientes. Además, se ha visto que nuestro modelo 3D ha correlacionado moderadamente con otros modelos 3D y poco con los parámetros obtenidos en 2D. (136)

6.4.4. Transporte dirigido de las nanopartículas HA-PEI-NIR-780-βCD-DOX en los cultivos HuP3D

A continuación, se ha ensayado la citotoxicidad y la internalización de las nanopartículas PEI-NIR-780 recubiertas con el ácido hialurónico como molécula directora hacia los receptores CD44 en cultivos tridimensionales HuP3D de las células MDA-MB-231.

Para los ensayos de citotoxicidad (Figura 6.40.A) y de entrada de las nanopartículas (Figura 6.40.B), las células MDA-MB-231 se han incubado en cultivos bidimensionales y tridimensionales HuP3D con las nanopartículas PEI-NIR-780 (4, 8 y 12 μM) y se ha medido la supervivencia celular a las 48 horas y la entrada del fluoróforo NIR-780 a las 24 horas mediante citometría de flujo.

Se ha observado, que la citotoxicidad y la entrada de las nanopartículas ha sido mucho mayor en los cultivos 2D, ya que las células están en contacto de forma directa y uniforme con las nanopartículas, mientras que, en los cultivos tridimensionales, al igual que ocurre en los tumores *in vivo*, las nanopartículas tienen que ir penetrando en la estructura tridimensional generando gradientes de concentración del compuesto. (44,45,66) Así, podemos concluir que los tejidos tridimensionales del plasma humano mimetizan mejor el microambiente tumoral y permiten predecir de una forma más eficaz la dosis efectiva para el tratamiento antitumoral *in vivo*.

Asimismo, se han realizado ensayos de internalización de la nanopartícula (8 μM) decorada con 7,5% (carga/masa) de HA de 8-15 kDa, 10-50 kDa y 40-50 kDa y se ha medido la internalización del fluoróforo NIR-780 por citometría de flujo en las células CD44+ (MDA-MB-231) cultivadas en HuP3D (Figura 6.40.C). Se ha observado, al igual que en los cultivos bidimensionales, que el ácido hialurónico de 40-50 kDa produce un aumento significativo en la entrada de la nanopartícula hacia las células que sobreexpresan sus receptores específicos y se ha confirmado que nuestras nanopartículas permiten un transporte dirigido y un diagnóstico específico tanto en los modelos bidimensionales y tridimensionales como *in vivo*.

RESULTADOS

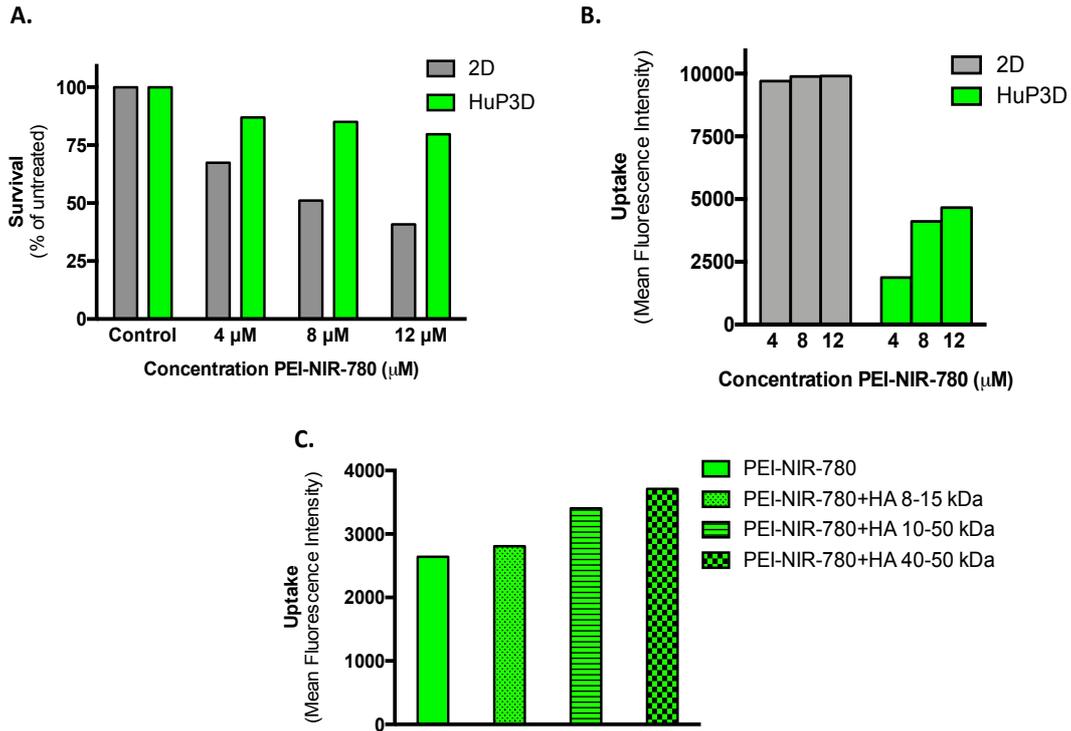


Figura 6.40. Citotoxicidad y transporte dirigido de las nanopartículas PEI-NIR-780 hacia las células del cáncer de mama CD44+ cultivadas en HuP3D. Células MDA-MB-231 (CD44+) cultivadas en HuP3D han sido incubadas con PEI-NIR-780 de 4, 8 y 12 μM y se ha medido su citotoxicidad (A) y la entrada específica de la nanopartícula mediante la sonda NIR-780 (B) por citometría de flujo. Posteriormente, se ha decorado la superficie del PEI-NIR-780 (8 μM) con 7,5% (masa/carga) del ácido hialurónico de 8-15 kDa, 10-50 kDa y 40-50 kDa y se ha medido la internalización del fluoróforo NIR-780 (C).

Para comprobar el transporte específico de DOX oculta en las nanopartículas HA-PEI-NIR-780- βCD -DOX hacia las células CD44+ cultivadas en los tejidos tridimensionales, se han incubado las células MDA-MB-231 marcadas con DiO (ThermoFisher) con 32 μM de DOX libre u oculta en las nanopartículas PEI-NIR-780- βCD -DOX decoradas con 7,5% de HA de 40-50 kDa durante 48 horas y se han tomado imágenes de fluorescencia de DOX, la sonda NIR-780 de la nanopartícula y de las células DiO+ por microscopía confocal (Figura 6.41.). Se ha observado una entrada específica hacia las células MDA-MB-231 y, además, una disminución de la población celular confirmando que las nanopartículas permiten un transporte dirigido del agente quimioterapéutico hacia las células tumorales CD44+.

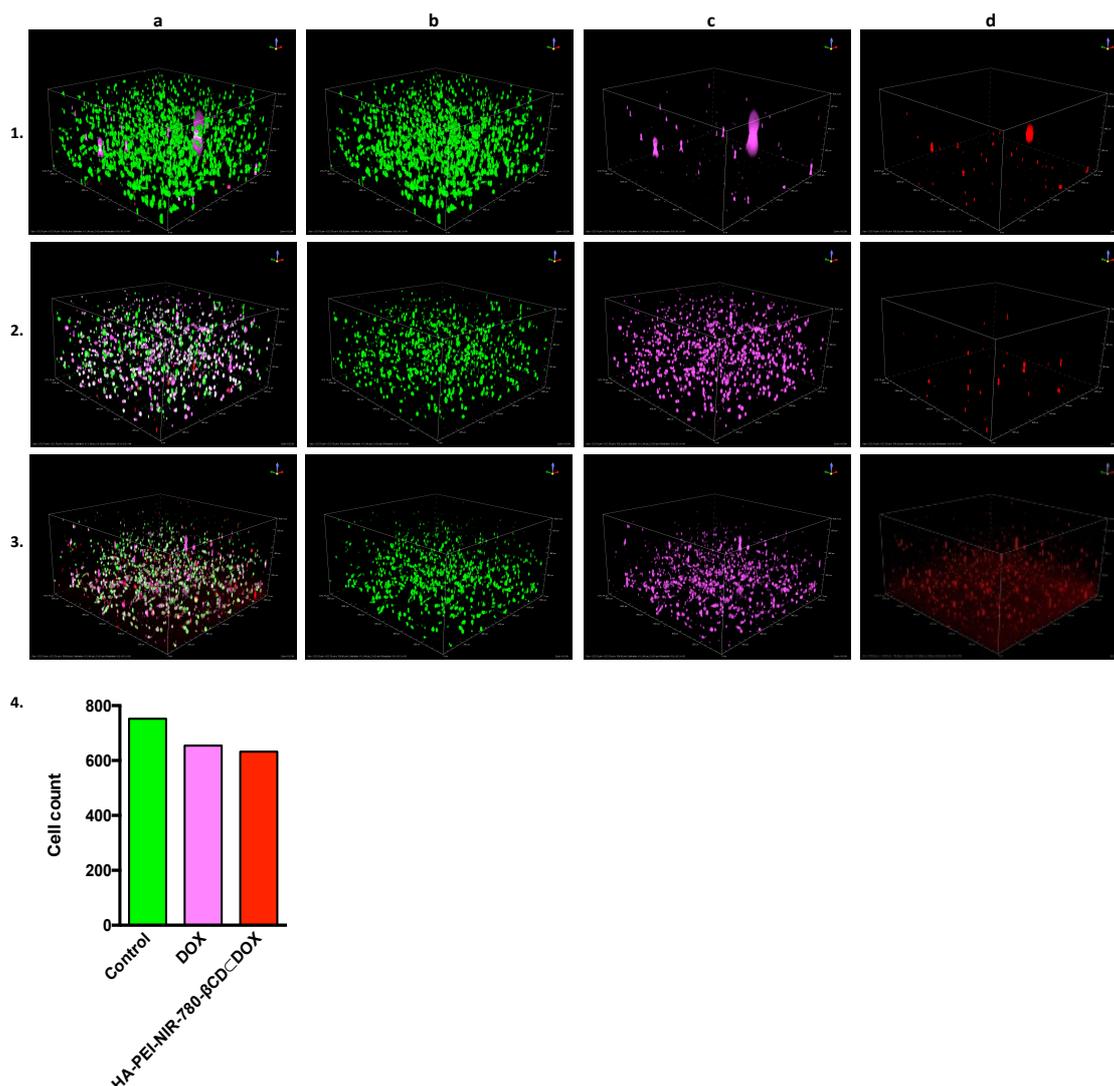


Figura 6.41. Imágenes de microscopía confocal de los tejidos tridimensionales del cáncer de mama triple negativo. Células MDA-MB-231 marcadas con DiO (ThermoFisher) (1) han sido tratadas con $32 \mu\text{M}$ de DOX libre (2) o la concentración equivalente de DOX ocluida en las nanopartículas HA-PEI-NIR-780- βCD -DOX (3) y se muestran las imágenes de los canales (a) combinados, (b) DiO, (c) doxorubicina y (d) NIR-780. Además, se ha realizado el recuento de la población celular marcada con DiO antes y después del tratamiento con DOX y HA-PEI-NIR-780- βCD -DOX (4).

6.5. Carbohidratos como moléculas directoras hacia distintos tipos de tumores

6.5.1. Sondas NIR-783 glico-conjugadas

La conjugación de los carbohidratos (p.ej. lactosa, glucosa, manosa, N-acetilglucosamina) con nanopartículas, agentes quimioterapéuticos o sondas fluorescentes permite un transporte dirigido hacia las células tumorales que sobreexpresan sus receptores específicos, como son los transportadores GLUT y las lectinas tipo C (las asialoglucoproteínas y las galectinas). (14)

Los transportadores GLUT son proteínas de membrana plasmática encargadas de la captación de glucosa para el aporte de energía en las células. Las células tumorales

RESULTADOS

presentan un metabolismo de glucosa aumentado debido al efecto Warburg que consiste en una glucólisis anaerobia aún en presencia de oxígeno con obtención de solamente 2 moléculas del ATP, por lo que necesitan un mayor aporte de glucosa en comparación con células sanas. (105,106) Las asialoglucoproteínas son un tipo de lectinas sobre-expresadas en la membrana de los hepatocarcinomas y sus sustratos naturales son la galactosa, la lactosa, la glucosa y la N-acetilglucosamina. (109,110) Las galectinas presentan un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) con capacidad de unirse a los glicanos que contienen lactosa y N-acetil-lactosamina. (114,115)

La lactosa se une tanto a las asialoglucoproteínas (97) como a los receptores de galectina-3, sobre-expresados en numerosos tumores (cáncer colorrectal, gástrico, cáncer de pulmón, cabeza y cuello, páncreas, melanoma, endometrio, tiroides, hígado, mama, vejiga, leucemias y linfomas). (98)

La manosa se une a sus receptores específicos CD206, un tipo de C- lectinas, sobre-expresados en los macrófagos, las células dendríticas, los fibroblastos y en el cáncer de mama. (99–102)

La glucosa y la N-acetilglucosamina (GlcNAc) tienen la capacidad de unirse específicamente a las lectinas sobre-expresadas en el cáncer de mama y en el hepatocarcinoma (103,104) y a los receptores GLUT1 sobre-expresados en los tumores de cerebro, cervix uterino, mama, colon, hígado y pulmón. (104,105)

Por otra parte, como se ha mencionado previamente, las sondas fluorescentes en el infrarrojo cercano (NIR) permiten el diagnóstico y la monitorización en tiempo real tanto *in vitro* como *in vivo*, evitan la autofluorescencia de las muestras y presentan la capacidad inherente de dirigirse específicamente hacia los tumores. (15,16)

Teniendo esto en mente, en el grupo del Dr. Santoyo se han sintetizado unas moléculas que consisten en las sondas fluorescentes NIR-783 conjugadas con distintos azúcares (manosa (Man-NIR-783), lactosa (Lac-NIR-783), glucosa (Glc-NIR-783) y N-acetilglucosamina (GlcNAc-NIR-783)) mediante un enlace de vinilsulfona, para permitir un diagnóstico específico y transporte dirigido hacia sus receptores sobre-expresados en numerosos tipos de cáncer.

Se han realizado ensayos de internalización celular con 100 μ M de sondas NIR-783, Man-NIR-783, Lac-NIR-783, Glc-NIR-783 y GlcNAc-NIR-783. Para ello, las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 como tipo de células tumorales con el metabolismo aumentado de glucosa, las células de cáncer colorrectal CT26.WT que sobre-expresan los receptores de galectina-3 y las células epiteliales no tumorales HEK-293 han sido incubadas durante 4 horas con los distintos compuestos. Se ha medido la fluorescencia de la sonda NIR-783 con el máximo de excitación a 690 nm y el máximo de emisión a 783 nm en el lisado celular y se ha normalizado el valor por la concentración de proteínas en cada muestra (Figura 6.42.). Se ha observado una entrada significativamente mayor del compuesto Glc-NIR-783 en las células MDA-MB-231, probablemente debido al efecto Warburg y la sobre-expresión de los receptores GLUT1 en este tipo celular. Asimismo, se ha comprobado que la sonda fluorescente NIR-783 conjugada con la lactosa se internaliza de forma preferente en las células de cáncer colorrectal que sobre-expresa sus receptores específicos de galectina-3. En las células control (HEK-293) también se ha observado un aumento en la entrada de las sondas

glico-conjugadas con respecto a NIR-783, lo que puede ser debido a que estos compuestos pueden entrar en el interior celular al ser reconocido el NIR-783 por los transportadores de aniones orgánicos (OATPs) o a través de los receptores GLUT que reconocen específicamente los carbohidratos de estos glico-conjugados.

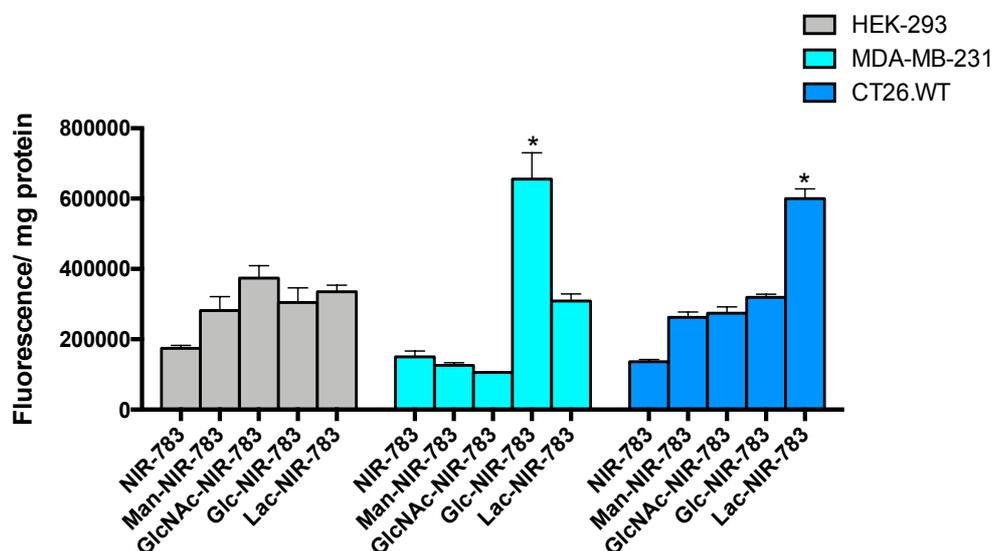


Figura 6.42. Internalización de las sondas NIR-783 glico-conjugadas. Células MDA-MB-231, CT26.WT y HEK-293 han sido incubadas durante 4 horas con 100 μ M de NIR-783 o NIR-783 conjugado con Manosa (Man), N-acetil-glucosamina (GlcNac), Glucosa (Glc) y Lactosa (Lac). Se ha determinado la fluorescencia en el lisado celular a 690/783 nm y se ha normalizado por la concentración de proteínas en cada muestra. Los resultados se presentan como media \pm SEM (n=4). *p<0.05 vs células HEK-293.

