

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOMEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Diseño de una proteína ligando inspirada en la toxina del ántrax para la
dirección de nanomedicinas hacia el receptor tumoral TEM8**

PhD THESIS

**Design of a ligand protein inspired by the anthrax toxin to target
nanomedicines to the TEM8 tumoral receptor**

Realizada por:

Ana Márquez López

Dirigida por:

Dra. Mónica López Fanarraga

ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Santander, 2024

Dña. Mónica López Fanarraga, Catedrática del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA:

Que Dña. Ana Márquez López ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: *“Diseño de una proteína ligando inspirada en la toxina del ántrax para la dirección de nanomedicinas hacia el receptor tumoral TEM8”*.

Considero que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Santander, a 12 de julio de 2024.

Fdo. Mónica López Fanarraga

(Directora y Tutora)

Esta Tesis ha sido financiada gracias a:

- Proyectos de investigación PI19/00349, PI22/00030 y PI23/00261.

Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad. Fondos
FEDER.

- Proyectos PREVAL20/02, INNVAL21/19, INNVAL19/12 del
Instituto de investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL).

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar estas líneas para agradecer a las personas que han hecho posible este trabajo. Las que empezaron acompañándome en esta aventura y ya no están, y aquellas que han seguido a mi lado.

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a mi directora de tesis, Mónica López Fanarraga. Muchas gracias por contar conmigo y darme la oportunidad hasta el final de realizar este trabajo en tu laboratorio. Gracias por enseñarme a ser paciente y a creer en mí misma.

Agradecer también a todo el grupo de Nanomedicina de la Universidad de Cantabria, sin los cuales, parte de este trabajo no habría salido adelante: Miguel, Iñigo, Juan Villegas, Rosa, Marina, Andrea y Víctor Ovejero. Ha sido un placer contar con vosotros, con vuestro conocimiento y experiencia. De forma especial les agradezco a Rafa y Lorena García, por haberme acompañado durante estos 4 años en el seguimiento del trabajo, por los consejos y por la paciencia.

Al Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) y la Universidad de Cantabria por la ayuda económica sin la cual esta tesis no habría sido posible. A todo el personal de administración por su dedicación y a David, María, responsables de la Unidad de Citometría de Flujo de IDIVAL y la UC, y a Fidel, responsable de la Unidad de Microscopía de IDIVAL.

A mi familia de laboratorio: Javier Santamaría, Andrés², Claudia, Henning, Lara, Judith, Laura y Ruth. A Amaya, Aitana, Jesús y Ana Marcos. A Laura Álvarez por sacarme siempre una sonrisa. Chicos, ha sido un enorme placer compartir estos años con vosotros. Sin duda, habéis hecho que todo fuera más ameno, incluso en los peores momentos. Andrés Ramos, me has acompañado casi desde el principio, muchas gracias por todas nuestras conversaciones y por todas las risas.

Ana y Deb, no puedo alcanzar a describir lo agradecida que estoy de haberos conocido. Creo que lo que empezó siendo una simple coincidencia ha terminado siendo una amistad para siempre. Solo vosotras comprendéis todo lo que esto significa. Lo mismo puedo decir de mis ex compañeros de labo. Lourdes, Nerea, Elena, Espe, Lorena González y Carlos. Os quiero mucho a todos.

A mis amigos de Santander. A mis cavlistas. Chicas, gracias a vosotras los miércoles se convirtieron en mi día favorito de la semana, y creedme, merecía la pena. Os estaré eternamente agradecida por crear y compartir momentos tan

bonitos y sinceros. Seguiremos creciendo juntas. A Cris, muchas gracias por atreverte a compartir conmigo, eres inspiración.

A mis amigos de Granada (Mónica, Carla, Pepe, Juanmi, Javi y Luis). Sobran las palabras, porque habéis hecho que cada viaje Santander-Granada y viceversa, mereciera la pena. Si algo me habéis demostrado en todos estos años, es que nuestra amistad es para siempre. Os quiero.

A la persona que más tarde se unió a esta aventura, Roberto. Eres la calma que necesitaba, sin duda, te ha tocado vivir de primera mano todo esto. Gracias por la paciencia y por creer en mí. Gracias por ser mi hogar. Te quiero.

Y, por último, y no menos importante a mi familia. Especialmente, a mis padres, Isaías y Esther, creo que solo puedo daros las gracias una y otra vez por vuestro apoyo incondicional. Nunca fue fácil vivir tan lejos, pero con el paso de los años cada vez entiendo mejor la frase que mamá me repetiría en cada despedida: “Si es que, ¡Santander está muy lejos!” A mi hermana y “hermano” (Cris e Isma), sin duda, todo sería más difícil sin vosotros. Cris, siempre fuiste un ejemplo para mí. Aunque seamos como la noche y el día (y tú sabes a lo que me refiero), siempre existirá una unión inexplicable entre nosotras. Seguiremos sumando aventuras. A los 4, gracias por estar cada vez que os he necesitado, os quiero mucho.

RESUMEN

El tratamiento del cáncer sigue siendo hoy en día un gran desafío a nivel mundial. La aparición de terapias innovadoras, como las terapias moleculares dirigidas al microambiente tumoral (TME), han representado un avance significativo en este campo, ya que abordan en gran medida, el problema de la heterogeneidad intratumoral. Actualmente las dianas del TME más exploradas son aquellas que van dirigidas hacia la neovasculatura tumoral (como por ejemplo, la vía VEGF/VEGFR). Sin embargo, debido a la falta de exclusividad de estas dianas en los tumores, estas terapias pueden presentar efectos adversos y comprometer el desarrollo de la vasculatura fisiológica. En la búsqueda de dianas más específicas en el TME, destaca el Marcador Tumoral Endotelial 8 (TEM8). Se trata de una proteína de membrana que se encuentra sobreexpresada en la neovasculatura tumoral frente a la vasculatura fisiológica en tumores sólidos, además de en células sostén del TME, como los fibroblastos asociados a tumores. La posibilidad de dirigir agentes antitumorales hacia este receptor a través de su ligando natural, la toxina del ántrax (Atx), le convierten en una diana interesante en las terapias contra el cáncer.

El objetivo principal de este trabajo ha consistido en diseñar una proteína ligando inspirada en la Atx para dirigir nanomedicinas al TME a través del receptor TEM8. Se ha evaluado la capacidad de unión de la proteína ligando al receptor tanto *in vitro* como *in cellulo*, y se ha estudiado su actividad antitumoral intrínseca en modelos de melanoma murino subcutáneo. Esta proteína ligando se ha empleado para una conjugación electrostática estable y orientada de un nanosistema quimioterápico, basado en nanopartículas de sílice mesoporosa con doxorubicina encapsulada. El tratamiento tanto intratumoral como intravenoso de modelos de melanoma murino subcutáneo con la quimioterapia nanoencapsulada y dirigida a TEM8, ha mostrado una reducción significativa en el crecimiento tumoral con respecto al nanosistema sin dirigir y al fármaco libre. Resultados similares se obtuvieron tras el direccionamiento de otra quimioterapia basada en un oligonucleótido formado por 10 unidades de 5-fluorouracilo, nanoencapsulada en nanopartículas de sílice compacta. Se trata, por tanto, de una terapia prometedora para el tratamiento del cáncer, que resulta más eficiente y podría disminuir los efectos secundarios de los tratamientos convencionales.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	17
1.1. Cáncer y microambiente tumoral.....	19
1.1.1. Microambiente tumoral	19
1.1.2. Señales distintivas del cáncer: inducción de la angiogénesis y metástasis.....	20
1.1.3. Melanoma maligno	25
1.2. Terapias convencionales en el tratamiento del cáncer	27
1.2.1. Cirugía, radioterapia y quimioterapia	27
1.2.2. Inmunoterapia y terapias moleculares dirigidas.....	30
1.3. Nanotecnología y nanomedicina	32
1.3.1. Características generales y clasificación de los nanomateriales	34
1.3.2. Nanopartículas de sílice mesoporosa	36
1.3.3. Identidad biológica de las nanopartículas: biocorona	37
1.3.4. Funcionalización de nanopartículas	39
1.3.5. Dianas para el direccionamiento de nanopartículas al microambiente tumoral	42
1.4. Receptores de toxinas AB bacterianas como dianas en el tratamiento del cáncer.....	44
1.4.1. Toxina del ántrax y su receptor TEM8.....	45
1.4.2. Papel fisiológico y patológico del receptor TEM8.....	50
1.4.3. La toxina del ántrax como ligando de direccionamiento de agentes terapéuticos y de diagnóstico	52
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.1. Proteínas recombinantes	61
3.1.1. Reactivos.....	61
3.1.2. Diseño de genes y proteínas recombinantes para expresión bacteriana	62
3.1.3. Sobreexpresión de proteínas recombinantes en bacterias	66

3.1.4.	Purificación de proteínas recombinantes bacterianas	68
3.1.5.	Cuantificación de proteínas.....	70
3.1.6.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	71
3.1.7.	Identificación de proteínas contaminantes	71
3.1.8.	Diseño de la proteína TEM8-EGFP recombinante para la expresión eucariota	72
3.1.9.	Purificación de ADN plasmídico	73
3.2.	Nanomateriales	73
3.2.1.	Reactivos.....	74
3.2.2.	Tipos de nanopartículas empleadas.....	74
3.2.3.	Técnicas de caracterización de nanopartículas	76
3.2.4.	Ensayos de liberación de fármaco <i>in vitro</i>	84
3.2.5.	Disolución de partículas <i>in vitro</i>	85
3.3.	Ensayos <i>in cellulo</i>	85
3.3.1.	Reactivos.....	85
3.3.2.	Medios de cultivo y soluciones.....	86
3.3.3.	Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	86
3.3.4.	Técnicas de análisis de cultivos celulares	87
3.3.5.	Modelo de sobreexpresión de TEM8 <i>in cellulo</i>	88
3.3.6.	Experimentos de interacción de proteínas ligando con TEM8 <i>in vitro</i>	90
3.3.7.	Liberación de doxorubicina encapsulada en cultivos celulares.....	92
3.3.8.	Análisis de los cambios morfológicos celulares inducidos por doxorubicina	92
3.3.9.	Ensayos de viabilidad celular.....	93
3.3.10.	Análisis del ciclo celular	93
3.4.	Experimentos <i>in vivo</i>	95
3.4.1.	Modelos animales	95
3.4.2.	Modelos de melanoma maligno murino.....	95
3.4.3.	Características histopatológicas de los modelos de melanoma desarrollados	97

3.4.4.	Inmunodetección del receptor TEM8 en tumores de melanoma murino.....	100
3.4.5.	Biodistribución de la proteína ligando PA17 en un modelo de melanoma murino subcutáneo	101
3.4.6.	Tratamiento de modelos de melanoma murino subcutáneo	101
3.4.7.	Evaluación de la fluorescencia en sangre en un modelo de carcinomatosis peritoneal.....	103
3.5.	Análisis Estadísticos	103
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		105
4.1.	Producción y purificación de proteínas ligando inspiradas en la toxina del ántrax	107
4.1.1.	Producción y purificación de proteínas ligando recombinantes 6xHis.....	109
4.1.2.	Reclonado, producción y purificación de proteínas ligando recombinantes 10xHis.....	112
4.1.3.	Funcionalización de nanopartículas como prueba de concepto	114
4.2.	Estudios <i>in vitro</i> de la afinidad y especificidad de las proteínas ligando por TEM8.....	116
4.2.1.	Diseño de un modelo de sobreexpresión de TEM8 en sistemas celulares.....	116
4.2.2.	Ensayos de interacción ligando-receptor <i>in vitro</i>	120
4.2.3.	Estudio de la estabilidad de la biocorona en condiciones fisiológicas	126
4.2.4.	Cuantificación de la cantidad de proteína PA17 presente en la superficie de MSNPs.....	128
4.3.	Estudios <i>in vivo</i> de la especificidad y actividad antitumoral del ligando PA17.....	130
4.3.1.	Detección de la expresión de TEM8 en modelos de melanoma maligno murino	130
4.3.2.	Direccionamiento del ligando PA17 a tumores <i>in vivo</i>	132
4.3.3.	Actividad antitumoral del ligando PA17 administrado localmente.....	136
4.3.4.	Actividad antitumoral del ligando PA17 administrado de forma intravenosa	138

4.4. Síntesis y caracterización de una nanomedicina dirigida al microambiente tumoral	139
4.4.1. Síntesis de MSNPs portadoras de doxorubicina	140
4.4.2. Comportamiento del nanosistema bajo condiciones fisiológicas <i>in vitro</i>	142
4.4.3. Liberación de doxorubicina encapsulada en cultivos celulares 2D.....	144
4.4.4. Estudio de la citotoxicidad de la doxorubicina libre frente a la encapsulada.....	145
4.4.5. Funcionalización del nanosistema con la proteína ligando PA17.....	150
4.5. Actividad antitumoral del nanosistema en el tratamiento local de melanoma murino	153
4.5.1. Histopatología de los tumores tratados localmente.....	156
4.6. Efecto antitumoral del nanosistema en el tratamiento intravenoso de melanoma murino	157
4.6.1. Histopatología de los tumores con tratamiento intravenoso	159
4.6.2. Estudio de la neovascularización tumoral	162
4.7. El ligando PA17 es versátil y permite dirigir otro tipo de nanosistemas a tumores	163
CONCLUSIONES	169
PERSPECTIVAS FUTURAS	173
BIBLIOGRAFÍA	179
ARTÍCULOS	201

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido ribonucleico

Atx - Toxina del ántrax (del inglés, *Anthrax Toxin*)

AUC - Área bajo la curva (del inglés, *Area Under the Curve*)

CAF(s) - Fibroblastos asociados a tumor (del inglés, *Cancer Associated Fibroblasts*)

Cy5 - Cianina 5

DE - Desviación estándar

DLS - Dispersión de luz dinámica (del inglés, *Dynamic Light Scattering*)

DMSO - Dimetilsulfóxido

DOX - Doxorubicina

DOX@MSNPs - MSNPs con DOX encapsulada

DOX@MSNPs@PA17 - MSNPs con DOX encapsulada y recubiertas con el ligando PA17

ECM - Matriz extracelular (del inglés, *Extracellular Matrix*)

EE - Eficiencia de encapsulación (del inglés, *Encapsulation Efficiency*)

EF - Factor Edema (del inglés, *Edema Factor*)

EMT - Transición epitelio-mesenquima (del inglés, *Epithelial to Mesenchymal Transition*)

EPR - Permeabilidad y retención aumentada (del inglés, *Enhanced Permeability and Retention*)

EtOH - Etanol

FBS - Suero Fetal Bovino (del inglés, *Fetal Bovine Serum*)

FDA - Administración de Alimentos y Medicamentos

FdU₁₀-Cy5 - Oligonucleótido con 10 unidades de floxuridina conjugado al fluorocromo Cy5

FdU₁₀-Cy5@SiO₂ - NPs de sílice compacta con FdU₁₀-Cy5 encapsulado

FdU₁₀-Cy5@SiO₂@PA17 - NPs de sílice compacta con FdU₁₀-Cy5 encapsulado y recubiertas con el ligando PA17

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

GFP - Proteína verde fluorescente (del inglés, *Green Fluorescent Protein*)

His - Histidina

IPTG - Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

ITH - Heterogeneidad intratumoral (del inglés, *Intratumoral Heterogeneity*)

LC - Capacidad de carga (del inglés, *Loading Capacity*)

LEW Buffer - Tampón de lisis-equilibrado-lavado (del inglés, *Lysis-Equilibration-Washing*)

LF – Factor Letal (del inglés, *Lethal Factor*)

MSNP(s) – Nanopartícula(s) de sílice mesoporosa (del inglés, *Mesoporous Silica Nanoparticle(s)*)

MTT – Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NM(s) – Nanomaterial(es)

NPs – Nanopartícula(s)

O/N – Incubación durante toda la noche – 12 horas (del inglés, *overnight*)

PA – Antígeno protector (del inglés, *Protective Antigen*)

PBS – Tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*)

PEG – Polietilenglicol

PFA - Paraformaldehído

IP – Índice de polidispersión

PS – Poliestireno

PS@PA17 – NPs de PS recubiertas con el ligando PA17

RFP – Proteína roja fluorescente (del inglés, *Red Fluorescent Protein*)

rpm – revoluciones por minuto

RT – Temperatura ambiente (del inglés, *Room Temperature*)

ROS – Especies reactivas de oxígeno (del inglés, *Reactive Oxygen Species*)

SDS-PAGE - del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SiO₂ – Óxido de silicio, sílice

TAM(s) – Macrófagos asociados a tumor (del inglés, *Tumor Associated Macrophages*)

TEM – Microscopía electrónica de transmisión (del inglés, *Transmission Electron Microscopy*)

TEM8 – Marcador Tumoral Endotelial 8 (del inglés, *Tumor Endothelial Marker 8*)

TEOS – Tetraetil Ortosilicato

TME – Microambiente tumoral, del inglés, *Tumoral Microenvironment*

VEGF - Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGFR – Receptor del Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)

INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer y microambiente tumoral

El cáncer es un conjunto de enfermedades que supone la principal causa de muerte a nivel global. Según la Organización Mundial de la Salud, solamente en 2020 se atribuyeron 10 millones de muertes a esta causa, es decir, 1 de cada 6 de las que se registraron. Una detección temprana del cáncer y una mejora en los tratamientos actuales son necesarias para disminuir estas cifras. La característica que mejor define al cáncer es el crecimiento rápido, anormal y descontrolado de células que no tienen un propósito funcional y su capacidad de extensión y colonización de otras partes del organismo [1,2]. Las células cancerosas crecen en una masa celular aberrante llamada tumor, excepto en el caso de los cánceres hematológicos, donde las células crecen y se distribuyen por la sangre, el sistema linfático y la médula ósea [1]. Tradicionalmente, el cáncer ha sido clasificado como una enfermedad genética causada por la acumulación de mutaciones en las células cancerosas [3]. Estos procesos se originan principalmente por daños o mutaciones en protooncogenes que codifican proteínas implicadas en la inducción de la proliferación celular y la diferenciación, y en genes supresores de tumores, que codifican proteínas que producen señales de inhibición del crecimiento celular o estimulan la apoptosis. Alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores son necesarias para el desarrollo tumoral [1]. Sin embargo, solamente entre un 5 y 10% de los casos de cáncer pueden ser atribuidos a defectos genéticos, y hoy en día se sabe que el ambiente y el estilo de vida juegan un papel esencial en el desarrollo de esta condición [4].

El concepto y comprensión del cáncer ha ido cambiando a lo largo de las décadas. Actualmente el cáncer es reconocido como un proceso que evoluciona y que requiere interacciones constantes, dinámicas y recíprocas entre las células tumorales y el microambiente tumoral (TME, del inglés, *Tumoral Microenvironment*) [4].

1.1.1. Microambiente tumoral

El TME es el ambiente celular en el que se desarrolla un tumor dentro del organismo. Se trata de un ecosistema altamente estructurado, donde las células tumorales rodeadas de células no malignas interactúan constantemente. Todas estas células están integradas en una matriz extracelular (ECM, del inglés, *Extracellular Matrix*) alterada y vascularizada. El TME tiene un gran impacto en

todos los aspectos de la biología del cáncer incluyendo la progresión del tumor, la metástasis y la respuesta a un determinado tratamiento [2,3,5,6].

El TME es complejo y heterogéneo, y su composición concreta varía en función del tipo de tumor. En general, está formado por distintos tipos de células, incluyendo células del sistema inmune (linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, asociados a tumor (TAMs, del inglés, *Tumor Associated Macrophages*), neutrófilos, células dendríticas, etc...), células estromales (células endoteliales, fibroblastos asociados a tumor (CAFs, del inglés, *Cancer Associated Fibroblasts*), adipocitos, etc...) y componentes no celulares (ECM, exosomas etc...) [7,8]. Las células tumorales son el corazón del TME y controlan la función del resto de componentes, tanto celulares como acelulares. Esto se consigue a través de redes de señalización complejas, que moldean y entrenan al TME. En última instancia esto se refleja en la formación y mantenimiento del tumor y de sus señales distintivas (*Hallmarks*), en una respuesta deficiente a las terapias y la resistencia a los fármacos, en la respuesta al estrés extrínseco o intrínseco y en la supervivencia de las células tumorales y su migración dentro del organismo, es decir, la metástasis [9,10]. La fuente de la comunicación intracelular es una red compleja de citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, mediadores inflamatorios y enzimas remodeladoras de la ECM. Sin embargo, nuevos mecanismos de interacción, incluyendo las células tumorales circulantes, exosomas, ADN en células libres y cuerpos apoptóticos, han surgido como novedosas fuentes de comunicación [10].

El TME es ácido (presenta un pH bajo debido al metabolismo anaeróbico de las células tumorales), hipóxico (tiene poca presencia de oxígeno), inmunosupresor (capaz de atraer o desarrollar células inmunes inmunosupresoras y reducir la eficiencia de los linfocitos T) y presenta una presión de líquido intersticial y una rigidez de la ECM elevadas. Estas condiciones limitan la entrega y eficiencia de las terapias, como los fármacos quimioterápicos, la radioterapia o la inmunoterapia [11].

1.1.2. Señales distintivas del cáncer: inducción de la angiogénesis y metástasis

Como se comentó anteriormente, los tumores tienen una serie de señales distintivas, cuyo desarrollo depende de la sinergia entre las células tumorales y el resto de las células del TME. Entre ellas, encontramos la activación de cascadas

de señalización de proliferación celular, la evasión de los supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad, la inducción de la angiogénesis y la activación de la invasión y metástasis [12]. Estas dos últimas suponen un gran reto de cara a los tratamientos contra el cáncer, limitando la aplicación de los tratamientos convencionales, y siguen siendo la primera causa de muerte en más del 90% de pacientes con cáncer [13].

1.1.2.1. *Angiogénesis tumoral*

Las células tumorales malignas requieren oxígeno y nutrientes para sobrevivir y proliferar. Por ello, el desarrollo de una vasculatura tumoral es esencial para el establecimiento del tumor primario y el desarrollo de la metástasis. Este hecho se puso de manifiesto con la observación temprana de que los tumores que proliferaban rápido estaban altamente vascularizados, mientras que los tumores latentes no, y llevó a Judah Folkman a hipotetizar que la angiogénesis era necesaria para la progresión tumoral [14].

La formación de una neovasculatura en los tumores puede ocurrir mediante el desarrollo de nuevos vasos a partir de otros ya existentes o por la inducción de la formación de nuevos vasos. Entre los procesos principales en la formación de una neovasculatura destacan la formación de vasos por brotes, la angiogénesis intususceptiva, la vasculogénesis, el mimetismo vasculogénico y la transdiferenciación de células madre cancerígenas [14–18]. Para que se de cualquiera de estos mecanismos, debe producirse un proceso conocido como cambio angiogénico (en inglés, *angiogenic switch*), que implica una señalización dominante de factores pro angiogénicos. De forma fisiológica, existe un balance entre los factores pro angiogénicos y anti angiogénicos, que regulan de forma estricta la angiogénesis. Sin embargo, los tumores promueven la sobreexpresión de factores pro angiogénicos. Este cambio angiogénico libera a un tumor de su estado latente para inducir un rápido crecimiento de las células tumorales acompañado de la formación de una neovasculatura tumoral [14,15] (Figura I.1).

Entre los factores pro angiogénicos destaca el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A, del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor A*), el regulador principal de la angiogénesis fisiológica y patológica. Se trata de un miembro de una familia de genes que incluye el factor de crecimiento placentario (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Todos ellos se unen a los receptores VEGFR-1, 2 y 3 (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*

Receptor). En concreto, VEGF-A se une preferencialmente a VEGFR-2 en las células endoteliales de los vasos y promueve la angiogénesis. La expresión de los factores pro angiogénicos es inducida por el estrés ambiental como la hipoxia, la privación de glucosa, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *Reactive Oxygen Species*), la acidosis celular, la deficiencia en hierro, la activación de oncogenes o la inhibición de genes supresores de tumores [16].

Independientemente del proceso a través del cual se formen nuevos vasos, estos tienen una serie de características funcionales distintas de los vasos fisiológicos (Figura I.1). Mientras que la formación de nuevos vasos de forma fisiológica (embriogénesis, ciclo menstrual, curación de heridas, etc...) es un proceso altamente regulado y controlado, la angiogénesis tumoral es un proceso desregulado debido a la presencia constante de factores pro angiogénicos presentes en el TME. Esto conlleva a que muchos de esos nuevos vasos no lleguen a madurar por completo, resultando en una red de vasos caótica, que tienen un diámetro muy heterogéneo y un flujo sanguíneo deficiente y en ocasiones, que fluye en sentido contrario, creando áreas intratumorales de hipoxia. Además, las uniones entre las células endoteliales en la vasculatura tumoral se encuentran debilitadas, presentando una permeabilidad vascular aumentada y una presión intersticial mayor [14]. Este aumento de permeabilidad tiene como efecto una acumulación tumoral de fármacos y otros agentes terapéuticos sin direccionamiento, proceso conocido como efecto de permeabilidad y retención aumentado (EPR, del inglés, *Enhanced Permeability and Retention effect*) [19–21]. Finalmente, los pericitos se encuentran parcialmente despegados de las células endoteliales y la membrana basal está desigualmente distribuida, por lo que existe mayor riesgo de rotura y hemorragia. Todo esto hace que, en muchas ocasiones, se reduzca la eficiencia de las terapias administradas de forma sistémica [14,17].

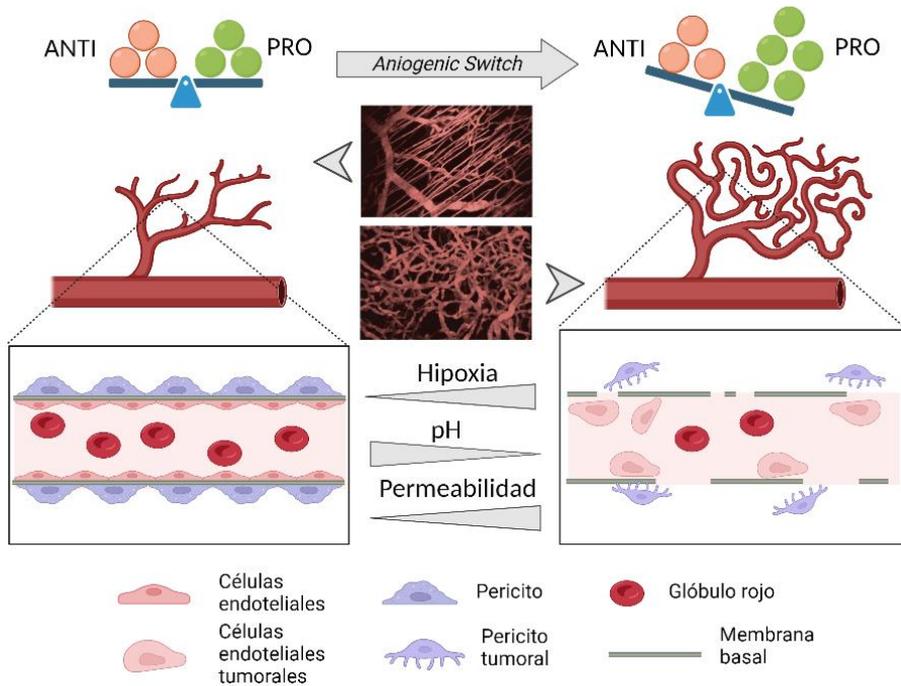


Figura 1. 1. Esquema del cambio angiogénico y desarrollo de la vasculatura tumoral. El aumento de factores pro angiogénicos conlleva a la formación de una neovasculatura tumoral desorganizada, con aspecto y funcionalidad que difieren de la vasculatura fisiológica.

La vasculatura tumoral se diferencia de la vasculatura fisiológica, no solo en su aspecto, organización y funcionalidad, sino también en el tipo de marcadores que expresa. Éstos suelen ser proteínas de superficie o proteínas de la ECM que, o bien son diferentes de los expresados por la vasculatura fisiológica, o se expresan a niveles mucho más altos. La expresión de muchas de estas proteínas se asocia con la angiogénesis y son importantes para este proceso. Estas dianas distintivas resultan clave para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra el cáncer [22].

1.1.2.2. Transición epitelio-mesénquima y metástasis

La metástasis es un proceso complejo que consiste en la diseminación de las células tumorales del tumor primario a órganos distantes a través de la sangre o la linfa [13]. En un primer paso, las células tumorales malignas tienen que invadir los tejidos sanos vecinos, ya sea en grupos de células o como células individuales.

Esta invasión está facilitada por la pérdida de adhesión célula-célula, que tiene lugar a través de un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés, *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*). Durante el proceso de EMT, las células tumorales pierden sus propiedades epiteliales (disminuye la expresión de E-cadherina) y adquieren un fenotipo mesenquimal, lo que resulta en una adhesión celular reducida, cambios en la estructura del citoesqueleto y un aumento en la motilidad. Por ello, la EMT es un proceso esencial para la progresión tumoral y está asociado con un potencial metastásico mayor [13,23,24].

Además, durante el proceso de invasión, la ECM sufre un proceso de remodelación mediante la degradación por proteasas secretadas. Una vez se ha producido la invasión de tejidos vecinos y se ha formado una nueva red de vasos sanguíneos, las células tumorales entran en contacto con pequeños vasos sanguíneos o linfáticos a través de los cuales pueden entrar en la circulación atravesando el lumen de la vasculatura de forma activa o pasiva, en un proceso conocido como intravasación. Este proceso está facilitado por varias citoquinas que son secretadas por las células tumorales y por los TAMs y CAFs. En su viaje a través de la sangre o la linfa hacia un nuevo nicho, las células tumorales circulantes o agregados celulares tienen que protegerse de las condiciones hostiles y de la respuesta del sistema inmune, por lo que unen plaquetas en su superficie. De esta manera pueden interactuar con neutrófilos circulantes que facilitan el siguiente paso de la diseminación, denominado extravasación. Durante este proceso, las células tumorales pasan de los vasos hacia los nichos secundarios, llamados nichos pre metastásicos. Reciben este nombre ya que son preparados por el tumor primario incluso antes de que comience la metástasis. El desarrollo de un nicho pre metastásico es un proceso complejo que requiere la secreción de moléculas implicadas en inducir permeabilidad vascular, remodelación de la ECM e inmunosupresión. Finalmente, las células tumorales colonizan el nuevo nicho, sobreviviendo al nuevo ambiente, donde proliferan gracias a la formación de nuevos vasos sanguíneos y establecen la metástasis [6,12,13,25]. Todo el proceso de EMT y metástasis se encuentra resumido en la Figura I.2.

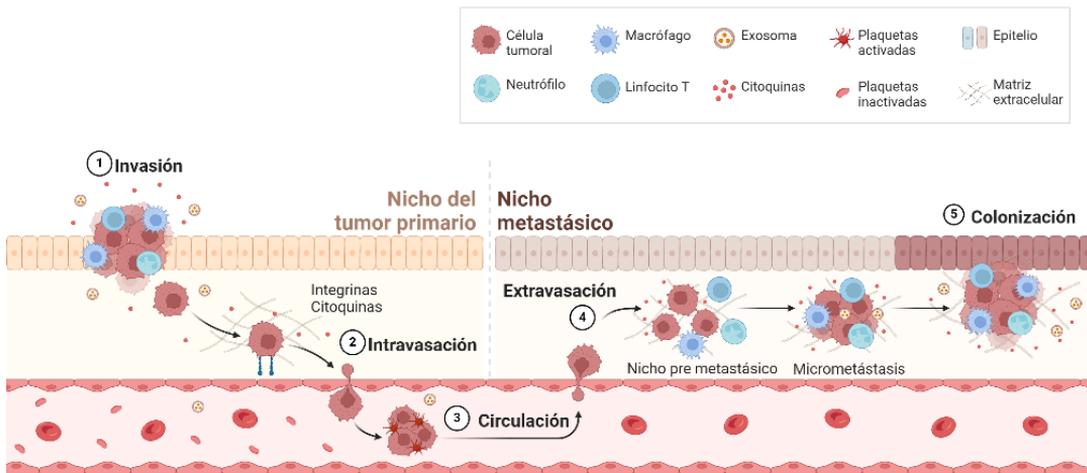


Figura I. 2. Esquema general del proceso de metástasis. Este proceso incluye los pasos de (1) invasión, (2) intravasación, (3) circulación, (4) extravasación y (5) colonización.

1.1.3. Melanoma maligno

Los modelos tumorales de estudio desarrollados durante esta tesis consisten en modelos de melanoma maligno murino, tanto sólidos como metastásicos. El melanoma se origina por la transformación maligna de los melanocitos, es decir, las células de la piel que producen melanina [26–29]. Aunque solamente un 4% del cáncer de piel es melanoma, se trata del cáncer de piel más agresivo (capacidad de metastatizar) y que más muertes produce en todo el mundo. Actualmente, la incidencia del melanoma se encuentra alrededor de un 1,7% de los cánceres primarios diagnosticados y los pacientes que mueren de melanoma se estiman en un 0,7% del total de muertes asociadas al cáncer [27]. La exposición a la radiación solar representa el mayor factor de riesgo medioambiental para el desarrollo de melanoma, aunque características del individuo como el color de piel, ojos y pelo, así como el historial familiar, también se consideran factores de riesgo. Además, existe una amplia lista de mutaciones conductoras, que se clasifican según el tipo de melanoma. La más conocida es la mutación V600E en el gen *BRAF*, mutación conductora del melanoma cutáneo [30].

Los melanocitos son células especializadas, productoras de pigmento que protegen a la piel del daño UV y le dan color. Su función está relacionada con la síntesis de melanina, un pigmento que tiene 2 importantes funciones biológicas: la capacidad de actuar como eliminador de oxidantes y la de actuar como un

sistema para absorber la luz UV y proteger a las células vecinas contra el daño en el ADN producido por esta radiación [29]. Los melanocitos derivan de la cresta neural y migran a través de la dermis y epidermis para localizarse, en humanos, en los folículos pilosos y en la epidermis interfolicular. Aunque el melanoma cutáneo es el más común diagnosticado, esta enfermedad también puede surgir en otros lugares donde residen melanocitos, como el ojo (melanoma uveal) o las mucosas (oral y respiratoria). Además, el melanoma es una enfermedad con una alta tasa de metástasis, que generalmente se desarrollan en ganglios centinela de los nodos linfáticos (enfermedad estadio III), pulmón, hígado, tracto gastrointestinal, huesos y el cerebro (enfermedad estadio IV) [30]. Durante el proceso de metástasis, las células de melanoma abandonan su nicho primario y migran a través de la sangre o la linfa para adaptarse a las condiciones ambientales de los nichos secundarios en órganos distantes (Figura I.3).

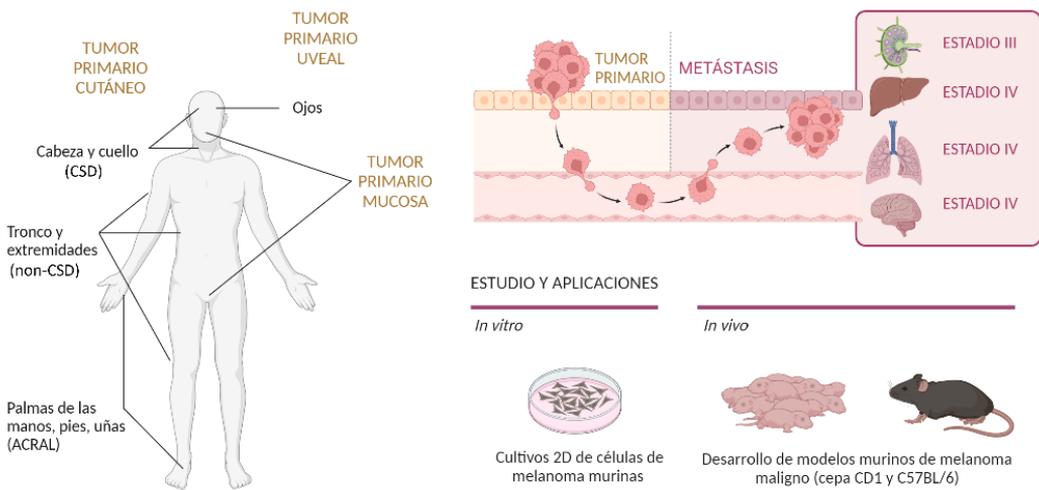


Figura I. 3. Melanoma maligno. Esquema general de los tipos de tumores primarios de melanoma en humanos (izquierda), así como del proceso de metástasis a órganos distantes (panel superior). Estudio y posibles aplicaciones de los modelos desarrollados en el laboratorio para esta enfermedad (panel inferior). CDS: *chronically sun-damaged*.

El melanoma maligno avanzado tiene un mal pronóstico y en la mayoría de los casos, la quimioterapia (decarbacin, temozolomida, cisplatino, tamoxifeno etc...) no es efectiva debido a la resistencia intrínseca que presentan las células tumorales. Actualmente se emplean terapias alternativas, aprobadas por la FDA, como la inmunoterapia (Ipilimumab, IL-2, IFN- α) y algunas terapias dirigidas

(inhibidores de las vías BRAF o MEK). Aunque estas terapias han mejorado el resultado de los pacientes en general, algunos pacientes con melanoma metastásico no responden a la terapia, debido, principalmente, a las vías de resistencia que se generan durante los diferentes estadios del desarrollo de la metástasis [28]. El fenotipo de las células de melanoma en los diferentes estadios de la metástasis no está bien caracterizado. Por ello, es esencial desarrollar modelos apropiados para estudiar estos procesos y comprender los mecanismos subyacentes y así poder desarrollar nuevas terapias dirigidas contra dianas específicas en cada caso. Los modelos desarrollados en el laboratorio para el estudio del melanoma pueden ser *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* [26] (Figura I.3). Durante esta tesis doctoral, se han empleado modelos *in vitro* 2D para estudiar el efecto terapéutico del nanosistema desarrollado sobre las células de melanoma maligno murino (B16F10), y modelos *ex vivo* e *in vivo* para evaluar la presencia de dianas terapéuticas específicas del TME. Además, mediante los modelos *in vivo*, que han consistido en el desarrollo de tumores de melanoma murino subcutáneo y metastásico, se ha evaluado la capacidad de desarrollar nuevas terapias dirigidas frente a dianas específicas.

1.2. Terapias convencionales en el tratamiento del cáncer

El fin último de cualquier tratamiento contra el cáncer debe ser eliminar el mayor número de células tumorales posibles y minimizar los efectos sobre las células sanas. Entre los tratamientos convencionales contra el cáncer, se incluyen la radioterapia, la cirugía y la quimioterapia. Sin embargo, para solventar la falta de especificidad y los efectos adversos, han ido surgiendo terapias más innovadoras, como lo son la inmunoterapia, las terapias moleculares dirigidas, y en última instancia, la nanomedicina.

1.2.1. Cirugía, radioterapia y quimioterapia

La cirugía y la radioterapia son la opción más efectiva para casos en los que se trate de tumores sólidos bien delimitados que no presentan metástasis. Por otro lado, la quimioterapia suele ser la primera opción cuando se trata de un cáncer metastásico, ya que, los fármacos pueden llegar a cualquier órgano mediante una administración sistémica. Este tipo de terapia se basa en el uso de fármacos

quimioterápicos, que son compuestos tóxicos que inhiben la división de células que crecen de forma muy rápida, característica de las células tumorales. Estos fármacos tienen como diana las diferentes fases del ciclo celular, y dependiendo de su mecanismo de acción, se clasifican en diferentes grupos. La quimioterapia no es un tratamiento dirigido, por lo que también afecta a células normales que proliferan más rápido, como puede ser el caso de los folículos pilosos, la médula ósea y las células del tracto gastrointestinal. Esto genera la destrucción indiscriminada de las células sanas, provocando una gran cantidad de efectos adversos en el organismo tras su administración intravenosa [1,31,32]. Sin embargo, este no es el único problema que presenta la quimioterapia. Además, los tumores pueden desarrollar resistencia a este tipo de fármacos, que sigue siendo uno de los mayores problemas en el tratamiento de pacientes con cáncer. Esta resistencia puede existir antes de comenzar el tratamiento (resistencia primaria o innata) o puede desarrollarse tras una exposición prolongada (resistencia adquirida), y una vez se ha desarrollado, quedan pocas opciones. Los mecanismos moleculares a través de los cuales tiene lugar este proceso incluyen, entre otros: la alteración en la farmacocinética y metabolismo del fármaco, la modificación en la expresión o función de la diana del fármaco, la compartimentalización del fármaco en orgánulos celulares, una reparación alterada del daño al ADN inducido por el fármaco, cambios en las vías de señalización de la apoptosis y/o expresión de proteínas que afectan al transporte celular del fármaco (bombas de eflujo). La gran heterogeneidad de las células tumorales, sumado a su alta tasa de mutación, contribuyen a la rápida selección de clones resistentes a fármacos [31–34].

Uno de los fármacos quimioterápicos más empleados a lo largo de los años ha sido la Doxorubicina (DOX). Se trata de un pigmento rojo producido por *Streptomyces peucetius* y pertenece a la familia de antibióticos antraciclinas. La DOX ejerce un efecto antineoplásico mediante diferentes mecanismos (Figura I.4). Por un lado, induce daños en el ADN debido a, (i) la formación de aductos de ADN-DOX e intercalación en la doble hélice a través de puentes de hidrógeno con guaninas y (ii) la inducción de roturas de hebra simple y de doble hebra, donde la topoisomerasa II queda atrapada sin poder llevar a cabo su función. Esto resulta en la inhibición de la replicación y transcripción del ADN y en el arresto del ciclo celular en fase G1 o G2, con la eventual inducción de la apoptosis celular. Para que esto tenga lugar, la DOX, entra por difusión en el interior celular formando un complejo con el proteasoma, que se transloca al núcleo, donde la DOX se disocia del proteasoma ya que tiene más afinidad por el ADN [35,36]. Por otro lado, la DOX ejerce un efecto citotóxico sobre las

mitocondrias, ya que se une directamente a la cardiolipina en la membrana interna de este orgánulo, donde se origina un proceso de producción de ROS. Grandes cantidades de DOX en la mitocondria conllevan a un gran daño en su estructura, que resulta en la inducción de la apoptosis celular. Además, la DOX sufre una reducción por oxidorreductasas como la NADH deshidrogenasa, formando un radical semiquinona, que puede llevar a la formación de ROS en el citoplasma celular. Finalmente, la DOX puede inducir la senescencia celular y otros tipos de muerte como ferroptosis y la piroptosis [35,37,38].

Además de su efecto directo sobre las células, la DOX es capaz de modular el sistema inmune para matar a las células tumorales a través de respuestas activadas por linfocitos T CD8⁺ e inducir la sobreexpresión de genes como PD-1 y PD-L1 y vías de señalización citotóxicas relacionadas con linfocitos T [35].

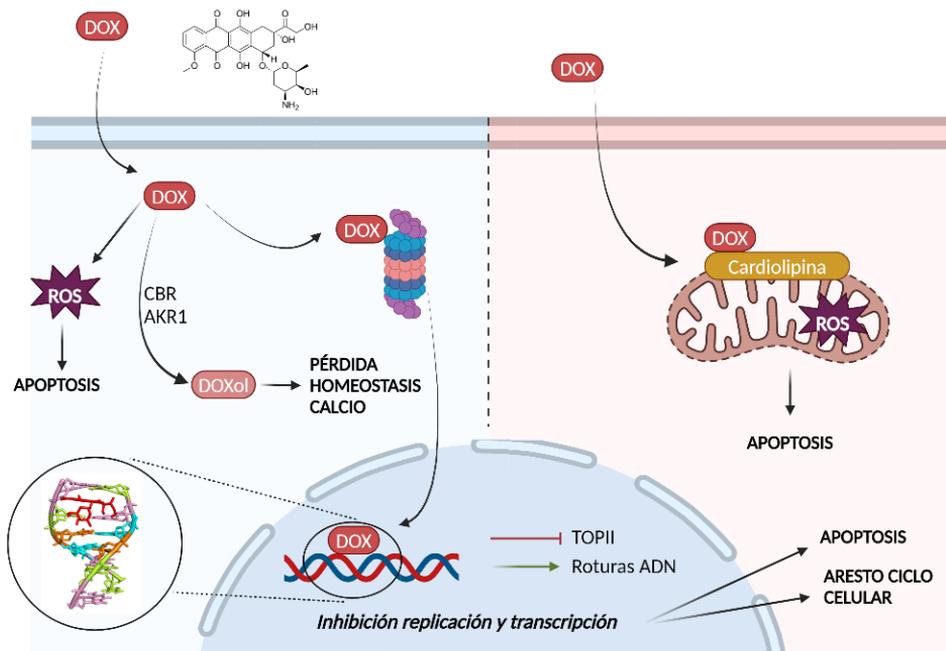


Figura I. 4. Esquema general de los efectos citotóxicos inducidos en las células por la DOX. Además de intercalarse en la doble hélice del ADN, provoca rupturas de hebra simple y doble e induce la acumulación de ROS en la mitocondria y en el citoplasma. Todo esto conlleva el arresto del ciclo celular y en última instancia, la apoptosis celular.

La DOX es el fármaco más empleado en el tratamiento de cáncer de vejiga, mama, estómago, pulmón, ovarios, tiroides, mieloma múltiple y linfoma de

Hodgkin. Presenta una farmacocinética lineal, con una amplia distribución a tejidos periféricos, lo que le confiere un gran volumen de distribución a pesar de su elevada unión a proteínas del suero, principalmente la albúmina. Este fármaco tiene un metabolismo principalmente hepático, que da lugar a su metabolito principal, el doxorubicinol (DOXol), principal responsable de la toxicidad del fármaco. Entre los efectos adversos más comunes, se encuentran la cardiotoxicidad y la toxicidad hematológica, aunque también se ha descrito toxicidad renal y hepática [38–41].

Desde la aprobación por la FDA de los primeros fármacos quimioterápicos para el tratamiento de cánceres hematológicos y tumores sólidos en los años 40 y 50, éstos han ido evolucionando para aumentar su efectividad. Aunque se han hecho importantes progresos en el tratamiento del cáncer empleando estos fármacos aislados o en combinación con adyuvantes, y se han descubierto y aprobado nuevos fármacos que se emplean hoy en día, como el cisplatino o el paclitaxel, la destrucción indiscriminada de células y la gran cantidad de efectos adversos, han llevado al desarrollo de terapias alternativas a lo largo de los años [1].

1.2.2. Inmunoterapia y terapias moleculares dirigidas

Entre las terapias alternativas contra el cáncer más empleadas hoy en día, destacan la inmunoterapia y las terapias moleculares dirigidas. Por un lado, la inmunoterapia consiste en aprovechar la respuesta natural del sistema inmune para erradicar las células tumorales. Las células del sistema inmune innato (células *natural killer*, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas), participan en la supresión tumoral matando directamente a las células tumorales o activando respuestas inmunes adaptativas. El sistema inmune adaptativo funciona con linfocitos B (respuesta humoral) y T (respuestas mediadas por células). Una respuesta efectiva del sistema inmune puede erradicar las células malignas o desregular su fenotipo y funciones. Sin embargo, las células tumorales han desarrollado mecanismos para escapar al control del sistema inmune, lo que conlleva a la ausencia de respuestas inmunes antitumorales. Por ello, la inmunoterapia intenta restablecer y/o aumentar la habilidad del sistema inmune para prevenir y eliminar las células tumorales. La inmunoterapia se divide en 5 categorías principales: virus oncolíticos, vacunas contra el cáncer, terapias con citoquinas, transferencia adoptiva de linfocitos T y el uso de inhibidores de puntos de control [42,43].

Por otro lado, las terapias moleculares dirigidas se basan en el uso de fármacos u otras sustancias que tienen un efecto sobre dianas moleculares específicas, bloqueando vías de señalización implicadas en el crecimiento y desarrollo de las células tumorales. Este tipo de terapias pueden emplearse mediante dos tipos de aproximaciones. Las aproximaciones directas consisten en el uso de anticuerpos monoclonales o pequeñas moléculas inhibitorias. Las aproximaciones indirectas emplean dianas moleculares sobreexpresadas o expresadas de forma exclusiva en la superficie de las células tumorales o de células del TME, para llevar al sitio moléculas citotóxicas como agentes quimioterápicos, toxinas, etc...De esta manera, se consigue la eliminación de las células tumorales o del TME [1,44–46]. La identificación de dianas específicas es esencial para un desarrollo exitoso de las terapias moleculares dirigidas. Una de las principales bases del cáncer es la alteración del perfil genético, que resulta en mutaciones o cambios en las proteínas y receptores que promueven la supervivencia celular y la proliferación. Estas alteraciones específicas permiten diferenciar entre células tumorales y células sanas, y pueden ser usadas como dianas moleculares para este tipo de terapias [44]. La incorporación de este tipo de terapias en la práctica clínica ha mejorado el pronóstico de subgrupos de pacientes con tumores sólidos. Su eficacia refleja las vulnerabilidades terapéuticas que resultan de la dependencia de las células tumorales en vías de señalización de crecimiento específicas [47].

Las terapias moleculares dirigidas pueden ir dirigidas a las células tumorales o al TME. En el primer caso, se produce una buena respuesta inicial al tratamiento. Sin embargo, se suele producir un relapso entre el primer y segundo año de tratamiento [47]. Esta resistencia ocurre debido a lo que se conoce como heterogeneidad intratumoral (ITH, del inglés, *Intratumor Heterogeneity*) y es un factor clave en el pronóstico letal del cáncer [47–49]. El proceso de conversión de una célula no maligna a una maligna ocurre a través de la adquisición secuencial de alteraciones que llevan a una proliferación celular aumentada, inhibición de vías de señalización de muerte, inducción de angiogénesis y activación de programas de señalización que inducen la metástasis. Incluso después de la transformación maligna, un tumor continúa evolucionando de forma dinámica. Esta evolución genera una heterogeneidad molecular que consiste en células cancerosas con patrones moleculares distintivos y con diferente sensibilidad a las terapias antitumorales. Esta ITH ofrece material genético y epigenético diverso sobre el cual la evolución Darwiniana puede actuar [48]. La ITH puede resultar de cambios genéticos, transcriptómicos, epigenéticos y/o fenotípicos, y puede desarrollarse de manera espacial o temporal en un mismo individuo. Los clones resistentes a la terapia surgen de la expansión selectiva de

poblaciones preexistentes durante el tratamiento con agentes específicos. La complejidad genómica de un tumor generalmente aumenta con la exposición secuencial a las terapias sistémicas. Por ello es esencial una caracterización serial de los tumores a diferentes tiempos para estudiar los cambios que se producen durante la evolución clonal [47]. Debido a este gran inconveniente, es mejor dirigir las terapias moleculares hacia dianas del TME, más que centrarse exclusivamente en dianas de las células tumorales. En ese caso, el factor limitante será encontrar las dianas terapéuticas adecuadas.