6.5.2. Carbon Dots glico-conjugados para el transporte dirigido hacia el hepatocarcinoma y el cáncer de colon

Los Carbon Dots (CNDs) son nanopartículas orgánicas esféricas con un tamaño menor de 10 nm que están cobrando un creciente interés en la investigación biomédica debido a sus propiedades ópticas únicas modificables, baja toxicidad, elevada biocompatibilidad, buena solubilidad en agua y alta fotoestabilidad. (40,73)

Además, los CNDs presentan una fácil síntesis basada en dos estrategias: *top-down* ("desde arriba hacia abajo") o *bottom-up* ("desde abajo hacia arriba"), utilizando diferentes fuentes de carbono como son glucosa, ácido cítrico, quitosán o zumo de plátano. (39,73) La síntesis *bottom-up* consiste en la pirolisis directa, la carbonización electroquímica, el tratamiento hidrotermal o la irradiación en el microondas de la fuente de carbono y, a diferencia de la síntesis *top-down*, permite un control preciso de la morfología y la distribución del tamaño de la nanopartícula y de la modificación y funcionalización de su superficie. (73)

El uso del ácido cítrico (CA) como fuente de carbono es muy popular debido a su bajo coste y tiempo de síntesis y se ha demostrado que su descomposición térmica da lugar a diversos compuestos ácidos anhidros. (39)

Las propiedades fisicoquímicas y fluorescentes de los CNDs se pueden ajustar mediante la modificación de su superficie y, además, su recubrimiento con distintos

grupos funcionales permite mejorar la eficacia en el transporte dirigido de los fármacos y para la visualización intracelular. (39,40,73)

El rendimiento cuántico de los carbon dots sin modificaciones en su superficie es menor del 10%, por lo que no son una herramienta útil para el transporte de fármacos *in vivo*. En los últimos años, se han desarrollado CNDs recubiertos con moléculas directoras como el ácido hialurónico que presentan especificidad en las células tumorales que sobre-expresan sus receptores específicos CD44. Asimismo, se han desarrollado CNDs catiónicos para el transporte del material genético o unidos a ciclodextrinas para un tratamiento específico y dirigido, una liberación del fármaco controlada y la monitorización en tiempo real. (73)

En nuestro laboratorio disponemos de CNDs con grupos funcionales ácidos anhídros, diseñados y realizados por el grupo de investigación del profesor Santoyo, cuya superficie se ha recubierto con distintos azúcares (manosa, lactosa y N-acetilglucosamina). Estos nanomateriales glico-conjugados son herramientas para estudiar las interacciones entre los carbohidratos y las lectinas sobre-expresadas en numerosos tipos de cáncer. (39) Los CNDs recubiertos por los carbohidratos podrían ser utilizados como sondas fluorescentes híbridas, que presentan las propiedades ópticas únicas de los CNDs con la actividad biológica y la especificidad de los carbohidratos que actúan como moléculas directoras.

6.5.3. Estructura y síntesis de los CNDs glico-conjugados

Los CNDs anhídros han sido sintetizados en el laboratorio del profesor Santoyo, mediante pirolisis térmica de ácido cítrico y posteriormente, se han formado los ácidos anhídros de los Carbon Dots (AA-CNDs (Na)) mediante su incubación con NaOH. Su superficie se ha modificado con grupos alquino (Ak-CNDs), azida (Az-CNDs) o vinilsulfona (VS-CNDs) para posibilitar su recubrimiento con carbohidratos como moléculas directoras (Figura 6.43.).

Los carbohidratos lactosa (Lac), manosa (Man) y N-acetilglucosamina (GlcNAc) han sido funcionalizados con los grupos azida, alquino o tiol para sintetizar los CNDs glico-conjugados (Figura 6.44.)

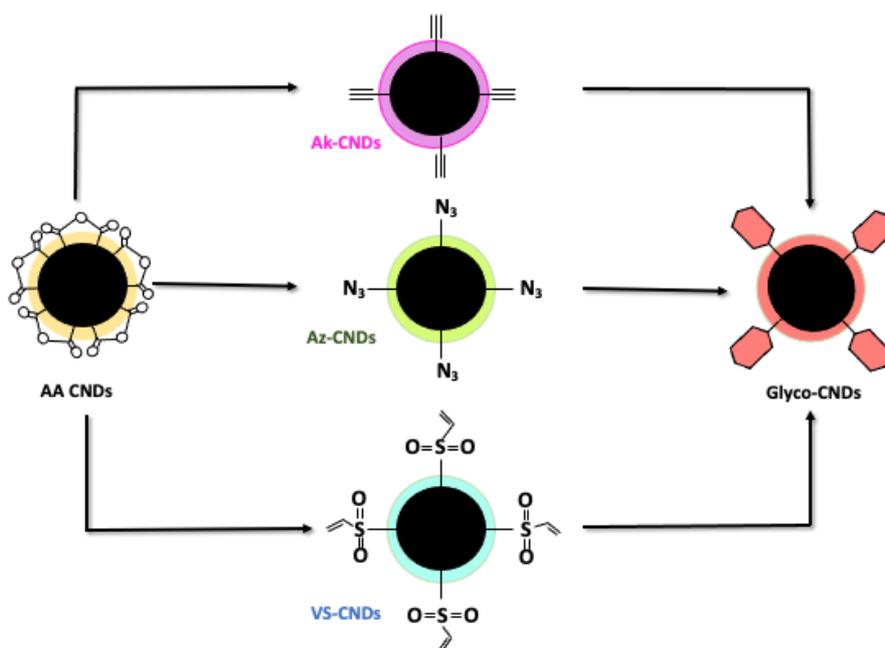


Figura 6.43. Síntesis de los CNDs glico-conjugados. Los CNDs obtenidos mediante pirólisis térmica del ácido cítrico han sido tratados con NaOH 1 M para convertirlos en ácidos anhídros (AA CNDs), cuya superficie ha sido modificada con grupos alquino (Ak-CNDs), azida (Az-CNDs) y vinilsulfona (VS-CNDs). Además, la superficie de estas nanopartículas ha sido funcionalizada con distintos carbohidratos (Glyco-CNDs) para estudiar sus interacciones con las lectinas.

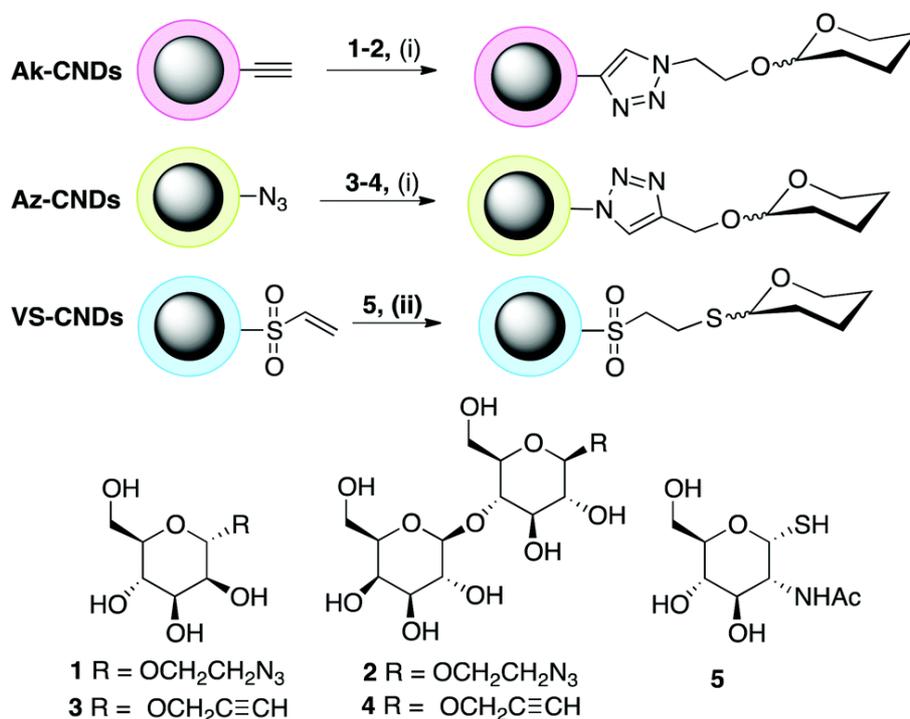


Figura 6.44. Estructura química de los CNDs glico-conjugados. Los carbohidratos manosa, lactosa y N-acetilglucosamina (estructuras de izq. a dcha.) han sido modificados con grupos azidas (1,2), alquinos (3,4) o tioles (5) y se han unido a los CNDs.

6.5.4. Citotoxicidad de los CNDs glico-conjugados

Los CNDs presentan una baja toxicidad y una buena biocompatibilidad, ya que, comparados con el resto de nanopartículas organometálicas, no presentan metales pesados en su estructura, lo que favorece su empleo en aplicaciones biológicas. (74)

Se ha evaluado la citotoxicidad de los CNDs glico-conjugados en las células CHO-k1. Las células han sido incubadas durante 24 h con 0, 50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ de las nanopartículas. Se ha determinado la viabilidad celular mediante el ensayo MTT y se ha representado como el porcentaje con respecto a las células no tratadas. (Figura 6.45.).

Se ha observado una baja citotoxicidad para los CNDs funcionalizados con la azida y recubiertos por la manosa y la lactosa modificadas con los grupos alquino (Az-CND@Man-Ak y Az-CND@Lac-Ak) y para el CND funcionalizado con la vinilsulfona unido a la N-acetilglucosamina mediante su grupo tiol (VS-CND@GlcNAc-SH). Asimismo, en el resto de compuestos se ha observado una citotoxicidad similar al compuesto base (AA-CND (Na)) en las concentraciones ensayadas.

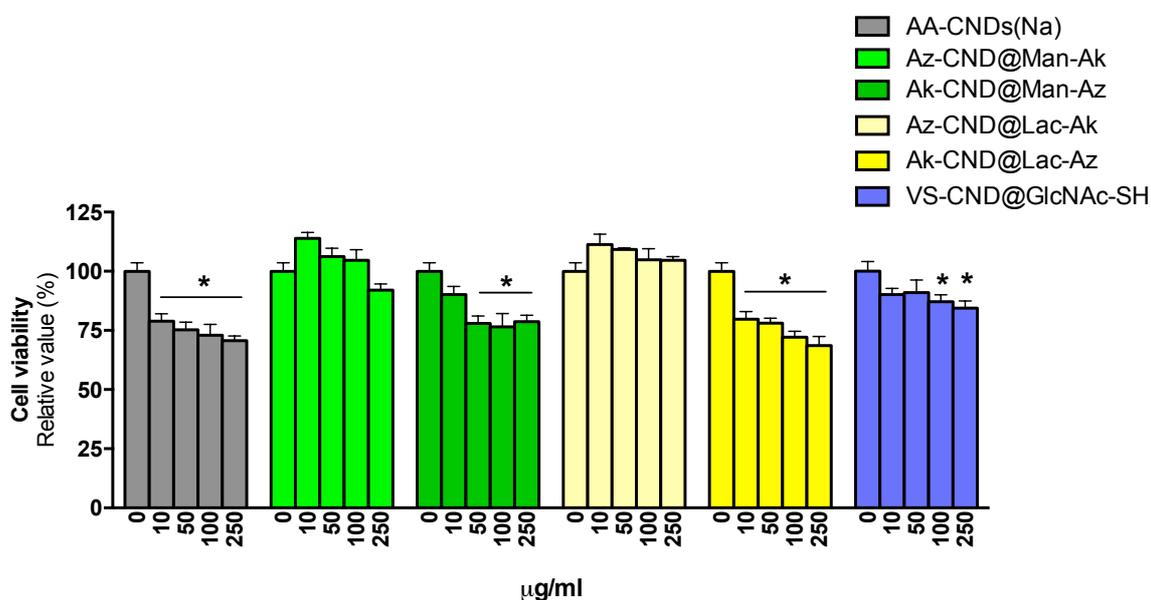


Figura 6.45. Citotoxicidad de los CNDs glico-conjugados. Se ha evaluado la viabilidad celular mediante el ensayo MTT en las células CHO-k1 incubadas durante 24 h con 0, 50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ de los CNDs. Los resultados se presentan como el porcentaje de la viabilidad con respecto a las células no tratadas a las que se les ha asignado el valor 100%. Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n=6$), * $p < 0,05$ vs AA-CNDs(Na).

Teniendo en cuenta las concentraciones citotóxicas, se ha realizado un ensayo hemolítico en sangre humana. Para ello, se han aislado los hematíes y se han incubado a temperatura ambiente durante 1, 3, 6 y 24 horas en presencia de 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de CNDs. Pasado el tiempo, se ha centrifugado y se ha medido la fluorescencia en el sobrenadante a 540 nm. Se han utilizado los hematíes en presencia de agua como control positivo de hemólisis y en presencia de PBS 1X como control negativo. (Figura 6.46.)

Se ha observado que el compuesto base cuya superficie no se ha recubierto con los carbohidratos (AA-CNDs(Na)) y los compuestos Az-CND@Man-Ak y Ak-CND@Man-Az presentan una baja capacidad de hemólisis en sangre humana cuando se utilizan a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 24 horas y por lo tanto serían los más adecuados para su uso *in vivo*.

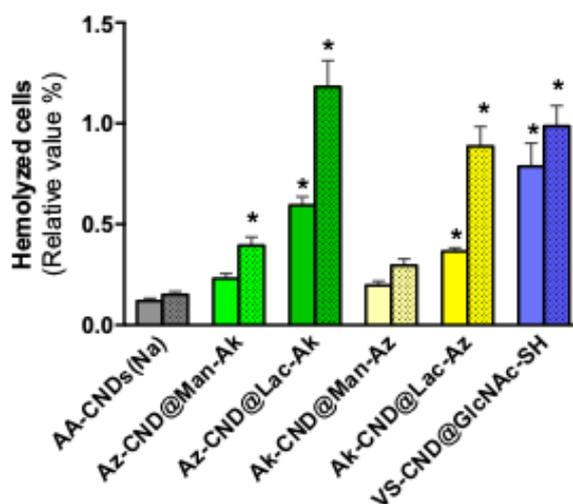


Figura 6.46. Ensayo hemolítico de los CNDs. Hematíes aislados a partir de la sangre humana han sido incubados con 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CNDs durante 24 h a temperatura ambiente y se ha medido la fluorescencia en el sobrenadante a 540 nm. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=6). * $p < 0,05$ vs células no tratadas.

6.5.5. Internalización celular de los CNDs glico-conjugados

Los Carbon Dots tienen propiedades ópticas únicas y su fluorescencia y propiedades de excitación son modificables, lo que permite su empleo en numerosas aplicaciones como es el diagnóstico, la monitorización *in vivo* en tiempo real, la terapia fotodinámica, la fotocatalisis, los biosensores y en los dispositivos emisores de luz. (40,73) Además, su funcionalización con moléculas directoras permite aportar especificidad en el transporte y el diagnóstico en los tejidos que sobre-expresan las dianas moleculares de interés. (73)

Para comprobar la entrada específica de CNDs funcionalizados con carbohidratos en las células que sobre-expresan sus receptores específicos, se han realizado ensayos de internalización celular mediante microscopía confocal. Se han incubado las células con 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de distintos CNDs durante 6 horas, se han fijado y se han adquirido imágenes de 1024x1024 píxeles (Figura 6.47.). Se han utilizado las células RAW264.7 que sobre-expresan los receptores CD206 para la manosa (99,102), las células CT26.WT que sobre-expresan los receptores de galectina-3 para la lactosa (166) y las células HeLa como modelo de células tumorales con el metabolismo de carbohidratos aumentado y que sobre-expresan los receptores GLUT (167) para la N-acetil glucosamina que debido a la presencia de la molécula de glucosa en su estructura permite dirigir las nanopartículas hacia los receptores GLUT1. (104)

Para cuantificar los niveles de entrada de los CNDs en el interior celular, se ha medido la fluorescencia en el lisado celular a 326(Ex)/454(Em) nm y se ha normalizado con la concentración de proteínas en cada muestra.