Debido a que todas estas terapias por separado presentan varios inconvenientes y limitaciones, en esta tesis nos hemos centrado en el uso de nanomateriales en el tratamiento del cáncer. La nanomedicina es una herramienta muy potente, ya que, gracias a ella, se pueden combinar, en un mismo tratamiento, las terapias convencionales como la quimioterapia, con las terapias moleculares dirigidas e incluso, con la inmunoterapia.

1.3. Nanotecnología y nanomedicina

La nanotecnología es un campo de investigación interdisciplinar que incluye, entre otros, la química, la ingeniería, la biología y la medicina, y que posee un gran potencial como herramienta de detección temprana, diagnóstico y tratamiento personalizado de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. “Nano” hace referencia al prefijo griego que significa enano, y representa algo tan pequeño como una milmillonésima de metro (10^{-9} m). Aunque el uso de nanomateriales (NMs) ha estado presente desde la época de los romanos, el término nanotecnología fue introducido por Richard Feynman en 1959, cuando en la reunión anual de la sociedad americana de física, presentó una charla titulada *There's Plenty of Room at the Bottom*. En ella desarrollaba la idea de usar máquinas para construir otras más pequeñas hasta el nivel molecular. Esta idea fue 15 años más tarde desarrollada por el japonés Norio Taniguchi, que definió por primera vez el término nanotecnología en 1974 como: *nanotechnology mainly consists of the processing of separation, consolidation, and deformation of materials by one atom or one molecule*. En su definición más estricta del *National Nanotechnology Initiative*, la nanotecnología hace referencia a estructuras cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 nm en al menos una dirección. Como comparación, el cabello humano tiene unos 60.000 nm de grosor, mientras que la doble hélice del ADN tiene un radio de 1 nm [50]. Sin embargo, hoy en día, la nanotecnología también hace referencia a estructuras que puedan superar estas dimensiones. Esta

disciplina incluye el estudio, diseño, creación, manipulación y aplicación de estructuras mediante el control de su forma y tamaño en estas dimensiones para aprovechar sus propiedades [51]. Después de que Feynman descubriese este nuevo campo de investigación, se desarrollaron dos aproximaciones principales en la síntesis de nanoestructuras. Por un lado, la aproximación *top-down* consiste en descomponer un material de partida para obtener partículas de tamaño nanométrico. Por otro lado, la aproximación *bottom-up* consiste en la construcción de nanoestructuras átomo por átomo o molécula a molécula, mediante métodos físicos y químicos que se producen en la escala nanométrica. Para ello se controla de forma precisa el autoensamblaje de los átomos y las moléculas en la reacción (síntesis química) [50,52].

Durante los últimos 20 años, los NMs se han empleado en diferentes campos científicos e industriales, como la agricultura, la industria textil o cosmética, pero, sobre todo, en la industria farmacéutica con propósitos de investigación médica [53]. Esta rama emergente de la nanotecnología es la nanomedicina, la aplicación de la nanotecnología a la medicina. La nanomedicina aprovecha las propiedades de los NMs para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades a nivel molecular, para tener un mayor entendimiento de la fisiopatología subyacente y mejorar la calidad de vida de los pacientes [54]. Los NMs presentan unas propiedades químicas, físicas y biológicas únicas en la nanoescala, en comparación con su respectivo material a escalas mayores. Esto les convierte en candidatos idóneos para ser usados en aplicaciones biomédicas, destacando el tamaño, la biocompatibilidad y las propiedades superficiales, y van a ser parámetros clave que van a afectar a cómo éstos interactúan con las células en el entorno fisiológico [55].

Las principales aplicaciones de la nanomedicina se pueden agrupar en tres grupos principales: herramientas analíticas y de diagnóstico, tratamiento de enfermedades y medicina regenerativa [56,57]. En el caso del tratamiento de enfermedades, destaca en tratamiento del cáncer. Los NMs pueden diseñarse de forma específica para responder a los estímulos del TME (acidez, hipoxia, alta presión vascular, etc...), mejorando así la penetración en los tumores y la eficiencia de los tratamientos. La nanomedicina permite combinar tanto los fármacos quimioterápicos, como la inmunoterapia y las terapias moleculares dirigidas a través del uso de NMs [58].

1.3.1. Características generales y clasificación de los nanomateriales

Los NMs según la *International Organization for Standardization*, se definen como materiales con alguna dimensión externa en la nanoescala. Lo más interesante acerca de ellos es que sus propiedades fisicoquímicas cambian cuando se trabaja en esta escala reducida. Los NMs cuentan con una serie de propiedades que les hacen ser unos candidatos excelentes para su uso en aplicaciones biomédicas. Entre ellas destacan [52,59] (Figura I.5):

- Pequeño tamaño. Al encontrarse en la nanoescala, les permite penetrar las barreras biológicas y tener acceso a dianas intracelulares.
- Alta relación superficie-volumen. Esta propiedad les permite interactuar con los sistemas biológicos a nivel molecular y transportar grandes cantidades de fármacos o agentes de imagen. En muchos casos se puede llevar a cabo la encapsulación de moléculas, incluyendo fármacos en el tratamiento del cáncer, que presentan poca solubilidad.
- Química de superficie. La superficie de los NMs puede ser modificada para controlar sus interacciones con los sistemas biológicos, como el recubrimiento con ligandos específicos o recubrimientos de protección. Esto ofrece la opción de emplearlos como agentes de tratamiento dirigidos hacia receptores específicos.
- Propiedades magnéticas. Algunos NMs, como las nanopartículas (NPs) de óxido de hierro, presentan propiedades magnéticas, pudiendo usarse como agentes de imagen o terapéuticos.
- Propiedades ópticas tuneables. Algunos NMs, como las NPs de oro o plata, presentan propiedades ópticas únicas que pueden ser modificadas cambiando su tamaño o forma.

Dependiendo del tamaño, origen, configuración estructural y/o diámetro de poro, los NMs pueden ser divididos en 4 grandes categorías [55,60] (Figura I.5):

- Según su origen, los NMs puede clasificarse en NMs naturales o artificiales. Los NMs naturales se encuentran en muchas formas de la naturaleza, incluyendo los virus, las arcillas, coloides como la leche y la sangre, los corales o la lava volcánica. Ejemplos de NMs artificiales son los nanotubos de carbono o los *quantum dots*.
- Según la configuración estructural/composición, los NMs pueden clasificarse en NMs orgánicos, inorgánicos, basados en carbono

(nanotubos de carbono, grafeno, fullerenos, nanofibras de carbono y negro de carbón) y composites. Los NMs orgánicos están formados mayoritariamente por materiales orgánicos, como son los liposomas, dendrímeros, NPs poliméricas o micelas. Los NMs inorgánicos no tienen átomos de carbono y se conocen como NPs inorgánicas. Pueden ser metálicas, basadas en óxido de metales, basadas en semiconductores y cerámicas. Los NMs basados en carbono pueden ser esféricos (fullerenos), planos (óxido de grafeno) y cilíndricos (nanotubos de carbono). Finalmente, los composites están formados por la combinación de NPs con otras NPs o con otros NMs.

- Según el número de dimensiones, los NMs pueden clasificarse en 0D, 1D, 2D y 3D. Los NMs 0D tienen las 3 dimensiones dentro de la escala nanométrica (nanoesferas como los quantum dots, fullerenos etc...), los 1D tienen 2 de las 3 dimensiones en la escala nanométrica, pero tienen 1 dimensión fuera de este rango (nanotubos de carbono, *nanorods* de oro etc...), los 2D tienen 2 dimensiones fuera del rango nanométrico (grafeno). Finalmente, los NMs 3D no tienen ninguna dimensión confinada en la escala nanométrica, pero el material está formado por bloques individuales que están en la escala nanométrica (liposomas o dendrímeros).
- Según la dimensión de los poros, los NMs pueden ser clasificados en microporosos (diámetro de los poros < 2 nm), mesoporosos (diámetro de los poros entre 2 y 50 nm) y macroporosos (diámetro de los poros > 50 nm).

Gracias a la aparición de la nanomedicina, el uso de fármacos quimioterapéuticos en clínica ha mejorado considerablemente. Este es el caso de la DOX. En 1995 la FDA aprobó por primera vez una formulación liposomal de DOX llamada Doxil® para el tratamiento de cáncer de ovario o sarcoma de Kaposi. A partir de ese momento, se aprobaron otras formulaciones similares como Caelyx®, Thermodox® o Nudoxa®. Cada una de ellas presenta eficiencias antitumorales, biodistribuciones y perfiles de toxicidad diferentes [35,61,62].

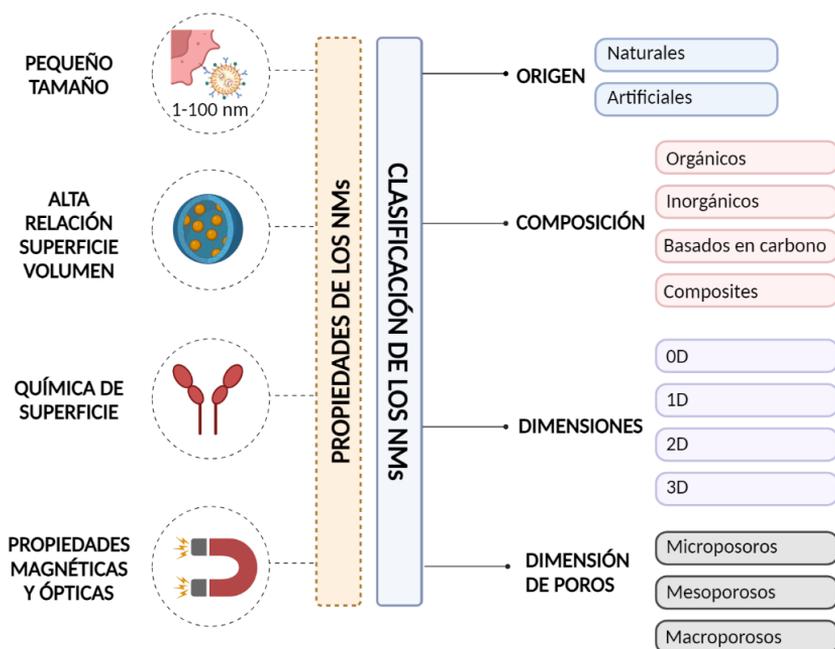


Figura 1. 5. Esquema de las propiedades principales de los NMs y de su clasificación, de acuerdo con distintos parámetros. En naranja, las propiedades; en azul, la clasificación según el origen, composición, dimensiones y dimensión de los poros.

1.3.2. Nanopartículas de sílice mesoporosa

Dentro de la gran cantidad de NMs, las NPs destacan por su amplia aplicabilidad en diferentes campos científicos incluyendo el biomédico, óptico, electrónico o agricultura. Según su composición, pueden clasificarse en NPs poliméricas (dendrimeros, micelas poliméricas, etc...), inorgánicas (NPs de sílice, NPs de oro, NPs de óxido de hierro, etc...) o basadas en lípidos (liposomas, NPs sólido lipídicas, etc...). Cada grupo posee sus ventajas y limitaciones, por lo que debería adecuarse el tipo de NP a la aplicación y efecto que se desee lograr. Las NPs tienen el potencial de mejorar la estabilidad y solubilidad de fármacos encapsulados, favorecer su transporte a través de las membranas y aumentar los tiempos de circulación para mejorar su seguridad y eficacia [58].

De entre todos las NPs, en esta tesis doctoral se ha optado por el uso de NPs de sílice mesoporosa (MSNPs) como agentes de administración de fármacos. Este tipo de NPs, introducidas por primera vez en 1992, presentan un tamaño de poro uniforme dentro de una estructura mesoporosa ordenada. Normalmente, se

emplean surfactantes en su síntesis, que se autoorganizan para formar micelas sobre las que se condensan los precursores de la sílice para formar un material híbrido inorgánico-orgánico. Finalmente, el surfactante se retira mediante calcinación o extracción por solvente para generar los poros. Las MSNPs resultantes presentan propiedades estructurales y biomédicas únicas, incluyendo [63]:

- Estructura porosa ordenada sin comunicación entre canales porosos individuales. Esto permite un buen control de la encapsulación y liberación de fármacos.
- Gran volumen de poro y área superficial, mostrando un alto potencial para la carga de moléculas y mejora de la disolución.
- Presencia de dos superficies funcionales, la superficie cilíndrica de los poros y la superficie exterior de la partícula. Ambas pueden ser funcionalizadas para mejorar los procesos de encapsulación y liberación de fármacos. Además, la superficie externa se puede funcionalizar con ligandos específicos orientados para emplear estas NPs como terapias dirigidas.
- Alta biocompatibilidad. La sílice es reconocida como un material seguro según la FDA. Se sabe que las partículas de sílice amorfa se disuelven mediante procesos incluyendo la hidratación, la hidrólisis y el intercambio de iones. La sílice hidrolizada en el medio acuoso no es tóxica y difunde a la sangre para ser eliminada en la orina [64].

Estas características únicas las convierten en candidatos excelentes para ser empleados como agentes de liberación controlada de fármacos o genes en aplicaciones biomédicas [63,65–70].

1.3.3. Identidad biológica de las nanopartículas: biocorona

Las barreras biológicas que tienen que atravesar las NPs desde su administración hasta su destino, dependen en gran medida del método de administración, así como del tipo de enfermedad y la progresión de esta. Aunque los métodos de administración local tienen algunas ventajas con respecto a la sistémica, normalmente requieren técnicas más invasivas que presentan otro tipo de limitaciones. Por ello, la administración sistémica suele ser la más común en el uso de NPs. En general, es importante considerar que la identidad biológica que adquieren las NPs, y por lo tanto su destino *in vivo*, dependen del tipo de

interacciones con los fluidos biológicos, las células y todas las biomoléculas fisiológicas, como las proteínas. Muchos parámetros físicoquímicos como la morfología, tamaño, forma y la química de superficie son responsables de la creación de una nueva identidad, pero también influyen la composición, pH y temperatura del medio fisiológico [58].

Después de una administración sistémica, las NPs se ponen inmediatamente en contacto con los fluidos biológicos como el plasma sanguíneo, y tiene lugar una rápida interacción con las biomoléculas presentes. La adsorción de las proteínas del plasma sobre la superficie de las NPs forma una fina capa llamada biocorona. Se trata de un proceso dinámico, explicado por el efecto *Vroman*, que involucra distintas fuerzas entre las NPs y las proteínas, como los puentes de hidrógeno, fuerzas de *Van Der Waals*, interacciones π - π e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Durante las etapas iniciales, se adsorben de manera rápida proteínas muy abundantes en los fluidos biológicos, pero con poca afinidad, que van siendo reemplazadas, a lo largo del tiempo, por proteínas menos abundantes que se adsorben con mayor afinidad. A la primera capa se le denomina *soft corona*, mientras que, a la segunda, *hard corona*. Las proteínas de la *hard corona* se unen de forma directa con una alta afinidad y crean una capa estable y no intercambiable, que le aporta a la NP una identidad biológica, responsable de su destino, controlando la adhesión a la membrana e internalización celular, biodistribución, citotoxicidad y capacidad de direccionamiento [53,71–73] (Figura I.6). Por ejemplo, en las NPs de oro, la proteína del suero más abundante, la albúmina, es depositada inicialmente, y es más tarde desplazada por el fibrinógeno, que tiene una alta afinidad por estas NPs [74]. En general, la albúmina, fibrinógeno e inmunoglobulinas se encuentran formando parte de la *hard corona* en la mayoría de las NPs.

La formación de una biocorona tiene un efecto en la biodistribución de las NPs. Por ejemplo, la apolipoproteína E en las biocoronas actúa como un ligando de direccionamiento hacia los receptores de lipoproteínas de baja densidad, que resulta en el direccionamiento a los hepatocitos. Por otro lado, si la biocorona contiene opsoninas, puede promover la eliminación de las NPs a través del sistema fagocítico mononuclear o sistema retículo endotelial, mediante

fagocitosis por macrófagos. Éstos, fagocitan las NPs y las acumulan en el bazo y en el hígado [58].

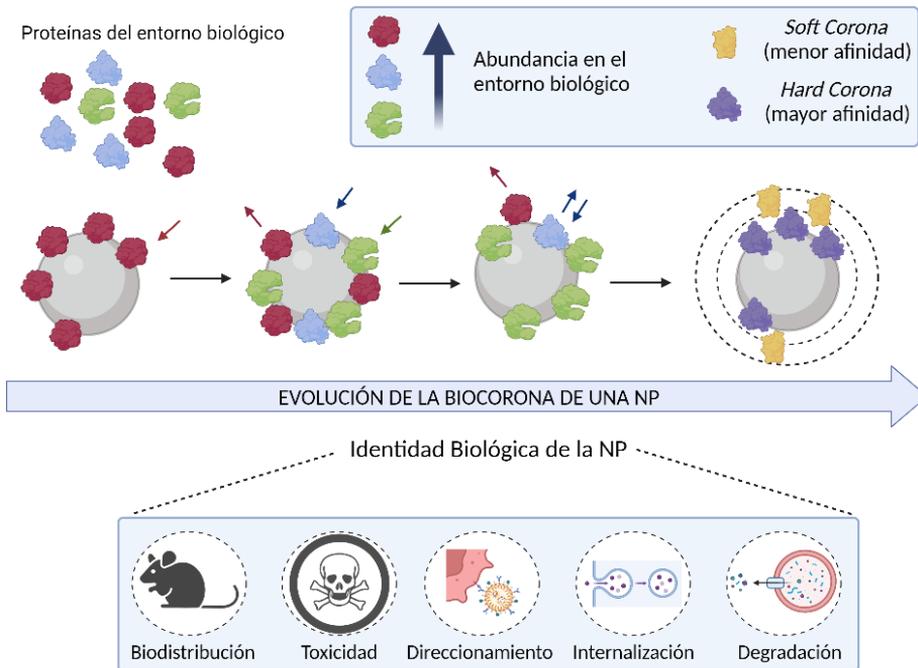


Figura I. 6. Esquema de la formación de la biocorona proteica sobre las NPs administradas sistémicamente. En primer lugar, se adsorben sobre la superficie las proteínas más abundantes en el medio con baja afinidad (rojas, soft corona), que van siendo poco a poco sustituidas por proteínas menos abundantes pero que tienen mayor afinidad (verdes, hard corona), para dar lugar a la formación de una corona que da identidad biológica a la NP.

1.3.4. Funcionalización de nanopartículas

La formación de una biocorona cuando las NPs son expuestas a un entorno fisiológico, hoy en día se ha convertido en una gran oportunidad para su modificación con diferentes fines. La estrategia de seleccionar y recubrir la superficie de las NPs antes de ser administradas se emplea actualmente para modificar algunas de sus propiedades, como disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo de circulación en sangre, disminuir el reconocimiento por el sistema inmune o utilizar esas NPs como terapias dirigidas [53,74]. Mediante la modificación previa de la biocorona, se puede cambiar la biodistribución y

destino específico de las NPs. Una de las estrategias que se ha utilizado, por ejemplo, para evitar la unión de proteínas inespecíficas y aumentar el tiempo de circulación en sangre, ha sido el recubrimiento con polímeros como el polietilenglicol (PEG). Este polímero genera impedimentos estéricos, evitando la interacción NP-NP o NP-proteína. Sin embargo, algunos tratamientos con NPs recubiertas con PEG han resultado en reacciones alérgicas o anafilaxis en pacientes de ensayos clínicos [58,75–77].

Con respecto al uso de NPs como agentes de direccionamiento, para evitar el direccionamiento pasivo debido al efecto EPR, se puede lograr el direccionamiento activo de las NPs mediante su conjugación con ligandos específicos que reconocen receptores sobreexpresados en el lugar de interés, como el TME. El direccionamiento activo hace referencia a la interacción de un ligando mediada por un receptor, que conlleva la unión a una superficie celular o a la endocitosis, facilitando la acumulación de las NPs en las células diana. El gran ratio superficie-volumen de las NPs permite alcanzar altas densidades de los ligandos en su superficie para una mejor eficiencia de direccionamiento [78–82]. Los ligandos empleados para el direccionamiento de NPs pueden tener naturaleza diversa, incluyendo carbohidratos (glucosa, galactosa, dextrano, etc...), anticuerpos, ligandos de receptores de superficie, vitaminas, ácidos nucleicos, pequeñas moléculas y/o aptámeros, entre otros [58,83] (Figura I.7a). En este caso, estaríamos usando las NPs como una terapia dirigida, tal y como se explicó anteriormente.

El tipo, tamaño, densidad, orientación y cantidad de estos ligandos es fundamental para proveer un direccionamiento correcto hacia el receptor de interés y lograr una alta afinidad por el mismo [53]. Diferentes estudios sugieren que en las NPs existe una mayor densidad de ligandos en la superficie si se comparan con las proteínas en la superficie de los virus (de 0,17 a 83 ligandos por cada 100 nm² vs 0,01 a 1,73 proteínas por cada 100 nm² respectivamente). Esto indica que se emplea más cantidad de ligandos de la necesaria para lograr un direccionamiento efectivo, lo cual puede conllevar: (i) un aumento del tamaño de las NPs, favoreciendo su acumulación por el efecto EPR; (ii) un coeficiente de difusión hacia el tumor disminuido; (iii) mayor probabilidad de eliminación mediante el sistema retículo endotelial; (iv) impedimentos estéricos entre ligandos cercanos, imposibilitando su unión a la diana y (v) saturación de los receptores, que puede resultar en una captación menor. En general, se han descrito dos tipos de comportamientos en las NPs funcionalizadas dependiendo de la densidad de ligandos: densidad óptima en fase estacionaria y densidad óptica con

un máximo. En el primer caso, a medida que la densidad de ligandos aumenta, se observa un aumento en la unión con las dianas hasta que se alcanza una fase estacionaria: no importa el número de ligandos que haya, la unión no aumenta más. En el segundo caso, a medida que aumenta la densidad de los ligandos, aumenta la unión a la diana. Sin embargo, a partir de una densidad máxima, la unión comienza a disminuir (Figura I.7b). Este aspecto sobre las NPs es muy importante y debería ser estudiado y puesto a punto para cada nanosistema [83].

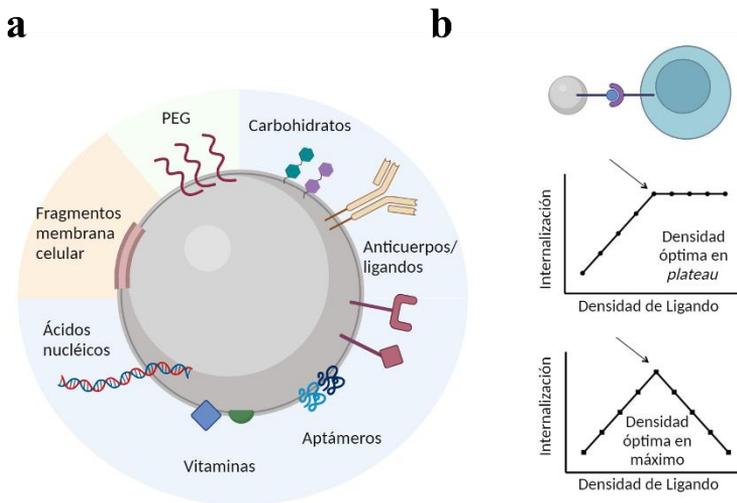


Figura I.7. Uso de NPs como agentes de direccionamiento específicos. (a) La superficie de las NPs se puede funcionalizar con diferentes ligandos incluyendo polímeros, carbohidratos, anticuerpos, aptámeros, vitaminas, ácidos nucleicos o fragmentos de membrana celular, para que reconozcan de forma específica dianas moleculares sobre expresadas en el TME. (b) Comportamientos de NPs funcionalizadas con densidad óptima de ligandos en forma fase estacionaria o en máximo. Figura adaptada de [83].

También es necesario tener en cuenta la capacidad de los receptores de superficie usados como diana. El número de receptores celulares en la superficie y su disponibilidad determinan cuántas moléculas de un ligando pueden unirse de forma específica en el tumor. Bajo condiciones ideales, la cantidad de ligando que puede unirse es igual al número de receptores disponibles (ratio 1:1). Sin embargo, solo una fracción de receptores estará disponible y todo exceso del ligando será conducido por el cuerpo como cualquier otro compuesto no dirigido. Si la cantidad de ligando libre supera a la cantidad que se puede unir a los

receptores, el efecto del direccionamiento específico será subestimado debido al fondo inespecífico. Por ello es esencial encontrar ligandos con una alta afinidad, aunque esto podría llevar a una penetración tumoral reducida debido al efecto conocido como *Binding Site barrier* [22].

Si bien es cierto que muchos sistemas basados en NPs dirigidos a tumores sólidos no resultan en una acumulación de más del 0,99% de las NPs administradas, y que no más del 2% de las células tumorales interactúan con las NPs, en casi todos los estudios realizados se muestra que las NPs dirigidas a tumores mejoran el tratamiento en comparación con los fármacos libres o con las NPs no dirigidas [84].

1.3.5. Dianas para el direccionamiento de nanopartículas al microambiente tumoral

Como se comentó anteriormente, la estrategia más adecuada para el uso de terapias dirigidas en el cáncer es emplear agentes que vayan dirigidos hacia el TME [81,82,85]. Esto es debido a dos motivos principales:

- Se podría solventar el problema del desarrollo de resistencia a las terapias debido a la ITH que presentan los tumores. En el TME existe una gran diversidad de dianas terapéuticas disponibles.
- El direccionamiento de NPs hacia los tumores solo será efectivo si las NPs funcionalizadas con los ligandos pueden extravasar a través del endotelio de la vasculatura. Sin embargo, aunque logren extravasar la vasculatura gracias a un tamaño, forma y modificación superficial adecuados, las NPs aún tienen que hacer frente a otras barreras biológicas (matriz densa de colágeno, alta presión intersticial etc...) y penetrar otras capas para alcanzar la superficie de las células tumorales e interactuar específicamente con las dianas [86].

Aunque casi todos los componentes del TME tienen dianas que podrían usarse para el direccionamiento de NPs, una de las estrategias más empleadas para direccionar agentes al TME consiste en usar dianas de la vasculatura tumoral. Primero, porque el crecimiento de todos los tumores sólidos depende de la angiogénesis y segundo, porque a diferencia de las células tumorales, que se encuentran lejos de los vasos y depende del tamaño de las NPs para que puedan extravasarlos, las células endoteliales están en contacto directo con la circulación sistémica, facilitando la unión de las NPs a sus dianas [86]. Las estrategias para

el tratamiento del cáncer frente a la vasculatura tumoral pueden ser de 5 tipos: NPs para la destrucción de los vasos, terapias anti angiogénicas, NPs para el bloqueo de los vasos, terapias para la normalización de los vasos y terapias para mejorar el efecto de las inmunoterapias [15]. Mediante estas estrategias se aprovecha la presencia de dianas de la vasculatura tumoral, entre las que destacan las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$, la aminopeptidasa N, la endosialina, la endoglina (CD105), la nucleolina de superficie, la anexina 1 de superficie, la plectina 1 de superficie, la fibronectina ED-B, el receptor de superficie p32/gC1q, el colágeno IV procesado por proteasas y los marcadores tumorales endoteliales (TEMs, del inglés, *Tumor Endothelial Markers*). Además de estas dianas, se pueden diseñar NPs cuya diana son vías de señalización esenciales para la angiogénesis tumoral, como la vía de señalización VEGF/VEGFR y otras vías pro angiogénicas como la de la angiopoyetina 2, el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés, *Epidermal Growth Factor*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés, *Platelet-Derived Growth Factor*) [15,22,86].

De todas, la diana más empleada en los últimos años ha sido la vía de señalización del VEGF/VEGFR. Como se comentó anteriormente, esta vía de señalización es clave para la angiogénesis y para promover la supervivencia y proliferación de las células tumorales. Se han diseñado diferentes tipos de NPs funcionalizadas con ligandos que son capaces de unirse de forma específica a los VEGFRs, impidiendo la unión de los VEGFs. De esta forma se bloquea la señalización a través de la vía, inhibiéndose la angiogénesis tumoral. Sin embargo, el direccionamiento de NPs hacia este receptor para reducir la irrigación tiene limitaciones: (i) se limita también la entrega de fármacos y otras nanomedicinas al espacio peritumoral, (ii) la presencia de vías angiogénicas alternativas a esta puede conllevar la aparición de resistencias, reduciendo su efectividad y (iii) esta vía de señalización no es específica de la angiogénesis tumoral, por lo que también podría verse afectada la angiogénesis fisiológica [86]. Existen algunas terapias dirigidas hacia el eje VEGF/VEGFR2 que han sido aprobadas clínicamente para tratar pacientes con cáncer de colon, pulmón, cerebro y riñón. Sin embargo, se asocian con algunos efectos adversos como la hipertensión, la proteinuria, hipotiroidismo, diarrea, trombos venosos y problemas de coagulación sanguínea, además de otras complicaciones más serias relacionadas con los dos últimos efectos. Las terapias anti angiogénicas deben ser administradas durante meses o años para que sean efectivas en la prevención del cáncer recurrente, por lo que todos estos efectos secundarios suponen una preocupación en la clínica [87]. Otras dianas como las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ o el marcador CD105 presentan también la limitación de que no son dianas específicas del TME [86].

Por ello, es esencial seguir buscando dianas alternativas en el TME para el uso adecuado de las terapias dirigidas, que puedan ser más específicas, de tal manera que se logre un direccionamiento efectivo de NPs terapéuticas y/u otros agentes terapéuticos que tengan menos efectos secundarios.

1.4. Receptores de toxinas AB bacterianas como dianas en el tratamiento del cáncer

En la búsqueda de dianas alternativas para el direccionamiento de terapias al TME, los receptores de algunas toxinas bacterianas surgieron como una opción novedosa debido a que son sobreexpresados en distintos tumores sólidos [88–90]. Las toxinas bacterianas son un tipo de biotoxinas, ligandos naturales con propósito, principalmente, de defensa frente a depredadores. Estas moléculas interfieren con los procesos fisiológicos de los organismos a los que infectan cuando las inhalan, ingieren o absorben [91–93]. Uno de los aspectos más importantes de las biotoxinas es la alta especificidad y afinidad inherente por sus receptores o dianas moleculares intracelulares, siendo letales a muy bajas dosis ($LD_{50} < 25 \text{ mg/kg}$) [94]. Esto, las convierte en una fuente invaluable de ligandos activos para su uso como herramientas farmacológicas o terapéuticas en terapias moleculares dirigidas.

En esta tesis, hemos centrado la atención en un tipo concreto de toxinas bacterianas, las toxinas AB. Estas toxinas se caracterizan por su estructura proteica única, que consiste en 2 dominios bien diferenciados que cumplen funciones distintas: el dominio A es el dominio catalítico mientras que el B, es el dominio de unión al receptor. A través de procesos evolutivos, estas toxinas han evolucionado en transportadores eficientes, capaces de transportar el dominio catalítico A, que ejerce una acción tóxica, al interior celular. Este transporte está facilitado por la unión del dominio de unión B, no tóxico, a su receptor en la superficie celular [95,96]. En la mayoría de las toxinas AB, el dominio B cuenta con un dominio de traslocación que juega un papel crucial para facilitar el transporte del dominio A al citosol. Normalmente, forma un poro o canal a través del cual es traslocado al otro lado de la membrana celular [96,97]. La mayoría toxinas AB son responsables del desarrollo de enfermedades humanas, que cursan, normalmente, con síntomas gastrointestinales y en última instancia conducen a la muerte del individuo [98]. Sin embargo, actualmente se están llevando a cabo estudios con toxinas AB modificadas para su uso como agentes de direccionamiento de fármacos hacia el TME donde se sobreexpresan sus

receptores, entre otras aplicaciones biomédicas [99,100]. Curiosamente, la mayoría de las toxinas AB se sintetizan inicialmente como toxinas inactivas y requieren un procesamiento proteolítico para ser convertidas en su forma activa. Los dominios A y B pueden ser sintetizados como una única cadena polipeptídica o de forma independiente, dependiendo del estado monomérico u oligomérico del dominio B [97].

En el desarrollo de esta tesis doctoral nos hemos centrado en un receptor concreto y en su ligando natural. Se trata del receptor de membrana Marcador Tumoral Endotelial 8 (TEM8, del inglés, *Tumoral Endothelial Marker 8*) y la toxina del ántrax (Atx).

1.4.1. Toxina del ántrax y su receptor TEM8

La Atx es una enterotoxina producida por la bacteria Gram positiva *Bacillus anthracis*, responsable de la enfermedad del ántrax o carbunco, descrita por primera vez en humanos en 1877 por Robert Koch [101,102]. Esta enfermedad se contrae a través de las esporas bacterianas, que pueden llegar al huésped por inhalación, a través de la piel, ingestión o inyección. Aunque el ántrax cutáneo es la forma más común de la enfermedad, la enfermedad producida por inhalación es la que mayor tasa de mortalidad muestra (85-90%). En el medio ambiente, esta bacteria se encuentra en forma de esporas inactivas que son muy resistentes a duras condiciones ambientales como el calor, la radiación, la presión o la luz ultravioleta, y pueden sobrevivir en el suelo durante décadas hasta que son incorporadas en un huésped. Una vez dentro de un ambiente favorable, germinan y crecen rápidamente, produciendo grandes cantidades de toxinas que se diseminan por el torrente sanguíneo [100,102]. Los síntomas de esta enfermedad van desde edema y necrosis hasta la sepsis y el colapso venoso. Hoy en día la Atx está considerada como un agente bioterrorista y fue usado como arma en la Primera y Segunda Guerras Mundiales. Además, es responsable de muertes en la Unión Soviética en 1979, en Japón en 1955 y en los Estados Unidos en 2001 [102].

1.4.1.1. Estructura de la toxina del ántrax

La Atx tiene una estructura tripartita con 3 cadenas polipeptídicas independientes: el antígeno protector (PA, del inglés, *Protective Antigen*), el factor letal (LF, del inglés, *Lethal Factor*) y el factor edema (EF, del inglés, *Edema Factor*) (Figura I.8). El PA es el dominio B, una proteína de 83 kDa que se une a células diana a través de su receptor TEM8. Por otro lado, el LF y el EF, proteínas de 90 y 89 kDa respectivamente, conforman el dominio A y tienen actividades enzimáticas diferentes en el citoplasma celular. La proteína PA tiene 4 dominios diferentes, y la unión a TEM8 tiene lugar a través de aminoácidos de los dominios II y IV. Cuando se produce la unión en la superficie celular, PA sufre una escisión proteolítica por una furina y da lugar a un péptido de 20 kDa y a una forma más corta de PA de 63 kDa, que se ensambla en un anillo heptamérico para reclutar a EF y LF [101,103,104].

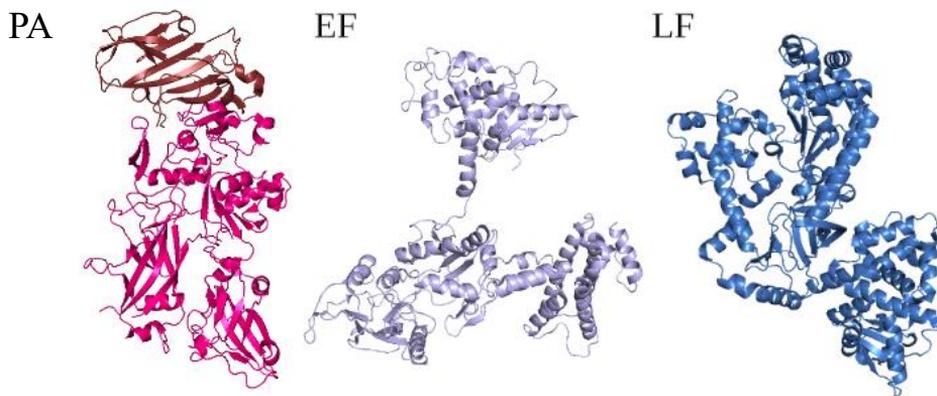


Figura I.8. Estructura molecular de la Atx. Estructura cristalina de las 3 partes de la Atx: PA en marrón (PA_{20}) y rosa (PA_{63}), EF en morado y LF en azul. Las estructuras se encuentran representadas mediante el software PyMOL. Los códigos de acceso de las proteínas en el Protein Data Bank son, respectivamente: 1ACC, 1J7N y 1XFY.

1.4.1.2. Estructura del receptor TEM8 y mecanismo de acción de la toxina del ántrax

A principios de los 2000, se describió por primera vez el receptor de la Atx. Se trata del receptor TEM8 o ANTXR (del inglés, *Anthrax Toxin Receptor*) [105], una proteína de superficie tipo integrina. Es una proteína transmembrana de tipo I que consiste en (i) un dominio extracelular de tipo *von Willebrand* (vWA),

(ii) un motivo MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) con estructura $DXSXS...T...D$ (donde X es cualquier aminoácido) que puede unir cationes divalentes como el Mg^{2+} y el Ca^{2+} , (iii) un dominio extracelular tipo inmunoglobulina (*Ig-like*), (iv) un dominio transmembrana, y (v) un largo dominio citoplasmático [106,107]. Esta estructura se corresponde con la isoforma larga del receptor y está altamente conservada entre ratones y humanos, con un 96% de similitud entre las secuencias de aminoácidos. La isoforma larga está compuesta por 564 aminoácidos. Sin embargo, existen otras variantes que resultan del procesamiento mediante corte y empalme (*splicing*). La isoforma media tiene 386 aminoácidos y le falta una secuencia del dominio citoplasmático. La isoforma corta no tiene dominio transmembrana, por lo que se trata de una forma secretada de la proteína [104,108].

El dominio extracelular vWA es el dominio de unión a la PA de la Atx, y tiene las características típicas del dominio extracelular de las integrinas: un plegamiento de Rossmann de unión a nucleótidos, que consta de 6 α hélices que rodean a una lámina β central de 6 hebras, creando un núcleo hidrofóbico (Figura I.9). La proteína PA se une al receptor a través de interacciones hidrofóbicas entre este dominio y aminoácidos de los dominios II y IV de PA [107]. Los residuos 153-158 localizados en el bucle $\beta 3$ - $\beta 4$ de TEM8 interactúan con Leu₃₄₀ y Ala₃₄₁ del dominio IV de PA. Los residuos 113 y 115 localizados en el bucle $\alpha 2$ - $\alpha 3$, interactúan con una hendidura hidrofóbica compuesta por Leu₆₈₇, Ile₆₈₉, Ile₆₄₆, Phe₆₇₈ e Ile₆₅₆ del dominio IV de PA. Los residuos 87 y 88 ubicados en el bucle $\beta 2$ - $\beta 3$ interactúan con Asp₆₅₇, Arg₆₅₈, Asp₇₁₄ y Thr₇₁₅ del dominio IV de PA. Finalmente, los residuos 65 y 57 localizados en la hélice $\alpha 1$ interactúan con Tyr₆₈₈ en el dominio II de PA. La mayoría de los residuos se encuentran en el DIV, aunque hay dos de ellos localizados en el DII [107]. Estudios *in vitro* han mostrado que la afinidad de TEM8 por la proteína PA es similar a la del colágeno por las integrinas. A través de experimentos de resonancia de plasmones superficiales se ha determinado que la constante de disociación de PA por TEM8 es 1.1 μM y 130 nM en presencia de Mg^{2+} y Ca^{2+} respectivamente.

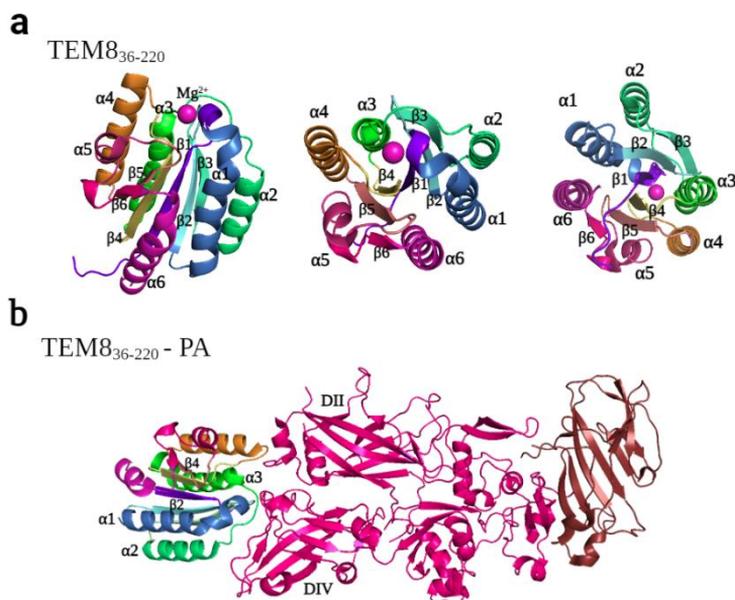


Figura I. 9. Estructura molecular del dominio vWA del receptor TEM8 y sitios de unión en la subunidad B de la Atx. (a) Estructura cristalizada del dominio extracelular TEM8 vWA correspondiente a los residuos 36-220. Consta de 6 α hélices que rodean un núcleo hidrofóbico central formado por seis láminas β trenzadas. El ion Mg^{2+} está representado como una esfera rosa unida al motivo MIDAS. (b) Estructura cristalizada de unión TEM8₃₆₋₂₂₀-PA mediante interacciones hidrofóbicas con residuos de los dominios II y IV de PA. Códigos de acceso de las proteínas en el Protein Data Bank son: 3N2N para el dominio extracelular TEM8 y 1T6B para unión TEM8-PA.

En ausencia de moléculas de toxina, TEM8 se encuentra pre organizado en la superficie celular gracias al citoesqueleto de actina [109]. Cuando se produce la unión entre PA y TEM8, la proteína PA83 sufre una escisión proteolítica por parte de furina presentes en la superficie celular, dando lugar a un péptido de 20 kDa y a una forma más corta de PA, PA63. En ese momento 7 subunidades de PA63 se ensamblan para formar un anillo en forma de heptámero sobre el cual se unen hasta 3 subunidades de EF y LF. Los complejos receptor-toxina son internalizados, principalmente, mediante endocitosis mediada por receptor en vesículas de clatrina hacia la ruta endosomal, aunque existen rutas alternativas. La endocitosis mediada por clatrina depende de dinamina, la proteína adaptadora AP-1 y actina. Cuando los complejos llegan a los endosomas, los heptámeros PA63 sufren un cambio conformacional debido a la bajada de pH y las moléculas de LF y EF son traslocadas al citoplasma celular, directamente o a través de

vesículas intraluminales (Figura I.10). El LF es una metaloproteasa dependiente de zinc, que escinde miembros de la familia quinasa de la proteína quinasa activada por mitógeno, inactivándolas. Esto resulta en la activación de cascadas de señalización que resultan en necrosis e hipoxia en las células. Por otro lado, EF es una adenilil ciclasa dependiente de calmodulina, que lleva a una elevación en los niveles intracelulares de AMPc, resultando en edema. Todos estos cambios celulares llevan a la muerte celular [103,110] (Figura I.10).

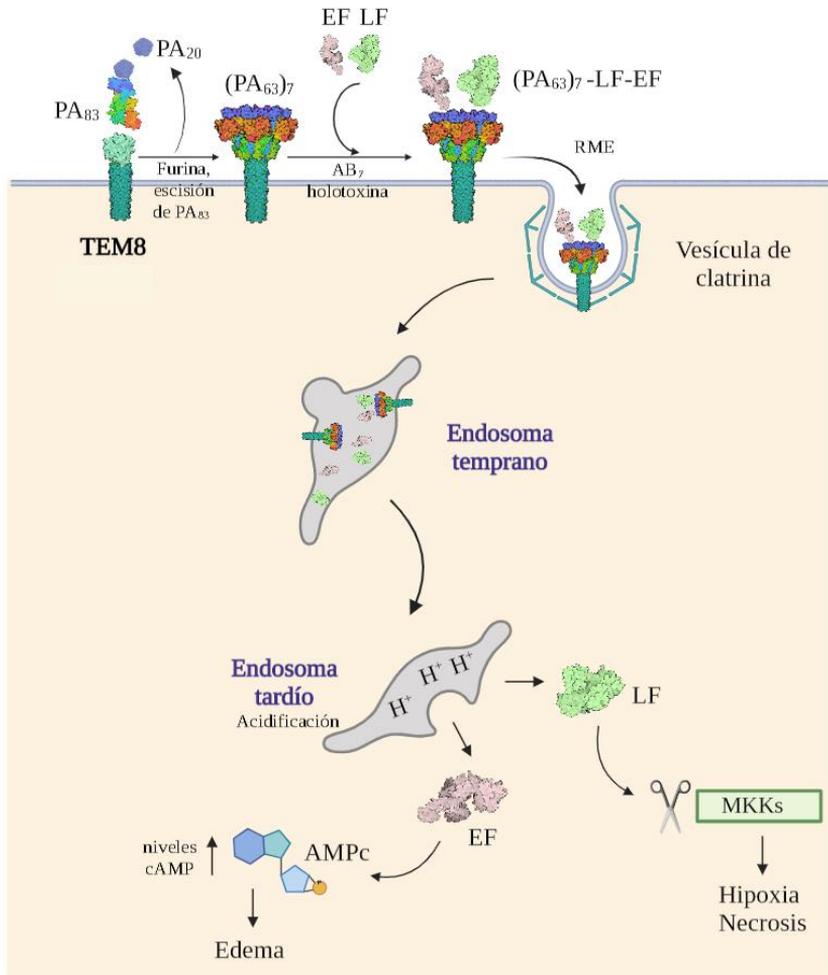


Figura I. 10. Mecanismo de entrada de Atx y efectos celulares. Después de la unión a TEM8, se produce la entrada de la toxina al citosol por endocitosis mediada por receptor. Una vez dentro del endosoma, el complejo encuentra un ambiente ácido y se forma un canal en la membrana del endosoma, permitiendo que las subunidades catalíticas LF y EF alcancen el citosol. LF escinde los miembros de la familia quinasa de la proteína quinasa activada por mitógeno (MKKs), y EF actúa como una adenilil ciclasa dependiente de calmodulina para aumentar las concentraciones de AMPc.

1.4.2. Papel fisiológico y patológico del receptor TEM8

En humanos, el receptor TEM8 se expresa principalmente en las células de los tejidos diana de esta toxina: la piel, los pulmones y el intestino delgado [104]. Además, también se expresa en otros tejidos, incluido el sistema nervioso central, el corazón y los linfocitos [105]. Desde su descubrimiento, la mayoría de los estudios se han centrado en describir las funciones patológicas del receptor con relación a la patogenicidad de la Atx. Sin embargo, TEM8 también desempeña funciones fisiológicas en vertebrados. Estas están principalmente relacionadas con la regulación de la homeostasis de la matriz extracelular y la remodelación de la angiogénesis, la migración y la diseminación celular mediante la interacción con el citoesqueleto de actina, similar a las integrinas [106,111].

En concreto, TEM8 se une al colágeno I, la gelatina y el dominio C5 del colágeno VI [112–114]. Esto ocurre ya que TEM8 está involucrado en la cascada de señalización de Wnt/ β -catenina. Esta cascada controla la proliferación celular, la polaridad y la migración. Las células que expresan TEM8 inducen esta vía a través de interacciones célula matriz a través del colágeno, aumentando el inicio de la angiogénesis a través de la inducción de un ambiente más reactivo y móvil [115]. Además, TEM8 regula la elasticidad, la proliferación y la apoptosis en los condrocitos de la piel a través de cambios en la presión hidrostática. Esta vía de señalización exclusiva es independiente del papel de TEM8 como integrina. Finalmente, se sabe que TEM8 juega un papel fundamental en la médula ósea. El factor de transcripción GAT2, encargado de la diferenciación osteoblástica, se une a la región promotora de TEM8 para regular su expresión. Después, TEM8 regula los ligandos RANK, que inducen la diferenciación osteoclástica, modificando la resorción ósea. Mutaciones en el gen que codifica la proteína TEM8 se asocian con hemangioma infantil, una enfermedad caracterizada por áreas de angiogénesis localizadas y de rápido crecimiento, pero algunas también se asocian con retraso del crecimiento, alopecia, pérdida de dientes postizos y síndrome de atrofia del nervio óptico [104,113].

Las principales funciones fisiológicas y patológicas relacionadas con este receptor se encuentran recogidas en la Figura I.11.

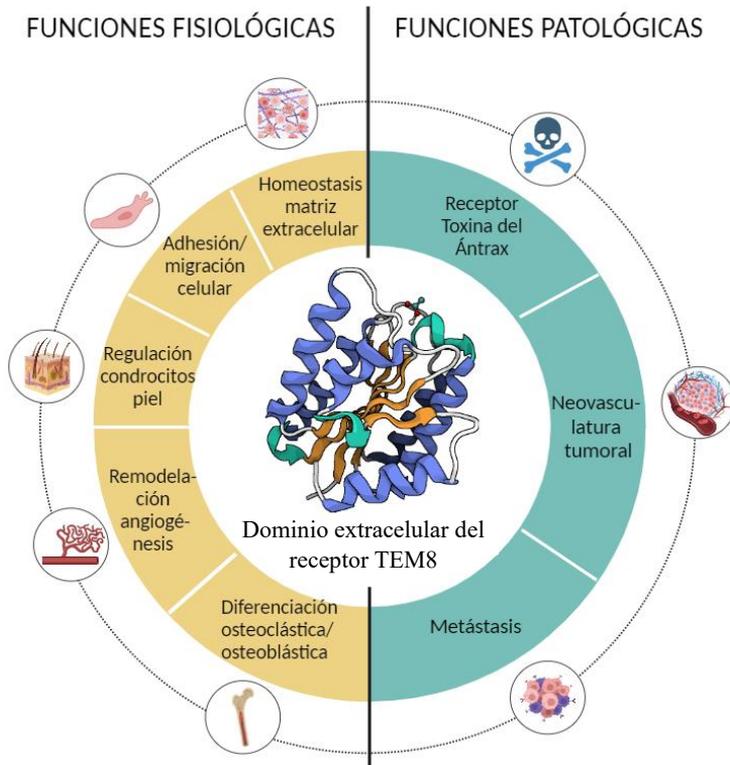


Figura 1. 11. Esquema de las principales funciones fisiológicas y patológicas del receptor de membrana TEM8. En amarillo, las funciones relacionadas con procesos fisiológicos; en azul, las funciones relacionadas con procesos patológicos.