RESULTADOS

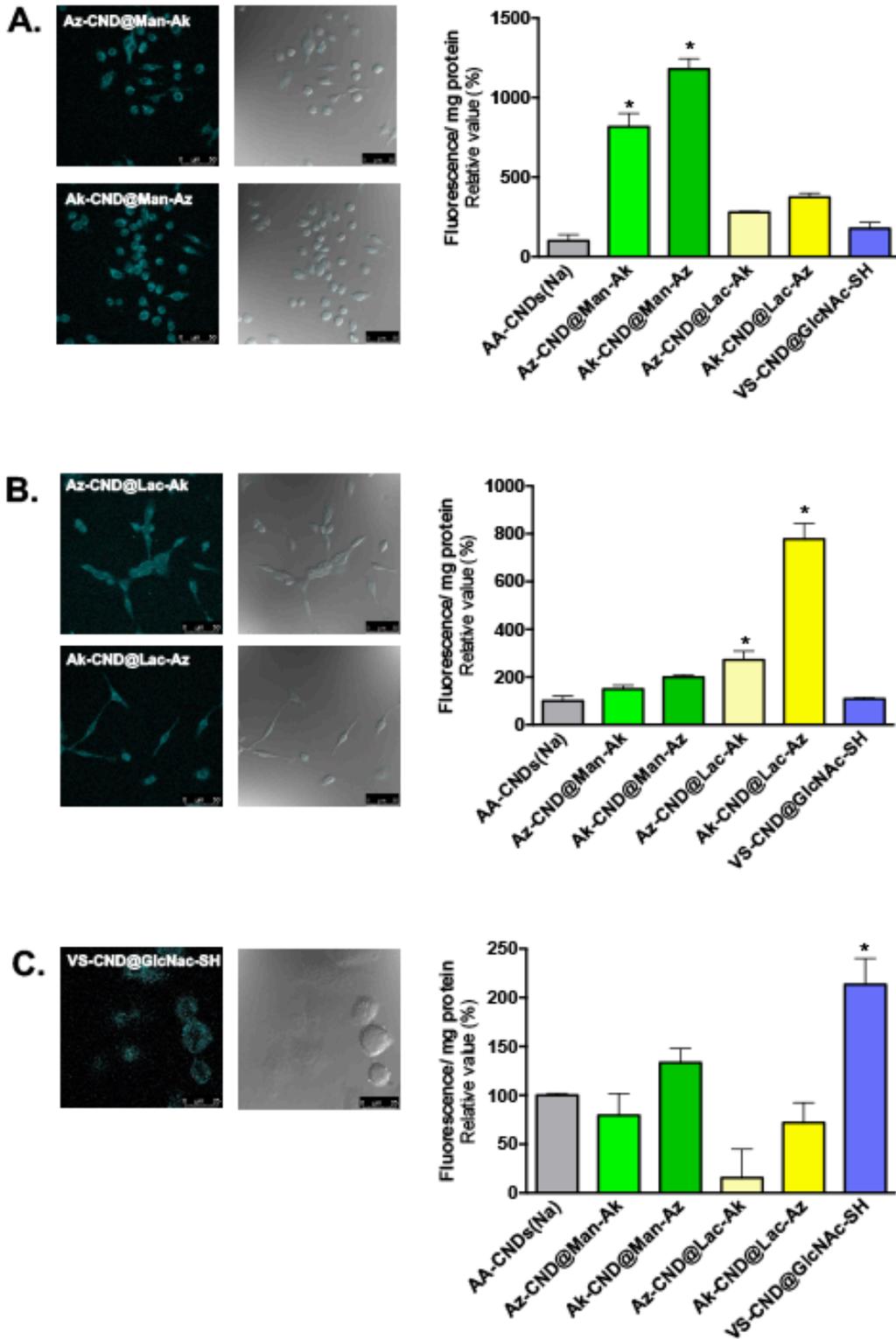


Figura 6.47. Internalización celular de los CNDs. Células (A) RAW264.7, (B) CT26.WT y (C) HeLa se han incubado con 250 $\mu\text{g/ml}$ de compuestos CNDs durante 6 horas y se ha determinado la internalización celular mediante microscopía confocal (imágenes representativas de la proyección máxima y Nomarsky). Para cuantificar la entrada en el interior celular, se ha medido la fluorescencia en el lisado celular y se ha normalizado con la concentración de proteínas en cada muestra. Los resultados se presentan como $\text{media} \pm \text{SEM}$ ($n=6$). * $p < 0,05$ vs AA-CNDs(Na).

Los resultados se han comparado con el compuesto base cuya superficie no se ha recubierto con los carbohidratos (AA-CNDs(Na)) y se ha observado una entrada específica significativamente más alta de los CNDs recubiertos con manosa (Az-CND@Man-Ak y Ak-CND@Man-Az) en las células RAW264.7 (Figura 6.47.A), de los CNDs recubiertos con lactosa (Az-CND@Lac-Ak y Ak-CND@Lac-Az) en las células CT26.WT (Figura 6.47.B) y los CNDs recubiertos con GlcNac en las células HeLa (Figura 6.47.C). Por tanto, se ha demostrado la capacidad de los CNDs glico-conjugados de dirigirse específicamente hacia sus dianas moleculares.

7.DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

A pesar de los grandes avances en las técnicas de diagnóstico y en el tratamiento, el cáncer sigue siendo la segunda causa de la muerte a nivel mundial, provocando un gran impacto socio-económico sobre todo en los países desarrollados. La Organización Mundial de la Salud espera un incremento en la incidencia y la mortalidad de cáncer para la próxima década, con 22 millones de nuevos casos y 13 millones de muertes para el año 2030. Las principales causas del aumento en la mortalidad son la falta de diagnóstico precoz debido a los síntomas leves iniciales en muchos tipos de cáncer, las recurrencias causadas por las resistencias a los tratamientos disponibles y la formación de metástasis. Actualmente, la respuesta terapéutica al tratamiento antitumoral se evalúa principalmente midiendo la reducción del tamaño del tumor a partir de imágenes no invasivas. (58) Así, las técnicas de diagnóstico utilizadas en la práctica clínica (rayos X, RMN, tomografía computerizada, ultrasonidos, etc.) permiten obtener información estructural y funcional de la patología. (168) Sin embargo, es importante la visualización a nivel molecular para conocer los niveles de expresión génica y los procesos moleculares involucrados en el desarrollo y la progresión del cáncer y en la respuesta al tratamiento que tienen lugar en las células y los tejidos. (2,3)

En los últimos años, la fluorescencia está cobrando un creciente interés en el diagnóstico por imagen y la monitorización del transporte de fármacos o genes guiado por imagen. (169,170) Entre las tecnologías fluorescentes, la fluorescencia en el infrarrojo cercano (700-1000 nm) presenta numerosas ventajas al ser una radiación no ionizante con una baja autofluorescencia de los tejidos, que disminuye la interferencia del fondo. Asimismo, permite un diagnóstico no invasivo y sensible y mejora la penetración en la profundidad del tejido comparando con el resto de técnicas de imagen. Recientemente, se han desarrollado las sondas de cianina de heptametina, como es la sonda NIR-780, que presentan una capacidad inherente de transporte dirigido hacia las células tumorales, ausente en otras sondas. (15,16)

Además, la investigación se centra actualmente en el desarrollo de nuevas estrategias basadas en la nanomedicina y en el desarrollo de agentes teragnósticos para permitir simultáneamente el diagnóstico y el tratamiento específicos, precisos y personalizados, con el objetivo de evitar los efectos secundarios de la quimioterapia y mejorar la eficacia terapéutica. Los agentes teragnósticos se basan en una nanopartícula cargada con un agente quimioterapéutico o con material genético para la terapia génica, unida a un agente de diagnóstico (p.ej. sondas fluorescentes) que permite monitorizar la eficacia terapéutica y la liberación de los fármacos antitumorales o de los genes y su localización *in vivo* en tiempo real de forma no invasiva. Asimismo, los agentes teragnósticos pueden incluir moléculas directoras que permiten su transporte dirigido y específico hacia las dianas moleculares sobre-expresadas en las células tumorales, evitando su acción inespecífica en el resto de tejidos. Hasta ahora, se han desarrollado agentes teragnósticos con numerosos tipos de moléculas directoras como son anticuerpos monoclonales, proteínas o péptidos, material genético (aptámeros), pequeñas moléculas (bifosfonatos), polímeros (ácido hialurónico), etc. (31,168,171)

Sin embargo, solo unos pocos medicamentos basados en nanopartículas han sido aprobados por la FDA para su uso clínico, como son por ejemplo Doxil[®] (liposomas cargados con doxorubicina), DaunoXome[®] (liposomas con daunorubicina), Abraxane[®]

DISCUSIÓN

(una nanopartícula proteica con paclitaxel) y Marqibo® (liposomas con vincristina). Estas nanopartículas carecen de moléculas directoras o agentes de diagnóstico y por tanto es necesario el desarrollo de nuevos agentes teragnósticos que tengan un impacto significativo en la tasa de supervivencia en los pacientes oncológicos. (171)

Por otra parte, en la terapia génica, que consiste en la transfección de las células diana con el material genético de interés (DNA, miRNA, siRNA, etc.), es necesario el desarrollo de nuevos vectores de transfección específicos y eficaces. Mientras que los vectores virales tienen una alta eficiencia de transfección, presentan problemas asociados con inmunogenicidad, carcinogénesis y dificultad de preparación a gran escala, a diferencia de los agentes químicos basados en polímeros o lípidos catiónicos que presentan una baja toxicidad y permiten transfección tanto *in vivo* como *in vitro*. (9,26)

La polietilenimina (PEI) es un polímero catiónico con una elevada eficiencia de transfección gracias a la presencia de numerosos grupos amino en su estructura, que permiten establecer interacciones electrostáticas con las cargas negativas del DNA. Es relativamente fácil su funcionalización con moléculas directoras mediante la incorporación de ligandos como transferrina, folato, carbohidratos, anticuerpos, proteínas y péptidos que permiten el transporte dirigido específico hacia las células tumorales. (14,140). Por último, tiene una capacidad inherente de actuar como un tampón lo que favorece su liberación de los endosomas tardíos (efecto denominado "esponja de protones"). (7,29,172)

Por lo tanto, en la presente tesis hemos desarrollado nuevos agentes teragnósticos basados en la unión de la polietilenimina a las sondas NIR-780 (PEI-NIR-780) para la detección y el transporte dirigido con el objetivo de obtener vectores de transfección teragnósticos multifuncionales.

La eficiencia de transfección y la citotoxicidad de los reactivos de transfección basados en PEI, dependen del peso molecular del polímero, la densidad de carga y el ratio N/P entre PEI y DNA. Es importante encontrar la combinación adecuada de PEI con el DNA para diseñar vectores de transfección eficaces y de baja toxicidad. (14,141,142) En nuestros ensayos hemos seleccionado PEI de 2kDa ramificado debido a que tiene un perfil bajo de citotoxicidad y mejor capacidad de unión al DNA que PEI lineal. Además, la sonda NIR-780 presenta la capacidad inherente de transporte dirigido hacia las células tumorales, buen rendimiento cuántico, baja señal de fondo y es foto-estable. Para unir la sonda NIR-780 a la polietilenimina se ha usado el enlace de vinilsulfona (vs). Se ha descrito previamente que el marcaje de biomoléculas con NIR-vs requiere síntesis complejas que implican muchas etapas. Sin embargo, las nanopartículas usadas en esta tesis doctoral se han formado mediante la mezcla directa de los componentes, obteniendo PEI-NIR-780 con un buen rendimiento mediante la química "click". (140) Estos reactivos han sido sintetizados por el grupo de investigación del profesor Santoyo (Departamento de Química Orgánica, Universidad de Granada).

El éxito de la terapia génica consiste en el transporte del DNA a través de las barreras fisiológicas hasta llegar al núcleo celular para que pueda expresarse de forma eficaz. Por tanto, el vector de transfección debe formar uniones estables con el material genético y evitar la acción de las DNAsas. (120) En los ensayos preliminares, hemos demostrado que PEI unido a NIR-780 presenta una buena capacidad de unión al DNA,

incluso mejor que PEI de 25 kDa, lo que se debe probablemente a que la sonda NIR-780 pueda establecer enlaces adicionales con las bases nitrogenadas del DNA. Estas nanopartículas protegen el material genético de la acción de las DNAsas, por lo que sirven para transportar el DNA hacia el núcleo celular evitando su degradación precoz. Además, no son tóxicas en los ratios N/P normalmente utilizados en los ensayos de transfección, aunque el carácter hidrofóbico de la sonda NIR-780 influye en la citotoxicidad de las nanopartículas PEI-NIR-780 probablemente debido a que, al acumularse en las mitocondrias, aumentaría la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y desestabilizaría la membrana mitocondrial. (16) Asimismo, la sonda NIR-780 aumenta la eficiencia de transfección probablemente gracias a su carácter lipofílico que favorece su paso a través de las membranas celulares, alcanzando unos niveles de transfección 2-3 veces más altos que el reactivo comercial, Lipofectamina 2000.

En nuestro grupo de investigación, se había demostrado previamente que la internalización de las nanopartículas PEI-NIR ocurre a través de endocitosis dependiente de caveolas. (140) Sin embargo, aunque estos vectores presentan buenos niveles de transfección, carecen de especificidad. Por tanto, su conjugación con bio-ligandos para favorecer el transporte dirigido del material genético mediado por receptores puede ser una solución para conseguir esta especificidad. En esta tesis hemos incorporado a la superficie de las nanopartículas basadas en la polietilenimina bifosfonatos (PEI-BP) y ácido hialurónico (HA-PEI-NIR-780) para el tratamiento y diagnóstico específicos de osteosarcomas y cáncer de mama triple negativo, respectivamente.

Asimismo, las aminas secundarias y terciarias de PEI permiten su funcionalización con β -ciclodextrinas (β CD), que son oligosacáridos cíclicos en forma de cono truncado, con una superficie hidrofílica y una cavidad interna hidrofóbica, que permite la oclusión de fármacos antitumorales poco solubles, aumentar su solubilidad en medio acuoso y su liberación controlada. Las β CD se han utilizado previamente en numerosos estudios, ya que pueden funcionalizarse con moléculas directoras para el transporte dirigido de fármacos antitumorales. (18,173) El principal problema de las ciclodextrinas es que los grupos hidroxilos de su superficie dificultan su paso a través de las membranas plasmáticas también cargadas negativamente. Su unión a PEI favorece la internalización celular ya que el polímero aporta cargas positivas que permiten su interacción con la membrana plasmática. (17,18) En la presente tesis, hemos funcionalizado las nanopartículas basadas en PEI con 4 moléculas de β CD para ocluir la doxorubicina como ejemplo de agente quimioterapéutico, con el objetivo de potenciar el efecto antitumoral de nuestros agentes terapéuticos. Además, la doxorubicina presenta una fluorescencia inherente (4), que nos ha permitido seguir el proceso de internalización de nuestras nanopartículas en el interior celular.

7.1. Bifosfonatos como moléculas directoras hacia el osteosarcoma

El osteosarcoma es el tumor primario más común en los huesos y constituye la segunda causa de las muertes relacionadas con el cáncer en los pacientes pediátricos. La tasa de supervivencia a los 5 años está entre el 50-65%. El 25-50% de los pacientes desarrollan metástasis, la mayoría en el pulmón y tienen una supervivencia menor del 20%. Aproximadamente la mitad de los pacientes desarrollan resistencias a la quimioterapia basada en la combinación de doxorubicina con cisplatino y metotrexato.

DISCUSIÓN

Asimismo, existe la limitación de una menor perfusión sanguínea en ciertas zonas de los huesos, por lo que se dificulta la entrada de los agentes quimioterapéuticos. A pesar de los grandes avances en la terapia dirigida y la nanomedicina, el pronóstico de supervivencia en los pacientes con osteosarcoma no ha mejorado comparando con los años ochenta. (32–34,90,174) Además, algunos tipos de cáncer (p.ej. cáncer de mama) en sus estadios avanzados producen microcalcificaciones en los tejidos blandos y metástasis en los huesos, que están relacionadas con un mal pronóstico. (43,91) Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento específico de este cáncer y las metástasis originadas en hueso. (32–34,90,174)

Basándonos en nuestros ensayos previos de las nanopartículas de PEI que pueden actuar como agentes teragnósticos sumado a la facilidad de su funcionalización con moléculas directoras hacia las dianas moleculares sobre-expresadas en los tejidos tumorales, hemos desarrollado las nanopartículas PEI-BP, formadas por la PEI ramificada de bajo peso molecular (bPEI 2 kDa) unida a distintos derivados de bifosfonatos (BP) como una posible estrategia para sobrellevar estos problemas. En los últimos años, los BP se han utilizado como moléculas directoras para el transporte dirigido mediante su conjugación con fármacos y con sondas fluorescentes o radionúclidos para el tratamiento y el diagnóstico de la osteoporosis y de los tumores y las metástasis óseas. (43,91) Los BP presentan una gran afinidad por el hidroxapatito que se encuentra en concentraciones elevadas en el tejido óseo y en las microcalcificaciones patológicas en otros órganos (p.ej. cáncer de mama) a diferencia del resto de tejidos, por lo que proporciona una oportunidad para el transporte dirigido específico de fármacos, material genético y sondas para el diagnóstico. (43) Además, la terapia dirigida es una alternativa atractiva para disminuir los efectos secundarios graves del uso prolongado de bifosfonatos (osteonecrosis de la mandíbula, fracturas femorales, etc.) y para el tratamiento avanzado de los tumores óseos, ya que permiten un aumento local de la concentración del fármaco para un mayor efecto terapéutico. (91,152)

La afinidad de unión de los bifosfonatos al hidroxapatito en el hueso se ve afectada por la estructura del BP y el número de ligandos, por lo que es necesario elegir el ligando más adecuado y optimizar su concentración para conseguir el transporte dirigido hacia los huesos. Asimismo, se ha demostrado que las cadenas laterales nitrogenadas pueden contribuir a la afinidad de unión mediante puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos en la superficie del hidroxapatito. (43) Por estas razones, hemos desarrollado nanopartículas con una o dos moléculas de distintos derivados de bifosfonatos con el objetivo de seleccionar la mejor combinación de PEI-BP para el transporte dirigido hacia las células del osteosarcoma y el cáncer de mama triple negativo.