Además de las funciones patológicas de TEM8 en relación con la patogenicidad de la Atx, TEM8 está implicado en la neoangiogénesis tumoral y en la metástasis [87]. Fue en el año 2000 cuando se describió que TEM8 era el octavo gen más sobreexpresado en el endotelio tumoral, frente al endotelio fisiológico [111,116][117]. La expresión de TEM8 se ha observado en células endoteliales durante desarrollo embrionario de ratón. Sin embargo, en adultos, se considera específico de vasos en tumores ya que no se ha detectado expresión durante la angiogénesis fisiológica. Esto está respaldado por varios estudios que han demostrado que el *knockout* (KO) de TEM8 en ratones muestran una angiogénesis normal, mientras que el crecimiento tumoral del melanoma está alterado en ratones KO en comparación con ratones de tipo salvaje (WT, del inglés, *Wild Type*) [90]. Estos hallazgos sugieren que TEM8 es esencial para el crecimiento tumoral y la angiogénesis patológica, pero no para la angiogénesis fisiológica, lo

que lo convierte en un excelente receptor para atacar específicamente tejidos cancerosos. Además de la neovasculatura, TEM8 se encuentra sobreexpresado en otros tipos de células de TME incluyendo los CAFs, pericitos y adipocitos [118,119]. La sobreexpresión de TEM8 se da en muchos tipos de tumores, incluyendo el osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, angiosarcoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y melanoma, donde la sobreexpresión está relacionada con tumores más agresivos (Figura I.12). En cáncer de mama triple negativo, TEM8 es un marcador de mimetismo vasculogénico, un proceso originado por la hipoxia a través del cual las células tumorales se organizan en estructuras que mimetizan a las células endoteliales, formando tubos funcionales que transportan glóbulos rojos. El mimetismo vasculogénico se asocia con un mal pronóstico en muchos tipos de tumores [120].

Los tumores utilizan este receptor de forma similar a su función fisiológica, dada su implicación en la vía Wnt/ β -catenina y la interacción con el colágeno, favoreciendo la proliferación tumoral, la migración de células endoteliales y la metástasis. Además, TEM8 regula algunos procesos oncológicos, incluyendo la síntesis de colágeno [115].

1.4.3. La toxina del ántrax como ligando de direccionamiento de agentes terapéuticos y de diagnóstico

La Atx ha sido propuesta como una herramienta alternativa para la terapia tumoral debido a que los 3 componentes que la conforman, por separado, no son tóxicos y la proteína PA debe ser proteolíticamente activada para poder traslocar las otras subunidades al interior celular. Estas características únicas de la toxina permiten que la introducción de pequeñas modificaciones restrinja su acción a células tumorales específicas. Las aplicaciones biomédicas de Atx se basan principalmente en su capacidad de traslocar diferentes proteínas, fármacos y otras moléculas de manera dirigida al citosol del huésped a través de un poro formado por oligómeros de PA, propiedad que depende de la unión de la PA al receptor y su posterior activación proteolítica. Como sistema de entrega, tiene aplicaciones similares a la toxina del cólera o de la Shiga [121].

Las proteínas PA y LF de la Atx muestran interesantes propiedades antitumorales intrínsecas ya que inhiben las vías asociadas a MAPKK, por ejemplo, en el melanoma con la mutación V600E en el gen *BRAF* [122,123]. Sin embargo,

algunos tumores han mostrado resistencia a estos efectos. Por ello, se realizaron modificaciones en este sistema de entrega para transportar subunidades catalíticas de otras toxinas que pueden ser más efectivas en células resistentes. Se diseñó un sistema formado por PA y una proteína de fusión entre el extremo N-terminal de LF (LFn) y la exotoxina A de *Pseudomonas ssp* (PEA), que cataliza la ADP-ribosilación del factor de transcripción EF2, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas. Los experimentos se llevaron a cabo en líneas celulares que expresan TEM8, y se consiguió una traslocación eficiente a través de PA de la proteína de fusión. Otros sistemas similares han sido desarrollados en los últimos años. Por ejemplo, se diseñó un sistema formado por PA y una proteína en la que se sustituyó el extremo N-terminal de LF por un péptido policatiónico, unido a la subunidad catalítica de la toxina diftérica. Mediante estos sistemas, y realizando algunas modificaciones en la secuencia de aminoácidos de PA para aportar selectividad por tumores específicos, se realizaron experimentos donde se redujo el crecimiento tumoral hasta en un 70% [124].

Finalmente, con respecto a la aplicación de la PA de forma aislada, se llevaron a cabo modificaciones en su secuencia de aminoácidos para que fuese resistente al procesamiento proteolítico. De esta forma, al permanecer unido a la superficie celular, inhibía la angiogénesis *in vivo* sin matar a las células endoteliales. Además, se han llevado a cabo modificaciones para producir mutantes de PA que presentan mayor especificidad hacia el receptor TEM8 para su uso como terapia dirigida. Finalmente, la secuencia de PA puede ser mutada en el lugar de corte de la furina para que sean más específicas por ciertas líneas tumorales. Por ejemplo, este sitio de corte puede ser cambiado por uno para metaloproteasas de la matriz y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa, que se sobreexpresan en muchos tipos de cáncer [121,125,126].

Todas las aplicaciones previamente descritas se encuentran resumidas en la Tabla I.1.

Tabla I. 1. Aplicaciones de la Atx en el tratamiento del cáncer, centrándonos en aquellas que dependen del PA, la subunidad de unión al receptor.

Conjugado	Compuesto liberado	Uso	Modelo
PA-LF	LF	<i>In vitro, In vivo</i>	Melanoma (V600E) neuroblastoma
PA LFn-PEA	PEA	<i>In vitro</i>	Células CHO
	PEA	<i>In vivo</i>	Xenoinjertos A549
PA Lys6-DtxA	DtxA	<i>In vitro</i>	Células CHO
PA ^{SSSR}		<i>In vivo</i>	Inhibición de la angiogénesis
PA ^{N657Q/ R659S/M662R}		<i>In vitro</i>	Células CHO, fibroblastos embrionarios murinos

Con todos estos antecedentes, el estudio que se plantea en esta tesis doctoral consiste en emplear el dominio B de la Atx como ligando para dirigir NPs quimioterápicas de forma específica al TME a través del receptor de superficie TEM8. En concreto, como modelo, se ha escogido estudiar el efecto terapéutico de NPs portadoras del fármaco Doxorubicina, funcionalizadas con una proteína ligando basada en la estructura de la proteína PA, en modelos de melanoma maligno murino que sobreexpresan TEM8 en el TME.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en desarrollar un ligando inspirado en la toxina del ántrax (Atx) para dirigir quimioterapias nanoencapsuladas al receptor de membrana Marcador Tumoral Endotelial 8 (TEM8) en el microambiente tumoral.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos que se han propuesto para alcanzar el objetivo final de este trabajo son los siguientes:

1. Diseño, producción y purificación de proteínas ligando basadas en la estructura del antígeno protector (PA) de la Atx.
2. Validación de la afinidad y especificidad de las proteínas diseñadas en un modelo de sobreexpresión de TEM8 *in cellulo*.
3. Validación de la especificidad y actividad de la proteína ligando PA17 en modelos preclínicos de melanoma murino.
4. Diseño, producción y caracterización de un nanosistema para la encapsulación de un fármaco quimioterápico dirigido al receptor de membrana TEM8.
5. Estudio del efecto terapéutico del nanosistema administrado localmente en un modelo de melanoma murino.
6. Estudio del efecto terapéutico del nanosistema administrado de forma intravenosa en un modelo de melanoma murino.
7. Evaluación de la versatilidad de la proteína ligando PA17 en el direccionamiento de otras quimioterapias nanoencapsuladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes son aquellas que se obtienen cuando se expresa un gen clonado en una especie o línea celular diferente a la célula de origen. Durante esta tesis doctoral se han diseñado diferentes proteínas recombinantes, algunas de ellas para su sobreexpresión en bacterias y otras para su sobreexpresión en células eucariotas.

3.1.1. Reactivos

Ampicilina (Nzytech, ref. MB021), cloranfenicol, *Mini Tablets EDTA-free protease inhibitors* (Thermo Fisher, ref. A32955), Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Nzytech, ref. MB026), Luria-Bertani (LB) broth medio (Labbox, ref. LBBR-00P-500), LB Agar (Labbox, ref. AGAG-00P-500), tampón fosfato salino 10X (PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*; Gibco™, ref. 10010), tampón de lisis-equilibrado-lavado (LEW Buffer; Macherey Nagel), tampón de elución (Macherey Nagel), Tris-HCl (99%; Sigma Aldrich, ref. T3253), metanol (ref. M/4000/21), ácido acético glacial, dodecilsulfato sódico (SDS 20% v/v; Nzytech, ref. MB11601), persulfato de amonio (APS; Nzytech, ref. MB03403), TEMED (Nzytech, ref. MB03501), Acrilamida/bis-Acrilamida (solución con ratio 37.5:1; Nzytech, ref. MB15601), 2-Mercaptoetanol (Sigma Aldrich, ref. M6250), azul de Coomassie R250 (Fisher Scientific, ref. 1549403), tampón de migración (*Running buffer / Tris-Glycine-SDS buffer*; Nzytech, ref. MB19501), glicerol anhidro para biología molecular (PanReac AppliChem, ref. A2926, 0500), suero fetal bovino (FBS Standard, del inglés, *Fetal Bovine Serum*; Pan Biotech, ref. P30-3306), cloruro sódico (NaCl; Sigma-Aldrich, ref.746398), cloruro potásico (KCl; Sigma-Aldrich, ref. P3911), dihidrógeno fosfato de sodio (NaH_2PO_4 ; Panreac, ref. 122018), dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4 ; Panreac, ref. 121512), azul de bromofenol (Backer Organic Chemical), marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*; Thermo Fisher, ref. 2665513), Fracción V de albúmina Bovina (BSA, del inglés, *Bovine Serum Albumin*, Nzytech, ref. MB04601), *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher, ref.23225).

La composición y características de las diferentes soluciones empleadas están recogidas en la Tabla MM.1.

Tabla MM. 1. Composición química de las soluciones empleadas en los experimentos con proteínas recombinantes.

Tampón	pH	Composición
PBS 1X	7,4	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM NaH ₂ PO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Tampón de lisis-equilibrado-lavado 1X (LEW)	8,0	50 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O, 300 mM NaCl
Tampón de elución 1X	8,0	50 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O, 300 mM NaCl + 250 mM imidazol
Tris-HCl	8,8	1,5 M Tris-HCl
Tris-HCl	6,8	0,5 M Tris-HCl
Tampón de migración	8,3-8,7	0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicina, 0,1% SDS
Tampón de carga 4X (LB)	-	250 mM Tris-HCl, 8% SDS (v/v), 0,1% azul de bromofenol (p/v), 40% glicerol (v/v), 14,3M 2-mercaptoetanol
Solución de tinción	-	2,5 g de azul Coomassie R250, 450 ml metanol, 100 ml ácido acético, H ₂ O Milli-Q
Solución de destinción	-	400 ml metanol, 100 ml ácido acético, 500 ml H ₂ O MilliQ

3.1.2. Diseño de genes y proteínas recombinantes para expresión bacteriana

3.1.2.1. *Proteínas recombinantes basadas en la toxina del ántrax*

Para el desarrollo de terapias dirigidas, se diseñaron 4 proteínas recombinantes basadas en la estructura de la proteína PA de la toxina del ántrax, de acuerdo con los residuos que interactúan con el receptor TEM8. Todas las construcciones se diseñaron estudiando la estructura de PA y de TEM8 en diferentes artículos científicos. Ambas estructuras fueron modeladas mediante el software PyMOL. Para el clonaje, la secuencia de aminoácidos de PA se obtuvo de la base de datos UniProt (ID: P13423 · PAG_BACAN). El peso molecular de cada construcción se estudió empleando herramientas de la base de datos EMBOSS Program Pepstats. Los nombres de cada construcción están formulados en base a su peso molecular en kDa, Además, todas las construcciones constan de una secuencia de

6 residuos de histidina (6xHis) o de 10 residuos (10xHis), ambas en el extremo N-terminal.

Las secuencias de ADN de las construcciones 6xHis fueron clonadas en el plásmido pMAL-pE5 por la compañía General Biosystems C (Morrisville, USA). Este plásmido presenta resistencia al antibiótico ampicilina. El gen de interés se clona bajo el control del promotor del bacteriófago T7 y la expresión génica está regulada por el promotor Tac. Se trata de una combinación entre los operones *trp* y *lac*, por lo que puede ser inducido tanto por la adición de triptófano como de IPTG en el medio de cultivo.

La secuencia proteica completa de las 4 construcciones se encuentra detallada debajo, con los residuos de histidina en color morado y los dominios de PA señalados por colores: DI en azul, DII en verde, DIII en amarillo and DIV en naranja). Los residuos de interacción con TEM8 se encuentran subrayados.

Secuencia aminoácidos de la proteína 6xHis:PA64

HHHHHSTTSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRTFLSPWISNIHEKKGLTKYK
 SSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDKNVSPPEARHPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQST
 QNTDSQTRTISKNTSTSRHTTSEVHGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHSL
 SLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIRYVNTGTAPIYNVLPPTTSLVLGKNQTLATIKAK
 ENQLSQILAPNNYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLELEKTKQLRLD TDQVY
 GNIATYNFENGRVVRVDTGSNWSEVLPQIQET **TARIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSDPLE**
TTKPDMTLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGDITEFDNFNDQQTSONIKNQLAELNATNI
YTVLDDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAVGADES VVKEAHREVINSSTEGLLLNIDK
DIRKILSGYI VEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFID FKKYNDKLPYISNP
NYKVN VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG

Secuencia aminoácidos de la proteína 6xHis:PA16

HHHHHVGADES VVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYI VEIEDTEGLKEVIN
DRYDMLNISSLRQDGKTFID FKKYNDKLPYISNPNYKVN VYAVTKENTIINPSENGDT
STNGIKKILIFSKKGYEIG

Secuencia aminoácidos de la proteína 6xHis:PA17

HHHHHFHYDRNNIAVGADES VVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYI VEIED
TEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFID FKKYNDKLPYISNPNYKVN VYAVTKENTI
INPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG

Secuencia aminoácidos de la proteína 6xHis:EGFP-PA17

HHHHHMVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGK
 LPVPWPVTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAE
 VKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHN

IEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGI
TLGMDELYKFHYDRNNI AVGADES VVKEAHREVINS STEGLLLL NIDK DIRKILSGYIVE
IEDTEGLKEV INDRYDMLN ISSLRQDGKTFIDFKKYNDKLPLYISNP NYKVN VYAVTKE
NTIINPSENGDTSTNGIKKILIFS KKGYEIG

Además, se diseñaron las mismas construcciones, pero con una secuencia 10xHis. Éstas fueron clonadas en el plásmido pET-16b por la compañía General Biosystems C (Morrisville, USA). Este plásmido presenta resistencia al antibiótico ampicilina. El gen de interés se clona bajo el promotor del bacteriófago T7 y su expresión está controlada por el operón Lac, solamente inducible por la adición de IPTG al medio de cultivo.

A partir de la secuencia 10xHis:PA17, se diseñó una nueva construcción en la que se añadió el sitio de reconocimiento para trombina y una proteína reportera (mCherry) entre la secuencia 10xHis y la secuencia PA17. El peso molecular de esta proteína es de 44 kDa.

La secuencia de aminoácidos completa se muestra a continuación, con los residuos de histidina en morado, el sitio de corte para trombina en azul, la mCherry en rojo y la secuencia PA17 en naranja. Los residuos que interactúan con el receptor TEM8 están subrayados.

Secuencia aminoácidos de la proteína 10xHis:throm:mCherry-PA17

HHHHHHHHHHLVPRGSMVSKGEEDNMAI I KEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPY
EGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVM
NFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFP SDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGA
LKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYE
RAEGRHSTGGMDELYKFHYDRNNI AVGADES VVKEAHREVINS STEGLLLL NIDK DIRKI
LSGYIVEIEDTEGLKEV INDRYDMLN ISSLRQDGKTFIDFKKYNDKLPLYISNP NYKVN
VYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFS KKGYEIG

3.1.2.2. *Proteínas recombinantes control*

A lo largo de esta tesis se han empleado 3 proteínas recombinantes para expresión bacteriana como controles negativos en los diferentes experimentos. Estas proteínas también tienen la secuencia 10xHis (color morado) para poder llevar a cabo su purificación y posterior funcionalización de nanomateriales.

La primera de ellas es la HTPG:10xHis. Se trata de una chaperona molecular bacteriana ATP dependiente. Esta construcción fue diseñada y validada por la Dr.

Ana Rodríguez Ramos durante su tesis doctoral [127]. La secuencia de aminoácidos se detalla a continuación:

Secuencia aminoácidos de la proteína HTPG:10xHis

MKGQETRGFQSEVKQLLHLMIHSLYSNKEIFLRELI SNASDAADKLRFRALSNPDLYEG
 DGELRVRVSFDKDKRILTITSDNGVGMTRDEVIDHLGTIAKSGTKSFLESLSGSDQAKDSQ
 LIGQFGVGFYSAFIVADKVTVRTRAAGEKPENGVFWESAGEGEYTVADITKEDRGTEIT
 LHLREGEDEFLLDWRVRSIIISKYSDHIALPVEIEKREEKDGETVISWEKINKAQALWTR
 NKSEITDEEYKEFYKHIAHDFNDPLTWSHNRVEGKQEYTSLLYIP SQAPWDMWNRDHHK
 GLKLYVQRFVIMDDAEQFMPNYLRFVRLIDSSDLPLNVSREILQDSTVTRNLRNALTK
 RVLQMLEKLAKDDAEKYQTFWQQFGLVLKEGPAEDFANQEAIAKLLRFASHTHTDSSAQT
 VSLEDYVSRMKEGQEKIYYITADSYAAAKSSPHLELLRKKGIEVLLLSDRIDEWMMNYL
 TEFDGKPFQSVSKVDESLEKLADEVDESAAKAEKALTPFIDRVKALLGERVKDVRLLTHR
 LTDTPAIVSTDADEMSTQMAKLF AAAGQKVPEVKYIFELNPDHVLVKRAADTEDEAKFS
 EWVLELLDQALLAERGTLEDPNLFI RRMNQLLVS HHHHHHHHHH

La segunda es la 10xHis:EGFP-VEGFR_{bp}. Se trata de una proteína recombinante que tiene un péptido de unión (bp) al VEGFR (ATWLPPR, color rosa), un receptor implicado en la angiogénesis de la neovasculatura tumoral [128]. La secuencia de aminoácidos se detalla a continuación:

Secuencia de aminoácidos de la proteína 10xHis:EGFP-VEGF_{bp}

HHHHHHHHH MVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKGLTLKFC
 TTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCF SRYPDHMKQHDFK SAMPEGVQERTIFFKDDGNYK
 TRAEVKFEGD TLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQNGIKVNFK
 IRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVT
 AAGITLGMDELYKATWLPPR

Finalmente, como proteína control también se empleó la proteína fluorescente mCherry (10xHis:mCherry). Se trata de una proteína roja fluorescente que deriva de anémonas marinas de la familia *Discosoma*. Pertenece a la familia de proteínas fluorescentes rojas monoméricas (mRFPs) y tiene un máximo de excitación a 587 nm y un máximo de emisión a 610 nm ($\lambda_{ex} = 587$ nm, $\lambda_{em} = 610$ nm). La secuencia proteica completa se obtuvo de la base de datos *FPbase* y se encuentra descrita a continuación en color rojo.

Secuencia aminoácidos de la proteína mCherry

HHHHHHHHH MVSKGEEDNMAI I KEFMRFK VHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTA
 KLKVTGGG PLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGG
 VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFP SDGPVMQKKTMGWEASSERMPEDGALKGEIK

**QRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRH
STGGMDELYK**

En la Tabla MM.2 se recoge información relevante sobre todas las proteínas diseñadas y producidas para la expresión bacteriana en este estudio, incluyendo el receptor hacia el que van dirigidas, la etiqueta molecular (*Tag*) y el peso molecular calculado (MW, del inglés, *Molecular Weight*).

Tabla MM. 2. Especificaciones de las proteínas recombinantes para expresión bacteriana, basadas en la toxina del ántrax y controles.

Proteína	Receptor	Tag	MW
6xHis:PA64	TEM8	N-term 6xHis	64 kDa
6xHis:PA17	TEM8	N-term 6xHis	17 kDa
6xHis:PA16	TEM8	N-term 6xHis	16 kDa
6xHis:EGFP-PA17	TEM8	N-term 6xHis	44 kDa
10xHis:PA64	TEM8	N-term 10xHis	64 kDa
10xHis:PA17	TEM8	N-term 10xHis	17 kDa
10xHis:PA16	TEM8	N-term 10xHis	16 kDa
10xHis:EGFP-PA17	TEM8	N-term 10xHis	44 kDa
10xHis:throm:mCherry-PA17	TEM8	N-term 10xHis:throm	44 kDa
HTPG:10xHis	-	C-term 10xHis	70 kDa
10xHis:EGFP-VEGFR_{bp}	VEGFR	N-term 10xHis	32 kDa
10xHis:mCherry	-	N-term 10xHis	28 kDa

3.1.3. Sobreexpresión de proteínas recombinantes en bacterias

Se transformaron células competentes de la cepa *Escherichia coli* BL21 con los plásmidos previamente descritos que contenían el gen de interés. Los plásmidos liofilizados se reconstituyen en agua MilliQ a una concentración final de 20 ng/μl. Para la transformación, se mezclan 30 μl de células competentes con 1 μl de ADN y se incuban a 4 °C durante 30 minutos. La mezcla se transfiere a un baño de agua a 42 °C durante 40 segundos y a 4 °C por 2 minutos más. Después, se añade a la mezcla 1 ml de medio LB sin antibiótico y las células se dejan crecer durante 1 hora a 37 °C en agitación. Finalmente, se siembran 100 μl de las células transformadas en placas con medio LB y con el antibiótico selector a 37 °C durante toda la noche. Solo las células transformadas con el plásmido pueden crecer en el medio con antibiótico ya que poseen resistencia al mismo. Colonias individuales se transfirieron a 20 ml de medio LB suplementado con 100 μg/ml

de ampicilina y se cultivaron a 37 °C toda la noche en agitación. Para preparar reservas de glicerol bacteriano a largo plazo, se mezclaron 750 µl del cultivo crecido toda la noche con 750 µl de glicerol al 50% en medio LB y se almacenaron a -80 °C.

Para la sobreexpresión de proteínas, se cultivaron 5 µl de glicerol bacteriano en 20 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de antibiótico selector y se cultivaron a 37 °C toda la noche en agitación. Luego, se transfirieron 200 µl del cultivo a 20 ml de medio LB nuevo suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. El cultivo se dejó crecer hasta que la densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600}) fue de 0,6. En ese momento, se añadió IPTG para la sobreexpresión de proteínas. Para optimizar todas las condiciones, se tomaron muestras de cultivo de 500 µl antes y después de la inducción de IPTG a diferentes condiciones. La sobreexpresión de proteínas se monitorizó mediante geles de electroforesis SDS-PAGE (Figura MM.1).

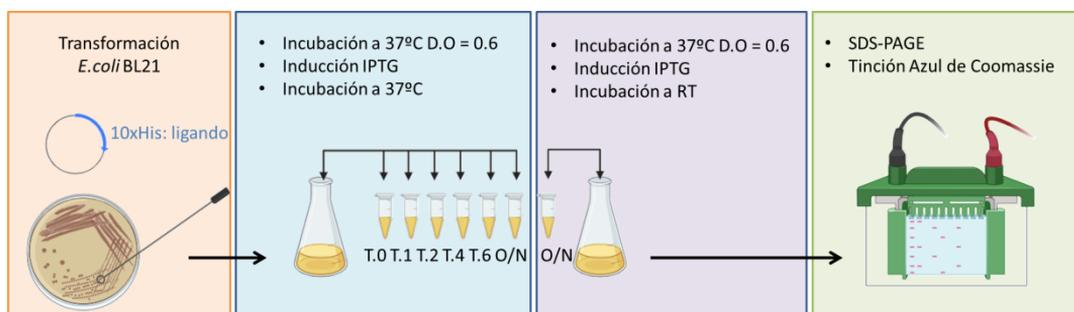


Figura MM. 1. Optimización de las condiciones de sobreexpresión de proteínas recombinantes en bacterias. Después de la transformación de células competentes con ADN plasmídico, se inoculan colonias individuales en medio LB con un antibiótico selector. Cuando los cultivos alcanzan una $D.O_{600}$ de 0,6, se agrega IPTG para inducir la sobreexpresión de proteínas, se toman muestras en diferentes tiempos y se verifican mediante electroforesis SDS-PAGE.

Cuando se establecieron las condiciones de sobreexpresión, se cultivaron 200 ml de medio LB y después de la inducción e incubación con IPTG, los cultivos se centrifugaron a 4200 rpm durante 30 minutos a 4 °C y los sedimentos se mantuvieron a -80 °C para su almacenamiento a largo plazo. Las condiciones de sobreexpresión para cada proteína están recogidas en la Tabla MM.3.

Tabla MM. 3. Condiciones optimizadas para la sobreexpresión de las diferentes proteínas recombinantes usadas durante esta tesis. O/N = overnigth. RT = room temperature.

Proteína	IPTG	Tiempo	Temperatura
6xHis:PA64	1 mM	O/N	RT
6xHis:PA17	0,5 mM	O/N	RT
6xHis:PA16	0,5 mM	O/N	RT
6xHis:EGFP-PA17	0,5 mM	O/N	RT
10xHis:PA64	0,25 mM	O/N	RT
10xHis:PA17	0,25 mM	O/N	RT
10xHis:PA16	0,25 mM	O/N	RT
10xHis:EGFP-PA17	0,25 mM	O/N	RT
10xHis:throm:mCherry-PA17	0,25 mM	O/N	RT
HTPG:10xHis	0,5 mM	O/N	RT
10xHis:EGFP-VEGF_{bp}	0,5 mM	4h	37°C
10xHis:mCherry	0,25 mM	O/N	RT

3.1.4. Purificación de proteínas recombinantes bacterianas

El primer paso en la purificación de proteínas es la lisis bacteriana. Los sedimentos bacterianos se descongelaron en hielo y se resuspendieron en tampón LEW 1X (2,5 ml de tampón LEW por cada 50 ml de sedimento bacteriano) suplementado con inhibidores de proteasas (1 tableta por cada 10 ml de tampón LEW). Las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos y luego se sonicaron en hielo (SONICS Vibra cell VCX130) durante 5 minutos, en ciclos de encendido y apagado de 5"-25" con una amplitud del 70% y se centrifugaron durante 30 minutos a 13.000 rpm a 4°C. La fracción soluble (donde está la proteína de interés) se separó del sedimento y se pasó a través de un filtro de 0,25 µm para evitar que las columnas de purificación se atascaran con restos de bacterias o agregados restantes.

Para la purificación de proteínas recombinantes se utilizaron columnas Nickel Protino Ni-TED 1000. La purificación se basa en una cromatografía de afinidad con metales inmovilizados los iones Ni²⁺ inmovilizados en la resina de sílice de las columnas tienen afinidad por los residuos de histidina presentes en las proteínas recombinantes. El anillo imidazol de la histidina forma un complejo hexacoordinado con el Ni²⁺ de la resina (Figura MM.2). Esta unión es reversible tras la adición de imidazol que competirá con la histidina liberando las proteínas

unidas de la resina. El protocolo estándar de las columnas Ni-TED es el siguiente. Las columnas se equilibran con 2 ml de tampón LEW y luego se añade la fracción soluble filtrada. Durante este paso, las proteínas recombinantes con la secuencia de histidinas se unirán a la resina como se describió anteriormente. La proteína unida se lava en la columna con 4 ml de tampón LEW y finalmente se eluye de la columna añadiendo 3 ml de tampón de elución que contiene imidazol en exceso (Figura MM.2). Para eliminar el exceso de imidazol de la elución, se utilizaron columnas de desalinización PD-10 con resina Sephadex® para intercambiar el tampón de Elución por PBS 1X. Las columnas PD-10 se equilibran con 24 ml de PBS antes de añadir nuestra proteína. Se añaden 2,5 ml de la elución de Ni-TED a la columna y la proteína se eluye en 3,5 ml de PBS. Las proteínas recombinantes en PBS se mantienen a 4 °C para su almacenamiento a corto-medio plazo. Todo el proceso de purificación es evaluado mediante SDS-PAGE.

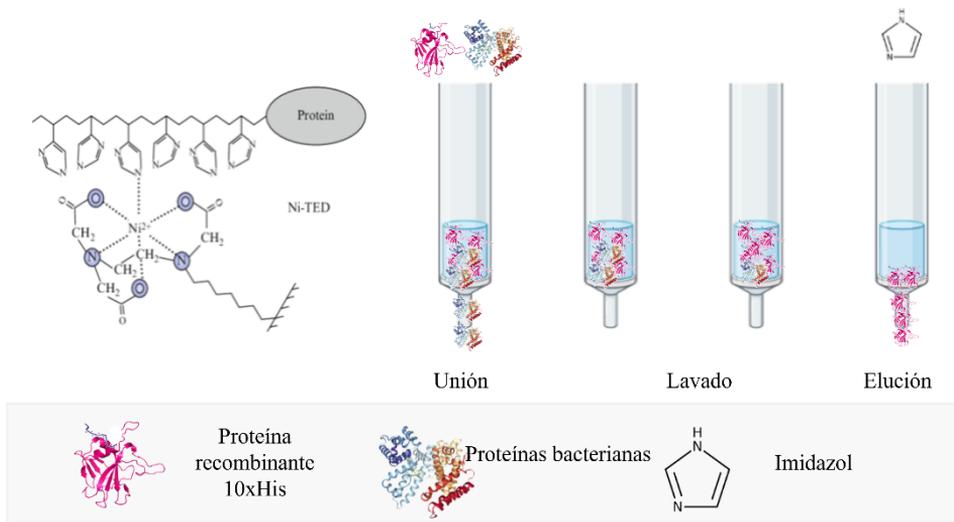


Figura MM. 2. Purificación de proteínas recombinantes con secuencias 6xHis o 10xHis mediante cromatografía de afinidad. Esquema de la interacción entre los iones Ni^{2+} de la resina de sílice de las columnas Ni-TED con el anillo de imidazol de las secuencias de histidina de las proteínas recombinantes. Protocolo de purificación de columnas Ni-TED. Después de añadir la fracción soluble filtrada, solo las proteínas marcadas se unen a la resina y los contaminantes pasarán a través de ella. La elución de proteínas recombinantes se consigue añadiendo imidazol que permanece adherido a la resina.

3.1.5. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó sobre los lisados bacterianos en tampón LEW y sobre la proteína purificada en PBS 1X. Para ello se empleó el ensayo del ácido bicinonínico (BCA), basado en la reacción de Biuret. Las proteínas forman un complejo quelato con iones Cu^{2+} en un medio alcalino, que se reduce a Cu^{1+} . Esta forma cuprosa es detectada por el BCA, formando un complejo violeta que puede medirse por absorbancia a 562 nm. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos añadiendo 200 μl de la solución de trabajo a 25 μl de cada muestra problema. La reacción se mantuvo a 37 °C durante 30 minutos antes de leer la absorbancia. La concentración de cada muestra se halló mediante el uso de una curva patrón de BSA con concentraciones conocidas entre 0,03125 mg/ml y 1 mg/ml (Figura MM.3).

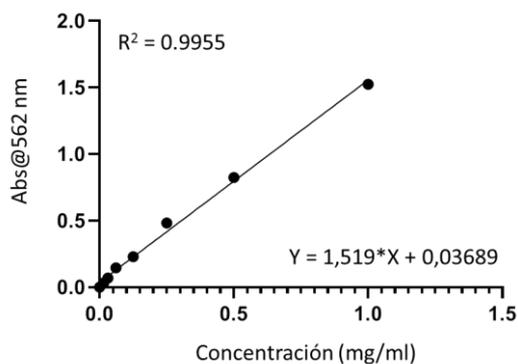


Figura MM. 3. Recta patrón de BSA para experimentos de cuantificación de proteínas mediante el método BCA. Se representa la concentración de BSA en mg/ml frente a la absorbancia medida a 562 nm.

Otra forma alternativa de llevar a cabo la cuantificación de proteínas es mediante geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Se cargan en el gel muestras de BSA a diferentes concentraciones, al lado de la muestra de interés. Después, se puede llevar a cabo la digitalización de los geles mediante el software *Image Lab* de Bio-rad. Gracias a este software, se puede calcular la concentración de proteína presente en una banda usando como referencia las bandas de BSA con concentraciones conocidas. Este método se empleó para la cuantificación de proteína presente en la superficie de diferentes tipos de nanopartículas (NPs).

3.1.6. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) es un sistema de electroforesis desarrollado por Ulrich K. Laemmli que se utiliza para separar proteínas de 5 a 250 kDa. Gracias al uso de SDS y geles de poliacrilamida, las proteínas se separan por diferencias en su peso molecular sin la influencia de la estructura y la carga. Para preparar muestras para SDS-PAGE, se diluyen en tampón Laemmli (LB) hasta una concentración final de 1X. Este tampón contiene agentes reductores (SDS y 2-mercaptoetanol) que junto con el calentamiento de las muestras a 95 °C durante 10 minutos, provocan la desnaturalización de las proteínas. Las proteínas desnaturalizadas pasan a través de la malla de poliacrilamida, primero, en el gel de apilamiento (*stacking*), donde todas las proteínas se apilan en una línea para una mayor separación en el gel de resolución (*resolving*). Los geles se tiñen con la solución de tinción y se decoloran con la solución de destinción (Tabla MM.1). Para proteínas pequeñas (12 – 26 kDa), se prepararon geles de acrilamida al 15%. Para proteínas más grandes (> 30 kDa), se prepararon geles al 12%. En la Tabla MM.4 se muestran los volúmenes utilizados para preparar los geles.

Tabla MM. 4. Volúmenes de los diferentes reactivos empleados en la preparación de geles de acrilamida.

Resolving	12%	15%	Stacking	4%
ddH ₂ O	3,4 ml	2,8 ml	ddH ₂ O	3,1 ml
Acrilamida (40%)	2,4 ml	3 ml	Acrilamida (40%)	0,5 ml
1,5M Tris pH 8,8	2 ml	2 ml	0,5M Tris pH 6,8	1,25 ml
SDS 10%	80 µl	80 µl	SDS 10%	50 µl
APS 10%	80 µl	80 µl	APS 10%	50 µl
TEMED	8 µl	8 µl	TEMED	5 µl
Volumen total	8 ml	8 ml	Volumen total	5 ml

Esta técnica se utilizó para evaluar experimentos de sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes, así como estudios de biocorona.

3.1.7. Identificación de proteínas contaminantes

La identificación de proteínas contaminantes co-purificadas con las proteínas de interés en geles de electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo en el servicio general de proteómica en la Universidad del País Vasco. Para ello, se cortaron las bandas

de interés de geles teñidos con azul de Coomassie y se enviaron a analizar bajo las siguientes condiciones:

- Digestión con tripsina y limpieza con columnas C18 caseras (EMPORE 3M).
- Cromatografía líquida y espectrometría de masas:
 - Cromatografía líquida: EASY nLC-1000 (Thermo)
 - Espectrometría de masas: Q Exactive (Thermo)
- Procesamiento de datos y búsqueda en bases de datos:
 - Proteome Discoverer 2.2 (Thermo).
 - Se utilizó la base de datos UniProt-SwissProt (www.uniprot.org) restringida a proteínas de *E. coli* + las secuencias de los constructos 6xHis-PA17 y 6xHis-GFP-PA17 + una base de datos de contaminantes habituales (keratinas, tripsina...).

3.1.8. Diseño de la proteína TEM8-EGFP recombinante para la expresión eucariota

Se ha diseñado una construcción de ADN recombinante basada en la estructura del receptor TEM8 para su expresión en sistemas eucariotas. Para ello, se mantuvieron el dominio extracelular (TEM8₃₃₋₃₂₁) y transmembrana (TEM8₃₂₂₋₃₄₂) del receptor, para asegurar la posición correcta de la proteína en la membrana celular. Sin embargo, se eliminó el dominio intracelular (TEM8₃₄₃₋₅₆₄) y se cambió por una EGFP para verificar la presencia de la proteína en las células mediante técnicas de fluorescencia. La secuencia del dominio extracelular se adquirió de un plásmido de Addgene (pIVEX2.3 TEM8, plásmido n.º 16563) a la cual se añadió el péptido señal y el dominio transmembrana. La secuencia de nucleótidos completa fue clonada en el plásmido pcDNA3.1-EGFP por General Biosystems Company (Morrisville, EE. UU.). En este plásmido, la expresión del ADN recombinante está bajo el control del promotor SV40 y tiene resistencia a ampicilina, neomicina y kanamicina. La secuencia de aminoácidos y el peso molecular de longitud completa de TEM8 se obtuvieron de la base de datos UniProt.

La secuencia completa de la proteína diseñada se muestra a continuación, con el péptido señal en naranja, el dominio *von Willebrand* (vWAD) en rosa, el dominio tipo IgG en gris claro, el dominio transmembrana en gris y la EGFP intracelular en verde.

Secuencia aminoácidos de la construcción TEM8-EGFP

MATAERRALGIGFQWLSLATLVLICAGQGRR EDGGPACYGGFDLYFILDKSGSVLHHW
 NEIYYFVEQLAHKFISPQLRMSFIVFSTRGTTLMKLTEDREQIRQGLEELQKVLPGGDT
 YMHEGFERASEQIYYENRQGYRTASVIALTDGELHEDLFFYSEREANRSRDLGAIVYC
 VGVKDFNETQLARIADSKDHVFPVNDGFQALQGI IHSILKKSCIEILAAEPSTICAGES
 FQVVVRNGNFRHARNVDRVLCSEFKINDSVTLNEKPFVVEDTYLLCPAPILKEVGMKAAL
 QVSMNDGLSFISSSV IITTTHCSDGS ILAIALLLILFLLLALALLWWF GGGSMVSKGEEL
 FTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSY
 GVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIEL
 KGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQ
 NTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK

3.1.9. Purificación de ADN plasmídico

Para el correcto almacenamiento del ADNp que contienen las construcciones de interés previamente descritas (tanto bacterianas como eucariotas), se transformaron células competentes de la cepa *E.coli* DH5 α . A diferencia de la cepa BL21 empleada para la sobreexpresión de proteínas recombinantes, las bacterias DH5 α se emplean para maximizar la eficiencia de transformación y almacenar plásmidos en su citoplasma. Después, se pueden llevar a cabo técnicas de purificación del ADNp a partir de dichas células.

Para ello, se empleó la técnica de la Miniprep a través del uso de kits comerciales (NZYMiniprep, Nzytech), que se basa en la lisis alcalina de las bacterias, seguido de la adsorción del ADN en columnas de sílice en presencia de altas concentraciones de sal. El ADNp se adsorbe selectivamente en la columna de centrifugación de plásmidos NZYTech basada en gel de sílice, mientras que las impurezas como proteínas, sales, oligonucleótidos (<40 unidades) son eliminadas en los procesos de lavado. El ADN eluido es apto para aplicaciones como la secuenciación fluorescente automatizada, PCR y una amplia gama de otras manipulaciones enzimáticas. Mediante el uso de este kit, se pueden aislar hasta 15 μ g de ADNp, que se almacenan en el tampón de elución para usos posteriores a -20 °C.

3.2. Nanomateriales

A lo largo de esta tesis doctoral se han empleado diferentes tipos de NPs, centrándonos en su uso como sistemas de administración de fármacos. En esta

sección se describen los protocolos seguidos para la síntesis y caracterización de las NPs, así como para la encapsulación de quimioterapia y liberación del fármaco elegido.

3.2.1. Reactivos

Tetraetil ortosilicato (TEOS 98%; Sigma-Aldrich, ref.333859-25ML), solución de hidróxido de amonio (25% v/v, Merck KGA, ref.1.05428.0500), etanol puro (EtOH; Panreac, ref.141086.1212), agua Milli-Q, hidróxido de sodio (NaOH), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), dihidrógeno fosfato de potasio (NaH_2PO_4 ; Panreac, ref. 121512), glicerol (Panreac, ref. A1123,1000), doxorubicina (DOX; Adoq Bioesciences, ref. A14403), ácido clorhídrico (HCl), dimetilsulfóxido (DMSO; Fisher Scientific).

3.2.2. Tipos de nanopartículas empleadas

3.2.2.1. *Nanopartículas de poliestireno*

Las NPs de poliestireno (NPs de PS) fueron empleadas como prueba de concepto en la funcionalización electrostática con las proteínas recombinantes y en experimentos de internalización en cultivos celulares. Para ello se usaron NPs comerciales: NPs de PS de 500 nm rojas fluorescentes ($\lambda_{\text{ex}} \sim 575$ nm; $\lambda_{\text{em}} \sim 610$ nm) con superficie modificada con grupos carboxilo (Sigma Aldrich, Ref.L3280). El potencial ζ de estas NPs es de -50.1 ± 1.2 , y el índice de polidispersión (IP) de 0.08 ± 0.02 .

3.2.2.2. *Nanopartículas de sílice*

En esta tesis hemos centrado la atención en el uso de NPs de sílice coloidal amorfa, en particular, NPs de sílice mesoporosas (MSNPs) y NPs de sílice compacta. Este tipo de NPs son sintetizadas en condiciones básicas (pH 7-10) por mecanismos de nucleación y crecimiento que implican el ataque nucleofílico de un grupo silanol desprotonado hacia un grupo silicato neutro [129]. El punto isoeléctrico de la sílice amorfa se encuentra alrededor de 3, por lo que las partículas en crecimiento se encuentran negativamente cargadas a pH 7-10 y son estables en agua frente a la agregación por repulsión electrostática [129].

Nanopartículas de sílice mesoporosa

En la síntesis de MSNPs, los precursores de sílice solubles se hidrolizan primero y se combinan con las cabezas anfífilas de surfactantes, ya sea mediante fuerzas electrostáticas o interacciones mediante puentes de hidrógeno. De esta manera, se ensamblan en mesofases líquido cristalinas bajo condiciones básicas, ácidas o neutras. La transformación de las mesofases ocurre durante la hidrólisis y la condensación de las especies de sílice. Al eliminar los surfactantes mediante extracción de solvente o tratamiento por calor (calcinación), se crea una réplica de sílice amorfa de la mesofase compuesta por poros continuos y del mismo tamaño [129,130].

Se llevó a cabo la síntesis de MSNs de diámetro aproximado de 100 nm siguiendo un protocolo estándar. Brevemente, se disolvieron 0,4556 g del surfactante CTAB en 10 ml de agua MilliQ y se añadieron 15 ml de glicerol. La mezcla se añadió a 100 ml de una solución neutra (NaOH 0,029 M, KH_2PO_4 0,0504 M, pH 7,4). La mezcla se mantuvo en agitación magnética y se calentó hasta que alcanzó los 95°C. Entonces, se añadieron 2,235 ml de TEOS. La reacción se mantuvo durante 8 horas a 95°C. Para eliminar el exceso de reactivos, las partículas resultantes se sometieron a 3 ciclos de centrifugación-dispersión con etanol puro (20 minutos, 11.000 rpm). Por otro lado, para eliminar el surfactante, se realizó un proceso de extracción de solvente con un gradiente de HCl/EtOH. Este protocolo de síntesis se encuentra recogido en la Figura MM.4.

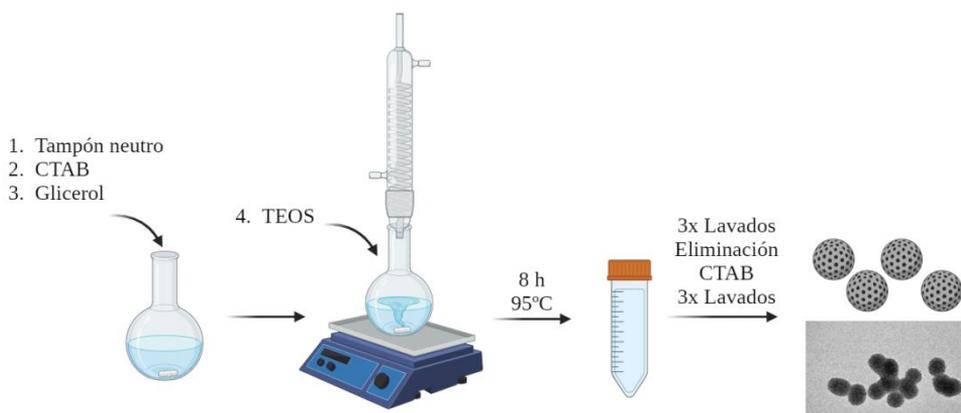


Figura MM. 4. Esquema explicativo del protocolo general para la síntesis de las MSNPs de 100 nm.

Además del uso de MSNPs de 100 nm, en este estudio se han empleado MSNPs de 300 nm sintetizadas por la Dra. Laura Marín Caba en el laboratorio del Dr. Miguel Correa de la Universidad de Vigo.

Para el uso de las MSNPs de 100nm como agentes de administración de fármacos, se encapsuló el fármaco quimioterápico DOX. Brevemente, 10 mg de MSNPs se dispersaron en 4 ml de H₂O MilliQ con un 5% de DMSO, y la DOX se añadió a una concentración final de 0,5 mg/ml. La mezcla se mantuvo en agitación magnética durante 24 horas a temperatura ambiente en oscuridad. El exceso de fármaco fue eliminado mediante 2 ciclos de centrifugación-dispersión en H₂O MilliQ con 5% de DMSO. Las partículas resultantes (DOX@MSNPs) se secaron para su almacenamiento a largo plazo. Los sobrenadantes de las centrifugaciones se guardaron para determinar la intensidad de fluorescencia de estos y así poder determinar la eficiencia de encapsulación del fármaco.

Nanopartículas de sílice compacta

Las NPs de sílice compacta son NPs esféricas que pueden ser preparadas mediante el método modificado de Stöber. Durante esta tesis se han empleado partículas de sílice compacta que tienen encapsulado en su interior un oligonucleótido fluorescente (FdU₁₀-Cy5), formado por 10 unidades de floxuridina, que interfiere con la división celular. Estas NPs fueron sintetizadas por el investigador predoctoral Andrés Ramos Valle en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo de Química de Ácidos Nucleicos del Instituto de Química Avanzada de Cataluña.

3.2.3. Técnicas de caracterización de nanopartículas

A medida que se desarrollan nuevos materiales, es necesario garantizar la disponibilidad de información sobre los peligros asociados y la seguridad de estos con el fin de mantener la implementación responsable de esta ciencia. Se ha conseguido llevar a cabo de manera satisfactoria la estandarización en la caracterización de las propiedades fisicoquímicas incluyendo el tamaño, la forma, la química de superficie, el ratio de disolución, interacción con ambientes biológicos y estado de agregación entre otros. Es de suma importancia seguir aproximaciones rigurosas y prácticas para la caracterización de estos nanomateriales para garantizar su seguridad y así poder desarrollar terapias basadas en la nanomedicina [131–133].

3.2.3.1. *Tamaño, carga superficial y forma*

A continuación, se describen las principales técnicas para determinar el tamaño, la forma y la carga superficial de las NPs.

Dispersión de luz dinámica

La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*) es una de las modalidades más populares para caracterizar la distribución de tamaños de pequeñas partículas en solución o suspensión empleando luz monocromática como fuente. El DLS monitoriza las fluctuaciones temporales de la intensidad de dispersión elástica de la luz inducida por los movimientos brownianos de las partículas a un ángulo de dispersión fijo. El tamaño de partícula puede calcularse mediante el uso de la ecuación de Stokes-Einstein [131,134].

La principal ventaja del DLS es que se trata de una técnica no destructiva, además de ser rápida y eficiente en determinar el tamaño hidrodinámico de muestras monodispersas en un alto rango de concentraciones. Sin embargo, cuando las muestras se encuentran agregadas, es complicado correlacionar las fracciones de tamaño. Además, la utilidad del DLS queda limitada cuando las partículas no muestran distribuciones homogéneas. La intensidad de la luz dispersada es proporcional a la sexta potencia del diámetro de las partículas, por lo que la presencia de pocas partículas de gran tamaño dará lecturas confusas. Finalmente, el DLS no se puede usar para materiales no esféricos ya que la naturaleza esférica de las partículas se asume en el análisis [131].

Para la medición de la distribución de tamaños en las NPs usadas en esta tesis, se usó el instrumento Zetasizer Ultra de la compañía Malvern Panalytical. Normalmente, se preparaban muestras que contenían entre 15-30 μg de NPs en 1 ml de solvente (H_2O MilliQ o PBS 1X) en una cubeta de plástico. Antes de la medición, la muestra se sonicaba durante aproximadamente 15 segundos. La medición se realiza por triplicado. Además, con este equipo se midió con este equipo el IP que informa acerca de la homogeneidad de los tamaños de las NPs en suspensión y tiene un valor entre 0 y 1. Cuanto más cercano a 0 es el valor de PI, mayor es la homogeneidad de la muestra.

Microscopía de transmisión electrónica

La microscopía de transmisión electrónica (TEM del inglés *Transmission Electron Microscopy*) es una de las técnicas más empleadas para la

caracterización de nanomateriales ya que nos da imágenes directas e información química a resoluciones espaciales a nivel atómico. En esta técnica, un haz de electrones incidente se transmite a través de una muestra fina interaccionando con ella. Los electrones que han interaccionado con la muestra se pueden transformar en electrones no dispersos, elásticamente dispersos o inelásticamente dispersos. Los electrones dispersos o no dispersos se enfocan mediante lentes electromagnéticas y luego se proyectan en una pantalla para generar una imagen de oscuridad variable, según la densidad de los electrones no dispersos. Mediante esta técnica se puede conocer el tamaño, forma, heterogeneidad y grado de agregación de los nanomateriales [131].

Para medir las partículas mediante TEM, normalmente se realizaron diluciones 1/500 de las partículas de partida, que fueron dispersadas en etanol. Tras su sonicación, se añadieron 7 μl de la mezcla sobre rejillas cobre con recubrimiento de carbono de malla 400 (EM Resolutions). El instrumento utilizado fue un microscopio JEOL JEM 1011 equipado con una cámara digital Gatan de alta resolución disponible en los servicios Tecnológicos de IDIVAL.

Potencial ζ

Cuando las partículas son expuestas a una solución iónica, la superficie de una partícula cargada se une a los iones de carga opuesta fuertemente asociados, formando una capa líquida llamada capa de Stern. Esta capa es rodeada por otra capa externa difusa compuesta por iones débilmente asociados. Estas dos capas forman lo que se denomina la doble capa eléctrica. Debido a las fuerzas brownianas de las partículas cargadas, cuando la partícula se mueve en el líquido, la doble capa eléctrica se mueve con ella a lo largo de lo que se conoce como plano de deslizamiento (interfaz entre la doble capa eléctrica y el líquido circundante). El potencial eléctrico del plano de deslizamiento se conoce como potencial zeta (potencial ζ) o potencial electrocinético. Se determina midiendo la velocidad de las especies cargadas hacia el electrodo en presencia de un campo eléctrico externo a través de la muestra en solución. NPs con un potencial ζ entre ± 30 mV se consideran coloidalmente estables. Valores absolutos menores de 30 mV indican inestabilidad, y posibilidad de agregación, coagulación o floculación [131,135].

El potencial ζ se evalúa normalmente por electroforesis de luz dispersada, donde se hace pasar un campo eléctrico débil a través de una solución diluida de NPs y la luz dispersada se observa para un cambio de frecuencia que se usa para calcular la movilidad electroforética. Esta técnica se emplea normalmente junto con el

DLS. Se trata de una técnica sensible a cambios de pH y fuerza iónica. Por lo tanto, el potencial ζ no puede reflejar el valor real de una muestra concentrada y variará con el cambio de solvente [131,134].

En esta tesis, el potencial ζ fue medido con el instrumento Zetasizer Ultra empleando la cubeta especial de potencial ζ . Generalmente, se preparaba una solución con 15-30 μg de NPs en 1 ml del dispersante (PBS 1X o H₂O MilliQ). La medición se realiza por triplicado.

3.2.3.2. *Tamaño de poro y área superficial*

El tamaño de poro y área superficial de las MSNPs fue determinado mediante el método de adsorción de nitrógeno. La isoterma de adsorción de nitrógeno (N₂) fue determinada a una temperatura de 77 K en un sistema Micromeritics ASAP 2010 con un sistema de microporo, después de desgasificar las muestras a 100 °C durante al menos 16 horas. La distribución del tamaño de los mesoporos se calculó utilizando la rama de adsorción de la isoterma de adsorción de nitrógeno y el enfoque de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) [136]. Estas medidas fueron llevadas a cabo por la Dra. Lorena González Legarreta del grupo de Nanomedicina IDIVAL-UC.

3.2.3.3. *Caracterización de las MSNPs sintetizadas*

Las MSNPs empleadas para la encapsulación de la DOX fueron caracterizadas mediante DLS y TEM. El análisis de las MSNPs resultantes mediante imágenes de TEM reveló que se trataba de NPs con forma esférica y con un diámetro medio de $112,6 \pm 12,2$ nm.

En la Figura MM.5 se muestran las imágenes de TEM de dichas partículas junto con su distribución de tamaños medidos por TEM.

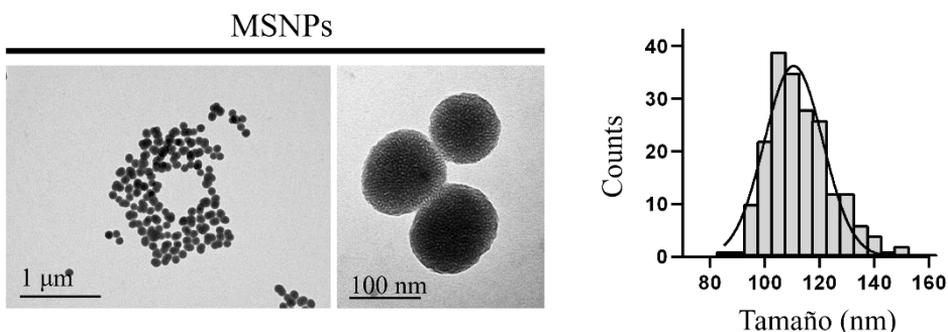


Figura MM.5. Caracterización de MSNPs de 100 nm mediante TEM. Imágenes representativas de TEM de las partículas sintetizadas y distribución de tamaño de las partículas caracterizado mediante TEM ($n = 200$).

Este análisis fue acompañado por la caracterización mediante DLS, donde el radio hidrodinámico medio fue determinado en $317,8 \pm 5,5$ nm, con un IP de 0,29 y un potencial ζ medido en H₂O MilliQ de $-32 \pm 0,2$ mV y en PBS 1X de $-1,7 \pm 1,2$ mV. En este caso, al tratarse de un índice de polidispersidad más alto, indica que las partículas no son perfectamente monodispersas, y por ello el radio hidrodinámico determinado mediante DLS es más grande que el diámetro real de las MSNPs. Por otro lado, mediante la isoterma de adsorción de N₂, se determinó la superficie específica de las MSNPs en 856 ± 6 m²/g y el tamaño de poro en 2,8 nm.

3.2.3.4. Eficiencia de encapsulación de fármacos en nanopartículas

Determinar la cantidad de fármaco que se ha encapsulado en el interior de los nanosistemas es esencial para poder llevar a cabo experimentos de liberación *in vitro* y posteriormente experimentos *in vivo*. Esto puede ser medido mediante métodos directos o indirectos. En el caso de los métodos directos, el fármaco encapsulado se mide directamente en el propio nanosistema. Sin embargo, en los métodos indirectos, el fármaco encapsulado es medido del sobrenadante resultante del proceso de encapsulación [135].

Existen dos parámetros importantes que van a determinar la cantidad de fármaco encapsulado: la eficiencia de encapsulación (EE, del inglés *encapsulation efficiency*) y el contenido de carga de fármacos (LC, del inglés *loading content*).

Ambos se expresan como porcentaje y se definen siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$LC (\%) = \frac{\text{Peso del fármaco en las NPs}}{\text{Peso de las NPs}} \times 100$$

$$EE (\%) = \frac{\text{Peso del fármaco en las NPs}}{\text{Peso del fármaco inicial}} \times 100$$

En esta tesis se han determinado ambos parámetros en el proceso de encapsulación de DOX en MSNPs mediante un método indirecto, usando la espectroscopía de fluorescencia o fluorimetría.

Espectroscopía de fluorescencia

Esta técnica analiza la fluorescencia presente en una muestra. Mediante esta técnica, los electrones de la muestra son excitados de su estado fundamental a su estado excitado empleando luz UV. Cuando vuelven a su estado fundamental emiten luz, pero no necesariamente luz visible. Si mantenemos la longitud de onda de excitación constante y medimos las diferentes frecuencias de la luz fluorescente emitida por una muestra empleando un monocromador, podemos obtener los espectros de emisión.

Mediante esta técnica se adquirieron los espectros de emisión de fluorescencia de los sobrenadantes del proceso de encapsulación de DOX en MSNPs. Para poder hallar la cantidad de DOX encapsulada, se obtuvieron los espectros de emisión de muestras de DOX con concentración conocida y preparadas en el medio de encapsulación (H₂O 5% DMSO). Se representó el área bajo la curva (AUC) de dichos espectros y se obtuvo la recta patrón (Figura MM.6). Conociendo la cantidad que quedaba en los sobrenadantes tras el proceso de encapsulación y la cantidad inicial del experimento, se pudo calcular el %EE y el %LC, que fueron determinados por triplicado en experimentos independientes.

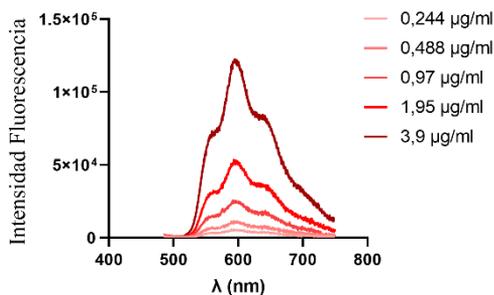
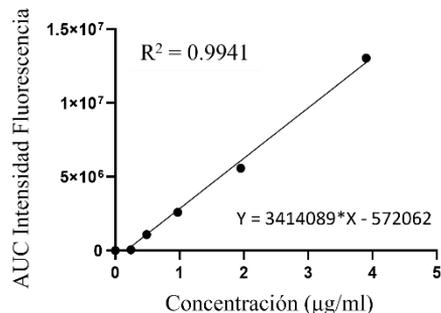
a**b**

Figura MM.6. (a) Espectros de fluorescencia de emisión de la DOX en H₂O 5% DMSO a distintas concentraciones. (b) Recta patrón de la DOX en medio de encapsulación. Para realizar la curva de calibrado, se halló el AUC de cada espectro y se representó frente a la concentración en µg/ml.

Se han empleado dos equipos: un espectrofluorímetro Edinburgh Instruments FLSP920, equipado con dos monocromadores (excitación y emisión), detectores para visible, extendido visible y InGaAs y una lámpara continua de Xenón de 450 W, y un espectrofluorímetro FS5 Edinburgh Instruments, equipado con monocromadores (excitación y emisión), un detector PMT para emisión (200-870 nm) y una lámpara continua de Xenón de 150 W. La longitud de onda de excitación para la DOX se mantuvo constante a 475 nm ($\lambda_{\text{Ex}} = 475\text{nm}$) y se recogieron los espectros de emisión fueron adquiridos desde los 450 a los 750 nm. Se contó con la ayuda del Dr. Rafael Valiente Barroso del grupo de Nanomedicina y la Dra. Virginia Martínez de la Universidad del País Vasco.

3.2.3.5. Estudio de la biocorona

El último aspecto sobre la caracterización de NPs abordado durante esta tesis doctoral ha sido el estudio de la biocorona. En este caso, se ha llevado a cabo la formación de una biocorona de proteínas recombinantes sobre la superficie de las NPs para dirigir las a tumores en modelos *in vivo*.

Funcionalización de nanopartículas con proteínas recombinantes

Para funcionalizar las NPs con las diferentes proteínas recombinantes, se ha seguido un protocolo puesto a punto previamente en nuestro laboratorio por las

doctoras Esperanza Padín y Elena Navarro. Esta funcionalización se basa en la interacción electrostática entre la superficie negativa de las NPs y la carga positiva de los residuos de histidina de las proteínas recombinantes. La secuencia de histidinas actúa como una cremallera electrostática con la superficie de las NPs, asegurando la correcta orientación de estas en la superficie para que puedan interactuar con los receptores diana [137] (Figura MM.7).

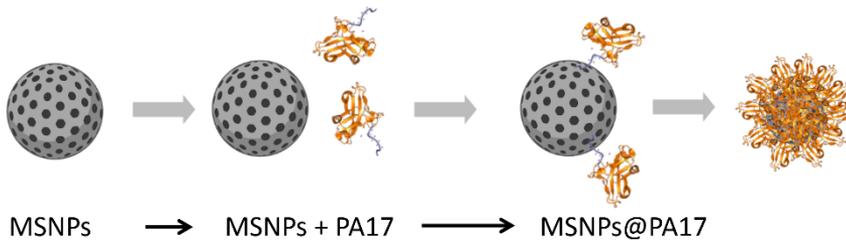


Figura MM. 7. Esquema general de la funcionalización electrostática de las MSNPs con proteínas recombinantes. Las proteínas permanecen unidas a la superficie cargada negativamente mediante interacciones electrostáticas. Ejemplo para la proteína recombinante 10xHis:PA17.

Para ello, los diferentes tipos de NPs fueron incubados con cantidades saturantes de las proteínas recombinantes purificadas en PBS 1X y sonicadas en baño durante 5 minutos. La temperatura del agua del baño se mantuvo a 4 °C durante el proceso. El exceso de proteína fue eliminado mediante 3 ciclos de centrifugación-dispersión con PBS 1X fresco. Para analizar la proteína unida en la superficie de las NPs, el sedimento lavado de NPs funcionalizadas fue resuspendido en LB 1X y analizado mediante SDS-PAGE.

En el caso de la proteína 10xHis:PA17, que es aquella con la que se han realizado la mayoría de los experimentos de esta tesis, se probaron diferentes ratios entre la masa de NPs empleada y la masa de proteína recombinante. De esta forma se pudo determinar la cantidad de proteína necesaria para lograr la saturación de la superficie de las MSNPs de 100 nm en los experimentos *in vivo*.

Estudios de estabilidad de la biocorona

Para evaluar la estabilidad de la biocorona formada mediante unión electrostática, 500 µg/ml de MSNPs@10xHis:PA17 de 300 nm o de NPs de PS@10xHis:PA17 de 500 nm, fueron incubados en presencia de FBS al 30% en PBS 1X pH 7,4. La suspensión de NPs se mantuvo a 37 °C en agitación y se tomaron muestras a los

30 minutos, 2 horas, 4 horas y 24 horas de incubación. Las NPs se lavaron 3 veces con PBS 1X antes de ser preparadas para análisis mediante SDS-PAGE. Este experimento se llevó a cabo 3 veces de manera independiente.

3.2.4. Ensayos de liberación de fármaco *in vitro*

Los ensayos de liberación de fármaco *in vitro* nos permiten estudiar el comportamiento de las NPs en una solución que simula las condiciones fisiológicas. Se estudió la liberación de DOX de partículas DOX@MSNPs de 100 nm, tanto desnudas como recubiertas con la proteína recombinante 10xHis:PA17, ya que esta biocorona podría afectar a la cinética liberación del fármaco. Brevemente, 1 mg de NPs fue dispersado en 1 ml de solvente, en este caso PBS 1X (pH 7,4). La suspensión de partículas se mantuvo en agitación magnética a 37°C en frascos de cristal. Se tomaron muestras a las 2, 4, 6, 24 y 48 horas. Para ello, se centrifugó el volumen total del frasco a 11.000 rpm durante 5 minutos; el sobrenadante se almacenó, mientras que el sedimento fue resuspendido en el mismo volumen de PBS 1X fresco y devuelto al frasco.

Para cuantificar la cantidad de DOX liberada de cada muestra, se obtuvieron los espectros de emisión por fluorimetría de los sobrenadantes a cada tiempo, por triplicado, que fueron comparados con los datos de una curva de calibrado de DOX en PBS 1X. Para la obtención de dicha recta se llevó a cabo el mismo procedimiento que para obtener la recta patrón de encapsulación y se encuentra representada en la Figura MM.8.

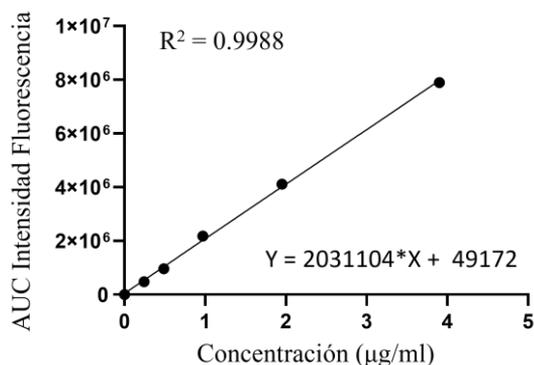


Figura MM.8. Recta patrón de la DOX en medio fisiológico. Para el cálculo de dicha recta se midieron los espectros de 5 muestras de DOX de concentración conocida y se integró su área bajo la curva (AUC). Se representó frente a la concentración en µg/ml.

3.2.5. Disolución de MSNPs *in vitro*

Para estudiar la disolución de las MSNPs sintetizadas bajo condiciones fisiológicas y así poder comprender su comportamiento en los modelos *in vitro* e *in vivo*, DOX@MSNPs de 100 nm fueron incubadas en PBS 1X pH 7,4 a una concentración final de 1 mg/ml a 37 °C y agitación magnética. Se tomaron muestras a 2, 4 y 24 horas. Para ello, el volumen total se centrifugó a 11.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento fue resuspendido en H₂O MilliQ, de donde se tomaron 7 µl para poner sobre una rejilla de cobre con recubrimiento de carbón. La disolución del núcleo de las partículas fue confirmada mediante TEM. Se llevó a cabo el mismo experimento, pero con DOX@MSNPs recubiertas con la proteína recombinante 10xHis:PA17 para evaluar si la formación de una biocorona afectaba al mecanismo de disolución de las partículas. Los resultados también se analizaron mediante TEM.

3.3. Ensayos *in cellulo*

Se emplearon experimentos *in cellulo* con diferentes líneas celulares para estudiar el comportamiento de las NPs en condiciones fisiológicas, incluida la liberación de fármacos y la citotoxicidad. Además, se llevaron a cabo experimentos para evaluar la interacción de las proteínas recombinantes con el receptor TEM8. Esta sección describe todas las líneas celulares utilizadas, así como los protocolos empleados.

3.3.1. Reactivos

Gentamicina (Gibco, ref. 15240-062), Tripsina-EDTA 0.5% (10X) (Gibco, ref.15400-054), Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher, ref. 11668027), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Thermo Fisher, ref. M6494), anticuerpo recombinante Anti-TEM8/ATR (Abcam, ref. ab241067), anti-conejo Cy3, 2-propanol (Sigma-Aldrich, ref. I9516-500ML), ácido clorhídrico (HCl), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, ref.D9542-10MG), anti-conejo Cy3, anti-VEGFR1 anticuerpo policlonal (Invitrogen, ref. PA5-32408), anticuerpo anti-GB3 (BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human CD77), paraformaldehído 16%, (PFA 16%; Thermo Fisher, ref.043368.9M), medio de montaje Immu-Mount™

(ref.9990402), fluoresceína isotiocianato (FITC; Sigma-Aldrich, ref.F7250-250MG), Tween-20, DOX (Adoq Bioesciences, ref.A14403).

3.3.2. Medios de cultivo y soluciones

Los medios de cultivo y soluciones empleados para mantener las distintas líneas celulares se detallan a continuación.

- IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Pan Biotech, ref.P04-20350).
- MEM: Eagle's Minimal Essential Medium, Pan Biotech, ref.P04-08500.
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 + GlutaMAX™, Gibco, ref.61870-010.

* Todos los medios de cultivo se completaron con gentamicina 10 µg/ml y FBS al 10%.

- HBSS: Hanks' balanced salt solution, Pan Biotech, ref.P04-34500.
- Tampón Fosfato Salino (PBS) 1X en H₂O MilliQ autoclavada.
- Tripsina 0.05% (1X) en HBSS 1X.
- PFA 4% en PBS 1X (para 1 ml: 250 µl PFA 16%, 100 µl PBS 10X, 650 µl H₂O MilliQ autoclavada).

3.3.3. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado diferentes líneas celulares (Tabla MM.5). Todas las líneas celulares se cultivaron a 37 °C en condiciones de 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las células se pasaron cada 3-4 días cuando la confluencia alcanzaba aproximadamente un 95%.

Tabla MM. 5. Detalles de las líneas celulares empleadas incluyendo nombre, especie, tipo de tumor, medio de cultivo y referencia.

Línea celular	Especie y origen	Medio	Tripsina	Código
HeLa	<i>Homo sapiens</i> Adenocarcinoma cérvico uterino	MEM	Sí	ATCC-CCL-2™
HEK293T	<i>Homo Sapiens</i> Riñón embrionarias	IMDM	No	ATCC-CRL- 3216™
B16F10	<i>Mus musculus</i> Melanoma de piel	IMDM	No	ATCC-CRL- 6475™
B16F10 RFP	<i>Mus musculus</i> Melanoma de piel	RPMI	Sí	Innoprot P20321
MCF-7	<i>Homo sapiens</i> Adenocarcinoma de mama	MEM	Sí	ATCC-HTB-22

3.3.4. Técnicas de análisis de cultivos celulares

Para la evaluación de los resultados de los experimentos con líneas celulares, se han empleado principalmente dos técnicas: la microscopía confocal y la citometría de flujo.

Microscopía Confocal

La microscopía confocal es una forma especializada de la microscopía de fluorescencia estándar que genera imágenes de alta resolución de muestras teñidas con sondas fluorescentes. El principio básico de esta técnica se basa en iluminar un punto de la muestra determinado mediante luz láser a una profundidad específica. Esto conlleva a la emisión de fluorescencia exactamente en este punto concreto. Para eliminar la señal de la luz fluorescente que se encuentra fuera de foco, se coloca una pieza denominada *pinhole*, que actúa a modo de filtro espacial. De esta manera, solamente la luz que procede de la región enfocada puede entrar en los detectores, obteniendo lo que se conoce como plano focal. Esta microscopía consigue obtener imágenes de alta resolución, nitidez y contraste en un único plano focal de la muestra. Tras obtener varios planos focales a lo largo del eje Z, se puede generar una imagen 3D de la muestra [138,139].

El microscopio confocal que se ha utilizado es un Nikon A1R equipado con 5 láseres de longitudes de onda: 405, 488, 514, 561, 633 nm, y con dos sistemas de

detección: por filtros en cuatro canales y espectral de 32 canales con tres redes de difracción diferentes, situado en la unidad de Microscopía de IDIVAL. Se emplearon los objetivos de distintos aumentos y aperturas numéricas (NA): 10x (0,45 NA), 20x (0,75 NA), 60x (1,4 NA), y 100x (1,49 NA), algunos de ellos (40x, 60x y 100x) de inmersión.

Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite el rápido análisis de células individuales o partículas mientras pasan a través de un flujo donde son excitadas mediante el uso de láseres. Para cada partícula, se analiza la dispersión de luz visible y uno o más parámetros de fluorescencia. La dispersión de luz visible se mide en dos direcciones: dirección frontal (FSC, del inglés *Forward Scatter*) que nos da una idea sobre el tamaño relativo de la partícula; y la dirección a 90° (SSC, del inglés *Side Scatter*), que indica la complejidad interna o la granulosidad. Las muestras para citometría se preparan por ejemplo mediante la transfección de proteínas fluorescentes, la tinción mediante sondas fluorescentes o la tinción mediante anticuerpos conjugados [140]. Incluso, en nuestro caso, se preparan para analizar la internalización de NPs fluorescentes.

Durante esta tesis se han utilizado dos citómetros. El primero, un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter) equipado con 3 láseres (405 nm, 488 nm y 638 nm) y 13 detectores de fluorescencia. El segundo fue un separador celular de sobremesa CytoFLEX SRT (Beckman Coulter) equipado con 4 láseres (405 nm, 488 nm, 561 nm y 638 nm) y 15 detectores de fluorescencia. Ambos se encuentran situados en la unidad de Citometría de Flujo y Separación Celular de IDIVAL.

3.3.5. Modelo de sobreexpresión de TEM8 *in cellulo*

El modelo de sobreexpresión *in vitro* de TEM8 se obtuvo transfectando la línea celular HEK293T con el plásmido que contiene la secuencia TEM8-EGFP. Para ello, se sembraron células HEK293T en placas y se dejaron crecer durante la noche para que alcanzasen una confluencia de aproximadamente el 70%. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con el plásmido utilizando Lipofectamina 2000, siguiendo las especificaciones del fabricante. Como control de transfección, se transfectó la misma línea celular, pero con un ADNp que contiene la secuencia para la proteína control EGFP. Para cada muestra de transfección, se prepararon los complejos ADN-Lipofectamina de la siguiente manera:

- Se incubó la Lipofectamina 2000 en medio de dilución sin FBS y sin antibióticos durante 5 min a temperatura ambiente.
- Se mezcló el ADN en medio de dilución sin FBS y sin antibióticos.
- Tras la incubación de los 5 min, se combinó el ADN diluido con la Lipofectamina diluida y se dejó incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
- Finalmente se añadieron los complejos ADN-Lipofectamina a cada pocillo o placa y se incubó con las células durante 4-6 horas a 37 °C. Tras ese tiempo, se cambió el medio por medio completo y se analizó la transfección al día siguiente.

Las condiciones de transfección se encuentran recogidas en la Tabla MM.6.

Tabla MM. 6. Condiciones de transfección de la línea celular HEK293T mediante el uso de Lipofectamina 2000.

Tipo de placa	Volumen Dilución	Volumen Final	ADN	Volumen Lipofectamina
24 pocillos	2 x 50 µl	0.5 ml	0.8 µg	1 µl
6 pocillos	2 x 250 µl	2 ml	4 µg	5 µl
60 mm	2 x 0.5 ml	5 ml	8 µg	10 µl
10 cm	2 x 1.5 ml	15 ml	24 µg	30 µl

La transfección de ambas construcciones se comprobó mediante microscopía de fluorescencia. Además, la transfección de la construcción TEM8-EGFP se comprobó mediante citometría de flujo después de 24, 48 y 72 horas para determinar el porcentaje de transfección y la intensidad media de fluorescencia.

3.3.5.1. Inmunodetección de TEM8 en membrana

Para comprobar la expresión del receptor TEM8 en la membrana de las células transfectadas con el gen de la proteína TEM8-EGFP recombinante, se llevó a cabo una inmunofluorescencia (IF) en célula viva del dominio extracelular de TEM8 empleando anticuerpos comerciales frente a este fragmento. Se sembraron células HEK293T trasfectadas sobre cubreobjetos redondos y se dejaron crecer durante toda la noche. Una vez la confluencia sobre los cubreobjetos fue adecuada, se incubaron con el anticuerpo primario anti-TEM8-ED durante 30 minutos a 37 °C en medio de cultivo completo. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se fijaron con PFA 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Después de 3 lavados con PBS 1X, los cubreobjetos fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo-Cy3 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron los cubres 3 veces con PBS 1X y se tiñeron los núcleos celulares con DAPI diluido durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar los cubres con PBS 1X y H₂O MilliQ, se montaron sobre portaobjetos empleando medio de montaje acuoso. Los cubreobjetos fueron analizados mediante microscopía confocal. Los detalles sobre los reactivos empleados en este protocolo se encuentran recogidos en la Tabla MM.7.

Tabla MM. 7. Detalles de los anticuerpos y reactivos empleados en la IF de TEM8 en membrana. RT = room temperature. ED = dominio extracelular.

Reactivo	Especie	Medio dilución	Dilución	Incubación	Longitud Onda
IgG anti-TEM8-ED	Conejo	Medio completo	1/250	1h 37°C	---
IgG anti-conejo-Cy3	Cabra	PBS 1X	1/1000	45 min RT	$\lambda_{Ex} = 555 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 569 \text{ nm}$
DAPI	---	PBS 1X	1/4000	3 min RT	$\lambda_{Ex} = 359 \text{ nm}$ $\lambda_{Em} = 457 \text{ nm}$

3.3.6. Experimentos de interacción de proteínas ligando con TEM8 *in vitro*

Para corroborar que las proteínas ligando sobreexpresadas y obtenidas de bacterias eran funcionales, se llevaron a cabo experimentos de interacción con el receptor TEM8. Para ello se emplearon las células HEK293T transfectadas, que sobreexpresan la proteína TEM8-EGFP en su membrana. Se estudió la interacción con proteína libre y con NPs funcionalizadas.

3.3.6.1. Experimentos con proteína libre

Se realizó un ensayo basado en los protocolos de *immunopanning*. Se trata de una técnica que nos permite seleccionar subpoblaciones celulares de interés utilizando la afinidad de los antígenos presentes en su membrana anticuerpos inmovilizados sobre una placa [141]. Para inmovilizar las proteínas ligando marcadas con secuencias 10xHis, se utilizaron placas de 96 pocillos recubiertos de níquel (Ni²⁺)

(Pierce™, Thermo Fisher Scientific). De esta manera, las proteínas quedan correctamente posicionadas para poder interactuar con su diana, en este caso, la proteína TEM8-EGFP presente en la membrana celular. Se incubó un total de 9 pmol de proteína recombinante en cada pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Los grupos experimentales consistieron en pocillos recubiertos con las proteínas ligando 10xHis:PA16, 10xHis:PA17 y 10xHis:PA64. Como controles negativos, se utilizaron pocillos sin proteína o recubiertos con una proteína control (HTPG:10xHis) que no se une a TEM8. Después de 3 lavados con PBS Tween-20 al 0,05%, se incubaron 50.000 células HEK293T transfectadas con TEM8-EGFP por cada pocillo en DMEM durante 1 hora en agitación. Las células no unidas se eliminaron mediante tres lavados con PBS 1X. Además, se emplearon 2 controles celulares negativos, con los cuales se llevó a cabo el mismo experimento: células HEK293T no transfectadas y células HEK293T transfectadas la construcción control EGFP.

La afinidad de unión se obtuvo como la cuantificación de la fluorescencia verde de cada pocillo medida utilizando un lector de microplacas Biotek Synergy HTX. Las longitudes de onda seleccionadas para detectar la EGFP fueron: $\lambda_{Ex} = 485/20$ nm, $\lambda_{Em} = 528/20$ nm. Después de esta medición inicial, las células adheridas a cada pocillo se separaron usando tripsina al 0,05% y se contaron mediante citometría de flujo.

3.3.6.2. Experimentos con NPs funcionalizadas

Células HEK293T transfectadas con la construcción TEM8-EGFP fueron incubadas con NPs de PS de 500 nm fluorescentes rojas, tanto funcionalizadas con la proteína ligando 10xHis:PA17, como sin funcionalizar (5 μ g/ml en medio completo). La interacción de las NPs con las células tras 30 minutos, 2 y 5 horas, fue analizada por citometría de flujo mediante el parámetro de intensidad media de fluorescencia de las poblaciones celulares. Es importante resaltar que, en el caso de los experimentos en HEK293T transfectadas, como el porcentaje de transfección no es del 100%, las células que no expresan TEM8-EGFP en membrana pueden considerarse un control negativo celular intrínseco en el experimento. Las partículas funcionalizadas deberían interactuar preferentemente con las células que expresan en membrana la proteína TEM8-EGFP frente a las que no, debido a la interacción específica entre ligando y receptor.

3.3.7. Liberación de doxorrubicina encapsulada en cultivos celulares

Para estudiar la liberación de la DOX desde las DOX@MSNPs y las DOX@MSNPs@PA17 en cultivos celulares, se empleó la línea celular de melanoma murino B16F10. Se sembraron células en cubreobjetos redondos y se dejaron crecer toda la noche. Al día siguiente, se añadieron las NPs a una concentración de 50 µg/ml, equivalente a una concentración final de DOX de 1 µg/ml. Se evaluó la liberación del fármaco a las 24 y 72 horas de tratamiento mediante microscopía confocal. A cada tiempo de análisis, los cubreobjetos se fijaron con PFA 4% y se tiñeron con una solución de FITC (1/1000) y DAPI (1/4000), ambas en PBS 1X. Finalmente los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos para el análisis y analizados mediante microscopía confocal.

3.3.8. Análisis de los cambios morfológicos celulares inducidos por doxorrubicina

Para el estudio de los cambios morfológicos celulares inducidos por la DOX encapsulada frente al fármaco libre, $3,5 \times 10^4$ células de melanoma murino fueron sembradas en placas de 24 pocillos y al día siguiente se añadieron los siguientes tratamientos:

1. Células B16F10 tratadas con DOX libre a 1 µg/ml o a 0,3 µg/ml, que simula la DOX liberada de las NPs.
2. Células B16F10 tratadas con DOX@MSNPs o DOX@MSNPs@10xHis:PA17. La concentración se estableció en 50 µg/ml, equivalente a una concentración final de DOX de 1 µg/ml.

Se analizó el efecto de los tratamientos a las 24, 48 y 72 horas. Para una rápida observación de la morfología celular, se empleó la microscopía de campo claro. Además, se determinó el diámetro celular, en comparación con partículas de referencia, mediante citometría de flujo. Para ello, a cada tiempo de análisis, se despegaron las células y se fijaron con PFA 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió PBS 1X y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis.

3.3.9. Ensayos de viabilidad celular

Para estudiar el efecto citotóxico de las partículas cargadas con el fármaco DOX frente al fármaco libre, se llevaron a cabo estudios de viabilidad celular *in vitro* mediante ensayos MTT. Se trata de un ensayo colorimétrico que permite evaluar la actividad metabólica de las células mediante la evaluación de las enzimas oxidorreductasas dependientes de NADH, dando una idea de las células viables presentes. Las células metabólicamente activas convierten el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) soluble en agua en formazán, produciéndose un cambio de color de morado a amarillo. A continuación, el formazán se solubiliza, y su concentración se determina mediante la lectura de absorbancia a en un lector de placas.

Los estudios se llevaron a cabo en la línea celular de melanoma murino. Para ello, se sembraron 7×10^3 células en placas de 96 pocillos con un volumen final del medio correspondiente de 100 μ l y se dejaron crecer durante toda la noche. Al día siguiente, se añadieron los tratamientos descritos en el apartado 3.3.8. Se analizó el efecto de dichos tratamientos a 24, 48 y 72 horas, dejando las células crecer a 37°C con los tratamientos indicados. A cada tiempo, se reemplazaron los 100 μ l de medio por medio fresco y se añadieron 10 μ l de la solución de MTT preparada en PBS 1X a 5 mg/ml (12 mM). El MTT se dejó incubando con las células durante 4 h a 37°C y después, se procedió a solubilizar las sales de formazán con 100 μ l de solución de parada (*stop solution*, mezcla de HCl e isopropanol; para 500 ml añadir 480 ml de isopropanol y 20 ml de HCl 1N). Finalmente, se calculó el porcentaje de viabilidad celular mediante las lecturas de absorbancia a 570 nm de cada condición, comparando frente al control (células sin tratamiento).

Además, para cada tratamiento se evaluó la cantidad de células adheridas a los pocillos a las 24, 48 y 72 horas post tratamiento. El número de células, que representa la viabilidad celular, fue determinado mediante citometría de flujo.

3.3.10. Análisis del ciclo celular

El análisis del ciclo celular se lleva a cabo mediante la medición en el contenido en ADN de las células, teñido con sustancias intercalantes fluorescentes (DAPI, yoduro de propidio o similar) y analizado mediante citometría de flujo. Esto permite la determinación simultánea de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular. La cantidad de ADN se representa en forma de histograma, de

tal manera que aparecen diferenciadas las distintas poblaciones celulares según la fase del ciclo en la que se encuentren (Figura MM.9). Las células en fase G₂ y M, que ya han duplicado su ADN en fase en la fase S de síntesis, contienen el doble de ADN que las células al comienzo del ciclo (G₁ y G₀). En la fracción subG₀ de los histogramas se puede conocer el porcentaje de células apoptóticas, que es la población que aparece a la izquierda de la fase G₁/G₀. Además, mediante los histogramas se puede conocer el porcentaje de células apoptóticas, que es la población que aparece a la izquierda de la fase G₁/G₀ [142].

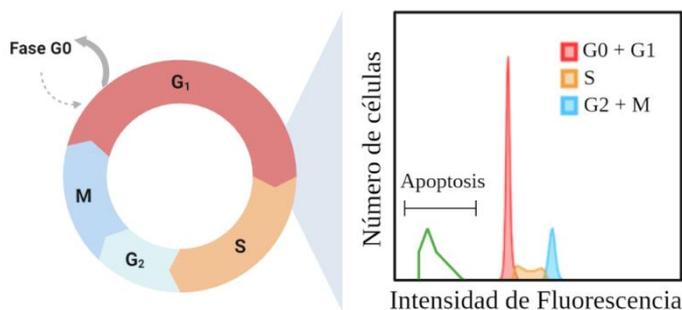


Figura MM. 9. Fases del ciclo celular y representación gráfica de su análisis mediante citometría de flujo.

Se llevó a cabo el estudio del ciclo celular en células de melanoma murino tratadas con DOX encapsulada y con fármaco libre. Para ello, se sembraron $3,5 \times 10^4$ células en placas de 24 pocillos y se dejaron crecer durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron los tratamientos descritos en el apartado 3.3.8. 24 horas post tratamiento, las células se despegaron y tras su lavado con HBSS 1X, se fijaron en EtOH 70% a -20 °C. Antes de su análisis mediante citometría de flujo, se incubaron con una solución de DAPI (1/500) en PBS 1X toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con PBS 1X antes de su análisis mediante citometría de flujo.

3.4. Experimentos *in vivo*

3.4.1. Modelos animales

Se realizaron experimentos *in vivo* con ratones utilizando las cepas de ratón C57BL/6 y CD1. Los ratones CD1 fueron adquiridos en el Servicio de Experimentación y Alojamiento Animal de la Universidad de Cantabria. Los ratones C57BL/6 fueron adquiridos de la compañía Janvier Labs. Todos los ratones se alojaron allí bajo el cuidado de personal autorizado.

Todos los experimentos fueron diseñados para minimizar el uso de animales. Los ratones se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas con la cantidad adecuada de comida y agua en el Servicio de Experimentación de la Universidad de Cantabria. Los animales fueron mantenidos, manipulados y escarificados siguiendo todas las directrices europeas (86/609/CEE), según la legislación española vigente (Real Decreto 1201/2005) y siguiendo todos los procedimientos aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria. Todos los experimentos se realizaron bajo los marcos legales y políticos y los permisos recibidos del proyecto PI-05-23.

3.4.2. Modelos de melanoma maligno murino

Durante esta tesis doctoral se han empleado 3 tipos de modelos de melanoma murino mediante el trasplante de células B16F10. A continuación se detallan.

3.4.2.1. *Melanoma subcutáneo en ratones CD1 neonatos*

El modelo de melanoma subcutáneo en ratones CD1 neonatos había sido puesto a punto previamente en nuestro laboratorio. Este modelo presenta numerosas ventajas entre las que se incluyen: se trata de un sistema en mamíferos donde no existe el rechazo por parte del sistema inmune; se produce el desarrollo de un órgano tumoral completo fácilmente evaluable debido al color negro; es reproducible; permite el testado de diferentes tratamientos terapéuticos (nanomedicinas) de aplicación intratumoral; es rápido, sencillo de desarrollar y barato [143]. Este modelo permite un rápido crecimiento tumoral debido a la

abundancia de factores de crecimiento en las crías de ratón. Debido a su corta edad, el sistema inmune de los ratones albinos no interfiere con este proceso. Además, este modelo proporciona suficientes animales tanto de control como de estudio dentro de una misma camada, lo que facilita la investigación.

Para desarrollar este modelo, se trasplantaron 1×10^5 células de melanoma murino de manera subcutánea en ratones neonatos CD1 a día post natal 2 (P.2) en un volumen total de 30 μ l de medio completo. Los tumores se dejaron crecer durante varios días hasta que una mancha negra visible aparecía en el cuello de los ratones. Se decidió que el día óptimo para la administración de tratamientos era a día 7 después del trasplante (P.9) de células.

3.4.2.2. *Melanoma subcutáneo en ratones C57BL/6 adultos*

El modelo de melanoma subcutáneo es ampliamente utilizado actualmente para la evaluación de terapias *in vivo* independientemente del sistema de direccionamiento. Tras el trasplante de las células de melanoma murino, se formará un tumor palpable en 5-10 días de progreso y llega alcanzar un tamaño de 1 x 1 x 1 cm en 14-21 días. Los tumores que se forman están altamente vascularizados, por lo que es un buen modelo para testar terapias administradas de manera intravenosa [144].

Para desarrollar este modelo se trasplantaron 2×10^5 células de melanoma murino de manera subcutánea en ratones hembra adultos C57BL/6 en un volumen total de 50 μ l de medio completo. Para estudiar cómo se desarrollaban los tumores, se sacrificaron ratones a diferentes tiempos y se analizó el peso de los tumores. Con esta información, se pudo determinar el tiempo óptimo para la administración de los tratamientos en experimentos posteriores.

3.4.2.3. *Carcinomatosis peritoneal*

El modelo de ratón que proponemos aquí se basa en un modelo de carcinomatosis peritoneal singenético derivado de células de melanoma murino. Este modelo ha sido bien descrito y estudiado en la literatura [145–148]. Para desarrollar el modelo, se trasplantaron directamente 6×10^4 células de melanoma murino en un volumen total de 100 μ l de medio completo en la cavidad peritoneal de ratones adultos C57BL/6 de 9 a 12 semanas de edad y se dejó que las células se

diseminaran por todo el peritoneo. Al cabo de 10 días, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se pudo apreciar perfectamente la formación de metástasis negras por toda la cavidad.

3.4.3. Características histopatológicas de los tumores en los modelos de melanoma desarrollados

Para evaluar las características histológicas de los tumores, se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina en secciones de parafina de los tumores extraídos de los animales. Una vez fijadas con formaldehído al 10%, los tumores se incluyeron en parafina después de la deshidratación en los siguientes pasos:

1. Etanol al 50% (1 x 1 hora) a temperatura ambiente.
2. Etanol al 70% (1 x 1 hora) a temperatura ambiente.
3. Etanol al 95% (1 x 1 hora) a temperatura ambiente.
4. Etanol 100% (2 x 30 minutos) temperatura ambiente.
5. Xilol (3 x 10 minutos) a temperatura ambiente.
6. Xilol parafina 1:2 (1 x 30 minutos) a 60°C.
7. Parafina (1 x 2 horas) a 60°C.
8. Parafina (2 x 1 hora) a 60°C.

Los bloques de parafina se almacenaron a temperatura ambiente. Antes de cortar los bloques en secciones de 5 μm , los bloques se enfriaron a -20°C. Las secciones se almacenaron a 4°C hasta que se realizaron los análisis histológicos. La tinción con hematoxilina-eosina se realizó en nuestro laboratorio siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se retiró el exceso de parafina mediante lavados con xilol (2 veces durante 20 minutos cada uno).
2. Las secciones fueron rehidratadas en etanol al 100% (2 veces durante 10 minutos cada uno), etanol al 96% (2 veces durante 10 minutos cada uno), etanol al 70% (1 vez durante 10 minutos), y etanol al 50% (1 vez durante 10 minutos).
3. Se eliminó el exceso de etanol mediante lavado con agua destilada (1 vez durante 10 minutos).
4. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina (1 vez durante 3 minutos).

5. Se eliminó el exceso de hematoxilina mediante lavados con agua destilada (2 veces durante 10 minutos cada uno).
6. Se procedió a un último lavado con agua del grifo (1 vez durante 15 minutos) para retirar más hematoxilina.
7. Se llevó a cabo la tinción con eosina (1 vez durante 30 segundos).
8. Las secciones fueron deshidratadas en etanol al 80% (1 vez durante 15 segundos), etanol al 96% (1 vez durante 30 segundos), etanol al 100% (2 veces durante 10 minutos cada uno), y xilol (2 veces durante 10 minutos cada uno).
9. Finalmente, se procedió al montaje de las secciones.

En el caso del melanoma subcutáneo, tras el trasplante de células de melanoma maligno murino, se esperaron 7 y 12 días para que se desarrollaran los tumores en el modelo de ratones CD1 o C57BL/6 respectivamente. En ese momento, se sacrificaron los ratones y los tumores se diseccionaron y procesaron para su estudio de las características histopatológicas mediante tinción hematoxilina-eosina. En la Figura MM.10 se muestran las secciones de los nódulos tumorales, constituidos por una masa celular densa, correspondiente a células del parénquima de melanoma. Estas células se encuentran bien organizadas y se entremezclan con otros tipos de células del microambiente tumoral (TME) como células de la neovasculatura. Se trata de órganos tumorales con un fenotipo típico de este tipo de cáncer.

Este examen anatomopatológico se llevó a cabo con la ayuda del doctor José Javier Gómez Román, jefe del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Valdecilla.

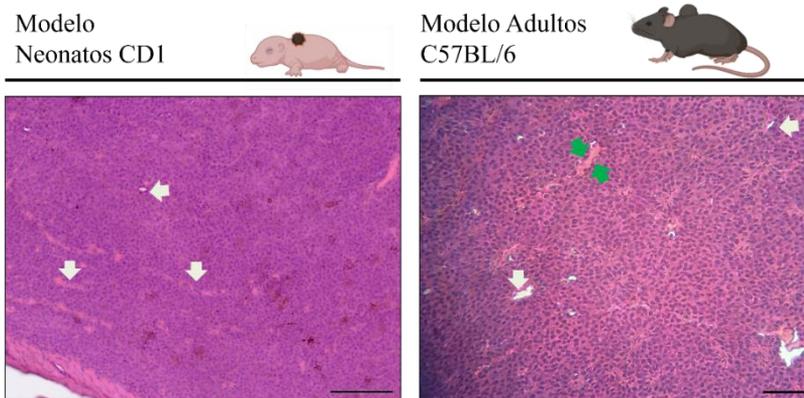


Figura MM. 10. Exámenes histopatológicos de los tumores de melanoma subcutáneos. Modelo neonatos CD1 izquierda, modelo adultos C57BL/6 derecha. Sección de hematoxilina-eosina de los tumores, que representan las características tumorales malignas típicas como la neovascularización (flechas blancas). Además, estas células que rodean los vasos sanguíneos cargados con eritrocitos pierden las conexiones intercelulares (acantolisis, flechas verdes). Barra de escala = 100 μ m.

Para el modelo de carcinomatosis peritoneal, tras el trasplante de células de melanoma maligno murino, se esperó 10 días para que se desarrollaran los tumores. En ese momento, se sacrificaron los ratones y los tumores se diseccionaron y estudiamos las características histológicas mediante tinción hematoxilina-eosina (Figura MM.11). En todos los casos analizados, se encontró una masa tumoral principal en la cavidad peritoneal, acompañada de pequeñas masas tumorales que se distribuían a lo largo del omento (Figura MM.11a), tal y como se describe en la bibliografía [146-148]. Éstas se encontraban adheridas a órganos como el bazo o el intestino. Este modelo recrea la carcinomatosis peritoneal en humanos: la masa tumoral principal podría corresponder con el tumor primario del que derivan células tumorales que se adhieren sobre el omento, y se correspondería con las metástasis. Se trata de tumores no penetrantes, es decir, las células tumorales no se encontraban infiltradas en los órganos de la cavidad peritoneal y altamente vascularizados (Figura MM.11b).

Este examen anatomopatológico se llevó a cabo con la ayuda del doctor Víctor Jacinto Ovejero, asociado al grupo de Nanomedicina IDIVAL-UC.

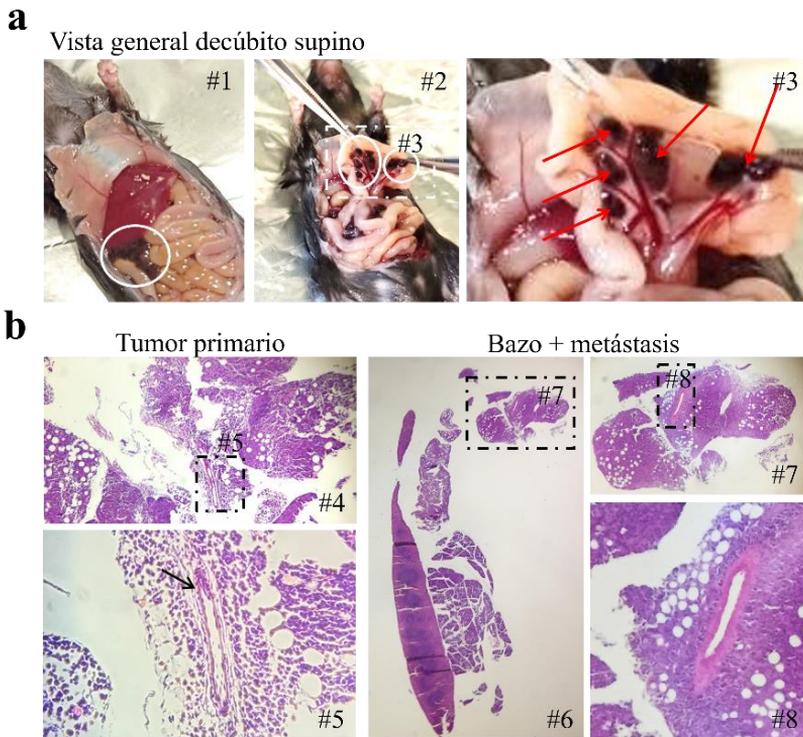


Figura MM.11. Desarrollo y características histopatológicas del modelo de melanoma maligno peritoneal. (a) Imágenes generales del tumor primario (#1) y de las metástasis (#2 y #3) desarrolladas en la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6 10 días post trasplante de células. (b) Imágenes representativas de tinción hematoxilina-eosina sobre secciones de parafina de 7 μ m de grosor de los tumores peritoneales. Tanto en el tumor primario como en las metástasis que crecen sobre el omento se puede observar el desarrollo de vasos sanguíneos, señalados con flechas negras.

3.4.4. Inmunodetección del receptor TEM8 en tumores de melanoma murino

Para corroborar la expresión de TEM8 en los modelos tumorales, se llevó a cabo una IF del dominio extracelular de TEM8 en tejido procedente de los tumores de melanoma fresco. El anticuerpo IgG anti-TEM8-ED y anti-conejo-Cy3 fueron empleados a la misma concentración que en su uso en líneas celulares, tal y como se describe en la Tabla MM.7. Previo análisis mediante microscopía confocal, se incubaron con una solución de DAPI (1/1000) para la tinción de los núcleos celulares.

3.4.5. Biodistribución de la proteína ligando PA17 en un modelo de melanoma murino subcutáneo

Para evaluar la especificidad de unión de la proteína ligando 10xHis:PA17 al TME, se llevó a cabo un estudio de su biodistribución a distintos tiempos. 10 días después del trasplante de células B16F10 de forma subcutánea en ratones adultos, se llevó a cabo la administración intravenosa de 30 μg la proteína ligando fluorescente 10xHis:mCherry-PA17 (volumen máximo 50 μl). Se sacrificaron 3 ratones a cada tiempo (15 minutos, 1, 2, 4 y 24 horas) y se analizó la biodistribución de la proteína mediante imágenes de fluorescencia adquiridas con el equipo IVIS® *Spectrum In vivo Imaging System*, situado en el animalario de la UC, de los distintos órganos (corazón, pulmones, hígado, bazo, intestino, riñones y vejiga) y tumores. Las longitudes de onda empleadas fueron $\lambda_{\text{Ex}} = 560 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{Em}} = 620 \text{ nm}$. La fluorescencia total acumulada en los tumores fue cuantificada mediante el software IVIS®. Se realizó el mismo estudio empleando la proteína control 10xHis:mCherry.

3.4.6. Tratamiento de modelos de melanoma murino subcutáneo

En esta tesis se ha llevado a cabo el tratamiento del melanoma murino subcutáneo, tanto intratumoral como intravenoso.

3.4.6.1. *Tratamiento intratumoral*

Para el tratamiento intratumoral del melanoma subcutáneo, cada camada de ratones neonatos CD1 portadores de tumores de melanoma subcutáneo, fue dividida de manera aleatoria en los diferentes grupos experimentales, que están especificados en cada apartado de resultados. Los tratamientos fueron administrados en P.9, es decir, 7 días post inoculación de células, de forma intratumoral (volumen máximo 50 μl). Finalmente, transcurridas 72 horas, los ratones fueron sacrificados y los tumores se pesaron para evaluar el efecto de los tratamientos (Figura MM.12). Los tumores se conservaron en formaldehído al 10% a 4 °C para su posterior análisis histológico.

Para poder agrupar los resultados de camadas diferentes y disminuir la variabilidad, se normalizaron los pesos de los tumores de los 3 grupos tratados frente al peso de los tumores del grupo control, que se consideró como el 100%.

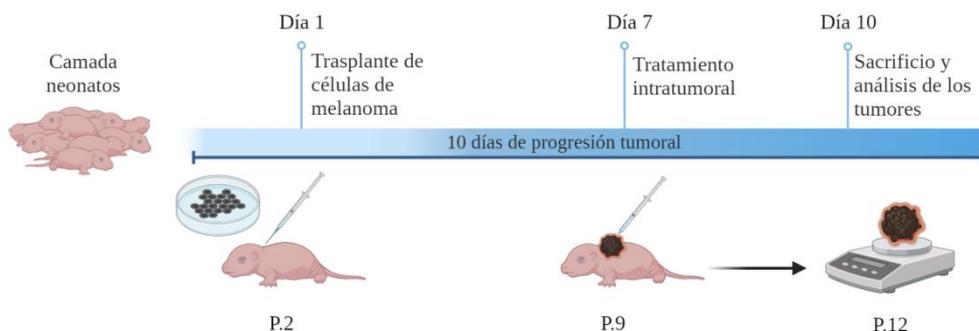


Figura MM. 12. Esquema general del modelo de melanoma subcutáneo en ratones CD1 neonatos y la administración de tratamientos intratumorales.

3.4.6.2. Tratamiento intravenoso

Para el tratamiento sistémica del melanoma subcutáneo, se dividieron los ratones adultos C57BL/6 portadores de melanoma subcutáneo de manera aleatoria en 4 grupos de tratamiento, que están especificados en cada apartado de resultados. Los tratamientos fueron administrados 6, 8 y 10 días post inoculación de células de forma intravenosa en el seno retro orbital de los ratones (volumen máximo 50 μ l). Finalmente, transcurridas 48 horas, los ratones fueron sacrificados y los tumores se pesaron para evaluar el efecto de los tratamientos (Figura MM.13). Éstos se conservaron en formaldehído al 10% a 4 °C para su posterior análisis histológico. El peso de cada ratón fue monitorizado a lo largo de todo el proceso experimental.