En las nanopartículas funcionalizadas con los derivados de bifosfonatos por el grupo del profesor Santoyo, se suma la funcionalidad dual de los BP que actúan como moléculas directoras y que, además, presentan propiedades antitumorales sinérgicas con el efecto citotóxico de los fármacos quimioterapéuticos, induciendo la apoptosis e inhibiendo la invasión celular, aunque para ello se requieren concentraciones elevadas (mM). (43,153) Tsubaki *et al.* demostraron que el alendronato (Fosamax[®]) es tóxico a partir de una concentración de 10 mM (95), mientras que no presenta efecto sobre la viabilidad de las células de osteosarcoma a una concentración 5 nM. (90,91,175) Chang

et al. estudiaron los efectos del ácido zolendrónico en las células del osteosarcoma MG-63 y vieron una reducción en la viabilidad celular. Además, se ha demostrado que los bifosfonatos presentan un efecto citostático y anti-proliferativo en varios tipos de células tumorales como el mieloma, el osteosarcoma, el cáncer de mama, próstata y páncreas. (94,148) Nuestras nanopartículas (B3, B4, BF3 y BF4) han presentado una citotoxicidad significativa a concentraciones elevadas (15 y 30 μM) e incluso más alta que el alendronato en las células de osteosarcoma a diferencia de las células no relacionadas con el hueso, lo que confirma su especificidad.

Se ha demostrado que el alendronato presenta su efecto citotóxico mediante la inhibición de las vías de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K-Akt-NF κ B) (94,95) y de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (176), que favorecen la proliferación y la supervivencia celular. Las nanopartículas PEI-BP utilizadas a altas concentraciones (principalmente BF3 y BF4) han sido capaces de bloquear la activación de ERK1/2 en las células del osteosarcoma incluso en mayor medida que el alendronato, lo que sugiere que los derivados de bifosfonatos actúan como moléculas directoras específicamente hacia las células de osteosarcoma, causando una menor viabilidad celular, lo que podría ser originado por la inhibición de la vía de señalización de las MAP quinasas. Sin embargo, esta citotoxicidad en las células del osteosarcoma se observa solamente cuando se utilizan en concentraciones muy altas, pero no cuando se emplean únicamente como moléculas directoras a bajas concentraciones (1 μM). Por tanto, para potenciar el efecto antitumoral de los derivados PEI-BP, hemos ocluido en su estructura la doxorubicina como agente quimioterapéutico en cuatro moléculas de β -ciclodextrinas.

Previamente, se habían descrito diferentes fármacos antitumorales (cisplatino, taxanos, camptotecina, gemcitabina, doxorubicina, metotrexato, etc.) funcionalizados con los derivados de bifosfonatos, que han demostrado una elevada capacidad de unión a las células y tejidos ricos en hidroxapatito tanto *in vitro* como *in vivo* ya que la conjugación de los BP con los agentes quimioterapéuticos ha permitido el transporte de una mayor dosis del agente quimioterapéutico hacia el hueso, reduciendo sus efectos secundarios y mejorando la eficacia del fármaco. (43)

En nuestros ensayos, hemos demostrado que las nanopartículas basadas en PEI-BP favorecen la entrada de DOX ocluida en su interior y su efecto citotóxico en las células del osteosarcoma a diferencia de la DOX libre o la misma ocluida en la βCD , que entran inespecíficamente en todas las líneas celulares. En este transporte dirigido, los derivados B y BF son los mejores candidatos. Por el contrario, los derivados MF presentan en su estructura un monofosfato que es incapaz de actuar como molécula directora hacia las células del osteosarcoma y cuando hemos usado esta molécula como control negativo se han observado niveles de internalización y citotoxicidad similares a los de DOX libre. Así, hemos demostrado que la estructura y el número de los ligandos que recubren la nanopartícula es importante para conseguir un transporte dirigido eficiente. Además, hemos observado que las nanopartículas PEI-BP entran preferentemente por endocitosis dependiente de clatrina y a través de los receptores transportadores de aniones orgánicos (OATPs) en las células del osteosarcoma, ya que presentan cargas negativas en su estructura. Nuestras nanopartículas PEI-BP (derivados B y BF) tienen la capacidad del transporte dirigido hacia las células óseas ricas en hidroxapatito, lo que favorece la entrada del agente terapéutico, por lo que se podría disminuir la dosis de

DISCUSIÓN

DOX sin perder la eficacia terapéutica y disminuir sus efectos secundarios en los pacientes con tumores óseos.

Asimismo, los bifosfonatos pueden prevenir las metástasis en el hueso en los estadios tempranos en el cáncer de mama y el deterioro del hueso ocasionado por los tumores, ya que inhiben la resorción ósea mediada por los osteoclastos y juegan un papel importante en la formación de las metástasis. (91) Se ha demostrado que el clodronato suprime las metástasis distales en los huesos y las vísceras en los pacientes con cáncer de mama. Hiraga *et al.* observaron que el ibandronato inhibe las metástasis de las células MDA-MB-231, favoreciendo la apoptosis no solo de los osteoclastos sino también de las células de cáncer de mama presentes en el hueso donde se deposita selectivamente el fármaco. (154) Los derivados B3 y B4 han presentado una buena capacidad de entrada en las células de cáncer de mama triple negativo y podrían ser una estrategia para el tratamiento específico de las metástasis óseas causadas por este tipo de cáncer de mama. Por tanto, los compuestos B3 y BF4 en las células de osteosarcomas y los compuestos B3 y B4 en las células MDA-MB-231 han resultado los mejores candidatos, mientras que los derivados MF no han presentado un efecto significativo en la citotoxicidad y en el transporte dirigido hacia las células diana.

Además, las células de osteosarcoma son capaces de desarrollar resistencias a los agentes quimioterapéuticos debidas a la sobre-expresión de la glicoproteína P. (19) En los últimos años, la investigación se ha centrado en el desarrollo de nuevas estrategias de transporte dirigido de DOX hacia las mitocondrias en las células tumorales, con el objetivo de evitar estas resistencias. Riganti *et al.* (2013) desarrollaron una DOX unida a óxido nítrico denominada NitDOX que va dirigida hacia las mitocondrias. La NitDOX afecta la respiración mitocondrial, el ciclo de Krebs y el complejo I de la cadena de transporte de electrones, reduce la síntesis del ATP, estimula la liberación del citocromo C hacia el citosol y favorece la apoptosis dependiente de mitocondrias. (19) Sin embargo, NitDOX no presenta especificidad hacia las células tumorales, por lo que puede afectar células, tejidos y órganos ricos en mitocondrias, como es el corazón. Buondonno *et al.* (2016) han desarrollado mtDox, una doxorubicina dirigida hacia las mitocondrias mediante su modificación química con un péptido específico de estos orgánulos, capaz de entrar en las células del osteosarcoma resistentes al fármaco y disminuir la proliferación celular e inducir la apoptosis. (32) No obstante esto implica una estrategia compleja de síntesis de estas moléculas.

La DOX libre o DOX ocluida en una β CD presentan una localización nuclear cuando entran en el interior celular, (159) mientras que en nuestros ensayos hemos observado que la DOX ocluida en los derivados PEI-BP tiene una localización mitocondrial y ha ocasionado una inhibición de la síntesis del ATP y la liberación del citocromo C hacia el citosol, teniendo un efecto similar a la NitDOX y mtDox. Estos resultados sugieren que existe un transporte dirigido de los derivados PEI-BP hacia las mitocondrias y se trata de un mecanismo de citotoxicidad alternativo basado en la apoptosis. A diferencia de NitDOX y mtDox, las nanopartículas PEI-BP permiten un transporte dirigido específico hacia las células del osteosarcoma y el cáncer de mama que origina metástasis en el hueso y no necesitan una modificación química para conseguir el transporte dirigido hacia las mitocondrias, lo que podría afectar la eficacia terapéutica de DOX. Asimismo, constituyen un sistema versátil, ya que permiten el

transporte de cualquier fármaco capaz de ser ocluido en la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas.

Además, los bifosfonatos unidos a fármacos antitumorales se han utilizado en varios ensayos en modelos animales para el tratamiento de cáncer de mama con efectos pro-apoptóticos y anti-angiogénicos. (156) Densmore *et al.* han demostrado que las nanopartículas basadas en PEI han sido eficaces en el tratamiento del osteosarcoma en los ratones con xenografts de células del osteosarcoma p53^{-/-} y metástasis en los pulmones, mediante una transfección *in vivo* con el plásmido codificante para el gen p53, disminuyendo el tamaño de los tumores y de las metástasis. (174) No obstante, estas nanopartículas no presentan moléculas directoras, por lo que carecen de especificidad. Asimismo, se han utilizado en modelos animales los bifosfonatos unidos a sondas fluorescentes o radionúclidos para favorecer el diagnóstico y el tratamiento específico en el cáncer de mama. Así, Frangioni *et al.* (2001) utilizaron el pamidronato conjugado con el fluoróforo NIR-780 que permitió la visualización de la actividad de los osteoblastos y de las calcificaciones vasculares y microcalcificaciones en la mama en los modelos animales de cáncer de mama. Actualmente, en el mercado existe una sonda fluorescente en el infrarrojo cercano dirigida específicamente hacia los huesos para visualizar y cuantificar las patologías óseas como artritis, osteoporosis, tumores y metástasis (OsteoSense™, Perkin Elmer) y que se ha utilizado en un amplio rango de modelos animales preclínicos. (43) Este tipo de sondas tienen la ventaja de que mientras que las técnicas normalmente usadas en el diagnóstico clínico (TC, RMN, SPECT y PET) no permiten la visualización en tiempo real, las sondas en el infrarrojo cercano sí permiten esa monitorización. En nuestros ensayos *in vivo*, hemos ocluido indocianina green (ICG) en los derivados PEI-BP, que es la única sonda fluorescente en el infrarrojo cercano aprobada por la FDA para su uso clínico. (15,16) A diferencia de la ICG ocluida en la β CD, la ICG en las nanopartículas PEI-BP (derivados B y BF) ha demostrado una especificidad hacia los tumores en los modelos animales con xenografts de células de osteosarcoma y de cáncer de mama triple negativo, por lo que se permitiría su uso terapéutico específico *in vivo* y en las técnicas de diagnóstico y visualización en el cáncer.

En ensayos futuros, nos planteamos ampliar el uso de los derivados PEI-BP como vectores de transfección para terapia génica. Los osteosarcomas se relacionan principalmente con las alteraciones en los genes supresores de tumores p53 y Rb que pueden ser dianas moleculares atractivas para esta terapia. (177,178) Por ejemplo, Dutour *et al.* emplearon vectores de transfección basados en cationes lipídicos con el plásmido codificante para endostatina, un inhibidor potente de la angiogénesis, que fueron capaces de inhibir los tumores primarios del osteosarcoma y las metástasis en el pulmón. (179)

Además, pretendemos incorporar sondas de cianina de heptametina (NIR-780 o NIR-783) en la estructura de los derivados PEI-BP para conseguir un diagnóstico específico y evitar los problemas asociados al uso de ICG, como es su baja fotoestabilidad, descomposición rápida en soluciones acuosas y presencia de señales inespecíficas en los tejidos sanos. (15,16)

7.2. Ácido hialurónico como molécula directora hacia el cáncer de mama triple negativo y el cáncer de cérvix uterino

El cáncer de mama triple negativo afecta principalmente a mujeres jóvenes y es el cáncer con el peor pronóstico en mujeres a nivel mundial. Presenta un elevado riesgo de recidivas en los primeros 3-5 años después del diagnóstico y la esperanza de vida, una vez alcanzado el estadio IV, es de 10 a 13 meses. (20,121) Este cáncer se caracteriza por la ausencia de la expresión de los receptores ER α , PR y Her2, por lo que actualmente su único tratamiento consiste en la quimioterapia basada en DOX asociada a ciclofosfamida y paclitaxel. (71,72) Una vez alcanzada la etapa metastásica, el tratamiento consiste en prolongar la vida del paciente y paliar los síntomas, ya que es incurable. (20)

Por otra parte, el cáncer cervical sigue siendo una de las principales causas de la muerte en mujeres a nivel mundial y la tasa de supervivencia de 1 año en el estadio avanzado es del 10-20%. (35–37) Por ello, es necesario desarrollar nuevas estrategia para aumentar la eficiencia del tratamiento en ambos tipos de cáncer y evitar los efectos secundarios asociados al tratamiento clínico.

Además, el diagnóstico clínico del cáncer de mama consiste en la examinación mamaria, la mamografía por ultrasonidos y la resonancia magnética nuclear (RMN). (123) La RMN tiene una alta resolución espacial y buen contraste en los tejidos blandos sin límite de penetración, pero presenta un elevado tiempo de diagnóstico y un alto coste, utiliza contrastes que pueden ser tóxicos y no puede ser empleada en los pacientes con implantes metálicos. (7,57) La técnica de ultrasonidos tiene una alta resolución y menor precio que RMN, sin embargo, ofrece una menor penetración en la profundidad de los tejidos. (8,10) Los sistemas de diagnóstico basados en la fluorescencia en el infrarrojo cercano podrían ser la solución a las limitaciones de estas técnicas de diagnóstico. (140)

El ácido hialurónico es un ligando natural para los receptores CD44. (89) Debido a su carácter aniónico permite establecer uniones electrostáticas con componentes policatiónicos, como es la polietilenimina. (41,42) Hasta ahora, el HA se ha utilizado en la síntesis de numerosos tipos de nanopartículas como son micelas, nanopartículas poliméricas, nanogeles, nanopartículas inorgánicas (sílice, oro, organometálicas), etc. (41) y en una conjugación directa con los fármacos como DOX y paclitaxel, permitiendo mejorar su biocompatibilidad, el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo y el transporte dirigido específico, evitando los efectos secundarios y las resistencias de la quimioterapia. (42)

Por tanto, en la presente tesis hemos decorado la superficie de las nanopartículas PEI-NIR-780 con el ácido hialurónico con el objetivo de conseguir un diagnóstico y un transporte específicos y dirigidos hacia las células de cáncer de mama triple negativo y de cáncer cervical que sobre-expresan los receptores CD44. (42,87,88) Además, la presencia del HA en la superficie de la nanopartícula, prolonga su vida media en el torrente sanguíneo, ya que las protege frente a la adsorción de las proteínas plasmáticas, ejerciendo un papel similar al de PEG comúnmente utilizado en el diseño de las nanopartículas para evitar su fagocitosis precoz. (41,42)

Tanto en la terapia génica como en el transporte dirigido de fármacos, es imprescindible optimizar las propiedades físico-químicas de las nanopartículas (tamaño,

carga, forma, etc.) que pueden influir en su paso a través de las distintas barreras biológicas y en su eficiencia de transfección. En estudios preliminares, hemos observado que el tamaño de PEI influye en su capacidad de transfección y su citotoxicidad. Así, hemos comprobado que PEI de bajo peso molecular presentaba una menor toxicidad, sin embargo, también produce unos niveles de transfección más bajos, en comparación con PEI de alto peso molecular. Esta disminución en la eficiencia de transfección es contrarrestada por la presencia de la sonda NIR-780 probablemente al aportar un carácter lipofílico a la nanopartícula. En todos los casos, el recubrimiento de las nanopartículas de PEI o PEI-NIR con HA, ha mejorado la entrada y los niveles de transfección en las células de cáncer de mama triple negativo (CD44+) a diferencia de lo que sucede en células epiteliales (CD44-). Así, es posible que en las células epiteliales que carecen del receptor CD44, la decoración con HA disminuye la entrada al neutralizar las cargas de PEI que interaccionará peor con la membrana plasmática cargada negativamente. (81) Por tanto, por el aumento de la transfección en células CD44+ y la concomitante disminución de la transfección en células CD44-, hemos demostrado la especificidad de nuestras nanopartículas y la posibilidad de su transporte dirigido, evitando los efectos secundarios sobre las células sanas.