Para las $FdU_{10}@SiO_2$, la fluorescencia presente en los tumores se cuantificó mediante el uso del software IVIS®.

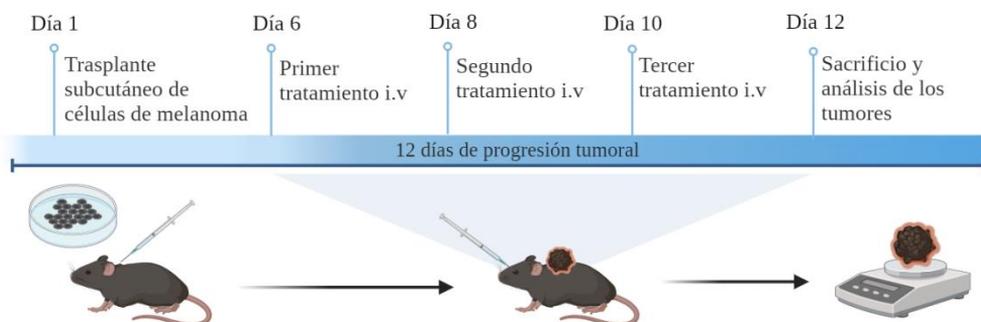


Figura MM. 13. Esquema general del modelo de melanoma subcutáneo en ratones C57BL/6 adultos y la administración de tratamientos de forma intravenosa.

3.4.7. Evaluación de la fluorescencia en sangre en un modelo de carcinomatosis peritoneal

Se inocularon células B16F10 RFP en la cavidad intraperitoneal de ratones adultos C57BL/6, 11 y 14 días tras la inoculación, se sacrificaron los ratones y se extrajo sangre del corazón, que se depositó en tubos *ependorf* recubiertos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para evitar su coagulación. La sangre se centrifugó a 4200 rpm durante 10 min a 4 °C y posteriormente a 5800 rpm durante otros 10 min a 4 °C. En ambos casos, se recogió el sobrenadante, que corresponde con el plasma (sangre sin células) donde se encuentran las proteínas fluorescentes. Finalmente, se leyó la fluorescencia de 100 μ l de cada muestra en lector de microplacas Biotek Synergy HTX. Las longitudes de onda empleadas para la RFP fueron: $\lambda_{\text{Ex}} = 590/20$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 620/10$ nm.

3.5. Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa GraphPad Prism 7. Todos los datos se encuentran representados como la media \pm DE (desviación estándar) o como la mediana \pm IQR (rango intercuartílico). Todos los experimentos fueron realizados al menos 3 veces de manera independiente. Con respecto a la representación gráfica, se han empleado histogramas, diagramas de barras o gráficas donde se representa un parámetro en función del tiempo (gráfico lineal).

Para el análisis estadístico se han empleado diferentes tipos de pruebas estadísticas:

- En el caso en el que los datos se ajustaran a una distribución normal, se llevó a cabo la comparación entre dos grupos mediante el uso de la prueba de la t de Student (se asume la desviación estándar de ambos grupos igual) o la prueba de Welch (no asume la desviación estándar de ambos grupos igual), y la comparación entre más de dos grupos mediante el ANOVA de una vía seguido de un análisis *post-hoc* de comparaciones múltiples de Tukey (se asume la desviación estándar de ambos grupos igual) o la prueba Welch ANOVA seguida de un análisis *post-hoc* de Games-Howell (no asume la desviación estándar de ambos grupos igual).
- Por otro lado, en los casos en los que los datos no cumplían el supuesto de normalidad, se llevó a cabo la comparación entre dos grupos mediante el uso de la prueba U de Mann-Whitney, y la comparación entre más de dos grupos mediante la prueba de Kruskal Wallis seguido de un análisis *post-hoc* de comparaciones múltiples de Dunnett. Ambos son los análogos no paramétricos de la t de Student y del ANOVA paramétrico.

Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas para un p -valor $\leq 0,05$ y no significativas (ns) para un p -valor $> 0,05$, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. En los pies de figura, el p -valor se representa como sigue: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción y purificación de proteínas ligando inspiradas en la toxina del ántrax

El primer objetivo propuesto en esta tesis doctoral consistió en diseñar proteínas ligando recombinantes inspiradas en la toxina del ántrax (Atx) con la finalidad de dirigir nanomedicinas específicamente hacia su receptor de membrana TEM8, sobreexpresado en el microambiente tumoral (TME).

Con este propósito, se estudió la estructura del antígeno protector (PA) de la Atx, que, como se explicó en la introducción, es la parte de la toxina que se une al receptor TEM8 con una alta afinidad. El PA es una proteína de 83 kDa que consta de 4 dominios estructurales, desde el extremo N terminal hasta el C terminal (DI, DII, DIII y DIV). De los 4 dominios, los dominios II y IV son los más interesantes de conservar en el diseño de las construcciones, ya que tienen los aminoácidos median la unión a TEM8 a través de interacciones hidrofóbicas (Figura R.1a).

A partir de la estructura de PA, se diseñaron 4 proteínas ligando diferentes de longitud variable. Todas ellas fueron diseñadas con una etiqueta molecular policatiónica de 6 o 10 histidinas (6xHis o 10xHis) en el extremo N-terminal de la construcción (Figura R.1b), ya que el extremo C-terminal tiene que quedar libre para su interacción con el receptor [149]. Por una parte, esta secuencia permite funcionalizar electrostáticamente los nanomateriales (NMs), pero además permite purificar las proteínas mediante el uso de cromatografía de afinidad empleando resinas modificadas con Ni^{2+} o Co^{2+} . La finalidad última de producir mutantes de distinta longitud es encontrar la mínima secuencia de PA que tenga una alta afinidad por el receptor TEM8 y que sea fácilmente producida, purificada y conjugada a la superficie de NMs siguiendo los protocolos empleados en nuestro laboratorio.

La primera secuencia diseñada consistió en el fragmento de 63 kDa que queda después de la escisión de PA por la furina en la superficie celular tras la unión con TEM8. Está formada por el DII, DIII, DIV y la parte de DI que no es escindido. Esta construcción consta de los residuos 197 al 735 y tiene un peso molecular de 64 kDa, por lo que se denominó PA64. Se trata de una construcción que tiene todos los residuos que interaccionan con TEM8, los que se localizan en el DII y los que se localizan en el DIV.

También se diseñaron 2 construcciones basadas únicamente en DIV de PA, ya que la mayoría de los residuos de interacción con TEM8 se encuentran en esta porción de la proteína. Esta parte de la proteína es el dominio estructural mínimo de unión

al receptor TEM8. La primera construcción consiste en la secuencia del DIV completa, consta de los residuos 625 al 735 y tiene un peso molecular de 17 kDa. La segunda, es una versión más corta, donde se eliminó una secuencia de 10 aminoácidos con estructura desordenada en el extremo N-terminal del DIV. Esta secuencia puede ser cortada por proteasas, por lo que se perdería también la secuencia de histidinas. Esta construcción consta de los residuos 635 al 735 y tiene un peso molecular de 16 kDa. Estas construcciones se denominaron PA17 y PA16 respectivamente.

Además, se diseñó una construcción adicional, como prueba de concepto, que consiste en una proteína de fusión entre la proteína PA17 y la proteína verde fluorescente (EGFP, del inglés, *Enhanced Green Fluorescent Protein*). Esta proteína fluorescente sirve como proteína reportera y resulta de mucha utilidad en experimentos donde se quiera estudiar la distribución de la proteína mutante. Como el extremo C-terminal de PA17 tiene que estar libre para la interacción con el receptor, la secuencia resultante fue EGFP-PA17. Esta proteína tiene un peso molecular de 44 kDa.

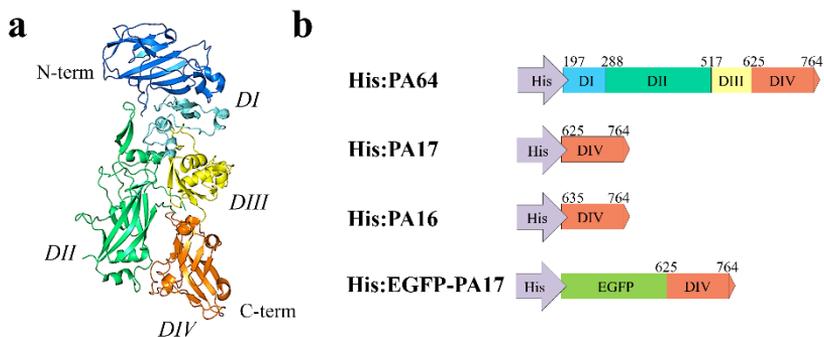


Figura R. 1. Diseño de proteínas ligando 6xHis o 10xHis basadas en la estructura del PA de la Atx. (a) Estructura de la proteína PA con cada dominio estructural coloreado en: azul (DI); verde (DII); amarillo (DIII); y naranja (DIV). En azul oscuro, la parte del DI que se escinde tras el corte por la furina en la superficie celular (20 kDa). (b) Diseños estructurales de las 4 proteínas ligando recombinantes. Todas ellas cuentan con una secuencia policatiónica de histidinas en el extremo N-terminal.

Con respecto a la sobreexpresión de estas proteínas, diseñadas en función de la estructura de PA, cabe destacar que se trata de proteínas insolubles con tendencia a formar cuerpos de inclusión dentro de la bacteria durante el proceso de sobreexpresión [150,151]. La probabilidad de formación de cuerpos de inclusión se obtuvo con la herramienta bioinformática *EMBOSS Pepstats*, donde el

parámetro *Probabilidad de expresión en cuerpos de inclusión* nos informa acerca de la solubilidad de la proteína, y se mueve en una escala del 0 a 1. Para la PA17 y la PA16, es de 0,4. Para la EGFP-PA17 es de 0,221, lo que indica que la presencia de una EGFP en el extremo N-terminal de la construcción favorece su expresión como proteína soluble. Sin embargo, para la PA64 es de 0,42, siendo la más insoluble de las 4. Induciendo la sobreexpresión de las proteínas mediante IPTG a tiempos más largos y temperatura ambiente, se puede controlar mejor la formación de cuerpos de inclusión en las bacterias [152,153] y así optimizar el rendimiento de la purificación de las proteínas al realizar la extracción de los sedimentos bacterianos.

4.1.1. Producción y purificación de proteínas ligando recombinantes 6xHis

Como primera aproximación, se añadió una secuencia 6xHis en el extremo N-terminal a cada una de las proteínas ligando descritas previamente. En la Figura R.2 se muestra, para cada construcción, una representación estructural de la proteína resultante y el análisis de su sobreexpresión en bacterias competentes mediante geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie.

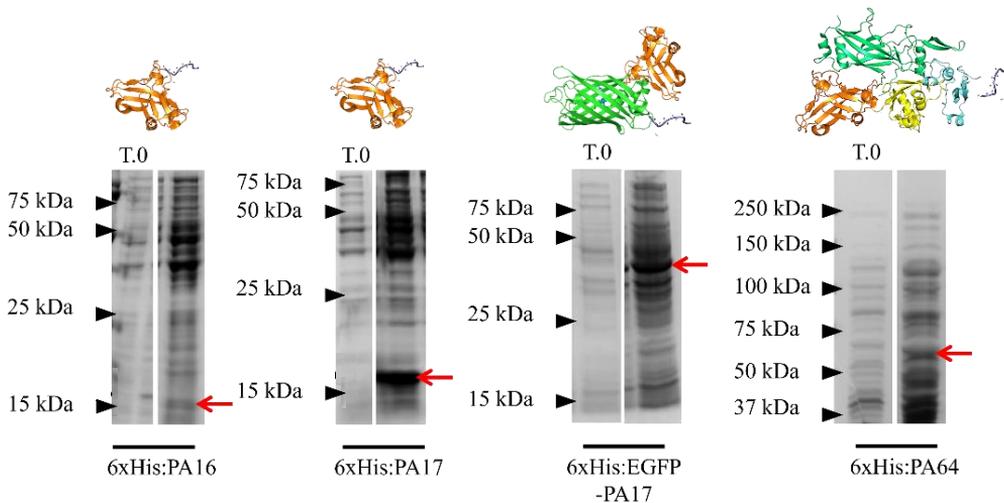


Figura R. 2. Sobreexpresión de proteínas ligando 6xHis. Geles SDS-PAGE donde se muestra la sobreexpresión de las 4 construcciones en la fracción total de proteína bacteriana, indicadas con flechas rojas. Incubación con IPTG: 12 horas a temperatura ambiente. T.0 hace referencia a proteínas del extracto bacteriano previa inducción con IPTG. Encima de cada gel se muestra la estructura final de cada construcción siguiendo el código de colores de la Figura R.1.

Se pueden observar las bandas correspondientes a la correcta sobreexpresión de las 4 proteínas ligando, que aparecen en los pesos moleculares esperados. Para las 4 proteínas recombinantes, se probaron diferentes tiempos de sobreexpresión, pero para todas ellas, se obtuvo mayor cantidad de proteína cuando eran incubadas con IPTG a tiempos largos (12 horas) y a temperatura ambiente. Sin embargo, se aprecia que, en concreto, 2 de las construcciones, tienen una sobreexpresión mayor. Éstas son la 6xHis:PA17 y la 6xHis:EGFP-PA17, donde la banda que aparece correspondiente es mucho más notable que para las proteínas 6xHis:PA16 y 6xHis:PA64. Esta diferencia de sobreexpresión podría deberse a que estas 2 últimas proteínas tienen secuencias de aminoácidos de dominios estructurales incompletos de la proteína PA. En el caso de la PA16, el DIV se encuentra incompleto, a falta de 10 residuos que unen el DIII con el DIV. Con respecto a la PA64, se trata de una proteína mucho más grande que tiene el DI incompleto, pues le falta la secuencia que codifica el péptido de 20 kDa que se escinde por la furina. Las proteínas adquieren su estructura terciaria cuando la cadena polipeptídica se pliega. Sin embargo, cuando una proteína tiene más de un dominio, éstos se pliegan de forma independiente, y cada dominio conforma una unidad estable de plegamiento [154]. Es posible que la presencia de un dominio incompleto, como en estos 2 casos, resulte en un plegamiento defectuoso de la proteína final, llevando a la proteína sintetizada a la degradación, y, por lo tanto, detectándose niveles de expresión más bajos.

A pesar de la correcta producción de las proteínas ligando en bacterias competentes, no se pudieron purificar de manera satisfactoria. Al analizar los resultados mediante electroforesis SDS-PAGE, se detectó una proteína contaminante de alrededor de 40 kDa que eluía junto con la proteína de interés a un ratio aproximadamente equimolar (Figura R.3). Esta proteína contaminante en la elución era común en las 4 construcciones y aparecía también en los geles de funcionalización de NPs.

Para conocer a qué proteína pertenecía la banda, ésta fue analizada mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos 3.1.7. Los resultados indicaron que se trataba de la proteína represora del operón *lac*, una proteína de la bacteria *E. coli* de 39 kDa que se encuentra unida al operón *lac* en ausencia de IPTG para bloquear la expresión del gen recombinante. Una vez se añade IPTG, ésta se separa del ADN y deja paso a la ARN polimerasa para comenzar la transcripción del gen [155].

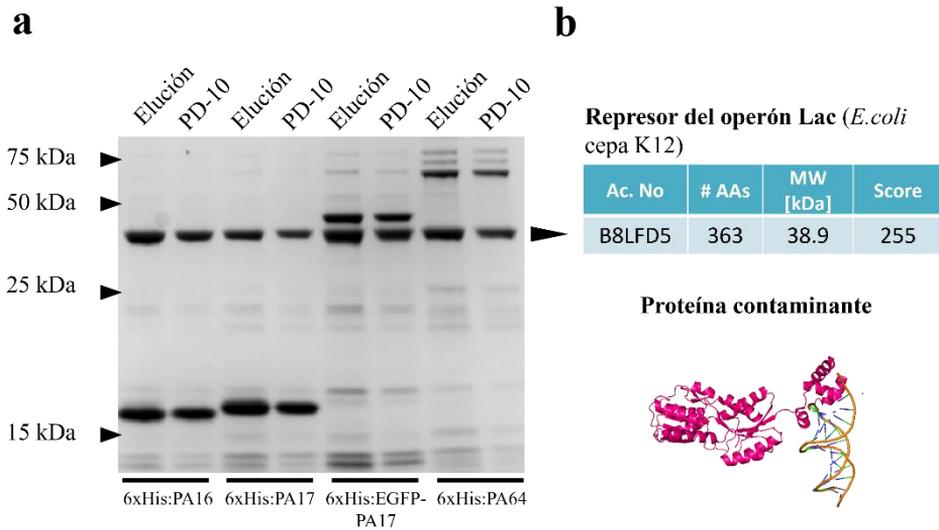


Figura R. 3. Purificación de proteínas ligando 6xHis y contaminación con la proteína represora del operón lac. (a) Gel de electroforesis SDS-PAGE donde se muestra la purificación de las 4 proteínas recombinantes. Aparece la proteína contaminante a 40 kDa. (b) Tabla con la información sobre la proteína contaminante: nombre, número de acceso, número de residuos, peso molecular, score del análisis y estructura molecular. Se trata de la proteína represora del operón lac de la cepa K12 de *E. coli*. Representación estructural mediante el software PyMOL. Código de acceso PDB: 1EFA.

Este problema durante el proceso de purificación ha sido previamente reportado en la bibliografía. Esta proteína se encuentra normalmente presente en cantidades minúsculas (típicamente menos de 8 copias por célula) y no debería ser un contaminante significativo en la purificación de proteínas. Sin embargo, muchos vectores de expresión tienen el alelo *lacI^q*, un alelo silvestre del gen *lacI*, que produce una sobreexpresión del represor para controlar la expresión de las proteínas recombinantes [156]. De hecho, esto se puede observar en los gels SDS-PAGE de la Figura R.2: aunque parece que esta proteína de 39 kDa aparece a T.0 (previa inducción con IPTG), sus niveles se ven altamente aumentados cuando se añade IPTG para inducir la sobreexpresión de las proteínas recombinantes. La estructura cristalina de esta proteína muestra una gran cantidad de residuos de histidina en su superficie, lo cual resulta suficiente para unirse a la resina de las columnas de purificación y competir con la unión de las proteínas de interés [156]. Para solventar este inconveniente, se consideró que, la mejor estrategia, era reclonar las secuencias en un nuevo vector de expresión bacteriana.

4.1.2. Reclonado, producción y purificación de proteínas ligando recombinantes 10xHis

Se clonaron las secuencias de nucleótidos para las 4 construcciones en el plásmido pET-16b tal y como está descrito en la sección de Materiales y Métodos 3.1.2. Mediante el uso de este plásmido se generan proteínas de fusión con una secuencia de 10xHis en vez de 6xHis. Con esta nueva secuencia se espera que se mejore el rendimiento en el proceso de purificación [157] y, además, que se produzca una interacción electrostática más estable con la superficie de las NPs. Para cada construcción, se estudió su sobreexpresión en bacterias competentes *E.coli* tras la adición de IPTG.

En la Figura R.4 se muestra, para cada construcción, el análisis de su sobreexpresión en bacterias competentes mediante geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie.

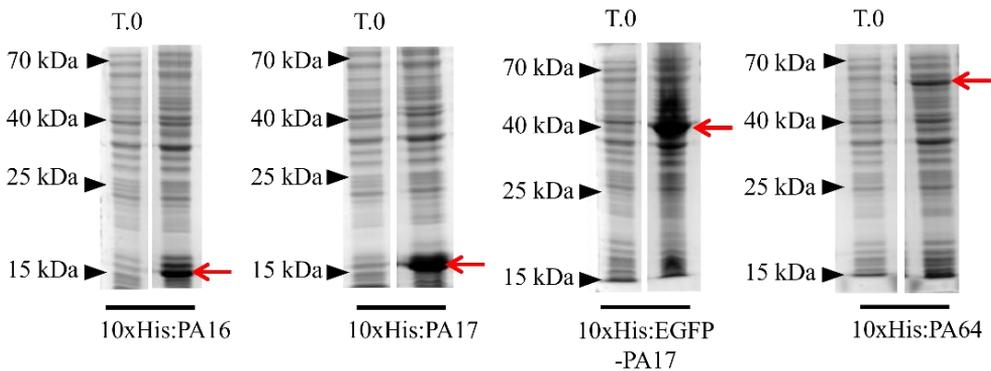


Figura R. 4. Sobreexpresión de proteínas ligando 10xHis. Geles de electroforesis SDS-PAGE donde se muestra la sobreexpresión de las 4 construcciones en la fracción total de proteína bacteriana, indicadas con flechas rojas. La incubación con IPTG se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 12 horas. T.0 hace referencia a proteínas del extracto bacteriano previa inducción con IPTG.

En los geles SDS-PAGE se puede apreciar la correcta sobreexpresión de las 4 proteínas ligando, donde las bandas correspondientes a cada proteína aparecen en los pesos moleculares esperados. Al igual que ocurría con las proteínas con la secuencia 6xHis, la mejor condición de sobreexpresión son tiempos largos de incubación con IPTG a temperatura ambiente. En general, se puede decir que las proteínas 10xHis se expresan de forma más eficiente que las de 6xHis, aun añadiendo concentraciones más bajas de IPTG (Tabla MM.3). Esto indica que el

plásmido pET-16b, solo inducible por IPTG, a diferencia del plásmido pMAL-p5e, inducible tanto por IPTG como por triptófano, funciona de manera más óptima en las bacterias competentes empleadas y bajo los protocolos seguidos en nuestro laboratorio. De las 4 construcciones, las que mejor se sobreexpresan son, de nuevo, 10xHis:PA17 y 10xHis:EGFP-PA17.

Además de observar una sobreexpresión más óptima con este nuevo sistema de expresión, tras el proceso de purificación, ya no aparece en la elución la banda correspondiente a la proteína contaminante junto a las proteínas de interés (Figura R.5).

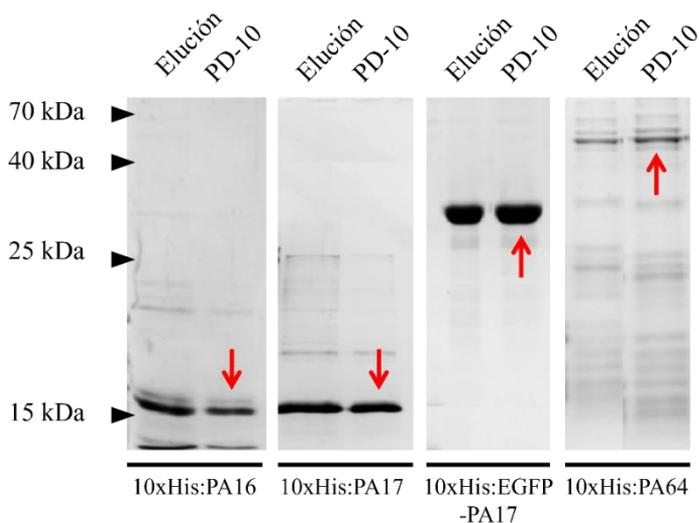


Figura R. 5. Purificación de proteínas ligando 10xHis. Geles de electroforesis SDS-PAGE donde se muestra la purificación de las 4 proteínas recombinantes, señaladas con flechas rojas. Las calles “Elución” se corresponden con la proteína purificada de las columnas de Ni^{2+} . Las calles “PD-10” se corresponden con la proteína eluida de las columnas de intercambio de tampón de elución a PBS IX.

Es importante destacar que, la purificación de la proteína 10xHis:PA64, es más sucia que la de las otras 3 construcciones, y puede estar relacionado con la baja sobreexpresión que muestra esta proteína y su baja solubilidad. Esto podría ser un inconveniente a la hora de funcionalizar NPs con esta construcción. Para las otras 3 proteínas, en un proceso de purificación habitual se obtiene proteína libre de contaminantes suficiente como para llevar a cabo la funcionalización de distintos tipos de NMs para diversas aplicaciones *in vitro* e *in vivo*.

Con todos estos resultados, se puede concluir por una parte que, la aparición de proteínas contaminantes procedentes del huésped en la elución de proteínas de interés está estrechamente ligado al vector de expresión que se emplee. Se han mejorado los procesos de expresión y purificación de las 4 proteínas recombinantes mediante el cambio de vector de expresión y el uso de una secuencia de 10xHis en vez de una de 6xHis. El sistema de sobreexpresión y purificación propuesto en esta tesis doctoral es económico, sencillo y rápido para obtener proteínas las de interés con suficiente calidad para su posterior uso en la funcionalización de NMs.

4.1.3. Funcionalización de nanopartículas como prueba de concepto

Antes de continuar con el proyecto, era necesario conocer si con las proteínas ligando producidas en bacterias y purificadas, se podía llevar a cabo una correcta funcionalización electrostática de NPs para lograr los objetivos propuestos. Para ello, y como prueba de concepto, se recubrieron NPs de PS carboxílicas (NPs de PS) de 500 nm y NPs de sílice mesoporosa (MSNPs) de 300 nm con las 4 proteínas ligando. Las características de ambos tipos de NPs caracterizadas mediante DLS, se encuentran recogidos en la Tabla R.1.

Tabla R. 1. *Tamaño, índice de polidispersión y potencial ζ medidos mediante DLS para las PS NPs y MSNPs.*

NPs	Tamaño (nm)	Índice de polidispersión (PI)	Potencial ζ (mV)
PS	534.3 \pm 3.6	0.08 \pm 0.02	-50.1 \pm 1.2
MSNPs	294 \pm 15	0.03 \pm 0.015	-40.2 \pm 1

Para la funcionalización de estas NPs se emplearon cantidades en exceso de proteína recombinante eluida en PBS 1X. Una vez funcionalizadas, la proteína unida a la superficie de ambos tipos de NPs se despegó y se analizó mediante SDS-PAGE. Como se puede observar en la Figura R.6, tanto la superficie de NPs de PS como de MSNPs, se funcionaliza correctamente con las 4 proteínas ligando de forma electrostática.

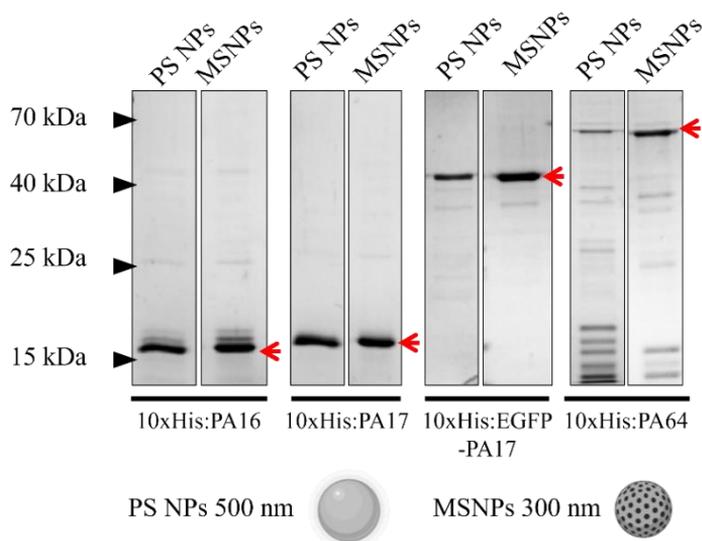


Figura R. 6. Funcionalización de NPs con las proteínas ligando 10xHis. Geles de electroforesis SDS-PAGE donde se muestran las 4 proteínas recombinantes unidas electrostáticamente a la superficie de NPs de PS carboxílicas de 500 nm y de MSNPs de 300 nm. Las proteínas de interés se encuentran señaladas con flechas rojas. En cada calle se muestra la proteína correspondiente a 50 μ g de NPs.

Estos resultados demuestran que este tipo de funcionalización basada en interacciones electrostáticas entre la superficie cargada negativamente de las NPs, con la secuencia policatiónica de las proteínas recombinantes cargada positivamente [137]. Este método es versátil, y permite conjugar todo tipo de proteínas recombinantes que tengan dicha secuencia con NMs de diversa naturaleza, cuyo potencial ζ sea negativo, en el rango de los -15 a -30 mV. Sin embargo, la funcionalización con la proteína 10xHis:PA64 incluye diferentes proteínas contaminantes unidas en la superficie, resultando en una funcionalización deficiente. Hipotetizamos que, la baja expresión de esta construcción en bacterias, sumado a la dificultad en su purificación debido a la insolubilidad, conllevan que la funcionalización de NPs no sea óptima. Más adelante, este resultado será decisivo a la hora de elegir la proteína ligando que se empleará en los modelos *in vitro* e *in vivo* para estudiar la interacción con el receptor TEM8.

4.2. Estudios *in vitro* de la afinidad y especificidad de las proteínas ligando por TEM8

El segundo objetivo propuesto en esta tesis fue la validación de la afinidad y especificidad de las proteínas ligando inspiradas en la Atx en un modelo celular que sobreexpresa TEM8 en membrana. Para ello, primero se diseñó y caracterizó un modelo de sobreexpresión de TEM8 en membrana en cultivos celulares. Después, se llevaron a cabo los experimentos de interacción ligando-receptor, tanto con proteína libre como conjugada a la superficie de NPs.

4.2.1. Diseño de un modelo de sobreexpresión de TEM8 en sistemas celulares

Para el fin propuesto en este trabajo, el receptor TEM8 debe encontrarse expuesto en el exterior de la membrana celular. De esta forma, podrá interactuar de forma correcta con las proteínas ligando. La generación de un modelo propio de sobreexpresión de TEM8 en membrana vino derivado de la falta de resultados concluyentes sobre la expresión de este marcador en distintas líneas celulares, tanto en nuestro laboratorio como reportado en la literatura. Algunos estudios han analizado mediante citometría de flujo la expresión de TEM8 en las líneas celulares HeLa o MCF-7, considerándolas positivas [114,158–160] o negativas [161] según se analice la expresión en citoplasma o membrana celular. Sin embargo, el modelo de sobreexpresión de TEM8 en membrana, previamente reportados en la literatura [104,119,162], asegura la correcta inserción del receptor en membrana y permitirá validar la funcionalidad de los ligandos *in vitro*.

Para el desarrollo de este modelo (Figura R.7), se diseñó una proteína recombinante como se describió en la sección de Materiales y Métodos 3.1.8, cuya estructura mantuvo el péptido señal, el dominio extracelular y el dominio transmembrana de la proteína TEM8, para asegurar así su correcta inserción en la membrana celular. Sin embargo, en este modelo no se incluyó el dominio citosólico presente en la isoforma larga de TEM8. Esto es debido a que isoformas más cortas del receptor que no tienen el dominio citoplasmático, muestran mayor afinidad por los ligandos extracelulares, al no estar en contacto con el citoesqueleto de actina [104,109,163–165]. En lugar del dominio citoplasmático, se añadió, como proteína de fusión en el extremo C-terminal de la construcción, la proteína fluorescente EGFP, que queda en la cara citoplasmática.

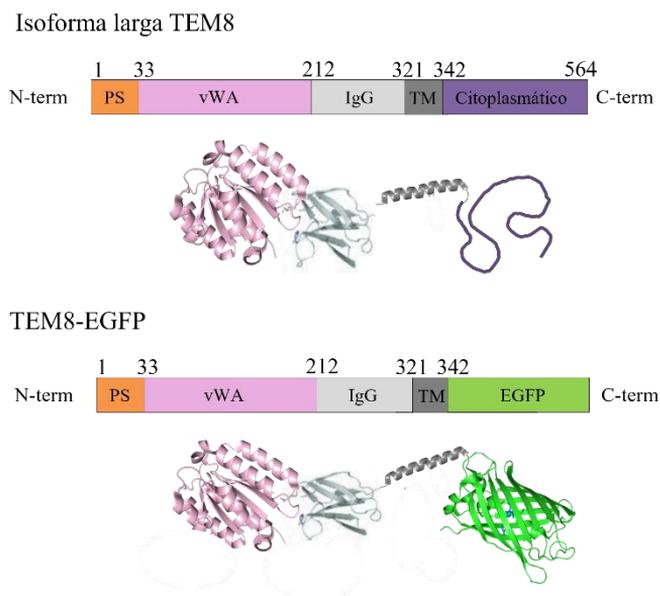


Figura R. 7. Esquema general de la estructura de la isoforma larga de TEM8 y de la construcción TEM8-EGFP diseñada para este estudio. En naranja, el péptido señal; en rosa, el dominio von Willebrand; en gris claro, el dominio tipo IgG; en gris oscuro, el dominio transmembrana (TM); en morado, el dominio citoplasmático; en verde, la proteína reportera EGFP.

La proteína EGFP sirve como proteína reportera, de tal manera que permite cuantificar la eficiencia de transfección mediante el análisis de la fluorescencia verde. El porcentaje de transfección y la intensidad media de fluorescencia en la línea celular HEK293T fueron analizados mediante citometría de flujo a las 24, 48 y 72 horas. Tal y como se observa en la Figura R.8a, el porcentaje medio de transfección se determinó en $55,8 \pm 2,3\%$ a las 24 horas, $52,1 \pm 1,4\%$ a las 48 horas y $52,1 \pm 2,7\%$ a las 72 horas. Se puede observar que la transfección de esta línea celular con la construcción TEM8-EGFP es estable, manteniéndose la expresión hasta las 72 horas. Por otro lado, la intensidad media de fluorescencia disminuye transcurridas 48 y 72 horas, ya que el ADN plasmídico transfectado es episómico. Finalmente, es importante destacar que, solo aproximadamente un 60% de las células se transfectan, lo que permite disponer en una misma placa de cultivo y un mismo experimento, un control negativo intrínseco para TEM8. Por otro lado, en la Figura R.8b, se muestra la sobreexpresión de la proteína TEM8-EGFP analizada mediante microscopía confocal a las 24, 48 y 72 horas post transfección.

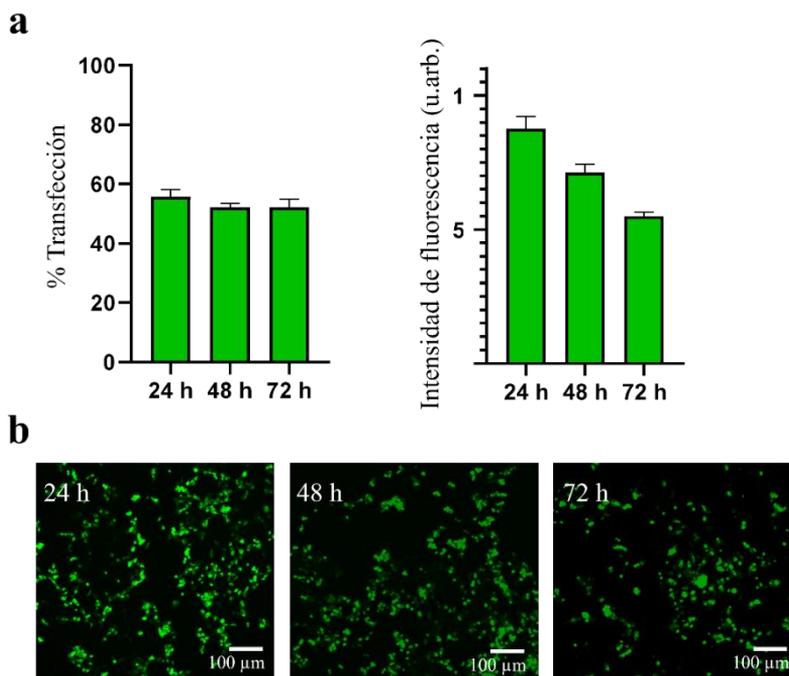


Figura R. 8. *Transfección de la construcción TEM8-EGFP en la línea celular HEK293T. (a) Diagramas de barras (media \pm DE) mostrando el % de transfección y la intensidad media de fluorescencia analizados a las 24, 48 y 72 horas mediante citometría de flujo. $n = 3$. (b) Imágenes representativas de microscopía confocal de fluorescencia de células transfectadas a las 24, 48 y 72 horas post transfección.*

4.2.1.1. Determinación de la localización subcelular de TEM8

Para asegurar que la proteína TEM8-EGFP sobreexpresada se encontraba correctamente posicionada en la superficie celular, insertada en la membrana, se llevó a cabo una inmunofluorescencia (IF) en célula viva frente al dominio extracelular de TEM8 de membrana. La IF en célula viva, debido a la ausencia de permeabilización celular, permite que los anticuerpos empleados, en este caso, frente al dominio extracelular de TEM8, se unan solamente a la proteína que se encuentra posicionada en la cara externa de la membrana celular. La hipótesis es que, como la EGFP de la construcción diseñada presenta fluorescencia verde y el anticuerpo frente a TEM8 tiene fluorescencia roja, se espera encontrar fluorescencia en tono amarillo/naranja en la membrana celular, resultado de la colocalización de ambas, en caso de que la proteína se encuentre posicionada en dicha localización.

Los resultados analizados mediante microscopía confocal de este experimento se encuentran recogidos en la Figura R.9.

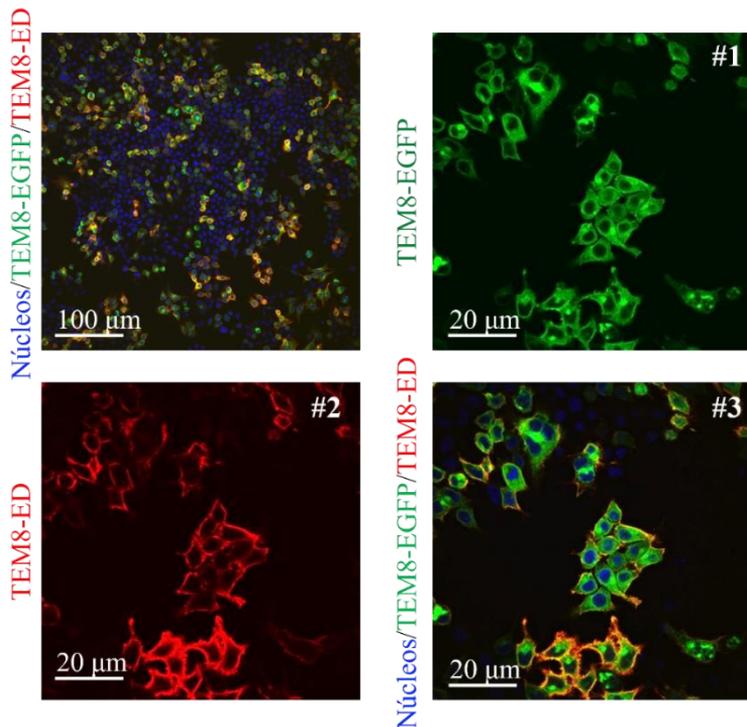


Figura R. 9. Inmunodetección del dominio extracelular de TEM8 en membrana en células HEK293T transfectadas con la construcción TEM8-EGFP. Imágenes representativas de microscopía confocal. La fluorescencia verde se corresponde con la transfección de la construcción TEM8-EGFP, la roja con la IF de TEM8 en la superficie de la membrana. La colocalización de ambas se corresponde con la fluorescencia amarillo/naranja en membrana. En azul, los núcleos celulares teñidos con DAPI. ED = dominio extracelular.

Como se puede observar en las imágenes de microscopía confocal de la Figura R.9 #1, correspondiente a la transfección de la construcción TEM8-EGFP, la fluorescencia verde se observa tanto en membrana celular como en regiones del citoplasma, en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático, resultado de la ruta que siguen las proteínas de membrana desde su síntesis hasta su inserción en la superficie celular. Sin embargo, en la Figura R.9 #2, que se corresponde a la IF frente al dominio extracelular de TEM8 en célula viva, la fluorescencia roja aparece solamente en la membrana celular. Por lo tanto, en la Figura R.9 #3, la

fluorescencia amarilla/naranja, resultado de la colocalización de ambas señales, también se restringe a la membrana celular. Con estos resultados podemos concluir que la construcción TEM8-EGFP se inserta correctamente en la membrana celular, por lo que este nuevo modelo de sobreexpresión *in vitro* es un modelo válido para estudiar la funcionalidad de las proteínas ligando.

También se llevó a cabo la transfección de la construcción TEM8-EGFP en células melanoma murino y HeLa (Figura R.10). Se puede observar que esta construcción es versátil y se consigue la correcta transfección de diferentes líneas celulares que pueden emplearse con otros propósitos de investigación. Con respecto a las células de melanoma murino, ya que los modelos tumorales producidos en ratón se han establecido con esta línea celular, sería interesante estudiar cómo afecta la sobreexpresión de este receptor al desarrollo tumoral. Además, se podría monitorizar el crecimiento de los tumores a tiempo real mediante el estudio de la fluorescencia.

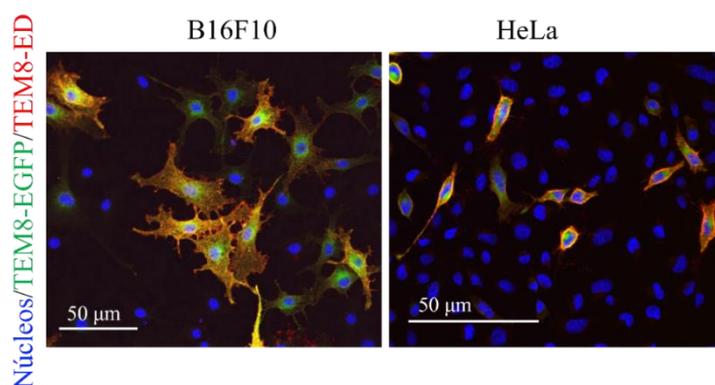


Figura R. 10. Inmunodetección del dominio extracelular de TEM8 de membrana en células B16F10 y HeLa transfectadas con la construcción TEM8-EGFP. En azul, los núcleos celulares; en verde, la proteína TEM8-EGFP transfectada; en rojo, la IF de TEM8 en superficie. En azul, los núcleos celulares teñidos con DAPI. ED = dominio extracelular.

4.2.2. Ensayos de interacción ligando-receptor *in vitro*

Los experimentos de interacción ligando-receptor empleando el modelo de sobreexpresión de TEM8 *in vitro*, se realizaron tanto con proteína libre como con proteína unida a la superficie de NPs.

4.2.2.1. Ensayos *in vitro* de interacción ligando-receptor con proteína libre

Los experimentos con proteína libre se realizaron basándonos en protocolos para ensayos del tipo *immunopanning*, tal y como se describió en la sección de Materiales y Métodos 3.3.6.1 [141]. En este caso, no se dispone de un anticuerpo, sino de las proteínas ligando 10xHis producidas en el laboratorio que pueden ser unidas a placas recubiertas de Ni^{2+} , quedando correctamente orientadas para su interacción con la proteína de membrana TEM8-EGFP (Figura R.11). En este experimento no se incluyó la proteína 10xHis:GFP-PA17 debido a que ya posee fluorescencia verde intrínseca que podría interferir con la lectura de la fluorescencia verde de las células correspondiente a la transfección de la construcción TEM8-EGFP.

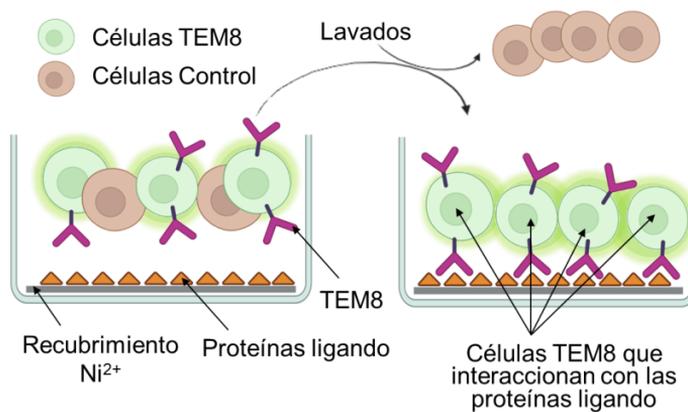


Figura R. 11. Esquema general del experimento de interacción de las proteínas ligando con células que sobreexpresan el receptor TEM8-EGFP. A través de la secuencia 10xHis, las proteínas ligando se adhieren a la superficie de placas recubiertas con Ni^{2+} y se incuban con células que expresan TEM8-EGFP en membrana. La afinidad de las proteínas por el receptor se mide a través de la fluorescencia verde de la EGFP en cada pocillo.

Después de realizar este experimento de interacción, fue evidente que los pocillos recubiertos con los ligandos 10xHis:PA16, 10xHis:PA17 y 10xHis:PA64, mostraban una mayor afinidad de unión a las células que expresaban el receptor TEM8 en comparación con ambas condiciones control (pocillos sin recubrimiento y recubiertos con proteína control 10xHis que no se une al receptor

TEM8). Este aumento de unión se cuantificó midiendo la fluorescencia emitida por la proteína recombinante TEM8-EGFP en cada pocillo (Figura R.12a). Para demostrar que el aumento de fluorescencia en los pocillos recubiertos con las proteínas ligando se debe a la especificidad por el receptor y no a que estas proteínas ligando tengan la capacidad de atrapar más cantidad de células en general, utilizamos un control de transfección, otra proteína fusionada a una EGFP y realizamos el mismo análisis para todos los grupos. Para las células transfectadas con la proteína EGFP como control, no hubo diferencias significativas en la intensidad de la fluorescencia media entre los 5 grupos experimentales (Figura R.12b).

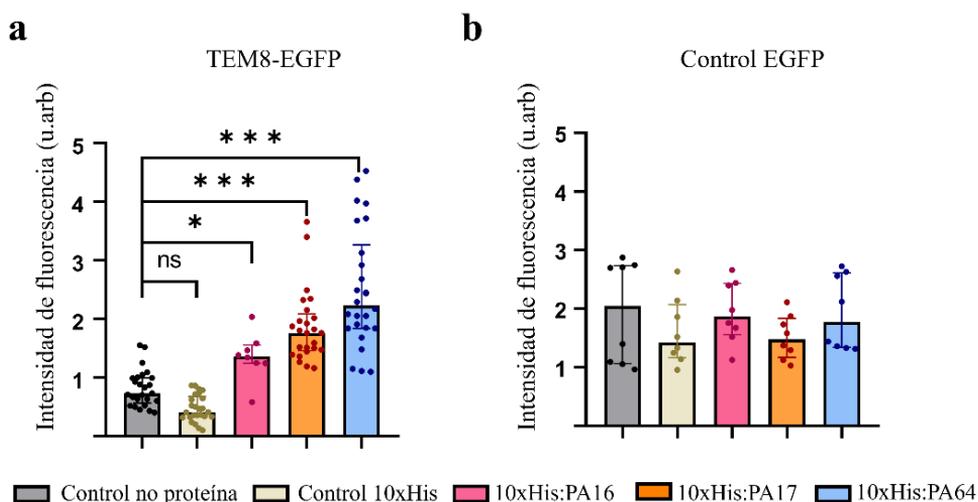


Figura R. 12. Experimento de interacción ligando-receptor in vitro analizando la intensidad de fluorescencia de la proteína EGFP. (a) Diagrama de barras (mediana \pm IQR) de la intensidad media de fluorescencia verde por pocillo para la construcción TEM8-EGFP analizada en un lector de placas. p -valor para la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis $<0,001$. p -valores para el análisis post-hoc no paramétrico de Dunnet indicados con asteriscos (valores de p : (ns) = 0,76; (*) = 0,01; (***) $<0,001$). $n = 24$ por grupo, 4 experimentos independientes. (b) Mismo análisis para la construcción control EGFP. p -valor para la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis = 0,51. $n = 8$ por grupo, 2 experimentos independientes.

Estos resultados corroboran que los ligandos diseñados han seleccionado con éxito células positivas para TEM8-EGFP en superficie. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla R.2, donde la afinidad de cada grupo experimental por los diferentes tipos de células analizadas se clasifica según la

intensidad media de fluorescencia por pocillo. Para ello, se dividió el rango de datos de intensidad de fluorescencia en 4 secciones y se clasificó cada grupo dentro de la sección en la que caía su valor medio.

Tabla R. 2. Especificidad de los diferentes grupos experimentales para los diferentes tipos de células utilizadas en el ensayo según los resultados en el análisis de fluorescencia.

Recubrimiento	TEM8-EGFP	Control-EGFP
No proteína	••	•
Control 10xHis	•	•
10xHis:PA16	•••	•
10xHis:PA17	••••	•
10xHis:PA64	••••	•

• $IMF \leq 575$ u.arb.; •• $IMF \leq 1150$ u.arb.; ••• $IMF \leq 1725$ u.arb.; •••• $IMF \leq 2300$ u.arb.; •••••; $IMF =$ Intensidad media de fluorescencia por pocillo

Además de medir la fluorescencia verde relativa a cada pocillo, los resultados se intentaron cuantificar mediante análisis de citometría de flujo, técnica que se empleó como contador de células presentes en cada pocillo.

Los resultados obtenidos mediante esta técnica corroboraron que el aumento observado en la fluorescencia verde correspondía a un aumento significativo en el número de células positivas para TEM8-EGFP atrapadas en los pocillos recubiertos con las proteínas ligando 10xHis:PA16, 10xHis:PA17 y 10xHis:PA64, en comparación con ambas condiciones control (pocillos sin recubrir y recubiertos con la proteína 10xHis control) (Figura R.13a). Para la construcción EGFP usada como control negativo, no se observaron diferencias significativas en el número de células por pocillo entre los 5 grupos experimentales (Figura R.13b), lo que sugiere que estos ligandos recombinantes se unen específicamente al receptor TEM8.

Los resultados presentados en esta sección del manuscrito demuestran que se ha diseñado, producido y validado *in vitro* un ligando inspirado en la proteína PA de la Atx, que se une específicamente a TEM8. El objetivo de esta tesis es diseñar y producir un ligando derivado de la proteína PA, con dimensiones mínimas y la mayor afinidad posible por el receptor TEM8, que sea sencillo de producir y purificar en el laboratorio. Considerando que la proteína 10xHis:PA64 es más difícil de producir y probablemente sea más inmunogénica debido a su gran tamaño [135,136], optamos por utilizar el mutante 10xHis:PA17 como ligando proteico para todos los experimentos posteriores descritos en este estudio. A partir de ahora nos referiremos a este ligando como PA17. Se trata de una proteína más

pequeña que PA64 que se produce fácilmente en bacterias y se purifica con cantidades despreciables de contaminantes para funcionalizar la superficie de NPs de diferente naturaleza.

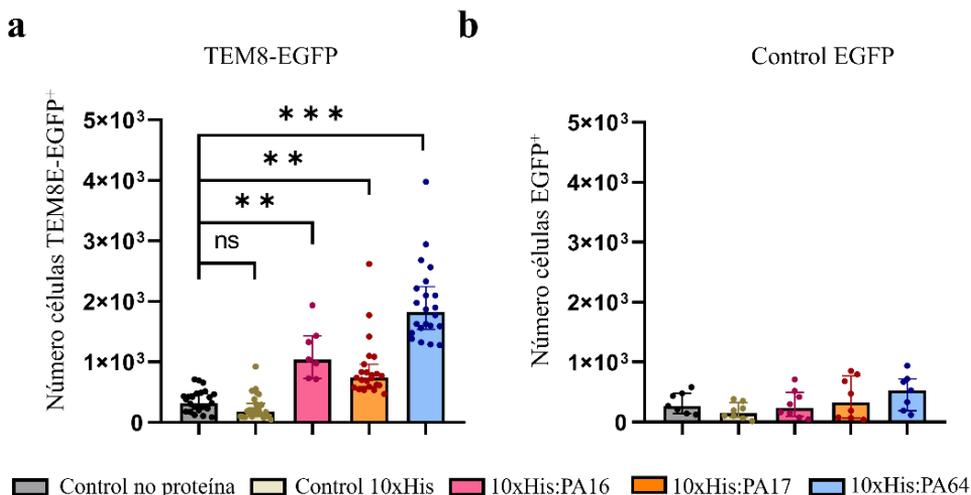


Figura R. 13. Experimento de interacción ligando-receptor in vitro analizando el número de células EGFP positivas atrapadas en cada pocillo. (a) Diagrama de barras (mediana \pm IQR) del número medio de células positivas por pocillo para TEM8-EGFP, analizado mediante citometría de flujo. *p*-valor para la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis $<0,001$. *p*-valores para el análisis post-hoc no paramétrico de Dunnet indicados con asteriscos (valores de *p*: (ns) $>0,99$; (**) = 0,01; (***) = 0,003; (***) $<0,001$). *n* = 24 por grupo, 4 experimentos independientes. (b) Mismo análisis para la construcción Hsp70-EGFP. *p*-valor para la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis = 0,25. *n* = 8 por grupo, 2 experimentos independientes.

4.2.2.2. Ensayos in vitro de interacción ligando-receptor con NPs funcionalizadas

A continuación, se llevaron a cabo experimentos de interacción ligando-receptor con NPs funcionalizadas. Para ello, un cultivo 2D de la línea celular HEK293T transfectada con la construcción TEM8-EGFP se incubó con NPs de PS fluorescentes rojas funcionalizadas con la proteína ligando PA17 y se estudió su interacción con las células mediante citometría de flujo a los 30 minutos, 2 y 5 horas. Como control negativo, se emplearon las mismas NPs sin recubrimiento. La especificidad del ligando por el receptor TEM8 se evaluó comparando la intensidad media de fluorescencia roja (de las NPs) presente en las células

positivas para TEM8-EGFP y negativas para dicho marcador. La hipótesis sugiere que las NPs funcionalizadas deberían interactuar preferencialmente con la población positiva para TEM8-EGFP, mientras que las NPs sin funcionalizar, no deberían mostrar dicha tendencia.

En la Figura R.14 se muestra la diferencia de intensidad de fluorescencia roja media, medida mediante citometría de flujo, entre la población TEM8-EGFP positiva y TEM8-EGFP negativa para ambos grupos experimentales. Un valor positivo de esta medida indica que la población positiva para TEM8-EGFP tiene mayor intensidad media de fluorescencia que la negativa, lo que implica mayor interacción y/o internalización de NPs. Se puede observar que, en todos los tiempos analizados, las NPs funcionalizadas interactúan más con las células positivas para TEM8-EGFP que las NPs sin funcionalizar. Esta diferencia comienza a ser evidente a partir de los 30 primeros minutos de incubación y alcanza su máximo a las 2 horas. Si aumentamos el tiempo de incubación, se puede observar cómo a las 5 horas, las diferencias comienzan a igualarse, y probablemente, si se analizaran tiempo más largos, acabarían siendo iguales. Esto se debe a que la incubación se realiza sobre cultivos 2D, donde por gravedad, las NPs acaban depositándose de forma inespecífica sobre las células.

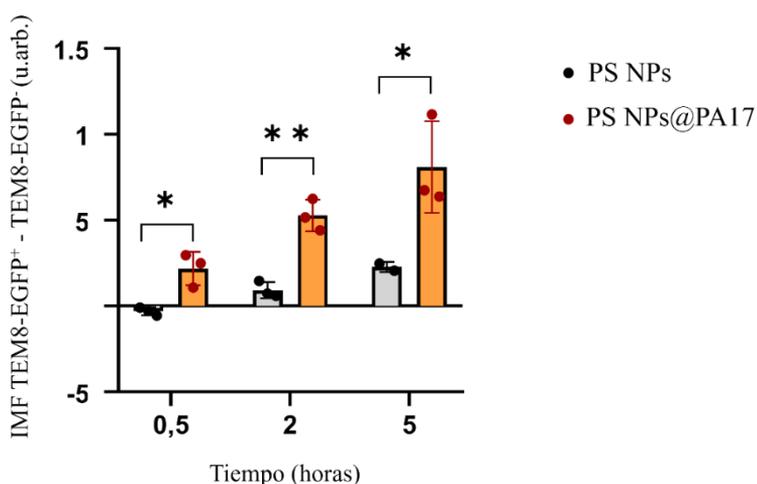


Figura R. 14. Interacción de NPs de PS@PA17 con células HEK293T transfectadas con la construcción TEM8-EGFP. Diagramas de barra (media \pm DE) donde se muestra la diferencia entre la intensidad media de fluorescencia roja (IMF) de las células positivas para TEM8-EGFP y negativas para este marcador. p-valores de la prueba de t-Student indicados con asteriscos: (valores de p: (*) = 0,01; (**) = 0,002; (*) = 0,02). n= 3 para cada tiempo.

Estos resultados, al igual que los obtenidos en los ensayos con proteína libre, corroboran que la proteína PA17 es funcional y capaz de interactuar con el receptor TEM8 en células que sobreexpresan este marcador en superficie.

4.2.3. Estudio de la estabilidad de la biocorona en condiciones fisiológicas

Para asegurar que la unión electrostática entre la proteína ligando PA17 y la superficie de las NPs se mantenía estable cuando el nanosistema era expuesto a un entorno bajo condiciones fisiológicas de pH, temperatura y composición, se llevaron a cabo experimentos para estudiar los cambios en la composición de la biocorona ensamblada por este ligando. NPs de distinta naturaleza se funcionalizaron con la proteína PA17 y se expusieron a un entorno fisiológicamente relevante (30% de FBS, pH 7,4 y 37°C). La estabilidad de la biocorona se estudió en NPs de PS carboxílicas y en MSNPs mediante el análisis de geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. (Figura R.15).

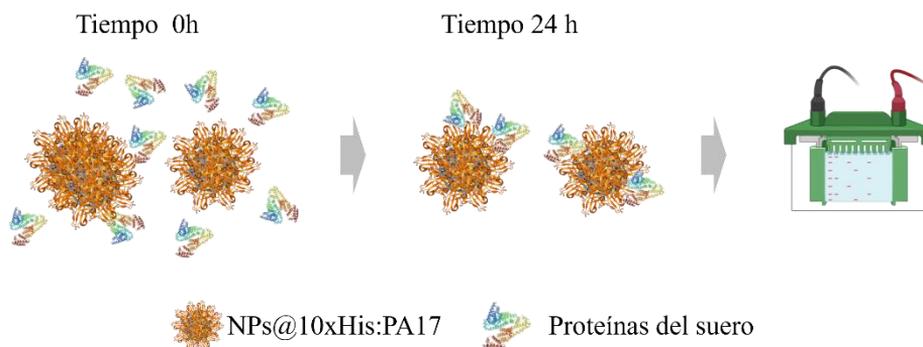


Figura R. 15. Diagrama del experimento de estabilidad de la biocorona formada por el ligando PA17. NPs funcionalizadas con PA17 fueron expuestas a un entorno fisiológicamente relevante (pH 7,4, 37°C y 30% FBS). Se tomaron muestras a distintos tiempos y se analizaron mediante SDS-PAGE.

La Figura R.16a muestra cómo, para ambos tipos de NPs, a medida que avanza el tiempo de incubación, la banda correspondiente a la proteína PA17 disminuye, y las bandas correspondientes a proteínas del suero van apareciendo. Esto indica que existe un intercambio entre la proteína recombinante unida y las proteínas del medio. Dicho intercambio es más evidente para las NPs de PS carboxílicas que para las MSNPs. El cálculo semi cuantitativo que se muestra en la Figura R.16b

en forma de diagrama de barras, indica que, durante las 2 primeras horas de incubación, un 50% de la proteína unida en la superficie de las NPs se corresponde con la PA17 para las NPs de PS, mientras que para las MSNPs es de un 80%. A las 4 horas de incubación, los porcentajes se mantienen aproximadamente iguales. Sin embargo, transcurridas 24 horas, ese porcentaje disminuye hasta un 10% en el caso de las NPs de PS y a un 25% en las MSNs.

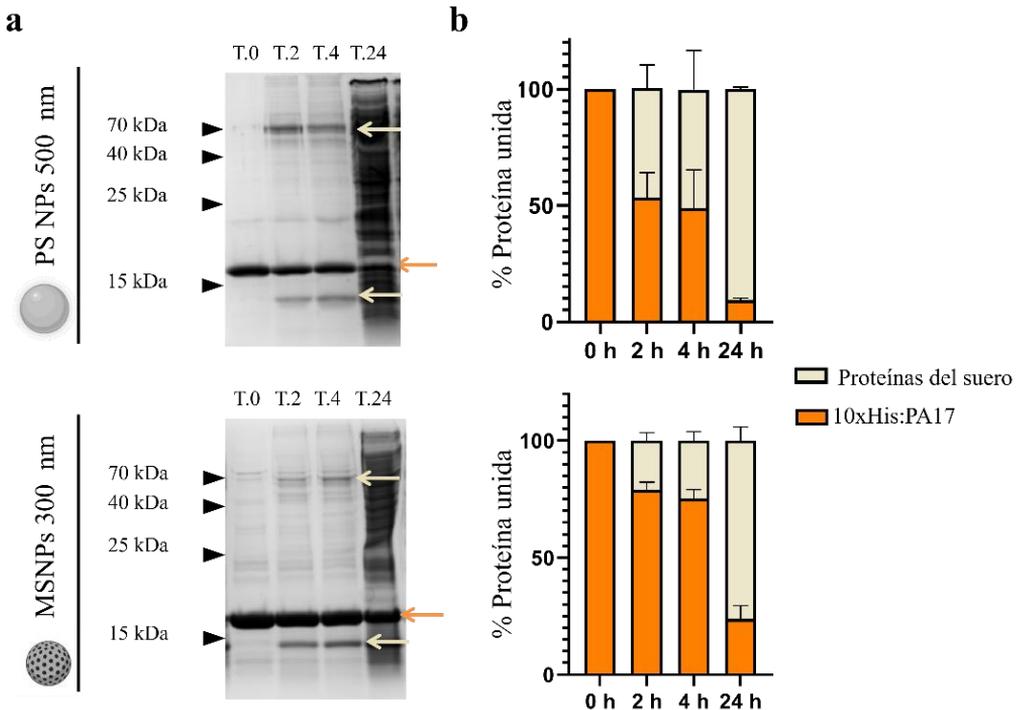


Figura R. 16. Análisis de la estabilidad de la biocorona de PA17 en condiciones fisiológicas. (a) Geles representativos SDS-PAGE mostrando la proteína unida a 50 μ g de NPs de PS (arriba) o MSNPs (abajo) a tiempo inicial (T.0) y transcurridas 2, 4 y 24 horas de incubación (T.2, T.4 y T.24 respectivamente). La flecha naranja hace referencia a la proteína PA17 y las flechas beige hacen referencia a algunas proteínas del suero, incluida la albúmina (flecha de arriba a 70 kDa). (b) Diagramas de barra (media \pm DE) de la cuantificación de la cantidad de proteína unida a las NPs de PS (arriba) o a las MSNPs (abajo) a los diferentes tiempos de incubación. $n = 3$ para cada tiempo.

Estos resultados indican que la biocorona formada por la proteína recombinante PA17 sobre la superficie de las MSNPs es más estable que sobre la superficie de PS NPs, aunque su potencial ζ sea ligeramente más negativo. En MSNPs, que emplearemos más adelante como agentes de administración de fármacos en

modelos *in vivo*, solamente se obtienen cantidades de proteínas contaminantes relevantes a partir de las 4 horas. Es de esperar, que, si inyectamos este nanosistema en sangre en modelos *in vivo*, en 4 horas haya llegado al lugar diana, por lo que se puede decir que la biocorona es lo suficientemente estable para el propósito de este trabajo de direccionamiento de los nanosistemas en modelos *in vivo*.

Cabe destacar, además, que la estabilidad de la biocorona no solo depende de la naturaleza del NM sino también de la proteína recombinante. Se pueden tomar como ejemplo los estudios llevados a cabo previamente en nuestro laboratorio con la 6xHis:GFP. A pesar de tener una secuencia de histidinas más corta que la proteína ligando testada en este caso, muestra mayor estabilidad a tiempos más largos de incubación, hasta las 72 horas, donde solo hay un 20% de proteínas contaminantes en la superficie de las NPs [137]. Esto puede ser debido a la estructura en forma de barril de la proteína GFP, donde los residuos hidrofóbicos quedan en la cara interna de la estructura. Sin embargo, la proteína PA17 tiene en el extremo C-terminal un bolsillo de residuos hidrofóbicos, que interaccionan con el receptor TEM8. Por ello además del intercambio previamente descrito, mediante estos residuos, es posible que la proteína interaccione con otras proteínas del suero o la sangre. Por lo tanto, sería necesario estudiar cómo se comporta esta biocorona sintética para cada ligando diseñado en el laboratorio y sobre un NM lo más similar posible al que se quiera estudiar en los modelos *in vivo*.

4.2.4. Cuantificación de la cantidad de proteína PA17 presente en la superficie de MSNPs

Para poder llevar a cabo algunos experimentos *in vivo* que se describirán más adelante, se realizó un estudio experimental de la cantidad de proteína ligando presente en la superficie de MSNPs de 100 nm. Para ello, se funcionalizaron 100 µg de las MSNPs de 100 nm con distintas cantidades iniciales de proteína recombinante PA17 (7 funcionalizaciones en total). Una vez funcionalizadas las MSNPs, la proteína adherida a la superficie se despegó y se cuantificó, mediante la comparación con bandas de BSA de cantidad conocida tras la digitalización de geles SDS-PAGE, como se describió en la sección de Materiales y Métodos 3.1.5 y empleando la recta patrón representada en la Figura MM.3.

En la Figura R.17a se muestra un gel de SDS-PAGE representativo para dichas funcionalizaciones. La funcionalización número 1 es aquella donde se añadió mayor cantidad de proteína PA17, mientras que la número 7 es aquella donde se añadió menos. Se puede observar, de forma cualitativa, que a partir de las funcionalizaciones 3-4, aunque se añada más proteína de partida, no se conjuga más a la superficie de las MSNPs, indicando que se ha alcanzado la saturación de dicha proteína en superficie. Estos resultados se encuentran representados en la Figura R.17b, donde se muestra en gris, la cantidad de proteína añadida inicialmente para cada funcionalización, y en naranja, la cantidad real de proteína unida a las MSNPs. De nuevo se observa que a partir de la funcionalización número 3, se alcanza la saturación de la superficie de las MSNPs para la proteína PA17. Dicha cantidad de proteína se corresponde con $7,3 \pm 0,4 \mu\text{g}$.

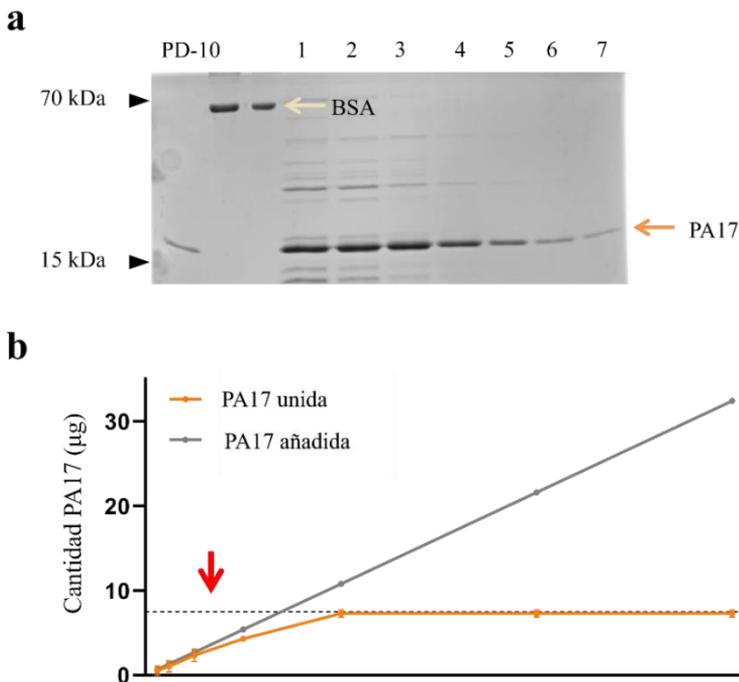


Figura R. 17. Cuantificación de la proteína PA17 en superficie de MSNPs de 100 nm. (a) Gel SDS-PAGE representativo donde se muestra la proteína unida a la superficie de las MSNPs en las funcionalizaciones 1-7. Las bandas de BSA se corresponden con 2 y 1 μg respectivamente. La calle PD-10 hace referencia a la proteína purificada en PBS 1X. (b) Cuantificación de la cantidad de proteína recombinante unida a la superficie de las MSNPs en cada funcionalización (naranja) frente a la cantidad de proteína recombinante añadida inicialmente (gris). La saturación de la superficie ocurre con 7,3 μg de proteína recombinante para 100 μg de MSNPs. $n=3$ para cada funcionalización.

Según los resultados experimentales, por cada mg de MSNPs se unirían 73 µg de la proteína recombinante 10xHis:PA17, es decir, que un 7,3% de la masa de las MSNPs se corresponde con la proteína unida a la superficie. Estos cálculos permiten estimar la cantidad de proteína PA17 libre que ha de emplearse en experimentos *in vivo* para que sea equivalente a la cantidad de proteína adherida a la superficie de las MSNPs.

4.3. Estudios *in vivo* de la especificidad y actividad antitumoral del ligando PA17

El tercer objetivo propuesto en esta tesis fue la validación de la especificidad y actividad antitumoral de la proteína ligando PA17 en modelos preclínicos de melanoma murino. Para ello, primero se evaluó la expresión de TEM8 en modelos de melanoma maligno murino y posteriormente, se llevaron a cabo los experimentos de biodistribución y actividad antitumoral del ligando PA17.

4.3.1. Detección de la expresión de TEM8 en modelos de melanoma maligno murino

La sobreexpresión del receptor de membrana TEM8 en el TME ha sido descrita en diversos tipos de tumores humanos, incluyendo el cáncer colorrectal, de mama, ovario o pulmón [87,120,166,167]. Sin embargo, existe poca información con respecto a los modelos subcutáneos descritos en las secciones de Materiales y Métodos 3.4.2.1 y 3.4.2.2. Para estudiar la expresión de dicho receptor en estos modelos, se llevó a cabo una IF del dominio extracelular de TEM8 en tumores diseccionados en fresco y se analizaron mediante microscopía confocal.

En la Figura R.18 se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal para la inmunodetección de TEM8 en el TME. Dichas imágenes revelaron que TEM8 se expresaba abundantemente en ambos modelos de melanoma murino subcutáneo. Se observaron 2 patrones de expresión. Por un lado, un claro marcaje de la neovasculatura tumoral (Figura R.18a), con una red de vasos desorganizada. Por otro lado, un marcaje de otras células aisladas de aspecto mesenquimal distribuidas por el TME (Figura R.18b). Además, también eran TEM8 positivas las células de la grasa. Por el contrario, las células de melanoma no presentaban un inmunomarcaje detectable.

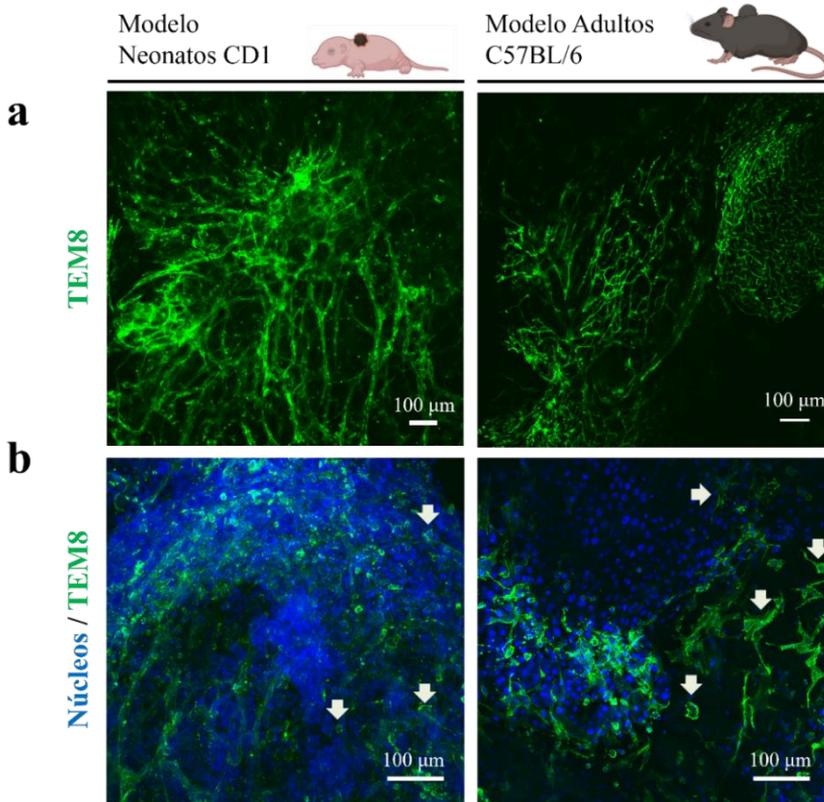


Figura R. 18. Inmunodetección del receptor *TEM8* en el TME del melanoma subcutáneo murino. Localización del receptor *TEM8* (verde) mediante IF en tumores de melanoma murino en el modelo de neonatos (izquierda) y adultos (derecha). Imágenes de microscopía confocal de (a) neovasculatura tumoral, y (b) células del TME con fenotipo mesenquimal (flechas blancas). Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI en color azul. Barra de escala = 100 μm .

Este estudio demuestra que *TEM8* se expresa en el TME de los modelos murinos seleccionados. Los resultados concuerdan con aquellos descritos en la bibliografía, donde se encontró que *ANTXR1*, el gen que codifica *TEM8*, era uno de los genes más sobreexpresados en la neovasculatura tumoral en distintos tipos de tumores [87,90,119], además de otras células de sostén del TME [119]. El hecho de que este receptor se exprese tanto en células de la neovasculatura como en otros tipos de células del TME, lo convierte en una diana muy versátil para dirigir quimioterapias nanoencapsuladas al TME. Esto no solo permitirá dirigir nanoterapias a los vasos tumorales, como ocurre con el VEGFR, típicamente expresado en la neovasculatura tumoral, sino que también, permitirá apuntar a las

células de sostén tumoral, que son igualmente esenciales para el desarrollo tumoral.

4.3.2. Direccionamiento del ligando PA17 a tumores *in vivo*

Para conocer la especificidad de la proteína ligando PA17 por los tumores *in vivo*, se llevó a cabo un estudio sobre la biodistribución de la proteína ligando cuando era administrada de forma intravenosa, siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos 3.4.5.

Con este objetivo, y basándonos en los resultados de sobreexpresión de la proteína ligando 10xHis:EGFP-PA17, se diseñó una proteína recombinante de fusión que contiene el ligando PA17 y la proteína fluorescente mCherry. Esta proteína, 10xHis:PA17-mCherry tiene un máximo de excitación a 587 nm y un máximo de emisión a 610 nm, que son longitudes de onda más adecuadas que las de la proteína EGFP para estudios de fluorescencia *in vivo*. Como control negativo, se diseñó la proteína 10xHis:mCherry, que no tiene el ligando PA17. En la Figura R.19 se muestran geles de SDS-PAGE de la sobreexpresión y purificación de las dos proteínas recombinantes empleadas en este estudio. La proteína control mCherry tiene un peso molecular de 28 kDa, mientras que la proteína ligando mCherry-PA17 tiene un peso molecular de 44 kDa.

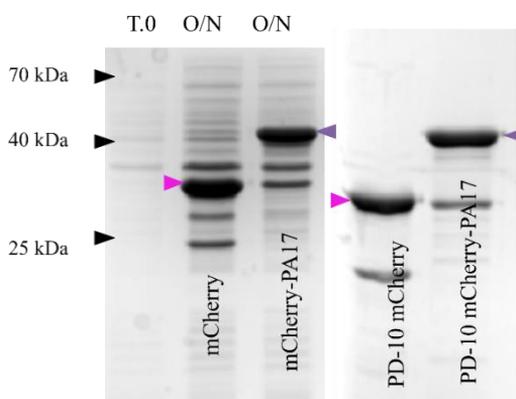


Figura R. 19. Sobreexpresión y purificación de las proteínas mCherry y mCherry-PA17. Geles SDS-PAGE donde se muestran la sobreexpresión de ambas proteínas tras una incubación con IPTG de 12 horas a temperatura ambiente (O/N), y su purificación. La proteína mCherry se muestra con flechas rosas mientras que la proteína mCherry-PA17 se muestra con flechas moradas.

Ambas proteínas se sobreexpresan correctamente cuando las bacterias son incubadas con IPTG durante 12 horas a temperatura ambiente. Además, se trata de proteínas altamente solubles, por lo que se obtienen grandes cantidades de proteína recombinante tras el proceso de purificación. Las proteínas purificadas se inyectaron intravenosamente en los ratones y se llevaron a cabo los estudios de biodistribución. Para ello, se tomaron imágenes de fluorescencia con el IVIS®, tanto de los tumores como de los distintos órganos, y se cuantificó la fluorescencia total presente en los tumores.

En la Figura R.20a se presentan imágenes que muestran la distribución de la proteína ligando mCherry-PA17 en tumores de melanoma murino subcutáneos, capturadas con el sistema IVIS® en distintos intervalos de tiempo. La fluorescencia en los tumores es visible a partir de los primeros 15 minutos tras la administración intravenosa y disminuye progresivamente hasta volverse indetectable a las 24 horas. La Figura R.20b muestra la cuantificación de la fluorescencia total en los tumores en cada uno de los tiempos observados. En la Figura R.20c se presentan imágenes de fluorescencia del resto de los órganos a los 15 minutos después de la administración intravenosa de la proteína. Se observa que la proteína no se acumula de manera inespecífica en otros órganos y que el exceso se excreta vía renal. Solo se detecta una leve fluorescencia en el hígado y el intestino, correspondiente a la autofluorescencia natural de estos órganos a las longitudes de onda utilizadas para el análisis. Las imágenes de los órganos tomadas en intervalos de tiempo más prolongados, hasta las 24 horas, muestran una biodistribución de la proteína similar a la observada a los 15 minutos.

En paralelo se realizó el experimento con la proteína control mCherry. Debido a que, 15 minutos después de la administración intravenosa del ligando, se halló el máximo de fluorescencia acumulada en los tumores, fue el tiempo que se eligió para el estudio de la proteína control. En la Figura R.21a, se puede observar que, a este tiempo, la fluorescencia en los tumores correspondiente a la acumulación de la proteína control no es detectable, en comparación a como ocurría con la proteína ligando mCherry-PA17. La cuantificación de la fluorescencia total reveló diferencias estadísticamente significativas entre la fluorescencia acumulada para ambas proteínas. Finalmente, la Figura R.21b muestra imágenes de fluorescencia del resto de órganos. Al igual que ocurría con la proteína ligando, se observa fluorescencia en los riñones debido a la rápida excreción renal de la proteína en exceso.

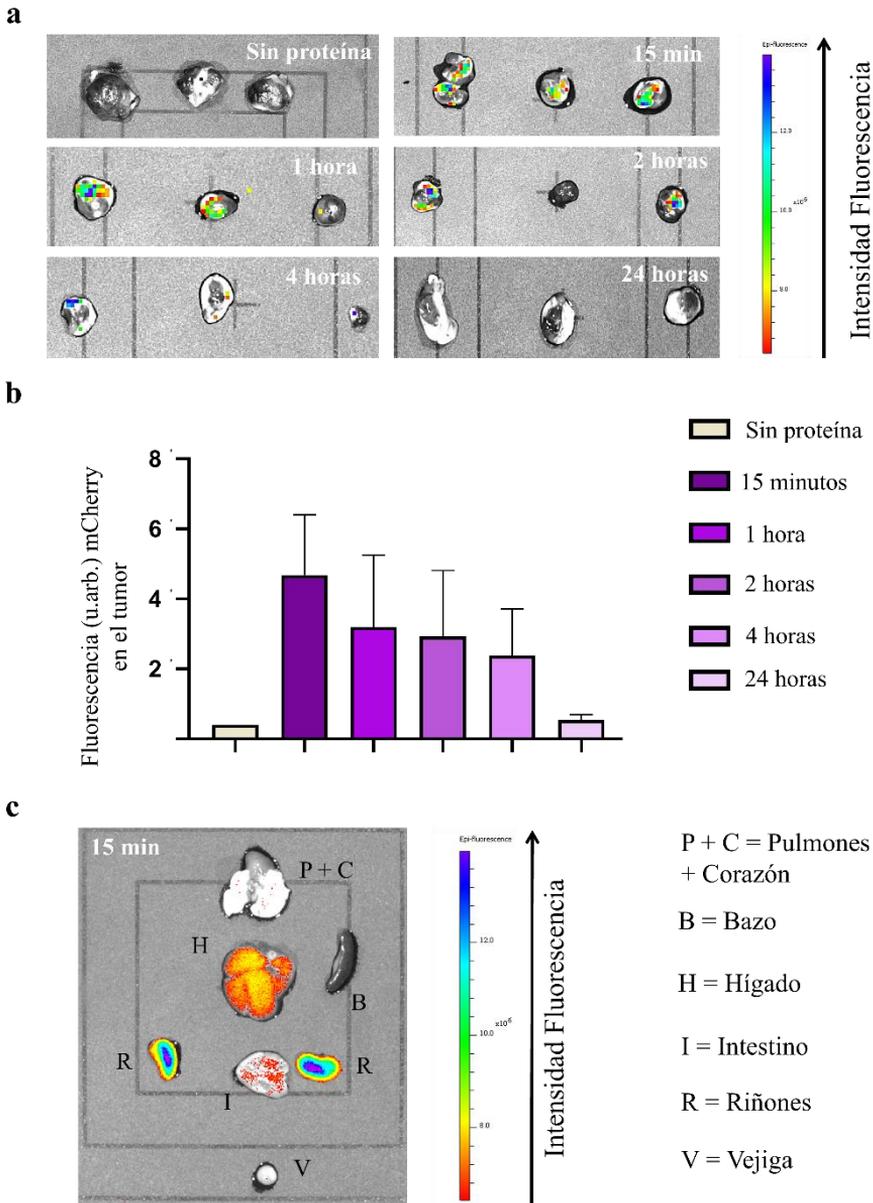


Figura R. 20. Biodistribución de la proteína ligando mCherry-PA17 administrada de forma intravenosa. (a) Imágenes del IVIS® ($\lambda_{Ex}=560$ nm; $\lambda_{Em}=620$ nm) de la acumulación de mCherry-PA17 en los tumores subcutáneos a diferentes tiempos tras la administración intravenosa. (b) Diagramas de barra (media \pm DE) de la cuantificación de la fluorescencia total en cada tumor a los diferentes tiempos. $n=3$. (c) Imagen del IVIS® de la acumulación de la proteína ligando en otros órganos a los 15 minutos tras su administración intravenosa. Se observa una intensa fluorescencia en los riñones.

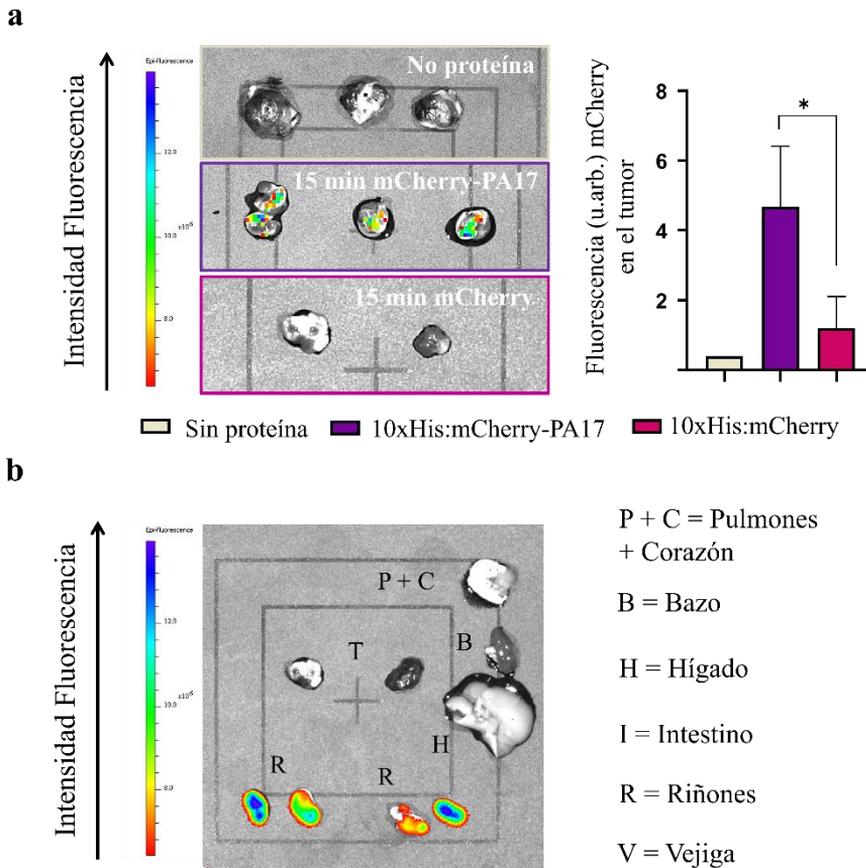


Figura R. 21. Biodistribución de la proteína control mCherry cuando se administra de forma intravenosa. (a) Imágenes del IVIS® ($\lambda_{Ex}=560$ nm; $\lambda_{Em}=620$ nm) de la acumulación de la proteína mCherry en los tumores (recuadro rosa) frente a la acumulación de la proteína ligando mCherry-PA17 (recuadro morado), 15 minutos tras su administración intravenosa y diagramas de barra (media \pm DE) de la cuantificación de la fluorescencia total en cada tumor. $n=3$. (b) Imagen del IVIS® de la acumulación de la proteína control mCherry en otros órganos a los 15 minutos desde su administración intravenosa. Se observa una intensa fluorescencia en los riñones.

Se puede concluir que, la proteína ligando PA17, muestra una alta especificidad por el TME en modelos de melanoma murino subcutáneos tras una administración intravenosa. El tropismo tumoral de esta proteína se asemeja al que se muestra en otros trabajos similares descritos en la bibliografía. En uno de ellos, emplean un anticuerpo monoclonal específico frente a TEM8 marcado con Zr^{89} . Tras la inyección sistémica de dicho anticuerpo, se puede observar a las 24 horas

mediante PET, su acumulación específica en los tumores que expresan TEM8 [168]. En otro estudio, diseñan un péptido basado en la Atx y realizan ensayos similares. Dicho péptido fue marcado con ^{18}F y fue administrado intravenosamente en ratones portadores de tumores de cáncer cabeza cuello, donde se expresa TEM8. Tras los 15 primeros minutos de administración, se observó, mediante imagen PET, una clara acumulación del péptido en los tumores. Además, este péptido también mostró una rápida eliminación vía renal. Sin embargo, y en comparación al péptido PA17, mostraba una alta acumulación en otros órganos vitales como el hígado y el pulmón [169].

4.3.3. Actividad antitumoral del ligando PA17 administrado localmente

Actualmente se están desarrollando diversas terapias contra el cáncer basadas en el uso de péptidos que reconocen receptores presentes en el TME y bloquean sus vías de señalización, impidiendo así, el desarrollo tumoral. Este es el caso del péptido ligando antagonista ATWLPPR, que es capaz de reconocer al VEGFR, uniéndose a él y bloqueando parcialmente la unión con su ligando natural, el VEGF. Este péptido ejerce una potente inhibición de la neoangiogénesis y desarrollo tumoral [128,170–174].

Basándonos en estos datos, y una vez confirmada la especificidad del ligando PA17 por el TEM en modelos *in vivo*, se llevó a cabo un estudio de su actividad antitumoral *in vivo*. Como primera aproximación, se evaluó su efectividad antitumoral tras su administración local, es decir, intratumoralmente. Para ello, se empleó el modelo de melanoma subcutáneo en ratones neonatos CD1, por tratarse de un modelo sencillo que permite recrear los experimentos *in vitro*, pero con la complejidad real de un tumor.

Como se indicó en la Figura MM.12, se dividió cada camada de ratones CD1, 7 días post trasplante con células de melanoma, aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales: (i) inyectados con PBS como grupo control, (ii) inyectados con 500 μg de MSNPs de 100 nm, (iii) inyectados con proteína ligando PA17 libre e (iv) inyectados con 500 μg MSNPs y funcionalizadas con la proteína ligando (MSNPs@PA17). El grupo control tratado con MSNPs sirvió para asegurar que las NPs no tienen ningún efecto tóxico para los animales. En todo momento, la cantidad de proteína libre se mantuvo igual a la proteína funcionalizada en la superficie de las MSNPs, tal y como se explicó en la sección

de Resultados 4.2.4. Los ratones fueron tratados 1 sola vez intratumoralmente, y 72 horas después, se sacrificaron para diseccionar y analizar el peso de los tumores (Figura R.22).

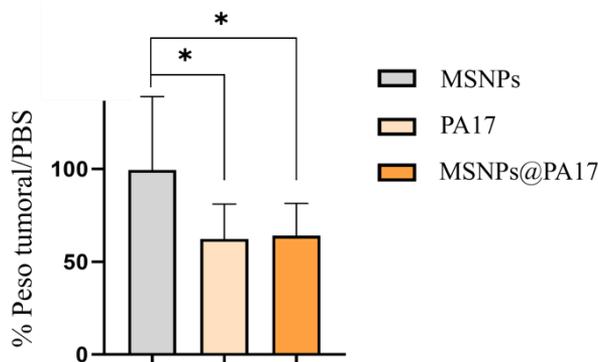


Figura R. 22. Actividad antitumoral de la proteína ligando PA17 administrada intratumoralmente. Diagramas de barra (media \pm DE) del porcentaje del peso tumoral de cada grupo experimental en relación con el grupo control (PBS), establecido en el 100%. p -valor para la prueba de Brown-Forsythe y Welch ANOVA = 0,004. p -valores para la prueba post-hoc de Games-Howell's indicados con asteriscos: (valores de p : (*)) = 0,03). $n=5$ por grupo.

Los resultados indicaron que las MSNPs control sin proteína ligando en la superficie no inducen una regresión tumoral, siendo el porcentaje en peso de los tumores con respecto a los controles (ratones tratados con PBS) del 99 ± 39 %. Sin embargo, tanto la proteína libre como las MSNPs@PA17 presentan una acción antitumoral comparable y significativa en comparación a las MSNPs control. Para la proteína libre se produce una reducción del $38 \pm 18,8$ % y para las MSNPs@PA17 del $36 \pm 17,5$ %.

Estos resultados confirman, por un lado, un efecto antitumoral intrínseco de la proteína PA17 libre, al menos, cuando es administrada localmente en un modelo de melanoma murino subcutáneo. Por otro lado, que la actividad de la proteína PA17 unida a la superficie de las MSNPs se mantiene.

4.3.4. Actividad antitumoral del ligando PA17 administrado de forma intravenosa

Como último paso en la validación de la proteína ligando PA17, se estudió su actividad antitumoral cuando era administrada de forma intravenosa. Para ello, tal y como se describió en la Figura MM.13, 6 días post trasplante de células de melanoma, los ratones adultos portadores de melanoma subcutáneo se dividieron de forma aleatoria en los siguientes grupos experimentales: (i) inyectados con PBS como grupo control, (ii) inyectados con proteína libre e (iii) inyectados con 500 μg de MSNPs y funcionalizadas con la proteína ligando (MSNPs@PA17). En todo momento, la cantidad de proteína libre se mantuvo igual a la proteína funcionalizada en la superficie de las MSNPs. Los ratones fueron tratados 3 veces a días 6,8 y 10 de desarrollo tumoral, y a día 12 se sacrificaron y se analizó el peso de los tumores (Figura R.23a). El peso de los ratones fue monitorizado durante todo el experimento para asegurar que ninguno de los tratamientos produce graves efectos adversos a los ratones (Figura R.23b).

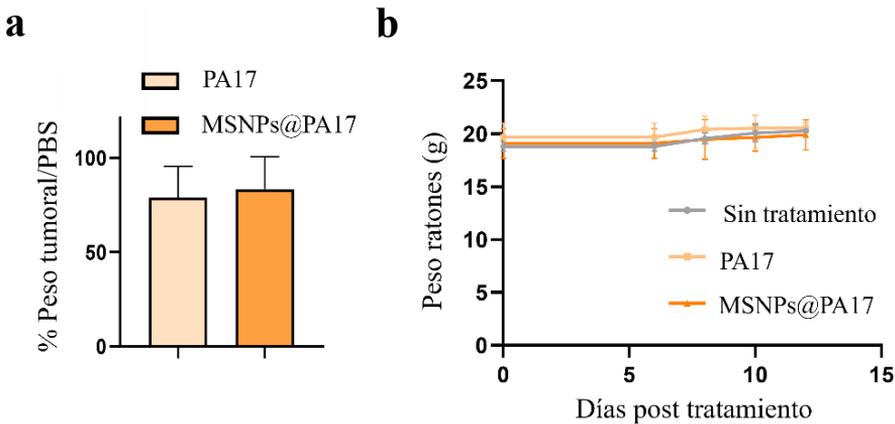


Figura R. 23. Actividad antitumoral de la proteína ligando PA17 administrada de forma intravenosa. (a) Diagramas de barra (media \pm DE) del porcentaje del peso tumoral de cada grupo experimental en relación con el grupo control (PBS), establecido en el 100%. n=4 por grupo. (b) Monitorización del peso de los ratones en cada grupo experimental durante los días de tratamiento.

Al igual que en los tratamientos locales, tanto la proteína PA17 libre como las MSNPs@PA17 presentan una reducción en el crecimiento tumoral con respecto a los ratones sin tratar (Figura R.23a). En los ratones tratados con proteína libre

se produce una reducción tumoral del 21%, mientras que para las MSNPs@PA17, se produce una reducción del 17%. Esto implica que la proteína libre tiene un ligero efecto antitumoral intrínseco también cuando se administra vía intravenosa. Esta reducción, que no es tan significativa como en el caso del tratamiento intratumoral, podría ser debido a la rápida eliminación de la proteína libre vía renal (tal y como se muestra en la Figura R.20c) o, en el caso de las MSNPs@PA17, por su rápida biodistribución al hígado y bazo. Por otro lado, la Figura R.23b muestra que ninguno de los tratamientos induce alteraciones en el peso de los ratones.

En resumen, los resultados obtenidos indican que la proteína ligando PA17 tiene actividad antitumoral intrínseca, ya que es capaz de inhibir el desarrollo tumoral. Esta actividad antitumoral intrínseca ha sido previamente reportada en la bibliografía, donde se ha empleado un mutante de la proteína PA para el tratamiento intravenoso del carcinoma de pulmón de Lewis [175]. Esta proteína mutante, así como el ligando PA17 diseñado en este trabajo, podrían tener el mismo mecanismo de acción de algunos anticuerpos monoclonales que se han desarrollado para bloquear el crecimiento tumoral a través de la inhibición de las vías de señalización del receptor TEM8 relacionadas con la angiogénesis tumoral o con la captación de colágeno [87,176]. Estos anticuerpos han sido diseñados con el fin de ser usados en una terapia de combinación con otros agentes antitumorales, como los fármacos quimioterápicos. Este sería el caso del nanosistema quimioterapéutico desarrollado en el siguiente apartado de esta tesis doctoral, que une la nanoencapsulación de una quimioterapia con un ligando con actividad antitumoral intrínseca.

4.4. Síntesis y caracterización de una nanomedicina dirigida al microambiente tumoral

Una vez caracterizada la afinidad de la proteína ligando PA17 en modelos *in vitro* e *in vivo*, el **cuarto objetivo de esta tesis doctoral fue diseñar, producir y caracterizar un nanosistema cargado con un agente quimioterápico dirigido específicamente hacia el TME**. Se eligió diseñar, sintetizar y optimizar un nanosistema basado en MSNPs con DOX encapsulada y recubierto con el ligando PA17 para lograr un efecto antitumoral dirigido.

4.4.1. Síntesis de MSNPs portadoras de doxorubicina

Para el estudio se han sintetizado NPs de sílice coloidal amorfa, en concreto, MSNPs. Se eligió este tipo de NM, ya que, aparte de tener una gran biocompatibilidad y amplia variedad de aplicaciones *in vivo*, su superficie naturalmente cargada negativamente permite la funcionalización electrostática con las proteínas ligando que se han diseñado [137]. Este protocolo de funcionalización, como ya se ha descrito previamente, resulta sencillo y económico, por lo que convierte a estas NPs en candidatas perfectas para su uso en este trabajo. Además, las NPs de sílice coloidal amorfa son fácilmente manipulables, ya que se pueden centrifugar y resuspender mediante sonicación, lo cual favorece la fácil funcionalización con las proteínas recombinantes. Por otro lado, el fármaco quimioterapéutico DOX ha sido propuesto para su encapsulación en estos nanosistemas para disminuir los efectos adversos que presenta tras su administración intravenosa *in vivo* [178,179]. Además, es un fármaco que presenta fluorescencia intrínseca, lo que permite un buen estudio de los procesos de encapsulación y liberación del mismo mediante diferentes técnicas espectroscópicas.

Como se describió en la sección de Materiales y Métodos 3.2.4, las MSNPs sintetizadas tienen un diámetro aproximado de 100 nm, determinado por TEM. La DOX es un fármaco que presenta un diámetro máximo de 1,5 nm, por lo que puede ser correctamente encapsulado en MSNPs con un tamaño de poro de 2,8 nm, como en el caso de las MSNPs de 100 nm de diámetro empleadas en esta tesis [180]. Tras la encapsulación de la DOX en este nanosistema (DOX@MSNPs), ninguno de los parámetros de las MSNPs caracterizados cambió significativamente, incluyendo el potencial ζ . Esto indica que, la DOX, un fármaco con carga positiva a pH fisiológico, se encuentra correctamente atrapada en el interior de los poros de las MSNPs y la cantidad encapsulada no es capaz de cambiar la carga superficial negativa típica de las MSNPs.

Los valores de los parámetros caracterizados para las partículas vacías y cargadas con fármaco se encuentran recogidos en la Tabla R.3.

Tabla R. 3. Caracterización (tamaño, índice de polidispersión y potencial ζ) de las MSNPs y DOX@MSNPs sintetizadas. *IP= índice de polidispersión.

Muestra	IP*	Tamaño DLS (nm)	Tamaño TEM (nm)	Potencial ζ H ₂ O (mV)	Potencial ζ PBS (mV)
MSNPs	0,29	317,8 ± 5,5	112,6 ± 12,2	-32 ± 0,2	-21,7 ± 1,2
DOX@MSNPs	0,21	279,5 ± 15	106,1 ± 12,2	-30,6 ± 0,8	-20,2 ± 2,4

En la Figura R.24 se muestran las imágenes de TEM de dichas partículas junto con su distribución de tamaños determinados por TEM.

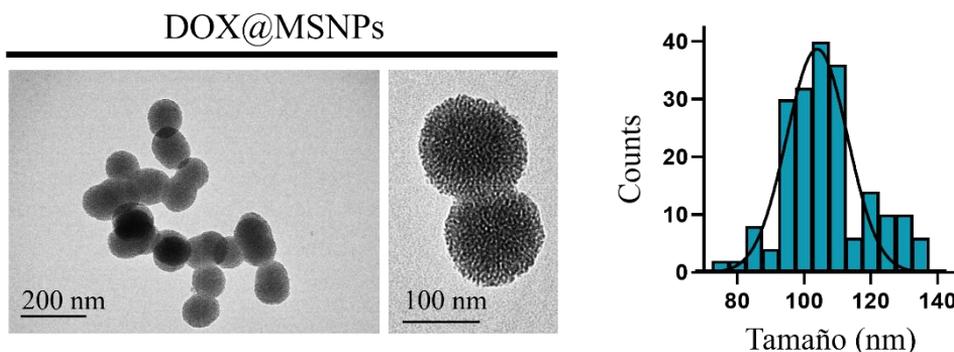


Figura R. 24. Síntesis y caracterización de DOX@MSNPs. Imágenes representativas de TEM de las partículas sintetizadas y distribución de tamaño de las partículas caracterizado mediante TEM ($n = 200$).

4.4.1.1. Eficiencia de encapsulación de la doxorrubicina

La encapsulación de fármacos en MSNPs depende de varios factores, incluyendo el tamaño de poro, el área y la carga superficial de las NPs y la carga del fármaco [181–183]. Para evaluar la eficiencia de encapsulación de la DOX en las DOX@MSNPs se empleó la espectroscopía de fluorescencia. Para poder conocer la cantidad de DOX en las muestras problema, se usó la recta patrón recogida en la Figura MM.5. Luego se calculó la cantidad, en μg , de DOX encapsulada por cada mg de DOX@MSNPs, el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) y el porcentaje de carga (%LC) siguiendo las fórmulas descritas en la sección de Materiales y Métodos 3.2.3.4 y la recta patrón de la Figura MM.6b.

Se obtuvo una encapsulación de $30,3 \pm 2,8 \mu\text{g DOX/mg DOX@MSNPs}$, siendo el %EE del $14,6 \pm 1,4\%$ y el %LC del $3,1 \pm 0,3\%$. En la Tabla R.4 se encuentran recogidos los datos para cada paso del proceso.

Tabla R.4. Determinación de la eficiencia de encapsulación de la DOX en las DOX@MSNPs.

Cantidad Inicial	Sobr.1 (μg)	Sobr.2 (μg)	Encap./mg NPs (μg)	%EE	%LC
1036 \pm 123	816 \pm 11	66,5 \pm 13	30,3 \pm 2,8	14,6 \pm 1,4	3,1 \pm 0,3

Los valores de %EE y %LC obtenidos en este trabajo están respaldados por los que se encuentran en la literatura científica con respecto a este tipo de NPs y fármaco [64,184–188].