Además, varios estudios han demostrado que el tamaño del polímero de HA influye en su capacidad de actuar como molécula directora y en sus diversas funciones fisiológicas. (162,180–183) El HA de bajo peso molecular favorece la angiogénesis y la inflamación, mientras que el de alto peso molecular tiene el efecto contrario a nivel fisiológico y presenta una mayor afinidad por los receptores CD44. (162) Por ejemplo, Zhong *et al.* (2019) sintetizaron liposomas recubiertos con HA de 7 kDa, 63 kDa y 102 kDa y observaron una mayor entrada con las nanopartículas decoradas con HA de 63 kDa. (161)

En la presente tesis hemos empleado tres tipos de HA (8-15 kDa, 10-50 kDa y 40-50 kDa) y hemos observado que mientras que el HA de bajo peso molecular no ha influido en la entrada de las nanopartículas en el interior celular, el HA de alto peso molecular (40-50 kDa) ha sido capaz de actuar como molécula directora hacia los receptores CD44. Asimismo, hemos demostrado que la concentración del ligando en la superficie de la nanopartícula influye en la capacidad de dirigir, siendo la óptima un 7,5% de ratio carga/masa entre HA/PEI para el HA de 40-50 kDa, por lo que confirmamos que es necesaria la optimización de las nanopartículas y la cantidad y las propiedades de la molécula directora pueden influir en la capacidad de la nanopartícula de dirigir específicamente hacia las dianas moleculares.

Además, se han observado efectos similares en modelos animales de xenografts de cáncer de mama triple negativo, donde se ha producido una entrada y transfección específicas en el interior tumoral con las nanopartículas recubiertas con 7,5% de HA de 40-50 kDa y en menor medida con HA de 10-50 kDa, mientras que las nanopartículas en ausencia de HA han presentado una localización hepática y no se ha observado transfección en los tumores. Por tanto, las nanopartículas PEI-NIR-780 recubiertas con HA de 40-50 kDa actúan como agentes teragnósticos tanto *in vitro* como *in vivo*, permitiendo un diagnóstico específico gracias a la sonda NIR-780 y una eficiente transfección gracias a PEI que se une al DNA.

A pesar de que el tratamiento del cáncer de mama con DOX es muy efectivo, en el 20-30 % de los casos se originan recurrencias y el avance del estadio con el desarrollo

DISCUSIÓN

de metástasis, generalmente debido a las resistencias originadas por las modificaciones en la actividad de la topoisomerasa II, la principal diana de la DOX, y por el aumento de la expulsión del agente quimioterapéutico hacia el exterior celular por la sobre-expresión de la glicoproteína P en las células de cáncer de mama resistentes al tratamiento. (121,184) Además, DOX puede originar cardiotoxicidad a largo plazo, causando fallo cardíaco. (64)

El transporte de fármacos y ácidos nucleicos en la misma nanopartícula hacia células tumorales es muy efectivo debido a su capacidad de afectar diferentes vías patológicas. Wang *et al.* (2016) desarrollaron micelas HA-PEI-PLGA-DOX-miRNA y demostraron que el recubrimiento de las nanopartículas con HA reduce la hemólisis y mejora su estabilidad y permiten aumentar la entrada y la citotoxicidad en las células de cáncer de mama triple negativo. (185) Kim *et al.* (2011) sintetizaron poliaminas dendriméricas modificadas con ciclodextrinas para el transporte de siRNA y de fármacos antitumorales en las que la β -ciclodextrina favoreció la entrada celular de los fármacos hidrofóbicos, mientras que la poliamina catiónica permitió la unión al siRNA. (17) Asimismo, Li *et al.* desarrollaron nanopartículas de PEI funcionalizadas con una β CD para la oclusión de DOX, y recubierta con el ácido fólico como molécula directora hacia sus receptores específicos sobre-expresados en las células de cáncer de mama (MCF7). Utilizaron la DOX como agente quimioterapéutico y siRNA para suprimir el gen BCL2 involucrado en las resistencias. Estas nanopartículas presentaron una mayor entrada celular y una significativa supresión génica. (186) En esta tesis, hemos demostrado que la oclusión de DOX en nuestras nanopartículas ha permitido una entrada mayor en comparación con DOX libre y además su recubrimiento con HA ha permitido un transporte dirigido específico hacia las células de cáncer de mama triple negativo y el cáncer cervical (CD44+) a diferencia de las células CD44- y cardiomiocitos. Por tanto, nuestras nanopartículas al incrementar la especificidad del transporte, podrían evitar la cardiotoxicidad asociada a la administración de DOX.

Asimismo, hemos demostrado que las nanopartículas HA-PEI-NIR-780- β CD-DOX entran en el interior celular a través de endocitosis dependiente de clatrina asociada al receptor CD44 y probablemente presentan, al igual que las nanopartículas PEI-BP, una localización mitocondrial, lo que permitiría inducir la apoptosis celular mediada por las mitocondrias, como un mecanismo alternativo para las células resistentes a DOX. (19)

Por tanto, hemos desarrollado un agente teragnóstico versátil, que permite (I) actuar como un vector de transfección gracias a PEI que establece fuerzas electrostáticas con el material genético de interés (DNA, miRNA, siRNA, etc.), (II) el transporte dirigido de los agentes quimioterapéuticos que puedan ser ocluidos en el interior de las 4 moléculas de β CD, aumentando su solubilidad y controlando su liberación y (III) diagnóstico específico debido a la presencia de la sonda NIR-780 en su estructura, que permite la monitorización *in vitro* e *in vivo*, tanto en los tumores primarios como en las metástasis que sobre-expresan los receptores CD44, lo que permitiría un diagnóstico precoz. Además, hemos demostrado que el recubrimiento de estas nanopartículas con HA favorece el transporte dirigido hacia las células tumorales que sobre-expresan los receptores CD44 en las células de cáncer de mama y de cáncer de cérvix uterino, pero podría aplicarse en otros tipos de cáncer CD44+ como es el cáncer de pulmón (187) o el cáncer colorrectal (188), etc.

En futuros ensayos, planeamos estudiar la eficacia de estas nanopartículas en otros tipos de cáncer que sobre-expresen los receptores CD44 y en las células con resistencia a DOX. Además, Alves *et. al.* (2019) han sintetizado unas nanopartículas poliméricas unidas a HA y NIR-780 para la terapia fototérmica en cultivos en monocapa y tridimensionales, ya que las sondas NIR tienen la capacidad de aumentar la temperatura e inducir la formación de ROS, provocando muerte celular. (189) Por tanto, nuestras nanopartículas podrían sumar un triple mecanismo de acción: terapia génica, transporte dirigido de agentes quimioterapéuticos y terapia fototérmica.

7.3. Modelos tridimensionales de cáncer de mama derivados de plasma humano (HuP3D)

La mayoría de las muertes en las pacientes con cáncer de mama se deben a la formación de las metástasis en los órganos de vital importancia y a las recurrencias, originadas por las resistencias al tratamiento. (190) El cáncer de mama se clasifica en varios sub-tipos moleculares en función de la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona (luminal A, luminal B, Her2+ y triple negativo) que se asocian con la predicción de la supervivencia y de la respuesta terapéutica. A pesar de que existan diferentes sub-tipos de cáncer de mama, en la práctica clínica se administra un tratamiento estándar en todos los pacientes. (21) Además, las interacciones de las células tumorales con el microambiente tumoral interfieren en la eficacia terapéutica y las resistencias. (22) Para conseguir una terapia eficaz, es imprescindible identificar a los pacientes que responderían bien a los fármacos específicos y a los que podrían desarrollar resistencias. Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevos modelos preclínicos accesibles para predecir la respuesta terapéutica de forma individual para cada paciente, con el objetivo de evitar la aparición de las resistencias y las recurrencias del cáncer.

Los cultivos bidimensionales han sido utilizados tradicionalmente para entender las bases moleculares del cáncer y para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales, aunque estos modelos no son capaces de recrear la complejidad de la patología y del microambiente tumoral *in vivo*. (44,124)

En las últimas décadas, se han desarrollado distintos modelos tridimensionales (esferoides, organoides, matrices 3D y xenografts derivados de pacientes) como una alternativa a las técnicas de cultivos bidimensionales. Los xenografts derivados de pacientes son clínicamente relevantes, pero se basan en el uso de animales de experimentación, por lo que presentan altos costes y problemas éticos asociados. El resto de los modelos 3D mencionados son modelos versátiles, que evitan el uso de animales de experimentación, tienen un bajo coste y un corto tiempo de preparación, favorecen realizar más réplicas y un cribado de alto rendimiento. Asimismo, permiten simular la difusión de los fármacos hacia el interior tumoral. Los modelos 3D ideales deben representar las estructuras específicas, los componentes biomecánicos y las interacciones intercelulares del microambiente tumoral, tal y como ocurre en los tumores *in vivo*. (44,124)

El modelo HuP3D se basa en el uso de plasma humano y es específico para cada paciente a diferencia de Matrigel® y otros polímeros. El uso de la matriz extracelular (ECM) específica del paciente evita la incorporación de materiales exógenos en los

modelos experimentales que puede introducir distintos artefactos y causar confusión en comparación con los comportamientos tumorales *in vivo*. La inclusión de la ECM artificial puede afectar la rigidez de la matriz e influir en la accesibilidad del fármaco o en el comportamiento celular en los ensayos *in vitro*. Además, el plasma humano no solo sirve como soporte celular, sino también aporta nutrientes, factores de crecimiento, citoquinas, vesículas extracelulares, moléculas de señalización y permite el desarrollo de modelos 3D más personalizados. Aunque la composición de las proteínas plasmáticas no es abundante en los tejidos tumorales, las células cultivadas en HuP3D aumentan la secreción de los componentes del microambiente tumoral relevantes para la enfermedad, como colágeno y fibronectina. (136,165)

Además, el microambiente tumoral y la matriz extracelular (ECM) son muy variables dependiendo del tipo de tumor, el estadio y su localización. Los cambios en la composición de la ECM pueden afectar la respuesta de las células tumorales al fármaco debido a que puede alterar la disponibilidad y la difusión del quimioterapéutico, la expresión de las dianas moleculares y originar cambios en los mecanismos de defensa intrínsecos de la célula (p.ej. la reparación del DNA dañado o la evasión de la apoptosis). (44) Se ha demostrado que las células cultivadas en los modelos 3D presentan una sensibilidad disminuida a los agentes quimioterapéuticos comparando con los cultivos tradicionales. (125) Por lo tanto, en la presente tesis hemos realizado un cribado de siete fármacos quimioterapéuticos comúnmente utilizados en el tratamiento clínico de cáncer de mama (ciclofosfamida, carboplatino, metotrexato, capecitabina, docetaxel, paclitaxel y epirubicina) para comprobar la sensibilidad de 5 líneas celulares de cáncer de mama cultivadas en el modelo HuP3D y hemos determinado 10 parámetros de respuesta terapéutica (IC_{50} , E_{max} , AUC, EC_{50} y E_{inf} , GR_{50} , GR_{max} , GR_{AOC} , GEC_{50} , GR_{inf}).

IC_{50} es el parámetro más utilizado para medir la respuesta terapéutica, pero en numerosas ocasiones se usa de forma incorrecta. (96) Los parámetros empleados tradicionalmente para definir la respuesta terapéutica, como IC_{50} y EC_{50} , no tienen en cuenta la población inicial (γ_0) y el número de divisiones celulares durante el transcurso del ensayo, que varía entre las distintas líneas celulares, debido a que depende de la densidad celular, la composición del medio de cultivo y la duración del experimento. En nuestros estudios, para sobrellevar estas limitaciones de los parámetros tradicionales, basados en el recuento relativo celular, hemos determinado también los parámetros de ratio de crecimiento (GR). Los parámetros GR son más adecuados para calcular las respuestas terapéuticas en nuestros ensayos porque consideran la población inicial y las diferencias en el ratio de crecimiento en las distintas líneas celulares de cáncer de mama en los cultivos HuP3D. Hemos estudiado si las diferencias en el crecimiento celular de las distintas líneas celulares cultivadas en HuP3D y el amplio rango de parámetros pueden influir en la respuesta terapéutica, dando origen a confusiones en su predicción. Hemos detectado una heterogeneidad significativa entre las distintas líneas celulares de cáncer de mama, entre los fármacos y entre los propios parámetros de respuesta terapéutica, sugiriendo que se necesita determinar más de un tipo de parámetro para predecir la eficacia terapéutica y para una predicción personalizada de la respuesta terapéutica. Los ejemplos relevantes de la importancia de incluir diferentes parámetros para medir el efecto terapéutico incluyen, por ejemplo, el efecto de docetaxel en las células MDA-MB-231 y ZR-75-1. Si tenemos en cuenta el recuento celular relativo, docetaxel es citotóxico para la línea celular MDA-MB-231 y citostático

para las células ZR-75-1. Sin embargo, en las curvas de GR, se observa un efecto invertido siendo citotóxico en ZR-75-1 y citostático en MDA-MB-231. La incorporación de la población inicial y las diferencias en el ratio de crecimiento de estas células han afectado la respuesta terapéutica.

Además, la comparación de los parámetros obtenidos a partir de HuP3D con IC_{50} determinada mediante una búsqueda bibliográfica para los modelos bidimensionales y otros modelos 3D, con la concentración quimioterapéutica efectiva de los ensayos clínicos en fase I y II (Css), ha demostrado una baja correlación positiva entre Css y 2D y una correlación moderada con otros modelos 3D. Estos modelos 3D incluyen xenografts derivados de pacientes, esferoides, organoides y matrices tridimensionales como un grupo combinatorio para obtener información significativa suficiente de la literatura publicada para los siete fármacos con el objetivo de establecer la correlación de Pearson. Estos resultados confirman que los cultivos bidimensionales no son capaces de predecir de manera eficaz la respuesta terapéutica y la dosis efectiva en pacientes con cáncer, debido a su incapacidad de representar la heterogeneidad del microambiente tumoral *in vivo*. Aunque exista una buena respuesta terapéutica en los modelos 2D y en los xenografts derivados de pacientes, muchos tumores presentan un perfil quimio-resistente. Existen numerosos estudios farmacológicos, que comparan los modelos 3D con cultivos en monocapa y los resultados clínicos, y todos concluyen que los modelos 3D son más adecuados para predecir la respuesta terapéutica de forma más precisa de acuerdo con las concentraciones efectivas en la práctica clínica. Dhiman *et al.* realizaron ensayos de inhibición de distintas concentraciones de tamoxifeno en seis días en las células MCF7 en monocapa y en modelos tridimensionales de quitosán y demostraron que los modelos 3D presentan una resistencia mayor al tamoxifeno si se comparan con 2D y tuvieron que usar una mayor dosis del fármaco para obtener un efecto citostático en las células cultivadas en 3D. (191) Hongisto *et al.* compararon 63 fármacos en modelos 2D y 3D de 2-hidroxietil metacrilato y en Matrigel® y observaron unas discrepancias elevadas, donde el Matrigel® tuvo una sensibilidad a fármacos significativamente más alta que el resto de modelos, sugiriendo que los cultivos 3D son una mejor alternativa a los cultivos en monocapa y permiten una plataforma para el cribado de fármacos de alto rendimiento. (137) Breslin y Driscoli realizaron ensayos con docetaxel y neratinib en las líneas celulares HER2+ en modelos 2D y 3D de poly-HEMA y encontraron que los modelos 3D eran más resistentes, lo que era debido a la sobreexpresión de los transportadores de fármacos y las proteínas receptoras y una elevada actividad enzimática metabólica. (137)

Asimismo, existen diferencias entre los ratios de crecimiento entre las células cultivadas en modelos 2D y 3D que dificultan la comparación de los parámetros entre ellos e incluso surge la cuestión de si se debería usar el mismo parámetro. (137) Brooks *et al.* revisaron 25 publicaciones de ensayos en modelos 2D y 3D y encontraron muchas dificultades que pueden afectar las comparaciones de los parámetros. Algunos estudios reportan el valor IC_{50} a pesar de que los fármacos no han sido lo suficiente efectivos para reducir la población a la mitad. Otros, confunden EC_{50} y GI_{50} con IC_{50} , que se interpreta de manera equívoca en el contexto de la inhibición de crecimiento. Además, se dieron cuenta que, para los fármacos muy potentes, la IC_{50} no difiere entre las publicaciones, pero, cuando la sensibilidad del fármaco es moderada o baja, los valores de IC_{50} varían mucho entre los modelos 2D e incluso mucho más en los modelos 3D. (137) Estas

DISCUSIÓN

discrepancias se forman porque los parámetros pueden depender del protocolo experimental (medio, tipo celular, tiempo incubación, etc.), la composición de los modelos 3D (células estromales, ECM, biomateriales distintos), el tipo o la duración del ensayo y el método de análisis (MTT, ATP, citometría de flujo, etc.). Es importante tener en cuenta que los investigadores pueden usar distintas formas de regresión no lineal para calcular la respuesta terapéutica y distintos métodos para tratar los *outliers*. (137,193) Asimismo, existen parámetros que no siempre se pueden calcular, dependiendo de la forma de la curva (IC_{50} y GEC_{50}) o cuando las células no crecen exponencialmente (GR_{50}) y algunos se deberían usar con cuidado en los análisis comparativos entre distintos rangos de concentración (E_{max} y AUC). (137) A pesar de estas limitaciones, nuestros resultados han demostrado ser factibles y eficaces para predecir la terapia eficaz clínicamente mejor que otros modelos preclínicos actuales. Además, nuestro modelo permite tomar imágenes y permitir aplicaciones de alto rendimiento.

La medicina personalizada es un área en crecimiento en la investigación. Tradicionalmente se limitó al uso de xenografts derivados de pacientes, que presentan la limitación de que se tarda meses en generarlos, mientras que HuP3D permite el cribado de fármacos en una semana, lo que permitiría ahorrar el tiempo y el coste en los estudios preclínicos.

Por lo tanto, HuP3D es un modelo efectivo y factible para permitir un cribado de fármacos y predecir las terapias efectivas para el tratamiento clínico mejor que otros modelos 3D actualmente disponibles. La predicción personalizada de la eficacia terapéutica permitiría superar el reto de la prevención de la mortalidad asociada con la recurrencia de la enfermedad en los pacientes con cáncer de mama con tratamiento dirigido, efectivo y menos tóxico, disminuyendo los costes y permitiendo salvar o prolongar la vida de los pacientes.

Además, el proceso del descubrimiento y del diseño de nuevos fármacos es un proceso complejo, lento y de elevado coste. Sin embargo, la mayoría de las nuevas moléculas fracasan en la fase II y la fase III de los ensayos clínicos, debido a la falta de eficacia terapéutica y una toxicidad inaceptable. (44,45) Esto puede ser debido a que los cultivos bidimensionales, tradicionalmente utilizados en los ensayos preclínicos, no permiten predecir la eficacia terapéutica y la citotoxicidad *in vivo* de manera eficaz, ya que no tienen en cuenta las interacciones de las células tumorales con el microambiente tumoral que interfieren en la eficacia de los fármacos ensayados. En los cultivos celulares en monocapa, todas las células están en contacto con el fármaco, mientras que en los cultivos 3D, como es el modelo HuP3D, al igual que ocurre *in vivo*, se generan gradientes de concentración del fármaco que tiene que ir penetrando a través del tumor. Asimismo, se ha demostrado que las células tumorales presentan un ratio de crecimiento menor cuando se cultivan en los modelos tridimensionales y un tercio de genes se expresan de manera diferente en comparación con las células cultivadas en los modelos en monocapa. (44,45,66) Por lo tanto, el diseño de las nanopartículas dirigidas hacia sus dianas específicas identificadas en los cultivos 2D, puede originar un comportamiento distinto en los modelos tridimensionales que mimetizan mejor los aspectos del microambiente tumoral *in vivo* y por tanto permiten obtener resultados con mayor valor predictivo para la clínica. (44)

Por esa razón, ensayamos las nanopartículas HA-PEI-NIR-780 y HA-PEI-NIR-780- β CD-DOX dirigidas hacia los receptores CD44 en los modelos bidimensionales y en el modelo HuP3D de las células de cáncer de mama triple negativo. Hemos observado que, tal y como se esperaba, la entrada y la citotoxicidad de las nanopartículas han sido mayores en los cultivos en monocapa, aunque se han conseguido unos niveles de internalización y de citotoxicidad específicas a dosis más elevadas en el modelo HuP3D. Además, hemos confirmado que el recubrimiento de estas nanopartículas con el ácido hialurónico de 40-50 kDa favorece la entrada en las células CD44+ cultivadas en el modelo tridimensional, por lo que nuestras nanopartículas permiten un transporte dirigido y un diagnóstico específico tanto en los modelos bidimensionales y tridimensionales como *in vivo*. Asimismo, el tratamiento de las células de cáncer de mama triple negativo cultivadas en el modelo HuP3D con las nanopartículas HA-PEI-NIR-780- β CD-DOX ha producido unos niveles de muerte celular similar a la doxorubicina libre. Los cultivos HuP3D son capaces de predecir el comportamiento de los fármacos *in vivo* mejor que los cultivos celulares tradicionales (135,136), por lo que, probablemente, nuestras nanopartículas podrían tener un efecto similar en el tratamiento de los tumores de cáncer de mama en modelos *in vivo*, aunque serían necesarios más ensayos.

Además, los modelos HuP3D permiten el co-cultivo de diferentes tipos celulares por lo que en los futuros ensayos podríamos ensayar la especificidad hacia las células CD44+ en comparación con las células CD44- dentro del mismo cultivo. Asimismo, este modelo permite el cultivo de células tumorales obtenidas a partir de las biopsias de los pacientes, por lo que permitiría determinar la dosis efectiva del fármaco oculto o no dentro de la nanopartícula de una manera personalizada para cada paciente y así disminuir el ratio de las resistencias al tratamiento. (135,136)

7.4. Nanopartículas glico-conjugadas como herramienta de diagnóstico específico

La conjugación de los carbohidratos (p.ej. lactosa, glucosa, manosa, N-acetilglucosamina) con nanopartículas, agentes quimioterapéuticos o sondas fluorescentes permite un transporte dirigido hacia las células tumorales que sobre-expresan sus receptores específicos, como son los transportadores GLUT y las lectinas tipo C (las asialoglucoproteínas y las galectinas). (14) Hasta ahora se han desarrollado numerosas nanopartículas glico-conjugadas (quantum dots, nanopartículas de oro, magnéticas, poliméricas, etc.). (194)

La manosa se une a sus receptores específicos CD206, un tipo de C- lectinas, sobre-expresados en los macrófagos, las células dendríticas, los fibroblastos y en el cáncer de mama. (99–102) Hatami *et al.* sintetizaron nanopartículas poliméricas recubiertas con manosa para el transporte dirigido hacia los macrófagos. (99) Ye *et. al* desarrollaron una β CD recubierta por manosa para el transporte dirigido de doxorubicina hacia las células MDA-MB-231. (100) Barrat *et al.* demostraron que los liposomas funcionalizados con manosa se dirigen específicamente hacia los macrófagos. (102) Los macrófagos tienen un papel importante en una gran variedad de patologías incluyendo el cáncer. (99) En el microambiente tumoral, existen macrófagos asociados al tumor (TAM) que tienen un papel importante en la invasión, proliferación y metástasis y que expresan altos niveles de receptores de manosa. (195)

DISCUSIÓN

La lactosa se une tanto a las asialoglucoproteínas (97) como a los receptores de galectina-3 que se sobre-expresan en el cáncer colorrectal, gástrico, cáncer de pulmón, cabeza y cuello, páncreas, melanoma, endometrio, tiroides, hígado, mama y vejiga y en las leucemias y los linfomas. (98,112,117,118) Nadaf *et al.* (2020) sintetizaron nanopartículas de sílica recubiertas por lactosa y PEG para el transporte dirigido de doxorubicina hacia las asialoglucoproteínas en el hepatocarcinoma, al igual que Cao *et al.* (2016) que desarrollaron una sonda NIR unida a lactosa para el transporte dirigido de este fármaco hacia las células HepG2. (196)

La N-acetil-glucosamina se dirige específicamente a las lectinas sobre-expresadas en algunos tumores (p.ej. cáncer de mama, hepatocarcinomas). (103,104) Asimismo, la glucosa y la N-acetil-glucosamina (al contener una molécula de glucosa en su estructura), permiten un transporte dirigido tanto hacia las asialoglucoproteínas como a los receptores GLUT-1 sobre-expresados en numerosos tumores debido al metabolismo de glucosa aumentado (efecto Warburg). (104–106) Tian *et al.* (2015) desarrollaron nanopartículas poliméricas recubiertas con N-acetilglucosamina para el transporte dirigido de doxorubicina hacia las células tumorales de cáncer de mama y de colon. (104) Smita *et al.* desarrollaron las nanopartículas de PEG-doxorubicina recubiertas con N-acetil-glucosamina para el transporte dirigido hacia las células de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231. (197) Li *et al.* (2014) sintetizaron unas nanopartículas de quitosan conjugadas con glucosa para el transporte dirigido de doxorubicina hacia las células tumorales de cáncer de mama. (105)

En la presente tesis se han caracterizado biológicamente unas moléculas consistentes en sondas fluorescentes NIR-783 conjugadas con distintos carbohidratos (manosa, lactosa, glucosa y N-acetilglucosamina) con el objetivo de desarrollar nuevos agentes para el diagnóstico específico de las células tumorales que sobre-expresan sus receptores GLUT1, galectina-3 y/o asialoglucoproteínas. En nuestros ensayos hemos demostrado una entrada específica de la sonda Glc-NIR-783 en las células MDA-MB-231 que presentan el metabolismo de glucosa aumentado por el efecto Warburg y de la sonda Lac-NIR-783 en las células de cáncer colorrectal que sobre-expresan los receptores de galectina-3. Se ha observado una entrada aumentada e inespecífica de las sondas glico-conjugadas en las células epiteliales no tumorales, ya que estas partículas tienen un segundo mecanismo de entrada en las células debido a que la sonda NIR-783 es reconocida por transportadores de aniones orgánicos OATPs. Por tanto, cambiamos de estrategia en el transporte dirigido de carbohidratos sustituyendo la sonda NIR-783 por las nanopartículas fluorescentes que contenían Carbon Dots (CNDs).

Los Carbon-Dots se descubrieron en el año 2004 y representan la nueva generación de nanopartículas fluorescentes que podrían reemplazar los quantum dots tradicionales y las sondas orgánicas, ya que presentan una elevada biocompatibilidad, baja citotoxicidad, bajo coste, fácil síntesis y unas propiedades ópticas únicas y modificables (absorción fuerte, resistencia al *fotobleaching*, fotoestabilidad). (38,198,199) Además, los CNDs permiten la entrada en el interior celular a través de la endocitosis mediada por receptores y no son reconocidos por las glicoproteínas P. Asimismo, se ha demostrado que pueden atravesar la barrera hematoencefálica. (200)

Hasta ahora, se han sintetizado CNDs a partir de una gran variedad de materiales químicos, naturales y biomasa (p.ej. leche de soja, zumo de plátano, grano de café,

huevo, etc.), lo que evita la producción de sustancias contaminantes y tóxicas. (38,198,199)

La mayoría de CNDs se sintetizan mediante una pirolisis térmica de la fuente de carbono (método *bottom-up*) que permite un control preciso de la morfología y de la distribución del tamaño, la funcionalización de su superficie y se puede realizar en el microondas convencional. (38,40,73,199,201) El uso del ácido cítrico como fuente de carbono es muy popular debido a su bajo coste y tiempo de síntesis y se ha demostrado que su descomposición térmica da lugar a diversos compuestos ácidos anhídros. (39)

Los CNDs son nanopartículas muy versátiles, ya que presentan numerosos grupos funcionales en su superficie (grupos aminos o carboxilos) que permiten su funcionalización con fármacos y biolípidos, por lo que pueden actuar como agentes teragnósticos, favoreciendo el transporte dirigido del agente terapéutico al mismo tiempo que el diagnóstico por imagen y monitorización en tiempo real. (38,200) Asimismo, se pueden modificar sus propiedades de fluorescencia, ajustando el tamaño de la nanopartícula y las características de su superficie. (199,201)

Por tanto, en la presente tesis se han evaluado biológicamente CNDs sintetizados por el grupo del profesor Santoyo derivados del ácido cítrico funcionalizados con los carbohidratos manosa, lactosa y N-acetil-glucosamina como moléculas directoras para estudiar las interacciones específicas entre los carbohidratos y las lectinas sobre-expresadas en varios tipos de cáncer. (39,194) Previamente, Yang *et al.* desarrollaron quantum dots recubiertos con galactosa y con N-acetil-lactosamina para el transporte dirigido hacia las asialoglucoproteínas sobre-expresadas en los hepatocarcinomas en modelos *in vivo*. (194) Weng *et al.* (2015) sintetizaron CNDs de citrato amónico funcionalizados con manosa para el marcaje de las lectinas FimH en los flagelos de *E. coli*. (202)

En nuestros ensayos hemos demostrado, que los CNDs recubiertos con manosa (Az-CND@Man-Ak y Ak-CND@Man-Az) presentan un transporte dirigido hacia los macrófagos (RAW264.7) que sobre-expresan sus receptores específicos CD206 (99,102), los CNDs decorados con lactosa hacia las células de cáncer colorrectal (CT26.WT), que sobre-expresan los receptores de galectina-3 (166) y las nanopartículas funcionalizadas con N-acetil-glucosamina hacia las células de cáncer cervical (HeLa) que sobre-expresan los receptores GLUT1. (167) Por tanto, hemos demostrado la capacidad de los CNDs glico-conjugados de dirigirse específicamente hacia sus dianas moleculares a diferencia de la nanopartícula no decorada con los carbohidratos (AA-CNDs (Na)).

Además, los CNDs presentan una baja toxicidad y buena biocompatibilidad, ya que, al no presentar metales pesados en su estructura, se favorece su empleo en aplicaciones biológicas. (74) En los estudios de viabilidad celular hemos demostrado que nuestras nanopartículas (Az-CND@Man-Ak, Az-CND@Lac-Ak y VS-CND@GlcNAc-SH) no presentan citotoxicidad en las concentraciones ensayadas y el resto de nanopartículas una citotoxicidad del 25%, pero similar al compuesto sin las moléculas directoras (AA-CND (Na)). Asimismo, se ha observado que la nanopartícula cuya superficie no se ha recubierto con los carbohidratos (AA-CNDs(Na)) y los compuestos Az-CND@Man-Ak y Ak-CND@Man-Az presentan una baja capacidad de hemólisis en sangre humana durante 24 horas y serían los más adecuados para su uso *in vivo*.

DISCUSIÓN

Por lo tanto, los CNDs recubiertos por los carbohidratos actúan como sondas fluorescentes híbridas, que presentan las propiedades ópticas únicas de los CNDs con la actividad biológica y la especificidad de los carbohidratos que actúan como moléculas directoras, con una baja citotoxicidad y una buena biocompatibilidad.

En los últimos años, se han sintetizado CNDs con distintos fármacos quimioterapéuticos (doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, etc.) recubiertas con diferentes moléculas directoras (transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico) para el transporte dirigido hacia las células que sobre-expresan sus dianas moleculares específicas (cáncer cervical, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de mama, hepatocarcinoma, etc.). (73,200) El recubrimiento de su superficie con polímeros catiónicos favorece la terapia génica y mejora la permeabilidad y el tiempo de retención de los CNDs en los tumores. (73,201) Por ejemplo, Wang *et al.* (2017) desarrollaron CNDs de ácido hialurónico funcionalizados con PEI de 25 kDa para el transporte dirigido, el diagnóstico y la transfección específica de células CD44+ (HeLa). (203) Sharker *et al.* (2015) prepararon CNDs de ácido hialurónico con fluorescencia en el infrarrojo cercano con un β CD para ocluir paclitaxel para un transporte dirigido hacia las células MDA-MB-231. (204)

Por tanto, para futuros ensayos, nos planteamos la funcionalización de estas nanopartículas con los polímeros catiónicos (PEI) para su posible uso en la terapia génica y con β CD para el transporte dirigido de los agentes quimioterapéuticos poco solubles, como es la doxorubicina.

8.CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1.- We have developed a novel theragnostic reagent PEI-NIR-780 which simultaneously allow specific visualization thanks to the NIR-780 probe and gene therapy thanks to the polyethyleneimine moiety that can establish electrostatic forces with genetic material. These nanoparticles have good DNA binding capacity and protection from DNase degradation, low cytotoxicity, and good transfection efficiency. In addition, they allow its functionalization with β -cyclodextrins for the inclusion of poorly soluble chemotherapeutic agents such as doxorubicin to increase its solubility and to promote its targeting and controlled release into the tumor cells. Likewise, polyethyleneimine allows its functionalization with directing molecules such as bisphosphonates or hyaluronic acid for its targeted and specific transport to molecular targets over-expressed in tumor tissues.

2.- The functionalization of PEI with bisphosphonates has allowed the development of PEI-BP nanoparticles that are capable of specifically directing doxorubicin towards osteosarcoma cells and bone metastases, due to its binding capacity to hydroxyapatite, which is specifically found in the bone tissue. Moreover, these nanoparticles allow the targeting of fluorescent probes such as indocyanine green to *in vivo* osteosarcoma xenografts models, thus constituting an attractive strategy for the specific diagnosis and treatment of the bone-related cancers. Furthermore, these nanoparticles are able to target the mitochondria, providing the advantage to overcome resistance to the treatment with doxorubicin.

3.- Hyaluronic acid of 40-50 kDa has demonstrated the ability to act as a targeting molecule towards the CD44 receptors. Our theragnostic reagents functionalized with HA allow a specific diagnosis, the targeting of the chemotherapeutic drugs and increase of the transfection efficiency in both *in vitro* and *in vivo* models of triple negative breast cancer. Furthermore, it can be extrapolated to other types of cancer that overexpress this receptor, such as cancer of the uterine cervix. Additionally, these nanoparticles permit to avoid the cardiotoxicity associated with the use of doxorubicin.

4.- We have developed a HuP3D human plasma three-dimensional cell culture model. This model allows to recreate the tumor microenvironment *in vivo* better than traditionally used two-dimensional cell culture models and therefore predict the therapeutic response in a personalized way. The screening of drugs commonly used in the clinical treatment of breast cancer using this system has shown a big heterogeneity in the therapeutic response in different molecular sub-types of breast cancer and the need of using different parameters to evaluate it. Therefore, HuP3D culture model is a feasible and efficacious platform for supporting the growth and expansion of breast cancer cell lines, allowing high-throughput drug screening and predicting clinically effective therapies better than current preclinical models. Likewise, it has been shown that nanoparticles coated with hyaluronic acid are capable of acting as theragnostic agents in cells grown in HuP3D, as well as in two-dimensional cultures and in animal models.