4.4.2. Comportamiento del nanosistema bajo condiciones fisiológicas *in vitro*

Conocer la estabilidad de las MSNPs en medios acuosos fisiológicamente relevantes es importante para su uso como agentes de administración de fármacos [189–193]. Trabajos de la literatura han demostrado que las MSNPs se disuelven cuando son incubadas en tampones bajo condiciones fisiológicas de pH y temperatura. El proceso de disolución de la sílice en H₂O ocurre hasta que se alcanza el equilibrio, es decir, cuando en el sistema se alcanza la concentración de saturación de sílice. En ese momento, no se disuelven más partículas ya que no se está retirando sílice del sistema. El ratio de disolución depende, además de la cristalinidad, de la concentración de NPs de partida en la solución acuosa, del tamaño y el grado de porosidad de las mismas, de la temperatura y del pH, y de la frecuencia con la que se sustituya el medio acuoso. En general, concentraciones de partida más bajas, tamaños de partícula pequeños, partículas porosas frente a partículas compactas, temperaturas altas y valores de pH básicos, aceleran la cinética de disolución. Además, cuando se cambia el medio de disolución durante el proceso también se acelera el proceso, ya que se están retirando las especies libres de sílice [190,193].

Como parte de este trabajo, se ha estudiado mediante TEM el proceso de disolución de las DOX@MSNPs en condiciones de pH y temperatura fisiológicas (PBS 1X, pH 7,4 y 37 °C). De forma paralela, se llevó a cabo el estudio de liberación de la DOX empleando la recta patrón recogida en la Figura MM.8.

Se puede apreciar una rápida disolución del núcleo de sílice (Figura R.25a). La superficie rugosa a las 2 y 6 horas de incubación indica que la estructura porosa de Si-O-Si de las MSNPs es atacada por los grupos OH- presentes en la solución acuosa, disolviendo las partículas desde fuera hacia adentro [64]. Las partículas mantienen su morfología esférica hasta las 6 horas, y a partir de ese tiempo la estructura comienza a colapsar, resultando en la aglomeración de las partículas y dando como resultado estructuras de forma irregular sin estructura mesoporosa. En tiempos más prolongados, 24 horas, las partículas se descomponen en su

mayor parte y sólo se pueden observar sustancias con formas irregulares. Esto resulta del deterioro y desintegración de la matriz de sílice.

Midiendo la fluorescencia correspondiente a la DOX en el medio a cada tiempo, se calculó la cantidad de fármaco liberada, y se representó como la cantidad en μg o el porcentaje liberado con respecto al tiempo. En la Figura R.25b se muestra la curva de liberación de la DOX, tanto en porcentaje como en masa. Este proceso presenta una fase inicial de liberación rápida (*burst release*) y otra de liberación prolongada y sostenida en el tiempo, que alcanza un máximo de $45,6 \pm 4,3\%$ a las 48 horas, y se corresponde con $17,5 \pm 1,6 \mu\text{g}$ de DOX. La DOX liberada de las DOX@MSNPs desarrolladas en este trabajo, muestra un perfil típico para este tipo de nanosistemas [187,188,194–199].

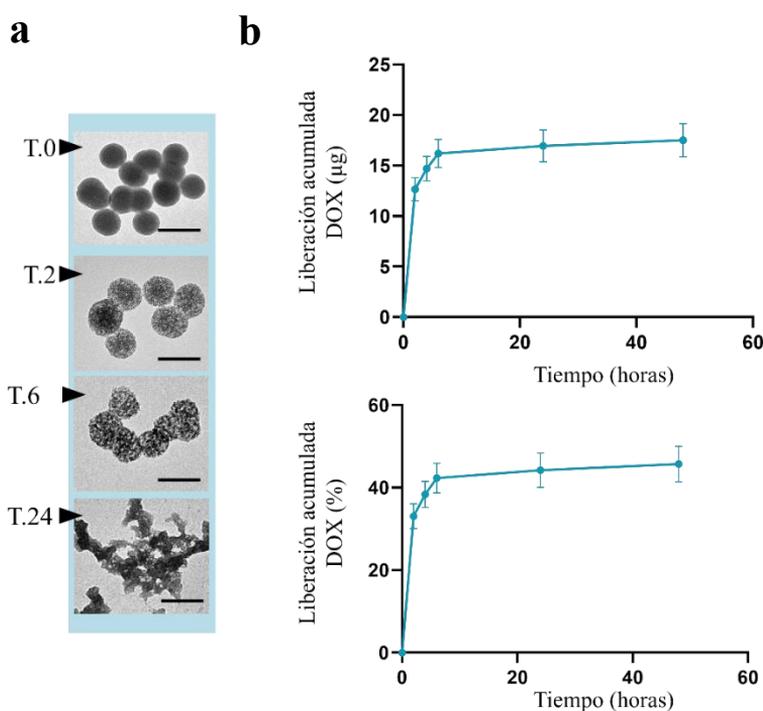


Figura R.25. Disolución de DOX@MSNP y liberación del fármaco en medio fisiológico. (a) Imágenes representativas de TEM del proceso de disolución de las MSNPs cargadas con el fármaco DOX. Barra de escala = 100 nm. (b) Perfil de liberación de la DOX de las DOX@MSNPs en función del tiempo, en masa (μg) y en porcentaje (%) con respecto a la cantidad encapsulada. Los datos están representados como la media \pm DE de 3 réplicas experimentales independientes. Tanto para las imágenes de disolución como para la liberación, la concentración de partículas se mantuvo a 1 mg/ml, y los experimentos se realizaron en PBS IX, pH 7,4 y 37°C.

4.4.3. Liberación de doxorrubicina encapsulada en cultivos celulares 2D

Para completar los estudios anteriores de liberación del fármaco *in vitro*, se llevó a cabo el estudio de la liberación de DOX del nanosistema en cultivos celulares 2D de células de melanoma murino. Para ello, se añadieron 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DOX@MSNPs a cultivos celulares 2D y los resultados se analizaron mediante microscopía confocal. Gracias a la fluorescencia intrínseca que presenta la DOX, se pudo determinar la localización celular del fármaco una vez liberado en las células.

En la Figura R.26 se muestran los resultados tras 24 horas de incubación. Las imágenes revelaron la acumulación de fluorescencia roja correspondiente a la DOX, que se aprecia tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula (#1) [195,200]. La fluorescencia del núcleo se corresponde con DOX libre que es capaz de atravesar la membrana nuclear para unirse al ADN. Esta DOX libre proviene de su liberación del nanosistema, bien en el medio de cultivo o una vez internalizado en el interior celular. Por otro lado, la fluorescencia en el citoplasma podría corresponder a la acumulación de DOX@MSNPs en proceso de disolución.

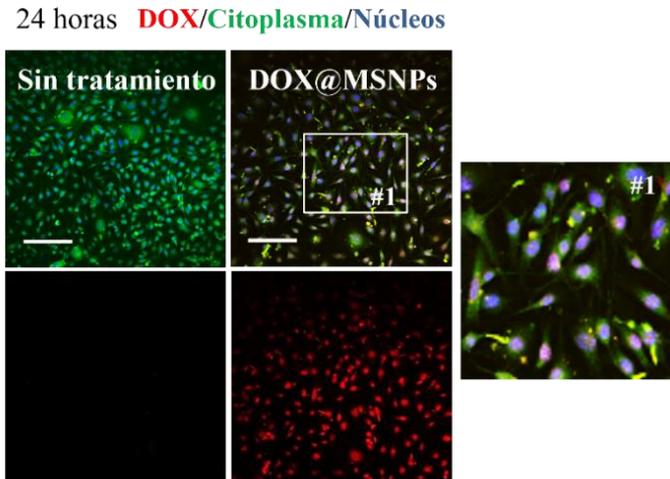


Figura R.26. Análisis de la liberación de DOX encapsulada en células de melanoma murino. Imágenes representativas de microscopía confocal 24 horas post tratamiento, de células sin tratar y tratadas con DOX@MSNPs. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul), los citoplasmas con FITC (verde) y la DOX presenta fluorescencia en el canal rojo. La cantidad de DOX@MSNPs en μg fue ajustada para añadir una concentración final de DOX de $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Barra de escala = $100\mu\text{m}$.

4.4.4. Estudio de la citotoxicidad de la doxorubicina libre frente a la encapsulada

Una vez estudiada la liberación de la DOX del nanosistema en cultivos celulares, se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad en la línea celular de melanoma murino. Se compararon los efectos del fármaco encapsulado frente al fármaco libre a 2 concentraciones diferentes: 1 $\mu\text{g/ml}$, que es la concentración establecida en ensayos previos en el laboratorio, y 0,3 $\mu\text{g/ml}$, que simula la cantidad de DOX liberada por las DOX@MSNPs durante las 2 primeras horas. La cantidad de DOX@MSNPs se estableció en 50 $\mu\text{g/ml}$, que equivale a una concentración final de DOX de 1 $\mu\text{g/ml}$.

En la Figura R.27 se muestran imágenes de contraste de fases donde se observan claros cambios morfológicos inducidos por los diferentes tratamientos tras 24 y 72 horas de incubación. En las células tratadas con el fármaco libre a una alta concentración se observa una muerte celular temprana. Las células muertas se ven como agregados de color negro debido a la gran secreción de melanina. A las 72 horas casi no se observan células adheridas a los pocillos, indicando una alta citotoxicidad del tratamiento. Por otro lado, las células tratadas con DOX@MSNPs, exhiben un fenotipo diferente. Se trata de células que presentan un tamaño celular mayor que el de las células sin tratar. Esta diferencia comienza a ser evidente a las 24 horas de tratamiento, acentuándose aún más tras 72 horas.

Este aumento en el tamaño celular inducido por el tratamiento con DOX encapsulada, se determinó cuantificando el diámetro corpuscular mediante citometría de flujo 24, 48 y 72 horas post tratamiento. En este estudio no se incluyó la DOX a 1 $\mu\text{g/ml}$ ya que, a las 24 horas, la mayoría de las células no eran viables, por lo que no se pudo determinar de manera adecuada su tamaño celular. En la Figura R.28 se muestra la cuantificación del diámetro celular mediante citometría de flujo. Se puede apreciar cómo, el diámetro de las células sin tratamiento y de las células tratadas con MSNPs vacías, se mantiene constante a lo largo del tiempo de análisis, alrededor de las 17 μm . Sin embargo, las células tratadas con DOX@MSNPs muestran un diámetro celular aumentado, llegando su máximo a las 48 alrededor de las 30 μm . A partir de este tiempo, el diámetro comienza a disminuir debido a que comienza la muerte celular, efecto visible a las 72 horas de tratamiento. Además, se aprecia que el diámetro de las células tratadas con la DOX libre a una concentración más baja, coincide con el de las células tratadas con DOX@MSNPs.

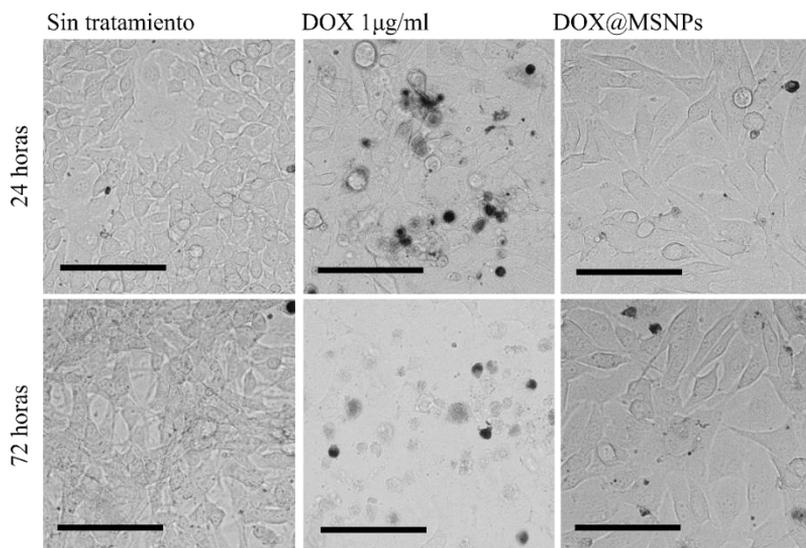


Figura R.27. Evaluación de los cambios morfológicos en las células de melanoma murino inducidos por el tratamiento con DOX libre y DOX encapsulada en MSNPs. Imágenes representativas de microscopía de campo claro a las 24 y 72 horas post tratamiento. La cantidad de DOX@MSNPs en μg fue ajustada para añadir una concentración final de DOX de $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Barra de escala = $120\mu\text{m}$.

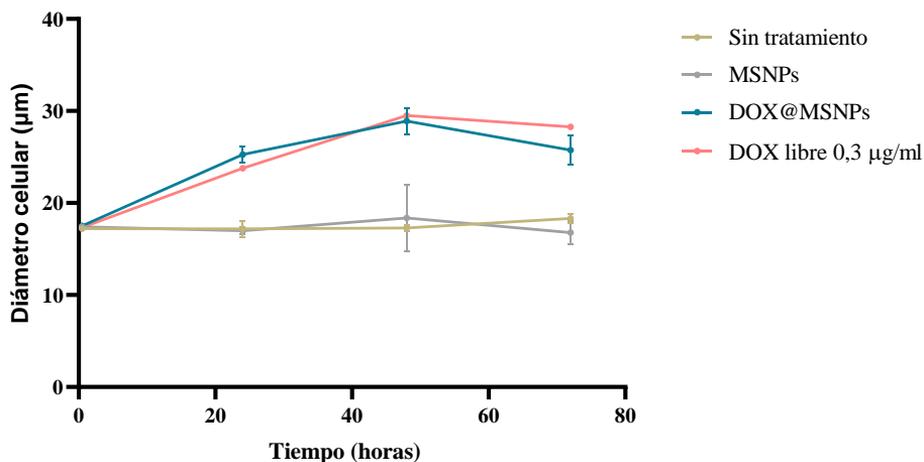


Figura R.28. Cuantificación del diámetro de células de melanoma murino mediante citometría de flujo. Se tomaron muestras de las células adheridas a los pocillos a 24, 48 y 72 horas post tratamiento. Los datos están representados como la media \pm DE de 3 réplicas experimentales independientes. La cantidad de DOX@MSNPs en μg fue ajustada para añadir una concentración final de DOX de $1\mu\text{g}/\text{ml}$.

Los estudios de morfología celular se completaron con estudios de viabilidad celular mediante ensayo MTT y conteo de células vivas mediante citometría de flujo 24, 48 y 72 horas post tratamiento.

En la Figura R.29 se muestran los resultados del ensayo MTT a los 3 tiempos de incubación para el fármaco libre a ambas concentraciones y las DOX@MSNPs. Se puede observar que todos los tratamientos inducen citotoxicidad en los cultivos celulares de manera progresiva con el tiempo. Sin embargo, existe una gran diferencia entre la DOX libre a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ con respecto a los otros 2 tratamientos, encontrándose la mayor diferencia a las 72 horas. A este tiempo, solo quedan un $2,7 \pm 0,9$ % de células viables tras un tratamiento con DOX libre a dicha concentración. Sin embargo, en células tratadas con DOX libre a una concentración de 0,3 $\mu\text{g/ml}$, quedan un 17 ± 1 % de células viables. Para las partículas, a las 72 horas de incubación, la viabilidad se reduce a un $26 \pm 5,4$ %. Esta reducción en la viabilidad está más equiparada a la de la DOX libre a una concentración de 0,3 $\mu\text{g/ml}$, aunque sigue siendo superior, probablemente debido a que el fármaco libre se incorpora más rápido en las células que las DOX@MSNPs.

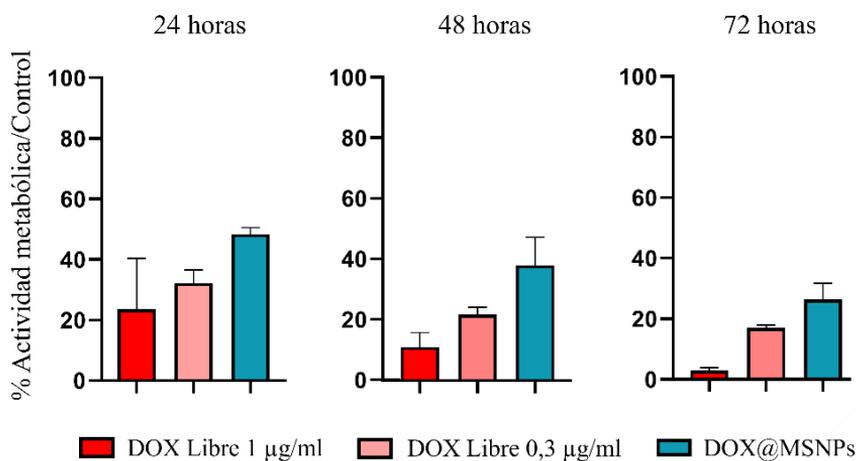


Figura R.29. Análisis de la viabilidad de células de melanoma murino mediante ensayo MTT. Se analizó la viabilidad 24, 48 y 72 horas post tratamiento. Los datos se representan como diagramas de barras donde se muestra la media \pm DE de 3 réplicas experimentales independientes. La cantidad de DOX@MSNPs en μg fue ajustada para añadir una concentración final de DOX de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Con respecto al conteaje de células vivas mediante citometría de flujo, se analizó la cantidad de células vivas que quedaban en cada pocillo después de 24, 48 y 72 horas de incubación con los distintos tratamientos.

En la Figura R.30 se muestra el número medio de células vivas a cada tiempo para cada grupo experimental. El número de células en el grupo no tratado y en el grupo tratado con MSNPs control (sin fármaco) aumenta con el tiempo, alcanzando su máximo a tiempo final de 72 horas de incubación. Por otro lado, el número de células tratadas con DOX libre a 1 $\mu\text{g/ml}$ disminuye significativamente con el tiempo, tal y como se observó con el ensayo MTT. Para este tratamiento se observa una disminución en el número de células desde el inicio del tratamiento y a las 72 horas este número es prácticamente 0. Por otro lado, el número de células en los pocillos tratados con DOX@MSNPs se mantiene estable durante las primeras 24 horas y comienza a disminuir a las 48 horas, alcanzando su mínimo a las 72 horas. Finalmente, las células tratadas con DOX libre a 0,3 $\mu\text{g/ml}$ presentan la misma tendencia que las tratadas con las partículas.

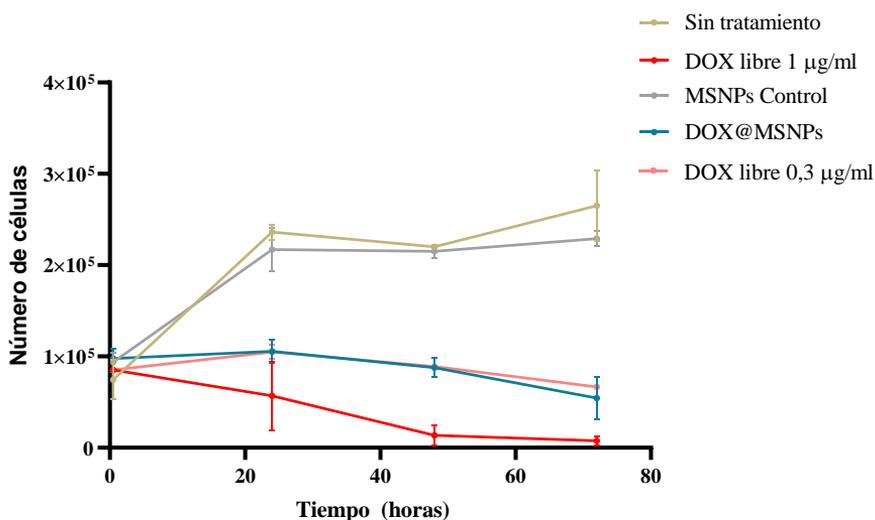


Figura R. 30. Análisis de la viabilidad de células de melanoma murino mediante citometría de flujo. Se analizó el conteaje de células vivas 24, 48 y 72 horas post tratamiento. Los datos se representan como la media \pm DE de 3 réplicas experimentales independientes. La cantidad de DOX@MSNPs en μg fue ajustada para añadir una concentración final de DOX de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Finalmente, para comprender por qué las células que se someten a un tratamiento con DOX libre a una baja concentración o a DOX encapsulada en MSNPs presentan ese comportamiento *in vitro* tan peculiar (crecimiento retardado con progresiva muerte celular y un tamaño celular aumentado), frente al comportamiento de las células tratadas con DOX libre a una mayor concentración, se llevó a cabo un estudio, mediante citometría de flujo, de los cambios en el ciclo celular a las 24 horas post tratamiento. Se analizaron los cambios a las 24 horas ya que es el tiempo en el cual el 100% de las células han internalizado los tratamientos, y se empiezan a observar los cambios en la proliferación celular y el aumento de tamaño.

Mediante este análisis (Figura R.31) se pudo observar, que, en las células tratadas con la DOX libre a 0,3 $\mu\text{g/ml}$ y con DOX@MSNPs, además de un aumento en la apoptosis con respecto a las células sin tratar, se producía un cambio en el perfil del ciclo celular, con una disminución en la fase G1 y aumento de la fase G2/M. Mientras que en las células sin tratamiento la fase G2/M ronda el 17%, esta fase representa un 49% para las células tratadas con DOX libre a 0,3 $\mu\text{g/ml}$ y alrededor del 43% para las tratadas con DOX@MSNPs. Esto implica que, dichas células se encuentran en una parada en la fase del ciclo celular en G2/M, no se dividen y por ello, presentan un tamaño celular aumentado con respecto a las células sin tratar.

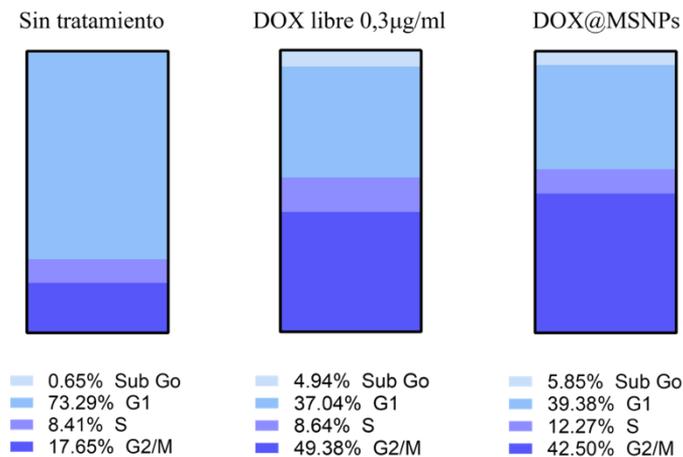


Figura R.31. Análisis del ciclo celular en células de melanoma murino mediante citometría de flujo. Cambios en el ciclo celular 24 horas post tratamiento. Se observa una parada del ciclo en G2/M para las células tratadas con DOX libre a 0,3 $\mu\text{g/ml}$ y DOX encapsulada. La cantidad de DOX@MSNPs en μg fue ajustada para añadir una concentración final de DOX de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados obtenidos en este apartado sugieren que los efectos de la DOX dependen de la dosis. Está reportado en la bibliografía que, la toxicidad inducida por el tratamiento con agentes quimioterápicos como la DOX, depende tanto de la dosis como del tiempo de exposición. Altas concentraciones de fármaco o tiempos largos de exposición promueven la apoptosis celular debido a la rápida difusión de la DOX al interior celular. Este fenotipo es el que se observa en los resultados anteriores con una exposición de las células de melanoma murino a una concentración de fármaco libre de 1 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, cuando se cambian las condiciones del tratamiento, por ejemplo, disminuyendo la dosis, la DOX es capaz de inducir otro fenotipo, que implica un aumento del tamaño celular debido a una parada en fase G2/M del ciclo celular. Este fenotipo es el que se observa cuando se exponen las células a una concentración de fármaco libre de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ o a DOX@MSNPs [35,201–204]. Aunque las DOX@MSNPs se añaden a los cultivos celulares para tener una concentración final de DOX de 1 $\mu\text{g/ml}$, la liberación del fármaco sostenida en el tiempo hace que la disponibilidad de fármaco libre al final sea menor. Por lo tanto, en cultivos celulares, las partículas no van a tener el mismo efecto citotóxico que el fármaco libre a la misma concentración [205]. La importancia de encapsular el fármaco y ver un efecto mejorado con respecto al fármaco libre, se pondrá de manifiesto en los experimentos *in vivo*. Esta citotoxicidad temprana de la DOX libre conduce a varios efectos secundarios *in vivo* que podrían reducirse mediante el uso de DOX@MSNPs dirigidas al TME a través del ligando PA17.

4.4.5. Funcionalización del nanosistema con la proteína ligando PA17

Después de encapsular el fármaco DOX en las MSNPs sintetizadas y evaluar su comportamiento en cultivos celulares, se llevó a cabo el estudio de la funcionalización con la proteína ligando PA17. La proteína unida a la superficie de las DOX@MSNPs se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE. Los resultados de dicha funcionalización se muestran en la Figura R.32.

Durante el protocolo de funcionalización se observó una pérdida de la DOX encapsulada dentro de las MSNPs, que se cuantificó mediante fluorimetría y se estimó en $12,6 \pm 6,5 \mu\text{g}$ por cada mg de DOX@MSNPs@PA17. Esta cantidad se

tuvo en cuenta a la hora de llevar a cabo los experimentos *in vitro* e *in vivo* y así poder igualar la cantidad de fármaco encapsulado frente al fármaco libre.

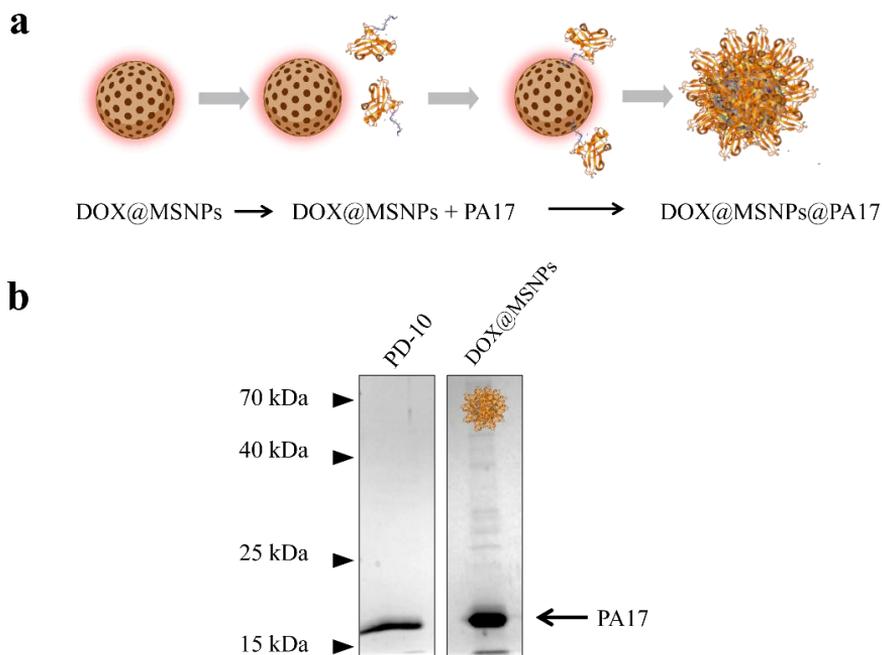


Figura R.32. Funcionalización de DOX@MSNPs con la proteína ligando PA17. (a) Esquema general del proceso de biofuncionalización electrostática del nanosistema. (b) Gel de SDS-PAGE donde se muestra la proteína purificada y la proteína PA17 unida a la superficie de las DOX@MSNPs. Proteína correspondiente a 100 µg de DOX@MSNPs.

4.4.5.1. Cambios en la cinética de disolución y liberación de doxorubicina inducidos por el ligando PA17

Está descrito en la bibliografía que, el recubrimiento de la superficie de las MSNPs con diferentes sustancias o procesos como la calcinación, disminuyen la velocidad de disolución y/o liberación del cargo encapsulado [193]. Por ello, se decidió llevar a cabo el mismo estudio descrito en el apartado de Resultados 4.4.2, pero con las DOX@MSNPs@PA17.

Estas NPs parecen tener una cinética de disolución más lenta que las partículas desnudas (Figura R.33a). A las 2 horas de incubación, la presencia de una superficie rugosa no es tan evidente y las partículas muestran un mayor contraste

en las imágenes de TEM, indicando un estado de disolución menos avanzado. A las 6 horas de incubación se observa una capa externa con más contraste que el interior de las partículas, indicando que podría tratarse de una disolución desde dentro hacia afuera. Esto significa que el núcleo de la MSNP se degrada antes que la superficie, que permanece protegida por la capa formada por la proteína ligando. La biocorona de PA17 adsorbida en la superficie de las MSNPs forma una capa limitante de difusión que conduce a la formación intermedia de partículas estructuradas núcleo-cubierta tras la disolución [190]. Además, son más estables en condiciones fisiológicas, como se ve en las imágenes tomadas a las 24 horas de incubación, donde aún se observan partículas completas. Esta diferencia en la disolución de las partículas recubiertas con proteína puede resultar ventajoso a la hora de emplearlas como agentes de administración de fármacos.

Por otro lado, el perfil de liberación de la DOX en estas MSNPs es igual que el de las MSNPs desnudas. La cantidad de fármaco en masa liberada de las partículas recubiertas con proteína ligando PA17 es menor que la de las partículas desnudas (Figura R.33b, panel superior), debido a la cantidad de fármaco que se pierde tras el proceso de funcionalización. Si se representa la liberación en porcentaje (Figura R.35b, panel inferior) se puede observar que la liberación de fármaco es ligeramente inferior que para las partículas desnudas, alcanzando un máximo de $40,9 \pm 3,8\%$ frente al $45,6 \pm 4,3\%$ que se observaba en la Figura R.27. Aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa, podría estar ocasionada por la diferencia en la cinética de disolución de las partículas al recubrir la superficie y modificar el mecanismo de disolución.

Estos resultados ponen de manifiesto que la biocorona formada por la proteína ligando PA17 no impide la liberación de DOX desde las MSNPs y sugieren que el sistema DOX@MSNPs@PA17 podría usarse como un agente antitumoral efectivo en experimentos *in vivo*.

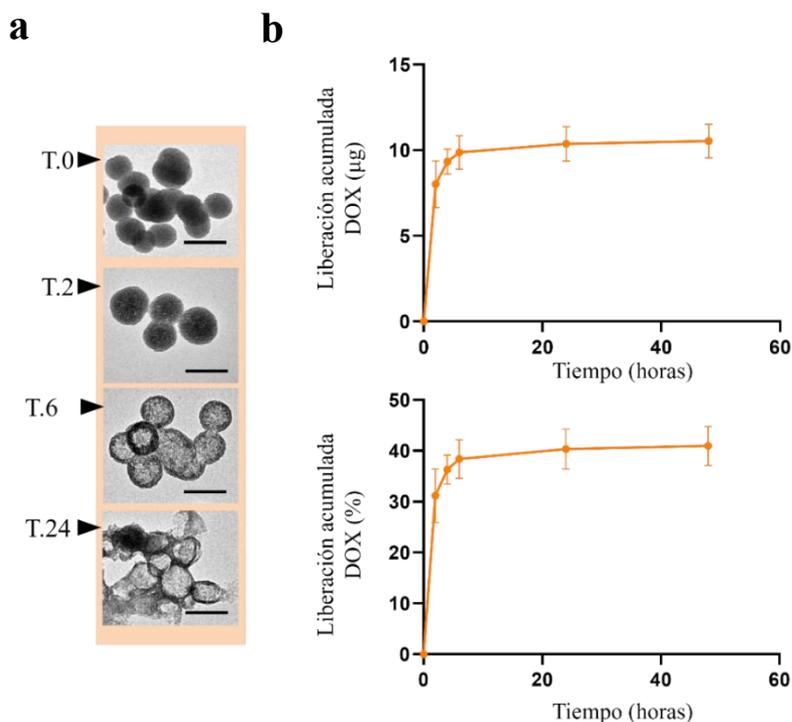


Figura R.33. Disolución de DOX@MSNPs@PA17 y liberación del fármaco en medio fisiológico. (a) Imágenes representativas de TEM del proceso de disolución de las DOX@MSNPs@PA17. Barra de escala = 100 nm. (b) Perfiles de liberación de la DOX en función del tiempo de las DOX@MSNPs@PA17, en masa (μg) y en porcentaje (%) con respecto a la cantidad encapsulada. Los datos están representados como la media \pm DE de 3 réplicas experimentales independientes. Tanto para las imágenes de disolución como para la liberación, la concentración de partículas se mantuvo a 1 mg/ml, y los experimentos se realizaron en PBS 1X, pH 7,4 y 37°C.

4.5. Actividad antitumoral del nanosistema en el tratamiento local de melanoma murino

Una vez caracterizado el comportamiento del nanosistema en cultivos celulares y su correcta funcionalización con la proteína ligando PA17, **el quinto objetivo de este trabajo consistió en estudiar su efecto antitumoral en el tratamiento local de melanoma maligno murino.** Según la hipótesis propuesta, en este modelo, donde se expresa el receptor TEM8 en el TME, las DOX@MSNPs recubiertas con el ligando PA17, tendrán un efecto quimioterapéutico mayor que las partículas sin recubrir y que el fármaco libre.

Para lograr dicho objetivo, se empleó el modelo de melanoma subcutáneo en ratones neonatos CD1 descrito en la sección de Materiales y Métodos 3.4.2.1. El protocolo que se siguió está descrito en la Figura MM.12. Brevemente, 7 días después del trasplante de células de melanoma, las crías de cada camada fueron divididas de forma aleatoria en 4 grupos de tratamiento: (i) inyectados PBS como grupo control, (ii) inyectados con DOX libre, (iii) inyectados con DOX@MSNPs e (iv) inyectados DOX@MSNPs@PA17. Los tratamientos se administraron intratumoralmente una única vez, sacrificándose los animales a las 72 horas después de aplicar el tratamiento. La concentración de DOX libre fue establecida en 2,5 mg/kg por inyección y la cantidad de DOX@MSNPs y DOX@MSNPs@PA17 fue ajustada para equiparar la cantidad final de DOX. Tras la disección de los tumores, se analizó su peso, normalizándose frente al grupo control (PBS) para cada camada (Figura R.34).

La cuantificación de los pesos tumorales reveló un efecto significativo de los tratamientos con DOX. Como era esperable, los tumores de los cuatro grupos experimentales crecieron con el tiempo. Sin embargo, los tumores en los tres grupos tratados crecieron significativamente menos que en el grupo control inyectado con PBS. Si se considera que en el grupo control el peso de los tumores ha alcanzado el 100% (que se corresponde con un peso medio de $304 \pm 148,7$ mg), el grupo tratado con DOX libre y el grupo tratado con DOX@MSNPs crecieron aproximadamente lo mismo, un $58 \pm 20,6\%$ y un $53,4 \pm 20,6\%$, respectivamente. El grupo tratado con DOX@MSNPs@PA17, sin embargo, creció un $35,2 \pm 17,1\%$. Esto implica que las DOX@MSNPs funcionalizadas con la proteína ligando han conseguido reducir en un 65% el crecimiento tumoral.

Aunque todos los tratamientos han sido administrados de forma local, se observan resultados muy diferentes en la inhibición tumoral. La hipótesis es que los tumores están altamente vascularizados. Por lo tanto, como el fármaco tiene un alto coeficiente de difusión, y las DOX@MSNPs tienen un pequeño tamaño, se espera que, después de la inyección intratumoral de los tratamientos, gran parte se pierda debido a la rápida difusión hacia los vasos sanguíneos [206,207]. Por otro lado, las DOX@MSNPs@PA17 presentarían el mejor efecto antitumoral debido a tres posibles factores. Primero, a que la propia proteína ligando tiene efecto antitumoral, como se mostró anteriormente en la Figura R.22. Segundo, a que este ligando interacciona con el receptor TEM8, por lo que las DOX@MSNPs son capaces de permanecer en el TME durante más tiempo. Tercero, a que el fármaco se libera de forma extendida en el tiempo, favoreciendo

así la no difusión fuera del tumor. Estos resultados ponen de manifiesto que la proteína recombinante PA17, además de tener una actividad antitumoral intrínseca cuando es administrada intratumoralmente, es capaz de mejorar el efecto antitumoral del fármaco encapsulado.

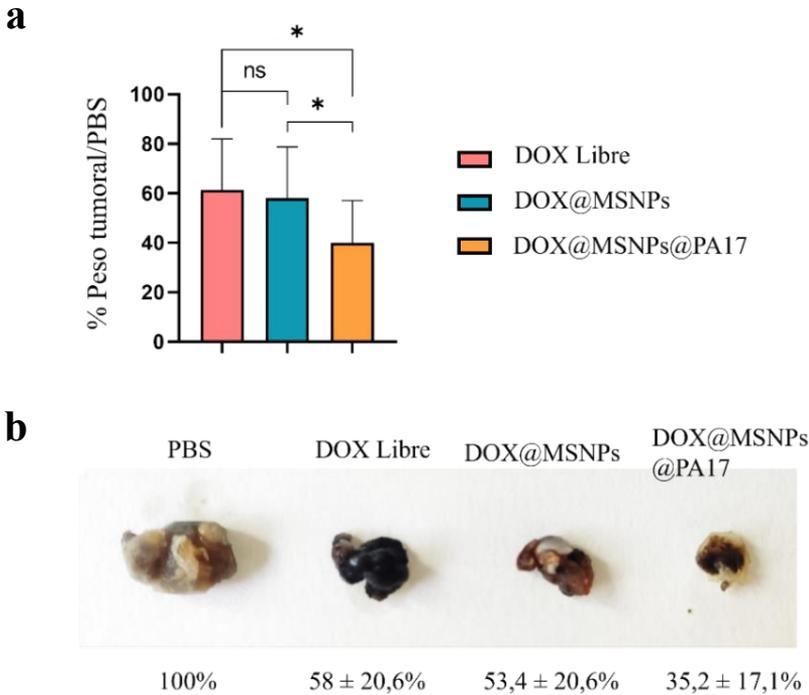


Figura R.34. Actividad antitumoral del nanosistema dirigido administrado intratumoralmente frente al nanosistema sin dirigir y al fármaco libre. (a) Diagramas de barra (media \pm DE) del porcentaje del peso tumoral de cada grupo experimental en relación con el grupo control (establecido en el 100%) de 9 experimentos independientes ($n=15$ PBS; 13 DOX libre; 15 DOX@MSNPs; 15 DOX@MSNPs@PA17). p -valor para la prueba de Brown-Forsythe y Welch ANOVA = 0,01. p -valores para la post-hoc de Games-Howell's indicados con asteriscos: (valores de p : (ns) = 0,91; (*) = 0,02; (*) = 0,04). La concentración de DOX se estableció en 2,5 mg/kg de ratón. La cantidad de DOX@MSNPs y DOX@MSNPs@PA17 en μ g fue ajustada para añadir esta concentración final de DOX. (b) Tumores sólidos de melanoma representativos de cada grupo experimental, tratados con una sola inyección intratumoral, diseccionados 72 horas después del tratamiento.

4.5.1. Histopatología de los tumores tratados localmente

En el estudio histopatológico de los tumores que se llevó a cabo, se observaron cambios en la morfología celular muy claros inducidos por los 3 tipos de tratamientos (Figura R.35).

Mientras que los tumores control (Figura R.35a) están formados por masas tumorales densas constituidas por células homogéneas, los tumores tratados (Figura R.35b, c, d) están constituidos por masas de células menos densas y heterogéneas. Se pueden observar células tumorales activas (más de 1 nucleolo, Figura R.35e), que presentan un tamaño celular aumentado con respecto a los tumores control. Estos resultados son muy similares a los que se observaron en el modelo de células de melanoma murino *in vitro* tratadas con DOX libre a una baja concentración y con DOX@MSNPs: células con un gran tamaño, que duplican el ADN, pero no se dividen, pues tienen bloqueado el ciclo celular en la fase G2/M.

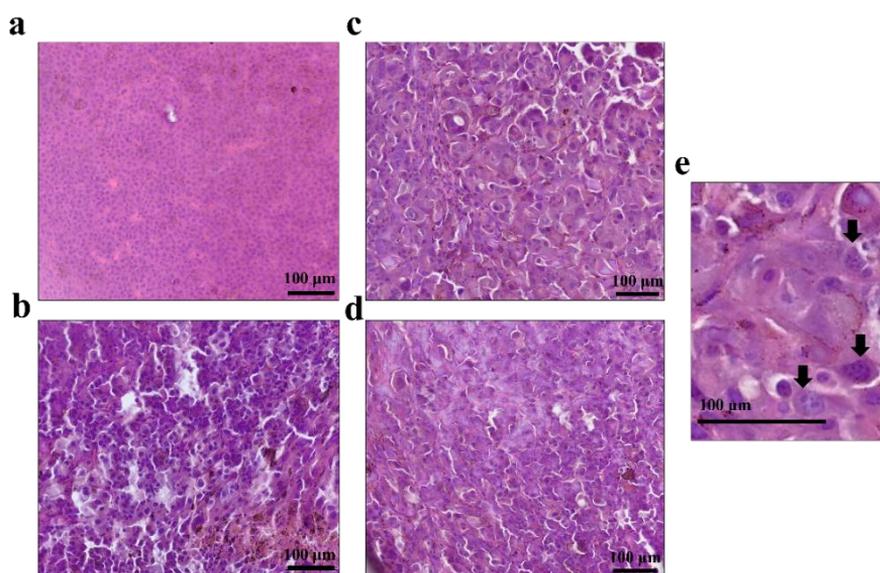


Figura R.35. Evaluación de la histopatología en tumores de melanoma subcutáneos tras un tratamiento intratumoral. Secciones de hematoxilina-eosina de los tumores (a) control, (b) tratados con DOX libre, (c) tratados con DOX@MSNPs y (d) tratados con DOX@MSNPs@PA17. En los tumores tratados se observa un claro fenotipo, donde las células tumorales presentan un tamaño aumentado con respecto a las células tumorales sin tratar. (e) Sección extraída de (a) donde se muestran, con flechas negras, las células con más de 1 nucleolo. Barra de escala = 100 µm.

4.6. Efecto antitumoral del nanosistema en el tratamiento intravenoso de melanoma murino

Gracias al estudio del efecto antitumoral del nanosistema en un sencillo modelo *in vivo* de melanoma murino, se ha puesto de manifiesto el potencial que tiene su recubrimiento con el ligando recombinante PA17 en la inhibición del crecimiento tumoral. Por ello, **el sexto objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto antitumoral de este nanosistema cuando se aplicaba de forma intravenosa en modelos de melanoma murino más complejos.**

Para lograr dicho objetivo, por su simplicidad y la facilidad de obtener una n de ratones adecuada, se empleó el modelo de melanoma subcutáneo en ratones adultos descrito en la sección de Materiales y Métodos 3.4.2.2. El protocolo que se siguió está descrito en la Figura MM.13. Brevemente, 6 días post trasplante de células tumorales, los ratones fueron divididos aleatoriamente en los grupos experimentales: (i) inyectados con PBS como grupo control, (ii) inyectados con DOX libre, (iii) inyectados con DOX@MSNPs e (iv) inyectados DOX@MSNPs@PA17. Se administraron de forma intravenosa a días 6, 8 y 10 post trasplante de células de melanoma. A las 48 horas después de aplicar el último tratamiento, los ratones fueron sacrificados. Se analizó el peso de los tumores y se normalizó frente al grupo control tratado con PBS para cada experimento. Para evaluar el posible efecto adverso del tratamiento intravenoso con estas NPs, se monitorizó el peso de los ratones durante todo el experimento. Es importante destacar que, en este experimento, la concentración de fármaco libre se determinó en función de la masa máxima de DOX@MSNPs que se podía administrar intravenosamente, determinándose en 1,5 mg/kg por inyección.

Tal y como se puede observar en la Figura R.36a, considerando el peso de los tumores del grupo control como el 100% (que se corresponde con tumores de $606,4 \pm 186,4$ mg), los tumores sólidos subcutáneos tratados con DOX libre de forma intravenosa a dicha concentración, crecen un $85,3 \pm 31,3\%$. Por otro lado, los ratones tratados con DOX@MSNPs presentan un crecimiento tumoral del $67,6 \pm 14,8\%$. Esto implica una reducción de casi el 20% con respecto al tratamiento intravenoso de fármaco libre, poniendo de manifiesto las ventajas reales de emplear un fármaco encapsulado frente al fármaco libre. Finalmente, en los ratones tratados con DOX@MSNPs@PA17, el peso de los tumores alcanza un $45 \pm 19,6\%$ en comparación al grupo control. Como se puede observar en la Figura R.36c, ninguno de los tratamientos indujo cambios aparentes en el peso de los ratones a lo largo del tratamiento.

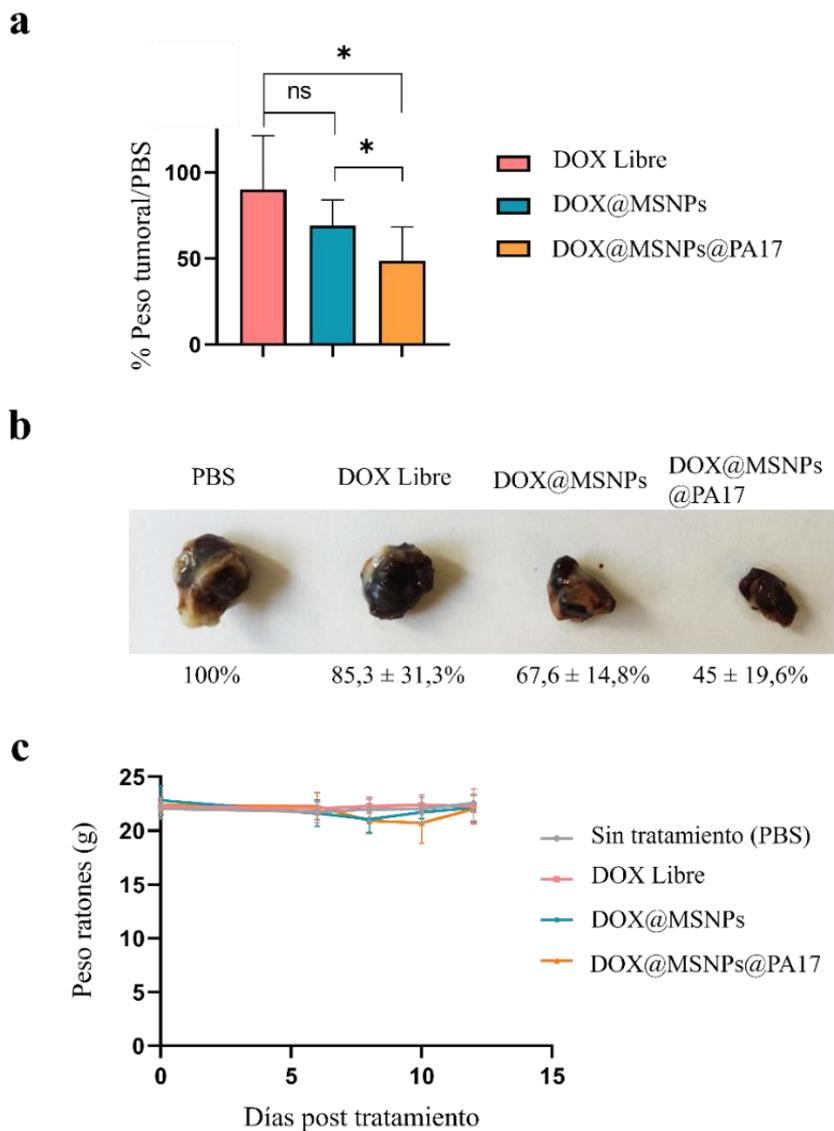


Figura R.36. Actividad antitumoral del nanosistema tras su administración intravenosa. (a) Diagramas de barra (media \pm DE) que muestran el porcentaje del peso tumoral de cada grupo experimental en relación con el grupo control, establecido en el 100% de 5 experimentos independientes ($n=13$ PBS; 9 DOX libre; 13 DOX@MSNPs; 15 DOX@MSNPs@PA17). p -valor para la prueba Brown-Forsythe y Welch ANOVA = 0,003/0,007. Los p -valores de la prueba post-hoc Games-Howell's se indican con asteriscos: (valores de p : (ns) = 0,21; (*) = 0,01; (*) = 0,04). La concentración de DOX se estableció en 1,5 mg/kg de ratón. (b) Tumores sólidos de melanoma representativos de cada grupo experimental, diseccionados 48 horas después del último tratamiento. (c) Monitorización del peso de los ratones en cada grupo experimental durante los días de tratamiento.

Aunque la concentración inicial de DOX encapsulada dentro de las MSNPs equivale a la del fármaco libre, se observa una inhibición tumoral más eficiente. La diferencia en la inhibición de la progresión tumoral entre el fármaco libre y encapsulado sin direccionamiento reside en que, tras una administración sistémica, la DOX libre se distribuye rápidamente en los tejidos, por lo que sus niveles en sangre caen rápido. Por lo general, tras una administración sistémica de este fármaco, se produce una acumulación en muchos órganos, incluyendo el corazón, el riñón y el hígado, produciéndose diversos efectos adversos [208,209]. Sin embargo, debido al efecto EPR causado por un aumento de la presión vascular en la neovasculatura, las DOX@MSNPs se acumulan en los tumores aunque no presenten un direccionamiento [21]. Por otro lado, el direccionamiento de las DOX@MSNPs@PA17 hacia el TME mediante su funcionalización con un ligando específico con actividad antitumoral intrínseca, y por otro, la liberación controlada del fármaco encapsulado, consiguen un efecto terapéutico mejorado con respecto a los otros 2 tratamientos.

Los resultados obtenidos en este apartado resultan muy prometedores en relación al direccionamiento de nanosistemas al TME a través del receptor TEM8. Aunque existen estudios donde se han empleado variantes modificadas de la proteína PA como agente antitumoral, hasta la fecha, no existen estudios donde se emplee para direccionar nanomedicinas al TME.

4.6.1. Histopatología de los tumores con tratamiento intravenoso

Al evaluar las características histopatológicas de los tumores tratados de forma intravenosa, se observó un claro fenotipo, diferente al que se observó con el tratamiento intratumoral (Figura R.37).

El fenotipo más visible es la presencia de focos de necrosis. Estos focos son reconocibles ya que se ve la acumulación de células poli-nucleadas con roturas de estos núcleos. Algunos de estos focos se encuentran alrededor de vasos sanguíneos, diana de las NPs dirigidas y punto de llegada y liberación de los tratamientos. En los tumores tratados con DOX libre, los focos de necrosis son pocos y de pequeño tamaño. La morfología celular no difiere significativamente con respecto al grupo control. Sin embargo, en los tumores tratados con DOX@MSNPs y DOX@MSNPs@PA17, es más abundante la presencia de estos focos de necrosis y son de mayor tamaño. Además, se observa la presencia de

células de aspecto aumentado, como ocurría en el caso de los tratamientos intratumorales.