CONCLUSIONES

5.- Finally, we have evaluated a specific non-toxic fluorescent acid anhydride coated Carbon Dots as diagnostic reagents and exploited their intrinsic reactivity for the direct functionalization of their surface with carbohydrates. These glyco-CNDs showed specificity towards cancer cells that overexpress GLUT-1, galectin-3 and asialoglycoproteins receptors.

9.BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. 2008;452(7187):580–9.
2. Fass L. Imaging and cancer: A review. *Mol Oncol*. 2008;2(2):115–52.
3. Lima ZS, Ebadi MR, Amjad G, Younesi L. Application of imaging technologies in breast cancer detection: A review article. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(5):838–48.
4. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2014;1845(1):84–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>
5. Muthu MS, Leong DT, Mei L, Feng SS. Nanotheranostics - application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics. *Theranostics*. 2014;4(6):660–77.
6. Estanqueiro M, Amaral MH, Conceição J, Sousa Lobo JM. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. Vol. 126, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015. p. 631–48.
7. Luk BT, Zhang L. Current advances in polymer-based nanotheranostics for cancer treatment and diagnosis. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(24):21859–73.
8. Roma-rodrigues C, Rivas-garcía L, Baptista P V., Fernandes AR. Gene therapy in cancer treatment: Why go nano? *Pharmaceutics*. 2020;12(3).
9. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm* [Internet]. 2014;459(1–2):70–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.041>
10. Hu T, Li Z, Gao CY, Cho CH. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*. 2016;22(30):6876–89.
11. Fotheringham S, Mozolowski GA, Murray EMA, Kerr DJ. Challenges and solutions in patient treatment strategies for stage II colon cancer. *Gastroenterol Rep*. 2019;7(3):151–61.
12. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: A review. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8(1):57–84.
13. Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40(3):159–70.
14. Sparks J, Anwer T, Anwer K. Enhanced Polyethylenimine-Based Delivery of Nucleic Acids. *Polym Biomed*. 2017;273–95.
15. Thomas RG, Jeong YY. NIRF Heptamethine Cyanine Dye Nanocomplexes for Multi Modal Theranosis of Tumors . *Chonnam Med J*. 2017;53(2):83.
16. Shi C, Wu JB, Pan D. Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting, and photodynamic therapy. *J Biomed Opt*. 2016;21(5):050901.
17. Gidwani B, Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
18. Shelley H, Babu RJ. Role of Cyclodextrins in Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems. *J Pharm Sci* [Internet]. 2018;107(7):1741–53. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.03.021>
19. Riganti C, Rolando B, Kopecka J, Campia I, Chegaev K, Lazzarato L, et al. Mitochondrial-targeting nitrooxy-doxorubicin: A new approach to overcome drug resistance. *Mol Pharm*. 2013;10(1):161–74.
 20. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2019;321(3):288–300.
 21. Russnes HG, Lingjærde OC, Børresen-Dale AL, Caldas C. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *Am J Pathol*. 2017;187(10):2152–62.
 22. Zhang Y, Li X, Zhou D, Zhi H, Wang P, Gao Y, et al. Inferences of individual drug responses across diverse cancer types using a novel competing endogenous RNA network. *Mol Oncol*. 2018;12(9):1429–46.
 23. Frangioni J V. New technologies for human cancer imaging. *J Clin Oncol*. 2008;26(24):4012–21.
 24. Block K, Gyllenhaal C, Lowe L, Amedei A, Amin R, Amin A, et al. A Broad-spectrum Integrative Prevention Design for Cancer Prevention and Therapy. *Semin Cancer Biol*. 2015;35(Suppl):S276–304.
 25. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Front Pharmacol*. 2018;9(NOV).
 26. Yang J, Liu H, Zhang X. Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2014;32(4):804–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.004>
 27. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Vinals F, Capella G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Curr Pharm Des*. 2009;16(1):3–10.
 28. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol*. 2019;54(2):407–19.
 29. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. Vol. 93, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015. p. 52–79.
 30. Bull M. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
 31. Babu A, Templeton AK, Munshi A, Ramesh R. Nanodrug delivery systems: A promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(3):709–21.
 32. Buondonno I, Gazzano E, Jean SR, Audrito V, Kopecka J, Fanelli M, et al. Mitochondria-targeted doxorubicin: A new therapeutic strategy against doxorubicin-resistant osteosarcoma. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(11):2640–52.
 33. Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: Current treatment and a collaborative pathway to success. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):3029–35.
 34. Chou AJ, Gorlick R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: Current challenges and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6(7):1075–85.
 35. Peralta-Zaragoza O, Bermúdez-Morales VH, Pérez-Plasencia C, Salazar-León J, Gómez-Cerón C, Madrid-Marina V. Targeted treatments for cervical cancer: A review. *Onco Targets Ther*. 2012;5:315–28.
 36. Wang L, Dai G, Yang J, Wu W, Zhang W. Cervical cancer cell growth, drug resistance, and epithelial-mesenchymal transition are suppressed by γ -secretase

- inhibitor RO4929097. *Med Sci Monit.* 2018;24:4046–53.
37. Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X, Zhu X. Drug Design, Development and Therapy Dovepress Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2016;10–1885. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S106412>
 38. Xia C, Zhu S, Feng T, Yang M, Yang B. Evolution and Synthesis of Carbon Dots: From Carbon Dots to Carbonized Polymer Dots. *Adv Sci.* 2019;6(23).
 39. Ortega-Muñoz M, Vargas-Navarro P, Hernandez-Mateo F, Salinas-Castillo A, Capitan-Vallvey LF, Plesselova S, et al. Acid anhydride coated carbon nanodots: Activated platforms for engineering clicked (bio)nanoconstructs. *Nanoscale.* 2019;11(16):7850–6.
 40. Sun X, Lei Y. Fluorescent carbon dots and their sensing applications. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2017;89:163–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.02.001>
 41. Kim K, Choi H, Choi ES, Park MH, Ryu JH. Hyaluronic acid-coated nanomedicine for targeted cancer therapy. *Pharmaceutics.* 2019;11(7):1–22.
 42. Luo Z, Dai Y, Gao H. Development and application of hyaluronic acid in tumor targeting drug delivery. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2019;9(6):1099–112. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.06.004>
 43. Cole LE, Vargo-Gogola T, Roeder RK. Targeted delivery to bone and mineral deposits using bisphosphonate ligands. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;99:12–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.005>
 44. Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front Pharmacol.* 2018;9(JAN):1–14.
 45. Alhaque S, Themis M, Rashidi H. Three-dimensional cell culture: From evolution to revolution. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2018;373(1750).
 46. No Title. Available from: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
 47. No Title [Internet]. [cited 2021 Feb 6]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>
 48. Observatorio AECC | Observatorio AECC [Internet]. [cited 2021 Feb 6]. Available from: <http://observatorio.aecc.es/#datos-informes>
 49. Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, et al. Sustained proliferation in cancer: therapeutic targets. *Semin Cancer Biol.* 2016;35:25–54.
 50. Understanding Cancer - NIH Curriculum Supplement Series - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2020 Mar 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
 51. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer.* 2017;8(5):761–73.
 52. Tsai M-J, Chang W-A, Huang M-S, Kuo P-L. Tumor Microenvironment: A New Treatment Target for Cancer. *ISRN Biochem.* 2014;2014:1–8.
 53. Ribeiro Franco PI, Rodrigues AP, de Menezes LB, Pacheco Miguel M. Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2020;216(1):152729. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152729>
 54. Diagnosis and Staging - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2020 Apr 1]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging>

BIBLIOGRAFÍA

55. Schiffman JD, Fisher PG, Gibbs P. Early Detection of Cancer: Past, Present, and Future. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2015;(35):57–65.
56. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov*. 2016;6(5):479–91.
57. Roy Chowdhury M, Schumann C, Bhakta-Guha D, Guha G. Cancer nanotheranostics: Strategies, promises and impediments. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2016;84:291–304. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.035>
58. Neves AA, Brindle KM. Assessing responses to cancer therapy using molecular imaging. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2006;1766(2):242–61.
59. Combs CA. Fluorescence microscopy: A concise guide to current imaging methods. *Curr Protoc Neurosci*. 2010;(SUPPL.50):1–19.
60. St Croix CM, Shand SH, Watkins SC. Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems. *Biotechniques*. 2005;39(6 Suppl).
61. Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev*. 2002;102(3):759–81.
62. Day RN, Davidson MW. The fluorescent protein palette: Tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev*. 2009 Sep 21;38(10):2887–921.
63. Chudakov DM, Matz M V., Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev*. 2010;90(3):1103–63.
64. Kalyanaraman B. Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree? *Redox Biol* [Internet]. 2020;29(November 2019):101394. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101394>
65. Nitiss KC, Nitiss JL. Twisting and ironing: Doxorubicin cardiotoxicity by mitochondrial DNA damage. *Clin Cancer Res*. 2014;20(18):4737–9.
66. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207–18.
67. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv Pharm Bull* [Internet]. 2017;7(3):339–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2017.041>
68. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature* [Internet]. 2019;575(7782):299–309. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
69. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1769–92.
70. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist*. 2019;
71. Zavala VA, Kalergis AM. New clinical advances in immunotherapy for the treatment of solid tumours. *Immunology*. 2015;145(2):182–201.
72. Pennock GK, Chow LQM. New Drug Development and Clinical Pharmacology The Evolving Role of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Treatment. *Oncologist* [Internet]. 2015;20(7):812–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2014->

73. Amer Ridha A, Pakravan P, Hemati Azandaryani A, Zhaleh H. Carbon dots; the smallest photoresponsive structure of carbon in advanced drug targeting. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2020;55(October 2019):101408. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101408>
74. Zhao X, Zhang J, Shi L, Xian M, Dong C, Shuang S. Folic acid-conjugated carbon dots as green fluorescent probes based on cellular targeting imaging for recognizing cancer cells. *RSC Adv*. 2017;7(67):42159–67.
75. Duchêne D, Bochot A. Thirty years with cyclodextrins. *Int J Pharm* [Internet]. 2016;514(1):58–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.030>
76. Datz S, Illes B, Gößl D, Schirnding C V., Engelke H, Bein T. Biocompatible crosslinked β -cyclodextrin nanoparticles as multifunctional carriers for cellular delivery. *Nanoscale* [Internet]. 2018;10(34):16284–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c8nr02462f>
77. Uekama K. Cyclodextrins in drug delivery system. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;36(1):1–2.
78. Tiwari G, Tiwari R, Rai A. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *J Pharm Bioallied Sci*. 2010;2(2):72.
79. Jeffrey R. Wozniak, Ph.D., Edward P. Riley, Ph.D., Michael E. Charness MD. 肌肉作为内分泌和旁分泌器官 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2019;176(1):139–48.
80. MA Gillentine, LN Berry, RP Goin-Kochel, MA Ali, J Ge, D Guffey, JA Rosenfeld, V Hannig, P Bader, M Proud, M Shinawi, BH Graham1, A Lin, SR Lalani, J Reynolds, M Chen, T Grebe, CG Minard, P Stankiewicz, AL Beaudet and C, Schaaf. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *J Autism Dev Disord*. 2017;47(3):549–62.
81. Forest V, Pourchez J. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona. *Mater Sci Eng C*. 2017;70:889–96.
82. Villanueva-Flores F, Castro-Lugo A, Ramírez OT, Palomares LA. Understanding cellular interactions with nanomaterials: Towards a rational design of medical nanodevices. *Nanotechnology*. 2020;31(13).
83. Kelf TA, Sreenivasan VKA, Sun J, Kim EJ, Goldys EM, Zvyagin A V. Non-specific cellular uptake of surface-functionalized quantum dots. *Nanotechnology*. 2010;21(28):1–14.
84. Johnston ST, Crampin EJ. Isolating the sources of heterogeneity in nanoparticle-cell interactions. 2019;
85. Rees P, Wills JW, Brown MR, Barnes CM, Summers HD. The origin of heterogeneous nanoparticle uptake by cells. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10112-4>
86. Ha MK, Chung KH, Yoon TH. Heterogeneity in biodistribution and cytotoxicity of silver nanoparticles in pulmonary adenocarcinoma human cells. *Nanomaterials*. 2020;10(1).
87. CANBEK M. The Relationship of Hyaluronic Acid-CD44 on Cancer Progression and Hyaluronic Acid-Based Self-Assembled Nanoparticle Roles. *Biomed J Sci Tech Res*. 2019;22(2):16560–4.

BIBLIOGRAFÍA

88. Cho Y, Lee HW, Kang HG, Kim HY, Kim SJ, Chun KH. Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6(11):8709–21.
89. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5(MAR).
90. Farrell KB, Karpeisky A, Thamm DH, Zinnen S. Bisphosphonate conjugation for bone specific drug targeting. *Bone Reports [Internet]*. 2018;9(June):47–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.06.007>
91. Nadar RA, Margiotta N, Iafisco M, van den Beucken JJJP, Boerman OC, Leeuwenburgh SCG. Bisphosphonate-Functionalized Imaging Agents, Anti-Tumor Agents and Nanocarriers for Treatment of Bone Cancer. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(8).
92. Rudnick-Glick S, Corem-Salkmon E, Grinberg I, Margel S. Targeted drug delivery of near IR fluorescent doxorubicin-conjugated poly(ethylene glycol) bisphosphonate nanoparticles for diagnosis and therapy of primary and metastatic bone cancer in a mouse model. *J Nanobiotechnology*. 2016;14(1):1–11.
93. Fazil M, Baboota S, Sahni JK, Ameenuzzafar, Ali J. Bisphosphonates: Therapeutics potential and recent advances in drug delivery. *Drug Deliv*. 2015;22(1):1–9.
94. Inoue R, Matsuki NA, Jing G, Kanematsu T, Abe K, Hirata M. The inhibitory effect of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate on the PI3K-Akt-NFκB pathway in osteosarcoma cells. *Br J Pharmacol*. 2005;146(5):633–41.
95. Tsubaki M, Komai M, Itoh T, Imano M, Sakamoto K, Shimaoka H, et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit RANKL- and M-CSF-induced osteoclast formation through the inhibition of ERK1/2 and Akt activation. *J Biomed Sci [Internet]*. 2014;21(1):1–14. Available from: *Journal of Biomedical Science*
96. Kröger APP, Komil MI, Hamelmann NM, Juan A, Stenzel MH, Paulusse JMJ. Glucose Single-Chain Polymer Nanoparticles for Cellular Targeting. *ACS Macro Lett*. 2019;8(1):95–101.
97. Quan G, Pan X, Wang Z, Wu Q, Li G, Dian L, et al. Lactosaminated mesoporous silica nanoparticles for asialoglycoprotein receptor targeted anticancer drug delivery. *J Nanobiotechnology*. 2015;13(1):1–12.
98. Aykaç A, Martos-Maldonado MC, Casas-Solvas JM, Quesada-Soriano I, García-Maroto F, García-Fuentes L, et al. B-Cyclodextrin-Bearing Gold Glyconanoparticles for the Development of Site Specific Drug Delivery Systems. *Langmuir*. 2014;30(1):234–42.
99. Hatami E, Mu Y, Shields DN, Chauhan SC, Kumar S, Cory TJ, et al. Mannose-decorated hybrid nanoparticles for enhanced macrophage targeting. *Biochem Biophys Reports [Internet]*. 2019;17(December 2018):197–207. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.01.007>
100. Ye Z, Zhang Q, Wang S, Bharate P, Varela-Aramburu S, Lu M, et al. Tumour-Targeted Drug Delivery with Mannose-Functionalized Nanoparticles Self-Assembled from Amphiphilic β-Cyclodextrins. *Chem - A Eur J*. 2016;22(43):15216–21.
101. Hu Y, Xu BH, Xu JJ, Shou D, Gao JQ. Synthesis of mannosylated polyethylenimine

- and its potential application as cell-targeting non-viral vector for gene therapy. *Polymers (Basel)*. 2014;6(10):2573–87.
102. Irache JM, Salman HH, Gamazo C, Espuelas S. Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008;5(6):703–24.
 103. Gray WD, Che P, Brown M, Ning X, Murthy N, Davis ME, et al. N-acetylglucosamine conjugated to nanoparticles enhances J Cardiovasc. 2012;4(5):631–43.
 104. Tian B, Ding Y, Han J, Zhang J, Han Y, Han J. N-acetyl-d-glucosamine decorated polymeric nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin: Synthesis, characterization and in vitro evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2015;130:246–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.019>
 105. Li J, Ma FK, Dang QF, Liang XG, Chen XG. Glucose-conjugated chitosan nanoparticles for targeted drug delivery and their specific interaction with tumor cells. *Front Mater Sci*. 2014;8(4):363–72.
 106. Venturelli L, Nappini S, Bulfoni M, Gianfranceschi G, Dal Zilio S, Coceano G, et al. Glucose is a key driver for GLUT1-mediated nanoparticles internalization in breast cancer cells. *Sci Rep*. 2016;6:1–14.
 107. Zhang W, Zhang SL, Hu X, Tam KY. Targeting tumor metabolism for cancer treatment: Is pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs) a viable anticancer target? *Int J Biol Sci*. 2015;11(12):1390–400.
 108. Ahmed M, Narain R. Carbohydrate-based materials for targeted delivery of drugs and genes to the liver. *Nanomedicine*. 2015;10(14):2263–88.
 109. D'Souza AA, Devarajan P V. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting - Strategies and applications. *J Control Release* [Internet]. 2015;203:126–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.022>
 110. Roggenbuck D, Mytilinaiou MG, Lapin S V., Reinhold D, Conrad K. Asialoglycoprotein receptor (ASGPR): A peculiar target of liver-specific autoimmunity. *Autoimmun Highlights*. 2012;3(3):119–25.
 111. Ebrahim AH, Alalawi Z, Mirandola L, Rakhshanda R, Dahlbeck S, Nguyen D, et al. Galectins in cancer: Carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Ann Transl Med*. 2014;2(9):1–7.
 112. Farhad M, Rolig AS, Redmond WL. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018;7(6):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1434467>
 113. Dings R, Miller M, Griffin R, Mayo K. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Mar 19;19(3):905. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/3/905>
 114. Vladioiu MC, Labrie M, St-Pierre Y. Intracellular galectins in cancer cells: Potential new targets for therapy (review). *Int J Oncol*. 2014;44(4):1001–14.
 115. Ahmed H, Guha P, Kaptan E, Bandyopadhyaya G. Galectin-3: A potential target for cancer prevention. *Trends Carbohydr Res*. 2011;3(2):12–21.
 116. Kim JW, Dang C V. Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Res*. 2006;66(18):8927–30.
 117. Ruvolo PP. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim*

- Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]. 2016;1863(3):427–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.008>
118. Piyush T, Chacko AR, Sindrewicz P, Hilkens J, Rhodes JM, Yu L-G. Interaction of galectin-3 with MUC1 on cell surface promotes EGFR dimerization and activation in human epithelial cancer cells. *Cell Death Differ* [Internet]. 2017 Nov 21;24(11):1937–47. Available from: <http://www.nature.com/articles/cdd2017119>
 119. Wirth T, Ylä-Herttua S. Gene therapy used in cancer treatment. *Biomedicines*. 2014;2(2):149–62.
 120. Chen J, Guo Z, Tian H, Chen X. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Mol Ther - Methods Clin Dev* [Internet]. 2016;3(September 2015):16023. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mtm.2016.23>
 121. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–11.
 122. Cabeza L, Ortiz R, Arias JL, Prados J, Martínez MAR, Entrena JM, et al. Enhanced antitumor activity of doxorubicin in breast cancer through the use of poly(Butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1291–306.
 123. Becker S. A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. 2015;131:S36–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.03.015>
 124. Haycock JW. Chapter 1 and Techniques. *3D Cell Cult Methods Protoc Methods Mol Biol*. 2011;695:1–15.
 125. Lv D, Hu Z, Lu L, Lu H, Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol Lett*. 2017;14(6):6999–7010.
 126. Sambrook J FE and MT. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harb Lab Press New York.
 127. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281–308.
 128. Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(20):6169.
 129. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557–80.
 130. Rejman J, Bragonzi A, Conese M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther* [Internet]. 2005;12(3):468–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.03.038>
 131. Guo S, Zhang X, Zheng M, Zhang X, Min C, Wang Z, et al. Selectivity of commonly used inhibitors of clathrin-mediated and caveolae-dependent endocytosis of G protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2015;1848(10):2101–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.05.024>
 132. Guo J, Li L, Guo B, Liu D, Shi J, Wu C, et al. Mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy in hepatocellular carcinoma. *Transl Cancer Res*. 2018;7(3):765–81.
 133. Francia V, Reker-Smit C, Boel G, Salvati A. Limits and challenges in using

- transport inhibitors to characterize how nano-sized drug carriers enter cells. *Nanomedicine*. 2019;14(12):1533–49.
134. Svoboda M, Riha J, Wlcek K, Jaeger W, Thalhammer T. Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs): Regulation of Expression and Function. *Curr Drug Metab*. 2011;12(2):139–53.
135. de la Puente P, Muz B, Gilson RC, Azab F, Luderer M, King J, et al. 3D tissue-engineered bone marrow as a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma. *Biomaterials* [Internet]. 2015;73:70–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.017>
136. Calar K, Plesselova S, Bhattacharya S, Jorgensen M, de la Puente P. Human plasma-derived 3d cultures model breast cancer treatment responses and predict clinically effective drug treatment concentrations. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1–29.
137. Clark NA, Hafner M, Kouril M, Williams EH, Muhlich JL, Pilarczyk M, et al. GRcalculator: an online tool for calculating and mining dose-response data. *BMC Cancer*. 2017;17(1):698.
138. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76–85.
139. Mruk DD, Cheng CY. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting. *Spermatogenesis*. 2011;1(2):121–2.
140. De Los Reyes-Berbel E, Salto-Gonzalez R, Ortega-Munoz M, Reche-Perez FJ, Jodar-Reyes AB, Hernandez-Mateo F, et al. PEI-NIR Heptamethine Cyanine Nanotheranostics for Tumor Targeted Gene Delivery. *Bioconjug Chem*. 2018;29(8):2561–75.
141. Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev*. 2009;109(2):259–302.
142. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials*. 2001;22(5):471–80.
143. Luxminarayan L, Neha S, Amit V, Khinchi MP. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. *Asian J Pharm Res Dev*. 2017;5(2):1–8.
144. Del Castillo T, Marales-Sanfrutos J, Santoyo-Gonzlez F, Magez S, Lopez-Jaramillo FJ, Garcia-Salcedo JA. Monovinyl sulfone B-cyclodextrin. a flexible drug carrier system. *ChemMedChem*. 2014;9(2):383–9.
145. Morales-Sanfrutos J, Lopez-Jaramillo J, Ortega-Muñoz M, Megia-Fernandez A, Perez-Balderas F, Hernandez-Mateo F, et al. Vinyl sulfone: A versatile function for simple bioconjugation and immobilization. *Org Biomol Chem*. 2010;8(3):667–75.
146. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Russell RGG, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 1998;13(4):581–9.
147. Schem C, Tower RJ, Kneissl P, Rambow AC, Campbell GM, Desel C, et al. Pharmacologically Inactive Bisphosphonates as an Alternative Strategy for Targeting Osteoclasts: In Vivo Assessment of 5-Fluorodeoxyuridine-Alendronate in a Preclinical Model of Breast Cancer Bone Metastases. *J Bone Miner Res*. 2017;32(3):536–48.

BIBLIOGRAFÍA

148. Chang J, Wang W, Zhang H, Hu Y, Yin Z. Bisphosphonates regulate cell proliferation, apoptosis and pro-osteoclastic expression in MG-63 human osteosarcoma cells. *Oncol Lett.* 2012;4(2):299–304.
149. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res.* 1992;7(6):683–92.
150. Sun J, Song F, Zhang W, Sexton BE, Windsor LJ. Effects of alendronate on human osteoblast-like MG63 cells and matrix metalloproteinases. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2012;57(6):728–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.12.007>
151. Carpio L, Gladu J, Goltzman D, Rabbani SA. Induction of osteoblast differentiation indexes by PTHrP in MG-63 cells involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2001;281(3 44-3):489–99.
152. Reyes C, Hitz M, Prieto-Alhambra D, Abrahamsen B. Risks and Benefits of Bisphosphonate Therapies. *J Cell Biochem.* 2016;117(1):20–8.
153. Ebert R, Meissner-Weigl J, Zeck S, Määttä J, Auriola S, Coimbra de Sousa S, et al. Probenecid as a sensitizer of bisphosphonate-mediated effects in breast cancer cells. *Mol Cancer.* 2014;13(1):1–13.
154. Hiraga T, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T. The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases. *Cancer Res.* 2001;61(11):4418–24.
155. Bao K, Nasr KA, Hyun H, Lee JH, Gravier J, Gibbs SL, et al. Charge and hydrophobicity effects of NIR fluorophores on bone-specific imaging. *Theranostics.* 2015;5(6):609–17.
156. Sebbah-Louriki M, Colombo BM, El Manouni D, Martin A, Salzmänn JL, Leroux Y, et al. A new phenylacetate-bisphosphonate inhibits breast cancer cell growth by proapoptotic and antiangiogenic effects. *Anticancer Res.* 2002;22(6 C):3925–31.
157. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 2004;377(1):159–69.
158. Chandra P, Zhang P, Brouwer KLR. Short-term regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in rat and human hepatocytes. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(6 51-6):1252–8.
159. Coley HM, Amos WB, Twentyman PR, Workman P. Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of the subcellular localisation of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines. *Br J Cancer.* 1993;67(6):1316–23.
160. Marshall M V., Rasmussen JC, Tan I-C, Aldrich MB, Adams KE, Wang X, et al. Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update. *Open Surg Oncol J.* 2020;2(1):12–25.
161. Zhong L, Liu Y, Xu L, Li Q, Zhao D, Li Z, et al. Exploring the relationship of hyaluronic acid molecular weight and active targeting efficiency for designing hyaluronic acid-modified nanoparticles. *Asian J Pharm Sci.* 2019;14(5):521–30.
162. Mizrahy S, Raz SR, Hasgaard M, Liu H, Soffer-Tsur N, Cohen K, et al. Hyaluronan-coated nanoparticles: The influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response. *J Control Release* [Internet]. 2011;156(2):231–8. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.031>
163. Mäger I, Langel K, Lehto T, Eiríksdóttir E, Langel Ü. The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2012;1818(3):502–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.020>
 164. Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller and DJL. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389–402.
 165. De La Puente P, Muz B, Gilson RC, Azab F, Luderer M, King J, et al. 3D tissue-engineered bone marrow as a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma HHS Public Access. *Biomaterials.* 2015;73:70–84.
 166. Gulbake A, Jain A, Jain A, Jain A, Jain SK. Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):582–99.
 167. Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R. Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells. *J Cell Physiol.* 2009;221(3):552–9.
 168. Jeyamogan S, Khan NA, Siddiqui R. Application and Importance of Theranostics in the Diagnosis and Treatment of Cancer. *Arch Med Res* [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.016>
 169. Song X, Han X, Yu F, Zhang X, Chen L, Lv C. Polyamine-targeting Gefitinib prodrug and its near-infrared fluorescent theranostic derivative for monitoring drug delivery and lung cancer therapy. *Theranostics.* 2018;8(8):2217–28.
 170. Guo X, Li D, Yang G, Shi C, Tang Z, Wang J, et al. Thermo-triggered drug release from actively targeting polymer micelles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(11):8549–59.
 171. Dawidczyk CM, Russell LM, Searson PC. Nanomedicines for cancer therapy: State-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Front Chem.* 2014;2(AUG).
 172. Prabhu RH, Patravale VB, Joshi MD. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: Current insights. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:1001–18.
 173. Fan W, Xu Y, Li Z, Li Q. Folic acid-modified β -cyclodextrin nanoparticles as drug delivery to load DOX for liver cancer therapeutics. *Soft Mater* [Internet]. 2019;17(4):437–47. Available from: <https://doi.org/10.1080/1539445X.2019.1624265>
 174. Dass CR, Choong PFM. Gene therapy for osteosarcoma: steps towards clinical studies. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(4):405–13.
 175. Barone AW, Fernandes G, Dziak R. Effects of alendronate and interferon- γ on bone cancer cells in vitro. *Cogent Biol* [Internet]. 2018;4(1):1–12. Available from: <http://doi.org/10.1080/23312025.2018.1427306>
 176. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Introduction. 1999;104(10):1363–74.
 177. Mei LT, Choong PFM, Dass CR. Osteosarcoma: Conventional treatment vs. gene therapy. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(2):106–17.
 178. Witlox MA, Lamfers ML, Wuisman PIJM, Curiel DT, Siegal GP. Evolving gene therapy approaches for osteosarcoma using viral vectors: Review. *Bone.* 2007;40(4):797–812.

BIBLIOGRAFÍA

179. Dutour A, Monteil J, Paraf F, Charissoux JL, Kaletta C, Sauer B, et al. Endostatin cDNA/cationic liposome complexes as a promising therapy to prevent lung metastases in osteosarcoma: Study in a human-like rat orthotopic tumor. *Mol Ther*. 2005;11(2):311–9.
180. Li J, He Y, Sun W, Luo Y, Cai H, Pan Y, et al. Hyaluronic acid-modified hydrothermally synthesized iron oxide nanoparticles for targeted tumor MR imaging. *Biomaterials* [Internet]. 2014;35(11):3666–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.011>
181. Arpicco S, Lerda C, Dalla Pozza E, Costanzo C, Tsapis N, Stella B, et al. Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2013;85(3 PART A):373–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.003>
182. Qhattal HSS, Liu X. Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes. *Mol Pharm*. 2011;8(4):1233–46.
183. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, Olekhovich R. Hyaluronic Acid : The Influence of Molecular Weight and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers (Basel)*. 2020;12:1800.
184. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2007;608:1–22.
185. Wang S, Zhang J, Wang Y, Chen M. Hyaluronic acid-coated PEI-PLGA nanoparticles mediated co-delivery of doxorubicin and miR-542-3p for triple negative breast cancer therapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2016;12(2):411–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.014>
186. Li JM, Zhang W, Su H, Wang YY, Tan CP, Ji LN, et al. Reversal of multidrug resistance in MCF-7/Adr cells by codelivery of doxorubicin and BCL2 siRNA using a folic acid-conjugated polyethylenimine hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanocarrier. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:3147–62.
187. Kong L, Mu Z, Yu Y, Zhang L, Hu J. Polyethyleneimine-stabilized hydroxyapatite nanoparticles modified with hyaluronic acid for targeted drug delivery. *RSC Adv*. 2016;6(104):101790–9.
188. Wang Z, Tang Y, Xie L, Huang A, Xue C, Gu Z, et al. The prognostic and clinical value of CD44 in colorectal cancer: A meta-analysis. *Front Oncol*. 2019;9(APR):1–11.
189. Alves CG, de Melo-Diogo D, Lima-Sousa R, Costa EC, Correia IJ. Hyaluronic acid functionalized nanoparticles loaded with IR780 and DOX for cancer chemophotothermal therapy. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2019;137(January):86–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.02.016>
190. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(10):1495–506.
191. Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials*. 2005;26(9):979–86.
192. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, et al.

- Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1837–43.
193. Hafner M, Heiser LM, Williams EH, Niepel M, Wang NJ, Korkola JE, et al. Quantification of sensitivity and resistance of breast cancer cell lines to anti-cancer drugs using GR metrics. *Sci Data.* 2017;4:1–9.
194. Zhang X, Huang G, Huang H. The glyconanoparticle as carrier for drug delivery. *Drug Deliv [Internet].* 2018;25(1):1840–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1519001>
195. Azad AK, Rajaram MVS, Schlesinger LS. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol [Internet].* 2014;1(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24672807> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3963702>
196. Cao S, Pei Z, Xu Y, Pei Y. Glyco-Nanovesicles with Activatable Near-Infrared Probes for Real-Time Monitoring of Drug Release and Targeted Delivery. *Chem Mater.* 2016;28(12):4501–6.
197. Pawar SK, Badhwar AJ, Kharas F, Khandare JJ, Vavia PR. Design, synthesis and evaluation of N-acetyl glucosamine (NAG)-PEG-doxorubicin targeted conjugates for anticancer delivery. *Int J Pharm [Internet].* 2012;436(1–2):183–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.078>
198. Liu JH, Cao L, LeCroy GE, Wang P, Meziani MJ, Dong Y, et al. Carbon “Quantum” Dots for Fluorescence Labeling of Cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(34):19439–45.
199. Liu ML, Chen B Bin, Li CM, Huang CZ. Carbon dots: Synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. *Green Chem.* 2019;21(3):449–71.
200. Pardo J, Peng Z, Leblanc RM. Cancer targeting and drug delivery using carbon-based quantum dots and nanotubes. *Molecules.* 2018;23(2).
201. Wu ZL, Liu ZX, Yuan YH. Carbon dots: Materials, synthesis, properties and approaches to long-wavelength and multicolor emission. *J Mater Chem B [Internet].* 2017;5(21):3794–809. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7TB00363C>
202. Weng CI, Chang HT, Lin CH, Shen YW, Unnikrishnan B, Li YJ, et al. One-step synthesis of bifunctional carbon quantum dots for bacterial labeling. *Biosens Bioelectron.* 2015;68:1–6.
203. Wang HJ, Zhang J, Liu YH, Luo TY, He X, Yu XQ. Hyaluronic acid-based carbon dots for efficient gene delivery and cell imaging. *RSC Adv.* 2017;7(25):15613–24.
204. Sharker SM, Kim SM, Kim SH, In I, Lee H, Park SY. Target delivery of β -cyclodextrin/paclitaxel complexed fluorescent carbon nanoparticles: Externally NIR light and internally pH sensitive-mediated release of paclitaxel with bio-imaging. *J Mater Chem B [Internet].* 2015;3(28):5833–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C5TB00779H>