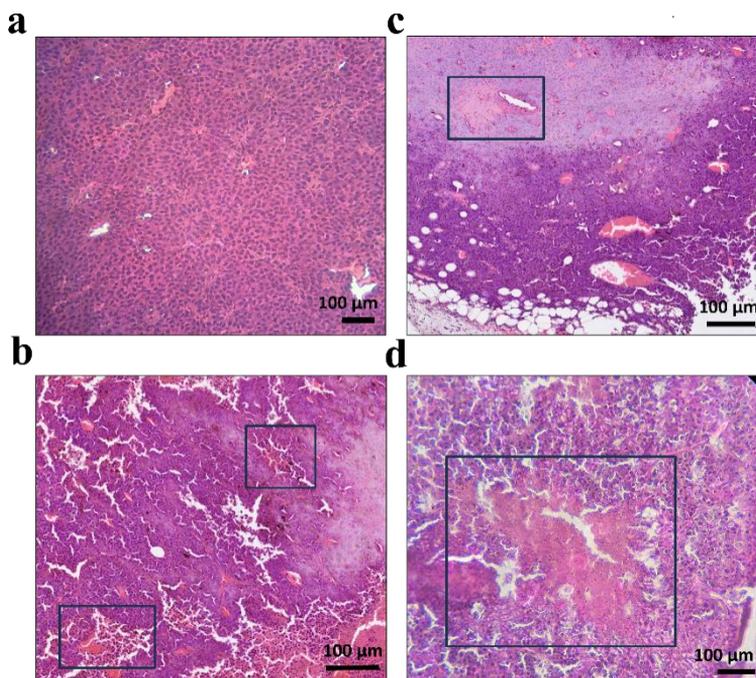


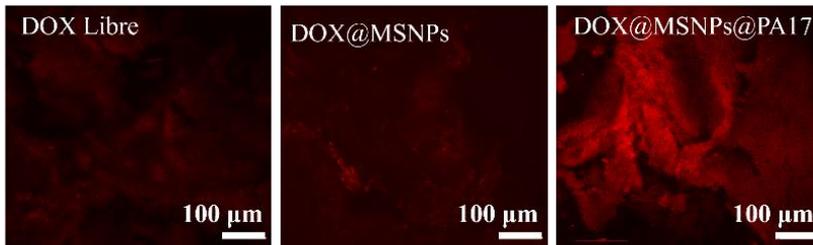
Figura R.37. Evaluación de la histopatología de los tumores de melanoma subcutáneos tratados vía intravenosa. Secciones de hematoxilina-eosina de los tumores (a) control, (b) tratados con DOX libre, (c) tratados con DOX@MSNPs y (d) tratados con DOX@MSNPs@PA17. En los tumores tratados se observa un claro fenotipo de focos de necrosis (recuadros negros), que son más grandes y abundantes en el grupo tratado con DOX@MSNPs dirigidas con la proteína ligando. Barra de escala = 100 μm .

Para saber si este fenotipo se asociaba a la mayor acumulación de DOX en el TME se llevó a cabo la valoración semicuantitativa de la fluorescencia correspondiente con la DOX mediante imagen empleando microscopía confocal (Figura R.38) [210–212]. Se examinaron los tumores con distintos tratamientos obtenidos tras el sacrificio de los animales (48 horas después del último tratamiento).

La Figura R.38a muestra imágenes de microscopía confocal de fragmentos de los tumores frescos obtenidas con ajustes idénticos para poder comparar sus emisiones en el canal rojo, representativas de la cantidad de DOX. La

Figura R.38b presenta la cuantificación de la emisión fluorescente capturada en secciones al azar de cada condición. Se puede observar que la emisión de fluorescencia en los tumores tratados con DOX libre, así como con DOX@MSNPs, es similar, pero es significativamente mayor en los tratados con DOX@MSNPs@PA17. Estos resultados corroboran la eficiencia antitumoral mejorada de las DOX@MSNPs funcionalizadas y dirigidas al TME con la proteína ligando PA17.

a



b

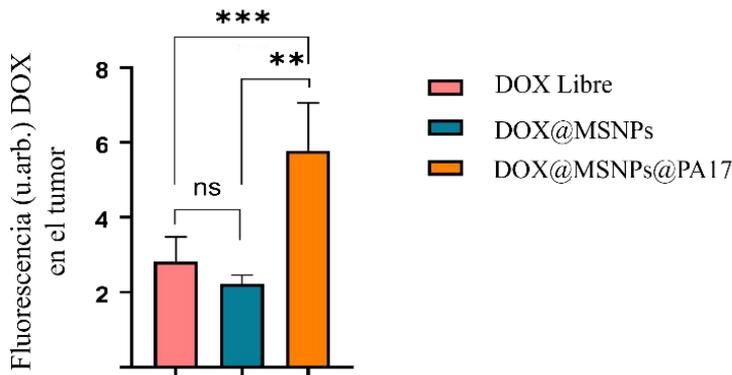


Figura R.38. Detección de DOX en los tumores 48 horas tras el tratamiento intravenoso. (a) Imágenes de microscopía confocal representativas de la fluorescencia correspondiente a la DOX del TME. Barra de escala = 100 µm. (b) Diagramas de barra (media ± DE) de la cuantificación de la fluorescencia roja en los 3 grupos experimentales. $n=7$ por grupo. p -valor para la prueba Brown-Forsythe y Welch ANOVA $< 0,001$. Los p -valores para la prueba post-hoc Games-Howell's se indican con asteriscos: (valores de p : (ns) = 0,14; (*) = 0,001; (***) $< 0,001$).

4.6.2. Estudio de la neovascularización tumoral

Existen diversos estudios descritos en la bibliografía en los cuales, cuando se emplean NMs dirigidos hacia la vasculatura tumoral, se observa una disminución significativa en el desarrollo tumoral acompañado de una reducción de la neovascularización en el estroma tumoral [170,213,214]. Los tumores sólidos no pueden crecer más de un tamaño de 2 mm³ sin una neovascularización que les proporcione oxígeno y nutrientes, por lo que la estrategia de destruir dicha vasculatura tumoral resulta clínicamente relevante en el tratamiento del cáncer [215].

Este estudio se realizó para demostrar que el tratamiento con DOX@MSNPs@PA17 afecta a la neovascularización tumoral y al TME, áreas hacia donde se dirige el nanosistema. Para evaluar la disminución inducida en la vasculatura intratumoral, se realizó la imagen por fluorescencia y cuantificación en secciones de parafina de los tumores teñidas con hematoxilina-eosina utilizando microscopía confocal. Los eritrocitos, localizados en los vasos sanguíneos, presentan una fluorescencia roja intensa cuando son examinados bajo láser de fluorescencia verde. Mediante ajustes específicos que permiten distinguir los eritrocitos del resto de tejido, se puede cuantificar la extensión de la vasculatura utilizando estos métodos de imagen.

El examen de las secciones tumorales (Figura R.39a) reveló una disminución en la cantidad de vasos en el estroma tumoral en ratones tratados con las DOX@MSNPs@PA17 frente a los ratones control (PBS) y tratados con DOX@MSNPs no dirigidas. La cuantificación de la vasculatura intratumoral (Figura R.39b) en las secciones histológicas confirmó una reducción significativa en la cantidad de vasos para los tumores tratados con DOX@MSNPs@DOXPA17.

Por lo tanto, esta disminución de la neovascularización en los tumores tratados con DOX@MSNPs funcionalizadas con el ligando PA17, junto con la destrucción de otras células de sostén del TME donde también se expresa TEM8, indican que el nanosistema sigue el comportamiento esperable de acuerdo con la hipótesis de su diseño, inhibiendo significativamente el desarrollo tumoral con respecto al grupo control, el fármaco libre y las DOX@MSNPs sin direccionamiento.

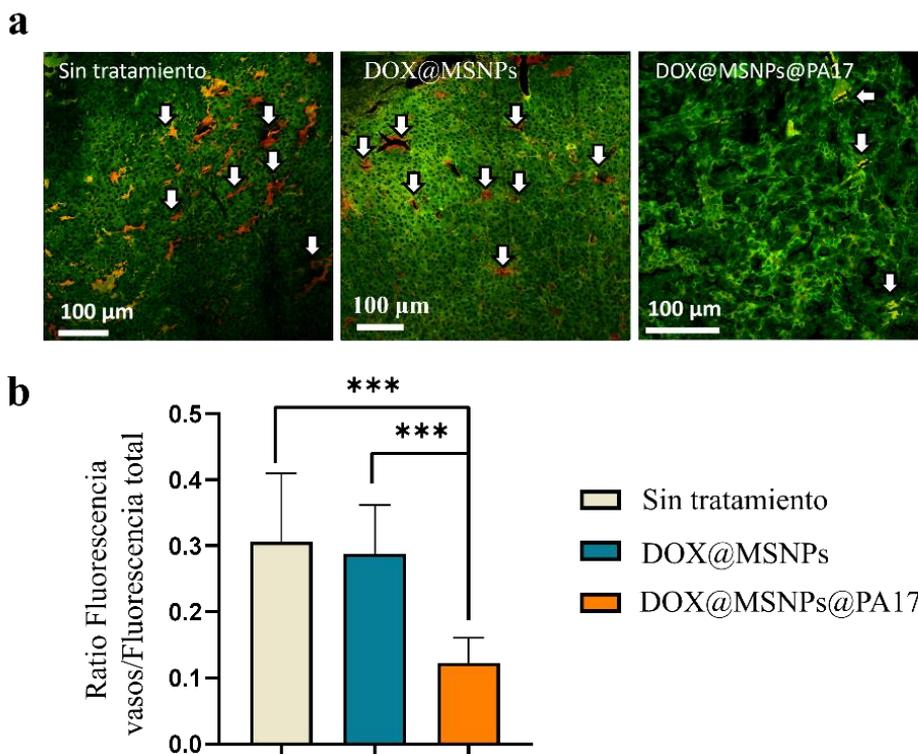


Figura R. 39. Estudio de la vasculatura intratumoral en tumores de melanoma murino subcutáneos. (a) Imágenes de microscopía confocal de las masas tumorales embebidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina. Los vasos sanguíneos (color rojo brillante) se encuentran señalados con flechas blancas. (b) Diagramas de barra (media \pm DE) de la cuantificación de la fluorescencia roja correspondiente a los vasos sanguíneos. Los datos se encuentran normalizados frente a la fluorescencia verde del estroma. p -valor ANOVA de una vía $< 0,001$. Los p -valores para el análisis post-hoc de Tukey se indican con asteriscos: (valores de $p:(***) < 0,001$). $n = 10$ por grupo.

4.7. El ligando PA17 es versátil y permite dirigir otro tipo de nanosistemas a tumores

El séptimo y último objetivo propuesto en esta tesis doctoral consistió en validar la versatilidad de la proteína ligando PA17 para el direccionamiento de otros nanosistemas al TME. Como nanosistema alternativo, se escogió una NP que se estaba desarrollando en el laboratorio por mi compañero Andrés Ramos Valle, en colaboración con el grupo de Química de Ácidos Nucleicos del Instituto de Química Avanzada de Cataluña.

Estas NPs de sílice compacta, sintetizadas por el método de Stöber modificado, incorporan en su interior un oligonucleótido que contiene múltiples unidades de 5-fluoro-2'-deoxyuridina (floxuridina o 5-FU). Este oligonucleótido, que en concreto consta de 10 unidades (FdU₁₀), ha demostrado una eficiencia mejorada en comparación a su administración en forma monomérica. Además, su incorporación en nanoformulaciones, ha demostrado una eficiencia *in vivo* mejorada en comparación al oligonucleótido libre [216–219]. En este estudio se conjugó el oligonucleótido al fluorocromo Cy5 (FdU₁₀-Cy5@SiO₂), lo cual permite detectar las NPs mediante técnicas de fluorescencia.

Los estudios de síntesis, encapsulación del FdU₁₀ en las partículas, comportamiento y efectos *in vitro*, se describen en la tesis de mi compañero Andrés Ramos Valle. Las NPs presentaron un diámetro medio de $209 \pm 5,1$ nm y un potencial ζ de $-28,2 \pm 2,3$ medido mediante DLS. Del mismo modo que actúa el fármaco quimioterápico floxuridina, estas NPs interfieren con la síntesis del ADN, impidiendo su replicación y provocando un arresto del ciclo celular en fase G0/G1. Para el direccionamiento de este nanosistema con la proteína ligando PA17, se procedió a su funcionalización siguiendo el protocolo de conjugación electrostática descrito en este trabajo (FdU₁₀-Cy5@SiO₂@PA17).

Para evaluar el efecto quimioterápico del nanosistema dirigido frente al nanosistema sin dirigir, se empleó el modelo de melanoma murino descrito en la sección de Materiales y Métodos 3.4.2.2. El protocolo para la administración de tratamientos se encuentra explicado en la Figura MM.13. Se establecieron 3 grupos experimentales: (i) ratones inyectados con PBS (grupo control), (ii) ratones inyectados con FdU₁₀-Cy5@SiO₂ y (iii) ratones inyectados con FdU₁₀-Cy5@SiO₂@PA17. Los tratamientos se administraron de forma sistémica a días 4, 7 y 10 de progresión tumoral y a las 48 horas después de aplicar el último tratamiento, los ratones fueron sacrificados. Se inyectaron 500 μ g de NPs por tratamiento. Se analizó el peso de los tumores, que se normalizó frente al grupo control para cada experimento y se evaluó la fluorescencia correspondiente a la acumulación de Cy5 mediante el IVIS®. Además, se monitorizó el peso de los ratones durante todo el experimento. Los resultados se encuentran reportados en la Figura R.40.

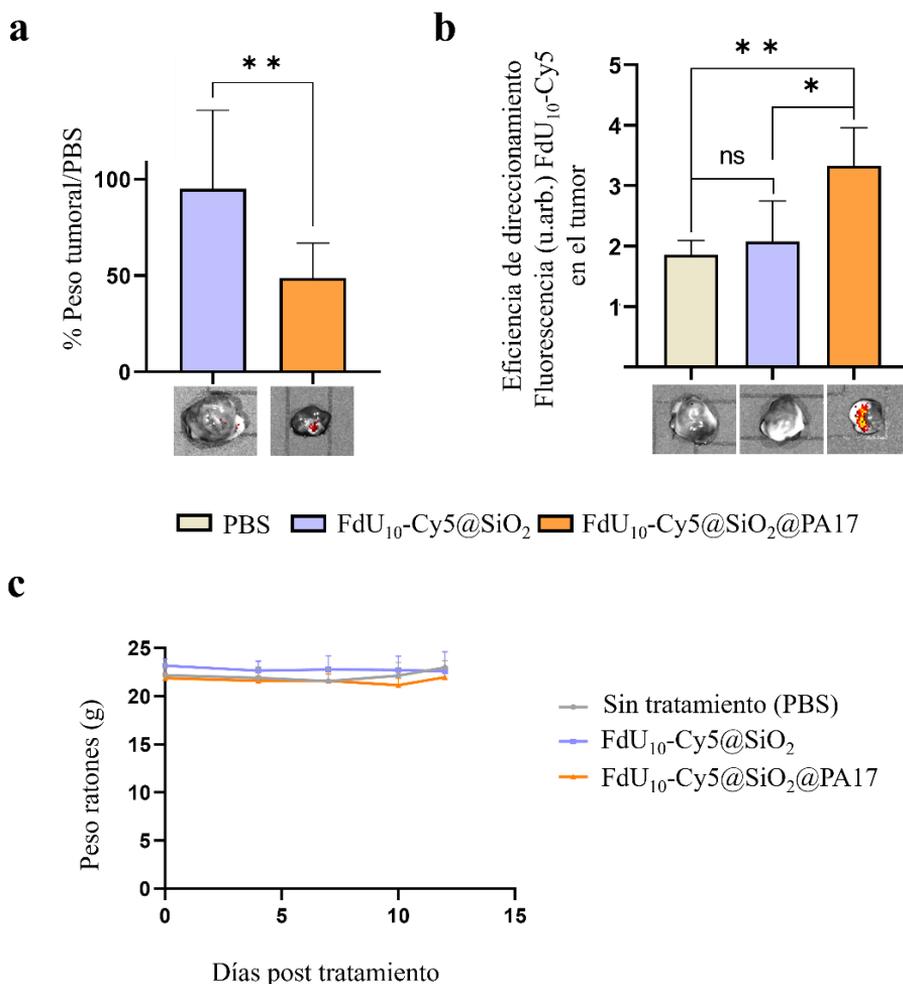


Figura R.40. Direccionamiento y actividad antitumoral del nanosistema FdU₁₀-Cy5@SiO₂@PA17 en un modelo de melanoma subcutáneo. (a) Diagramas de barra (media ± DE) del porcentaje del peso tumoral de cada grupo experimental en relación con el grupo control, establecido en el 100%. n=10 por grupo. p-valor para la prueba de Welch = 0,006. (b) Diagramas de barra (media ± DE) de la cuantificación de la fluorescencia total de los tumores mediante el IVIS®. n=5 por grupo. p-valor para la prueba de Brown-Forsythe y Welch ANOVA = 0,004/0,008. Los p-valores para la prueba post-hoc Games-Howell's se indican con asteriscos: (valores de p: (ns) = 0,78; (*) = 0,04; (**) = 0,01). (c) Monitorización del peso de los ratones en cada grupo experimental durante los días de tratamiento.

Como se puede observar en la Figura R.40a, las NPs FdU₁₀-Cy5@SiO₂ funcionalizadas con la proteína ligando muestran una reducción significativa en el crecimiento tumoral con respecto a las NPs FdU₁₀-Cy5@SiO₂ sin funcionalizar (48,6 ± 18 % vs 95 ± 40,6%). Estos resultados se explican por la mayor acumulación de las NPs funcionalizadas en los tumores, tal y como muestra la cuantificación de fluorescencia correspondiente al fluorocromo Cy5 en los tumores (Figura R.40b). Esta mayor fluorescencia en los tumores es a su vez un indicativo del correcto direccionamiento de las NPs FdU₁₀-Cy5@SiO₂ gracias a la proteína ligando PA17. Al igual que en los experimentos anteriores, se observó que ninguno de los tratamientos inducía cambios aparentes en el peso de los ratones durante el tiempo de tratamiento (Figura R.40c).

Finalmente, se localizó la fluorescencia correspondiente al FdU₁₀-Cy5 en los tejidos tumorales mediante microscopía confocal. Tras la disección, fragmentos de los tumores se sometieron a una IF *in vivo* frente al dominio extracelular del receptor TEM8. En la Figura R.41, se puede apreciar cómo la fluorescencia correspondiente a FdU₁₀-Cy5 (canal rojo) se encuentra difuminada por las regiones donde abunda el receptor TEM8 (canal verde).

Núcleos/TEM8/FdU₁₀-Cy5@SiO₂@PA17

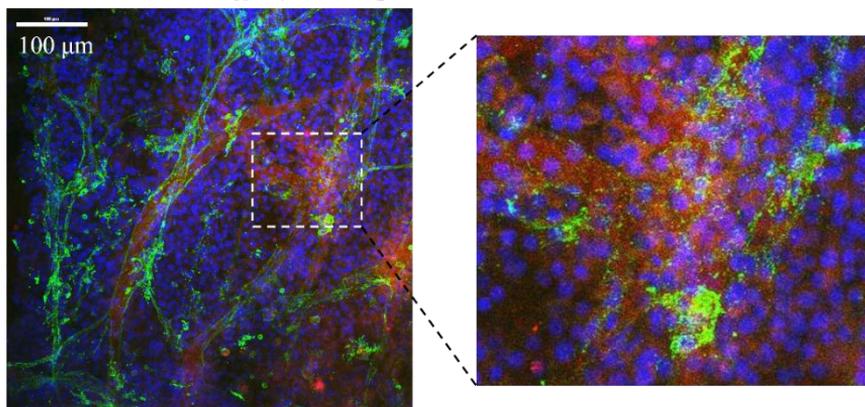


Figura R.41. Análisis de NPs FdU₁₀-Cy5@SiO₂@PA17 en tejido tumoral en relación con TEM8. Imagen representativa de microscopía confocal de los tumores tratados con NPs FdU₁₀-Cy5@SiO₂@PA17. Se muestra la IF de TEM8 en el TME (en verde). El oligonucleótido y algunas NPs sin disolverse se observan en el canal rojo.

Estos hallazgos sugieren que el ligando PA17 posee una versatilidad notable, permitiendo dirigir diversos tipos de nanosistemas hacia el TME. En este estudio,

se ha logrado una inhibición eficiente del desarrollo tumoral, independientemente del agente antitumoral encapsulado dentro de las NPs. Este resultado subraya la capacidad del péptido PA17 para potenciar la acumulación selectiva de las NPs en el entorno tumoral, lo cual es crucial para mejorar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios no deseados en tratamientos contra el cáncer. Así, el uso de ligandos como PA17 podría representar una estrategia prometedora para el diseño y la optimización de nanosistemas terapéuticos dirigidos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Se han diseñado, producido y purificado 4 proteínas recombinantes inspiradas en la secuencia y estructura del antígeno protector de la toxina del ántrax para el direccionamiento de nanopartículas al receptor de membrana TEM8. Éstas incorporan una secuencia policatiónica que permite su bioconjugación electrostática estable y orientada en la superficie de las nanopartículas.
2. Los ligandos diseñados muestran alta afinidad y especificidad por el receptor de membrana TEM8 en el modelo de sobreexpresión *in vitro* diseñado, siendo la proteína ligando PA17 la que mejores resultados ha mostrado. Este ligando ensambla una biocorona estable bajo condiciones fisiológicas manteniendo su afinidad por el receptor TEM8.
3. En modelos de melanoma murino, la proteína ligando PA17 inyectada de forma intravenosa muestra una alta especificidad por el microambiente tumoral, donde se expresa TEM8.
4. El ligando PA17 muestra actividad antitumoral intrínseca tanto a nivel local como administrada de forma intravenosa en modelos de melanoma murino subcutáneos.
5. El nanosistema de sílice mesoporosa portador de doxorubicina funcionalizado con la proteína ligando PA17 y dirigido específicamente al receptor TEM8 en tumores de melanoma murino subcutáneos, muestra una eficiencia terapéutica mejorada con respecto al nanosistema sin dirigir y al fármaco libre, administrado localmente o vía intravenosa.
6. La proteína ligando PA17 es versátil y permite el direccionamiento de otro tipo de nanopartículas portadoras de oligonucleótidos de floxuridina al microambiente tumoral, mostrando una eficiencia terapéutica mejorada con respecto al sistema sin dirigir.

PERSPECTIVAS FUTURAS

El estudio del receptor de membrana TEM8 como posible diana para el tratamiento del cáncer es muy novedosa. No fue hasta el año 2000 cuando se describió por primera vez el posible rol que desempeña en el microambiente tumoral (TME) [117]. Desde entonces, cada vez son más las publicaciones científicas que hacen alusión a este receptor, señalando sus posibles ventajas en comparación a otras dianas, debido, principalmente, a su especificidad en la neovascularización tumoral y otras células de sostén [87,90,120,160,167,175,220,221]. Actualmente, se trata de una diana que se encuentra implicada en ensayos preclínicos y clínicos [166].

Por ello, con el objetivo de dirigir de forma específica quimioterapias nanoencapsuladas al TME, nos hemos centrado en el diseño y caracterización de un ligando inspirado en la toxina del ántrax, el ligando PA17. Este ligando posee la mayoría de los residuos de interacción con TEM8, a excepción de 2, presentes en el DII del antígeno protector (PA). Al igual que está descrito en la bibliografía, este ligando ha demostrado tener actividad antitumoral intrínseca [175] tras su administración intratumoral y sistémica en modelos de melanoma murino. Sin embargo, sería interesante el diseño de nuevos mutantes de PA17 para aumentar su afinidad por TEM8. La toxina del ántrax no solo se une a TEM8, sino que también es capaz de unirse al receptor CMG2 (del inglés, *Capillary Morphogenesis Gene 2*). Aunque este receptor también se sobreexpresa en algunos tumores sólidos, tiene un patrón de expresión mucho menos específico que TEM8 [100,103,104,222,223]. Mediante mutaciones en residuos clave de PA, se pueden generar mutantes que tengan mayor afinidad por TEM8, para disminuir la posible inespecificidad cruzada por CMG2 [125, 224].

Por otro lado, se ha diseñado un nanosistema basado en MSNPs cargadas con DOX para ser dirigidas al TME a través del ligando PA17. Teniendo en cuenta que la limitación en el tratamiento intravenoso de melanoma murino fue la baja encapsulación de fármaco en el nanosistema, y, por ende, la cantidad de DOX@MSNPs que se pudieron administrar (1.5 mg/kg), se debería estudiar el uso de otro tipo de nanosistema, por ejemplo, basado en lípidos. Éstos, por lo general, son capaces de encapsular mayores cantidades de fármacos. De este modo, para mejorar aún más el efecto terapéutico observado en la Figura R.36, se podría aumentar la concentración de administración de la DOX hasta 2,5 mg/kg, a la vez que se reduce significativamente la cantidad en masa de NPs que hay que administrar. Aumentando la cantidad de DOX encapsulada podría inducir la apoptosis de las células del TME para evitar que entren en un estado de senescencia debido a la menor disponibilidad de fármaco. Aunque como se vio en los experimentos *in vitro* muchas de las células que entran en ese estado acaban

muriendo, algunas de ellas podrían generar resistencia a la apoptosis, favoreciendo un relapso tumoral [201].

Además, independientemente del tipo de NM que se elija, sería relevante estudiar la cantidad óptima de proteína ligando que se añade a la superficie de los NMs. Como se describió en la introducción, normalmente, estos ligandos se añaden en exceso, y esto puede provocar que la eficiencia de interacción entre el ligando y el receptor no sea óptima.

Por otra parte, sería conveniente realizar estudios de supervivencia de los ratones y evaluar el posible relapso tumoral después de las 3 administraciones sistémicas del nanosistema dirigido. En estos estudios habría que incluir el control de parámetros relevantes a nivel inmunológico tras la administración de los tratamientos. Está descrito en la bibliografía que la administración de PA que se emplea para lograr la inmunización de animales frente al ántrax, induce respuestas inmunes mediadas por linfocitos T [225–228].

Finalmente, con respecto a los modelos animales propuestos en esta tesis, cabe destacar que también se ha desarrollado un modelo de melanoma murino metastásico que recrea los modelos humanos de carcinomatosis peritoneal. Se trata de tumores primarios gastrointestinales (cáncer de colon o gástrico) o ginecológicos (cáncer de ovario) que tienen el potencial de metastatizar y crecer en la cavidad peritoneal. Cuando se trata de un cáncer de ovario epitelial, la metástasis peritoneal ocurre casi en un 100% de los casos. Actualmente no existen tratamientos demasiado efectivos y resulta muy complicado extirpar todo el tejido tumoral una vez se ha diseminado por toda la cavidad peritoneal. Esto conlleva a que, en algunos pacientes, las metástasis se vuelvan a desarrollar posteriormente. Se trata, por lo tanto, de un reto en la medicina actual [146-148].

Después de la caracterización del modelo tal y como se describió en la Figura MM.11, se estudió la expresión del marcador TEM8 en el TME. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal revelaron (Figura PF.1a) que este marcador también se expresaba en el modelo de melanoma murino metastásico, al igual que ocurría con los modelos subcutáneos. Este marcaje se correspondía con la neovascularización tumoral. Además, se llevó a cabo una mejora en la detección de la carga tumoral mediante el trasplante de células de melanoma murino que expresan de forma estable una proteína fluorescente roja (B16F10-RFP). Mediante la cuantificación de fluorescencia roja en sangre de ratones

portadores de melanoma peritoneal (Figura PF.1b), se podría reportar a tiempo real el crecimiento tumoral.

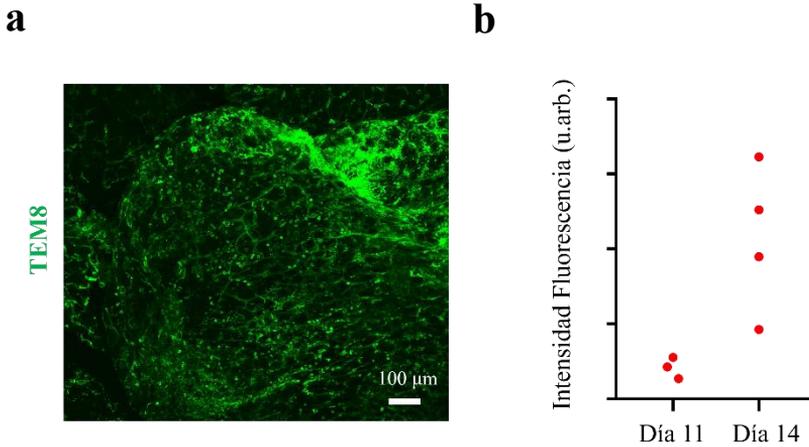


Figura PF.1. Modelo de melanoma murino metastásico: carcinomatosis peritoneal. (a) Imagen de microscopía confocal donde se muestra la IF del receptor TEM8 en el TME. Se observa el marcaje de la neovascularización tumoral. (b) Cuantificación de la fluorescencia en sangre de la proteína RFP en ratones portadores de melanoma metastásico, 11 y 14 días post trasplante celular. Cada ratón se muestra como un punto independiente.

Este nuevo modelo de melanoma metastásico, que resulta menos agresivo que el melanoma metastásico pulmonar, resultaría útil para estudiar el direccionamiento del nanosistema desarrollado en este trabajo o de otras terapias dirigidas a nivel sistémico.

Todos estos experimentos futuros podrían contribuir a la mejora de este estudio y estar un paso más cerca de la aplicabilidad en clínica de este trabajo a través del direccionamiento de nanomedicinas al tumoral TEM8 mediante el ligando PA17.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 93:52–79.
- [2] Wang J-J, Lei K-F, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22(12):3855-3864.
- [3] Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res* 2019; 79:4557.
- [4] Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther* 2021; 221:107753.
- [5] Mayer S, Milo T, Isaacson A, Halperin C, Miyara S, Stein Y, et al. The tumor microenvironment shows a hierarchy of cell-cell interactions dominated by fibroblasts. *Nature Communications* 2023; 14:1–17.
- [6] De Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell* 2023; 41:374–403.
- [7] Li Z, Zhang Z, Fang L, Zhao J, Niu Z, Chen H, et al. Tumor Microenvironment Composition and Related Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma* 2023; 10:2083–99.
- [8] Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas)* 2019; 30;56(1):15.
- [9] Jin MZ, Jin WL. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5:166.
- [10] Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling* 2020; 18:1–19.
- [11] Awad NS, Salkho NM, Abuwatfa WH, Paul V, AlSawaftah NM, Husseini GA. Tumor vasculature vs tumor cell targeting: Understanding the latest trends in using functional nanoparticles for cancer treatment. *OpenNano* 2023; 11:100136.
- [12] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144:646–74.

- [13] Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5:28.
- [14] Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77:1745–70.
- [15] Zhu D, Li Y, Zhang Z, Xue Z, Hua Z, Luo X, et al. Recent advances of nanotechnology-based tumor vessel-targeting strategies. *J Nanobiotechnology* 2021; 19:435.
- [16] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:401–10.
- [17] Krishna Priya S, Nagare RP, Sneha VS, Sidhanth C, Bindhya S, Manasa P, et al. Tumour angiogenesis-Origin of blood vessels. *Int J Cancer* 2016; 139:729–35.
- [18] Delgado-Bellido D, Serrano-Saenz S, Fernández-Cortés M, Oliver FJ. Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Molecular Cancer* 2017; 16:1–14.
- [19] Caro C, Avasthi A, Paez-Muñoz JM, Pernia Leal M, Garcia-Martin ML. Passive targeting of high-grade gliomas via the EPR effect: a closed path for metallic nanoparticles? *Biomater Sci* 2021; 9:7984–95.
- [20] Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, Kobayashi H. Nano-drug delivery: Is the enhanced permeability and retention (EPR) effect sufficient for curing cancer? *Bioconjug Chem* 2016; 27:2225.
- [21] Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *J Pers Med* 2021; 11(8):771.
- [22] Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J Cell Biol* 2010; 188:759–68.
- [23] Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020; 21:341–52.
- [24] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420.

- [25] Thews O, Riemann A. Tumor pH and metastasis: a malignant process beyond hypoxia. *Cancer Metastasis Rev* 2019; 38:113–29.
- [26] Nascentes Melo LM, Kumar S, Riess V, Szylo KJ, Eisenburger R, Schadendorf D, et al. Advancements in melanoma cancer metastasis models. *Pigment Cell Melanoma Res* 2023; 36:206–23.
- [27] Guo W, Wang H, Li C. Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6:424.
- [28] Mishra H, Mishra PK, Ekielski A, Jaggi M, Iqbal Z, Talegaonkar S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; 144:2283–302.
- [29] Testa U, Castelli G, Pelosi E. Melanoma: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Clonal Evolution and Tumor Initiating Cells. *Medical Sciences* 2017; 5:28.
- [30] Castro-Pérez E, Singh M, Sadangi S, Mela-Sánchez C, Setaluri V. Connecting the dots: Melanoma cell of origin, tumor cell plasticity, trans-differentiation, and drug resistance. *Pigment Cell Melanoma Res* 2023; 36:330–47.
- [31] Mollaei M, Hassan ZM, Khorshidi F, Langroudi L. Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? *Transl Oncol* 2021; 14:101056.
- [32] Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull* 2017; 7:339.
- [33] Rivera E, Gomez H. Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: the evolving role of ixabepilone. *Breast Cancer Res* 2010; 12:S2.
- [34] Eslami M, Memarsadeghi O, Davarpanah A, Arti A, Nayernia K, Behnam B. Overcoming Chemotherapy Resistance in Metastatic Cancer: A Comprehensive Review. *Biomedicines* 2024; 12:183.
- [35] Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ź, Celik I, et al. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells* 2023; 12(4): 659.
- [36] Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013; 65:157–70.

- [37] Kong CY, Guo Z, Song P, Zhang X, Yuan YP, Teng T, et al. Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. *Int J Biol Sci* 2022; 18:760.
- [38] Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 2014; 10:853–8.
- [39] Schaupp CM, White CC, Merrill GF, Kavanagh TJ. Metabolism of Doxorubicin to the Cardiotoxic Metabolite Doxorubicinol Is Increased in a Mouse Model of Chronic Glutathione Deficiency: A Potential Role for Carbonyl Reductase 3. *Chem Biol Interact* 2015; 234:154.
- [40] Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol* 2000; 13:414–20.
- [41] Zeng X, Cai H, Yang J, Qiu H, Cheng Y, Liu M. Pharmacokinetics and cardiotoxicity of doxorubicin and its secondary alcohol metabolite in rats. *Biomed Pharmacother* 2019; 116:108964.
- [42] Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin Oncol Nurs* 2019; 35(5):150923.
- [43] Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol* 2020; 17:807.
- [44] Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol* 2018; 834:188–96.
- [45] Hou J, He Z, Liu T, Chen D, Wang B, Wen Q, et al. Evolution of Molecular Targeted Cancer Therapy: Mechanisms of Drug Resistance and Novel Opportunities Identified by CRISPR-Cas9 Screening. *Front Oncol* 2022; 12:755053.
- [46] Min HY, Lee HY. Molecular targeted therapy for anticancer treatment. *Experimental & Molecular Medicine* 2022; 54:1670–94.
- [47] Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15:81–94.
- [48] McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* 2017; 168:613–28.
- [49] Vitale I, Shema E, Loi S, Galluzzi L. Intratumoral heterogeneity in cancer progression and response to immunotherapy. *Nature Medicine* 2021; 27:212–24.

- [50] Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 2020; 25:112.
- [51] Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 2009; 3:16–20.
- [52] Baig N, Kammakakam I, Falath W, Kammakakam I. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater Adv* 2021; 2:1821–71.
- [53] Fasoli E. Protein corona: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of nanomedicine. *Biotechnol Appl Biochem* 2021; 68:1139–52.
- [54] Rizzo LY, Theek B, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Recent Progress in Nanomedicine: Therapeutic, Diagnostic and Theranostic Applications. *Curr Opin Biotechnol* 2013; 24:1159–66.
- [55] Mekuye B, Abera B. Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Select* 2023; 4:486–501.
- [56] Boulaiz H, Alvarez PJ, Ramirez A, Marchal JA, Prados J, Rodríguez-Serrano F, et al. Nanomedicine: Application Areas and Development Prospects. *International Journal of Molecular Sciences* 2011; 12:3303–21.
- [57] Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, Alves F, Andrews AM, Ashraf S, et al. Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* 2017; 11:2313.
- [58] Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2020; 20:101–24.
- [59] Altammar KA. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Front Microbiol* 2023; 14: 1155622.
- [60] El-Kalliny AS, Abdel-Wahed MS, El-Zahhar AA, Hamza IA, Gad-Allah TA. Nanomaterials: a review of emerging contaminants with potential health or environmental impact. *Discover Nano* 2023; 18:68.
- [61] Borišev I, Mrdanovic J, Petrovic D, Seke M, Jović D, Srdenović B, et al. Nanoformulations of doxorubicin: how far have we come and where do we go from here? *Nanotechnology* 2018; 29:332002.
- [62] D'Angelo NA, Noronha MA, Câmara MCC, Kurnik IS, Feng C, Araujo VHS, et al. Doxorubicin nanoformulations on therapy against cancer: An overview from the last 10 years. *Biomaterials Advances* 2022; 133:112623.

- [63] Zhou Y, Quan G, Wu Q, Zhang X, Niu B, Wu B, et al. Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharm Sin B* 2018; 8:165–77.
- [64] Kim MK, Ki DH, Na YG, Lee HS, Baek JS, Lee JY, et al. Optimization of Mesoporous Silica Nanoparticles through Statistical Design of Experiment and the Application for the Anticancer Drug. *Pharmaceutics* 2021; 13(2):184.
- [65] Djayanti K, Maharjan P, Cho KH, Jeong S, Kim MS, Shin MC, et al. Mesoporous Silica Nanoparticles as a Potential Nanoplatform: Therapeutic Applications and Considerations. *Int J Mol Sci* 2023; 28;24(7):6349.
- [66] Narayan R, Nayak UY, Raichur AM, Garg S. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics* 2018; 6;10(3):118.
- [67] Xu B, Li S, Shi R, Liu H. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for biomedical applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023; 8:1–28.
- [68] Niculescu VC. Mesoporous Silica Nanoparticles for Bio-Applications. *Front Mater* 2020; 7:486705.
- [69] Bharti C, Gulati N, Nagaich U, Pal A. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *Int J Pharm Investig* 2015; 5:124.
- [70] Zhang C, Xie H, Zhang Z, Wen B, Cao H, Bai Y, et al. Applications and Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanocarriers in the Field of Medicine. *Front Pharmacol* 2022; 13: 829796.
- [71] Mahmoudi M, Landry MP, Moore A, Coreas R. The protein corona from nanomedicine to environmental science. *Nature Reviews Materials* 2023; 8:422–38.
- [72] Neagu M, Piperigkou Z, Karamanou K, Engin AB, Docea AO, Constantin C, et al. Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. *Archives of Toxicology* 2016; 91:1031–48.
- [73] Shannahan J. The biocorona: a challenge for the biomedical application of nanoparticles. *Nanotechnol Rev* 2017; 6:345.
- [74] Gupta MN, Roy I. How Corona Formation Impacts Nanomaterials as Drug Carriers. *Mol Pharm* 2020; 17:725–37.
- [75] Padín-González E, Lancaster P, Bottini M, Gasco P, Tran L, Fadeel B, et al. Understanding the Role and Impact of Poly (Ethylene Glycol) (PEG) on

Nanoparticle Formulation: Implications for COVID-19 Vaccines. *Front Bioeng Biotechnol* 2022; 10:882363.

[76] Shi L, Zhang J, Zhao M, Tang S, Cheng X, Zhang W, et al. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale* 2021; 13:10748–64.

[77] Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 99:28.

[78] Chen F, Cai W. Tumor vasculature targeting: a generally applicable approach for functionalized nanomaterials. *Small* 2014; 10:1887–93.

[79] Sun L, Liu H, Ye Y, Lei Y, Islam R, Tan S, et al. Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023 8:1 2023; 8:1–28.

[80] Abdellatif AAH, Alshubrumi AS, Younis MA. Targeted Nanoparticles: the Smart Way for the Treatment of Colorectal Cancer. *AAPS PharmSciTech* 2024; 25:1–17.

[81] Miao L, Huang L. Exploring the Tumor Microenvironment with Nanoparticles. *Cancer Treat Res* 2015; 166:193.

[82] Wu P, Han J, Gong Y, Liu C, Yu H, Xie N. Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy Resistance: Current Advances and Applications. *Pharmaceutics* 2022; 14:14.

[83] Alkilany AM, Zhu L, Weller H, Mews A, Parak WJ, Barz M, et al. Ligand density on nanoparticles: A parameter with critical impact on nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2019; 143:22–36.

[84] Cheng YH, He C, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA, Lin Z. Meta-Analysis of Nanoparticle Delivery to Tumors Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling and Simulation Approach. *ACS Nano* 2020; 14:3075–95.

[85] Fernandes C, Soares D, Yergeri MC. Tumor Microenvironment Targeted Nanotherapy. *Front Pharmacol* 2018; 9:411406.

[86] Chen F, Cai W. Tumor Vasculature Targeting: A Generally Applicable Approach for Functionalized Nanomaterials. *Small* 2014; 10:1887.

- [87] Chaudhary A, Hilton MB, Seaman S, Haines DC, Stevenson S, Lemotte PK, et al. TEM8/ANTXR1 blockade inhibits pathological angiogenesis and potentiates tumoricidal responses against multiple cancer types. *Cancer Cell* 2012; 21:212–26.
- [88] Lingwood C. Therapeutic Uses of Bacterial Subunit Toxins. *Toxins (Basel)* 2021; 26;13(6):378.
- [89] Aureli M, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A, Toffano G, Secchieri C, et al. GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential. *Mol Neurobiol* 2016; 53:1824–42.
- [90] Nanda A, St. Croix B. Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2004; 16:44–9.
- [91] Janik E, Ceremuga M, Bijak JS, Bijak M. Biological toxins as the potential tools for bioterrorism. *Int J Mol Sci* 2019; 20(5): 1181.
- [92] Vijayakumar A, Shobha G, Vinutha M and Soumya C. A review on various types of toxins. *Pharmacophore* 2015; 6:181–8.
- [93] Shapira A, Benhar I. Toxin-based therapeutic approaches. *Toxins (Basel)* 2010; 2:2519–83.
- [94] Zhang Y. Why do we study animal toxins? *Dongwuxue Yanjiu* 2015; 36:183–222.
- [95] Luginbuehl V, Meier N, Kovar K, Rohrer J. Intracellular drug delivery: Potential usefulness of engineered Shiga toxin subunit B for targeted cancer therapy. *Biotechnol Adv* 2018; 36:613–23.
- [96] Henkel JS, Baldwin MR, Barbieri JT. Toxins from bacteria. *EXS* 2010; 100:1–29.
- [97] Zuverink M, Barbieri JT. Protein Toxins that Utilize Gangliosides as Host Receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2018; 156:325.
- [98] Biernbaum EN, Kudva IT. AB5 Enterotoxin-Mediated Pathogenesis: Perspectives Gleaned from Shiga Toxins. *Toxins* 2022; 14(1), 62.
- [99] Robert A, Wiels J. Shiga toxins as antitumor tools. *Toxins (Basel)* 2021; 13:1–15.
- [100] Bachran, C, Leppla, S. H. Tumor Targeting and Drug Delivery by Anthrax Toxin. *Toxins (Basel)*. 2016; 8(7): 197.

- [101] Young JAT, Collier RJ. Anthrax toxin: Receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem* 2007; 76:243–65.
- [102] Savransky V, Ionin B, Reece J. Current Status and Trends in Prophylaxis and Management of Anthrax Disease. *Pathogens* 2020; 9(5), 370.
- [103] Friebe S, van der Goot F, Bürgi J. The Ins and Outs of Anthrax Toxin. *Toxins (Basel)* 2016; 8:69.
- [104] Cryan LM, Rogers MS. Targeting the anthrax receptors, TEM-8 and CMG-2, for anti-angiogenic therapy. *Front Biosci* 2011; 16:1574.
- [105] Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JAT. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 2001; 414:225–9.
- [106] Sergeeva OA, van der Goot FG. Converging physiological roles of the anthrax toxin receptors. *F1000Res* 2019; 12;8:F1000 Faculty Rev-1415.
- [107] Fu S, Tong X, Cai C, Zhao Y, Wu Y, Li Y, et al. The Structure of Tumor Endothelial Marker 8 (TEM8) Extracellular Domain and Implications for Its Receptor Function for Recognizing Anthrax Toxin. *PLoS One* 2010; 18;5(6):e11203.
- [108] Greither T, Marcou M, Fornara P, Behre HM. Increased Soluble CMG2 Serum Protein Concentration Is Associated with the Progression of Prostate Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2019; 26;11(8):1059.
- [109] Abrami L, Bischofberger M, Kunz B, Groux R, Van Der Goot FG. Endocytosis of the anthrax toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors. *PLoS Pathog* 2010; 6(3): e1000792.
- [110] Deuquet J, Lausch E, Superti-Furga A, Van Der Goot FG. The dark sides of capillary morphogenesis gene 2. *EMBO J* 2012; 31:3–13.
- [111] Sun KR, Lv HF, Chen BB, Nie CY, Zhao J, Chen XB. Latest therapeutic target for gastric cancer: Anthrax toxin receptor 1. *World J Gastrointest Oncol* 2021; 13:216–22.
- [112] Hotchkiss KA, Basile CM, Spring SC, Bonuccelli G, Lisanti MP, Terman BI. TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen. *Exp Cell Res* 2005; 305:133–44.
- [113] Nanda A, Carson-Walter EB, Seaman S, Barber TD, Stampfl J, Singh S, et al. TEM8 Interacts with the Cleaved C5 Domain of Collagen $\alpha 3(\text{VI})$. *Cancer Res* 2004; 64:817–20.

- [114] Werner E, Kowalczyk AP, Faundez V. Anthrax toxin receptor 1/tumor endothelium marker 8 mediates cell spreading by coupling extracellular ligands to the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:23227–36.
- [115] Kareff SA, Corbett V, Hallenbeck P, Chauhan A. TEM8 in Oncogenesis: Protein Biology, Pre-Clinical Agents, and Clinical Rationale. *Cells* 2023; 12:2623.
- [116] Pietrzyk A. Biomarkers Discovery for Colorectal Cancer: A Review on Tumor Endothelial Markers as Perspective Candidates. *Dis Markers* 2016; 2016:4912405.
- [117] St. Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, et al. Genes Expressed in Human Tumor Endothelium. *Science* 2000; 18;289(5482):1197-202.
- [118] Corbett V, Hallenbeck P, Rychahou P, Chauhan A. Evolving role of seneca valley virus and its biomarker TEM8/ANTXR1 in cancer therapeutics. *Front Mol Biosci* 2022; 9:930207.
- [119] Szot C, Saha S, Zhang XM, Zhu Z, Hilton MB, Morris K, et al. Tumor stroma–targeted antibody–drug conjugate triggers localized anticancer drug release. *J Clin Invest* 2018; 128:2927.
- [120] Xu J, Yang X, Deng Q, Yang C, Wang D, Jiang G, et al. TEM8 marks neovascrogenic tumor-initiating cells in triple-negative breast cancer. *Nat Commun* 2021;12:4413.
- [121] Piot N, Gisou van der Goot F, Sergeeva OA. Harnessing the Membrane Translocation Properties of AB Toxins for Therapeutic Applications. *Toxins (Basel)* 2021; 6;13(1):36.
- [122] Koo HM, VanBrocklin M, McWilliams MJ, Leppla SH, Duesbery NS, Vande Woude GF. Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:3052–7.
- [123] Abi-Habib RJ, Urieto JO, Liu S, Leppla SH, Duesbery NS, Frankel AE. BRAF status and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 activity indicate sensitivity of melanoma cells to anthrax lethal toxin. *Mol Cancer Ther* 2005; 4:1303–10.
- [124] Arora N, Leppla SH. Fusions of anthrax toxin lethal factor with shiga toxin and diphtheria toxin enzymatic domains are toxic to mammalian cells. *Infect Immun* 1994; 62:4955–61.

- [125] Chen KH, Liu S, Bankston LA, Liddington RC, Leppla SH. Selection of anthrax toxin protective antigen variants that discriminate between the cellular receptors TEM8 and CMG2 and achieve targeting of tumor cells. *J Biol Chem* 2007; 282:9834–45.
- [126] Rogers MS, Christensen KA, Birsner AE, Short SM, Wigelsworth DJ, Collier RJ, et al. Mutant anthrax toxin B moiety (protective antigen) inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 2007; 67:9980–5.
- [127] Rodríguez-Ramos A, Ramos-Docampo MA, Salgueiriño V, Fanarraga ML. Nanoparticle biocoating to create ATP-powered swimmers capable of repairing proteins on the fly. *Mater Today Adv* 2023; 17:100353.
- [128] Starzec A, Ladam P, Vassy R, Badache S, Bouchemal N, Navaza A, et al. Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF (165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex. *Peptides (NY)* 2007; 28:2397–402.
- [129] Croissant JG, Butler KS, Zink JI, Brinker CJ. Synthetic amorphous silica nanoparticles: toxicity, biomedical and environmental implications. *Nat Rev Mater* 2020; 5:886–909.
- [130] He Q, Cui X, Cui F, Guo L, Shi J. Size-controlled synthesis of monodispersed mesoporous silica nano-spheres under a neutral condition. *Microporous and Mesoporous Materials* 2009; 117:609–16.
- [131] Lin PC, Lin S, Wang PC, Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv* 2014; 32:711.
- [132] Fadeel B. Nanomaterial characterization: Understanding nano-bio interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2022; 633:45–51.
- [133] Boverhof DR, David RM. Nanomaterial characterization: Considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation. *Anal Bioanal Chem* 2010; 396:953–61.
- [134] Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release* 2016; 235:337–51.
- [135] Daneshmand S, Golmohammadzadeh S, Jaafari MR, Movaffagh J, Rezaee M, Sahebkar A, et al. Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. *J Cell Biochem* 2018; 119:4251–64.

- [136] Barrett EP, Joyner LG, Halenda PP. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J Am Chem Soc* 1951; 73:373–80.
- [137] Padín-González E, Navarro-Palomares E, Valdivia L, Iturrioz-Rodríguez N, Correa MA, Valiente R, et al. A custom-made functionalization method to control the biological identity of nanomaterials. *Nanomedicine* 2020 ;29:102268.
- [138] Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom* 2020; 92:e68.
- [139] Peterson DA. Confocal Microscopy. *Encyclopedia of Movement Disorders* 2010; 250–2.
- [140] McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 2018; 120:5.1.1.
- [141] Macintosh J, Michell-Robinson MA, Chen X, Chitsaz D, Kennedy TE, Bernard G. An optimized and validated protocol for the purification of PDGFR α + oligodendrocyte precursor cells from mouse brain tissue via immunopanning. *MethodsX* 2023; 2:10:102051.
- [142] Ligasová A, Frydrych I, Koberna K. Basic Methods of Cell Cycle Analysis. *Int J Mol Sci* 2023; 24:3674.
- [143] García-Hevia L, Fernández F, Casafont I, Villegas JC, Fanarraga ML. A fast, reliable and cost-effective method to generate tumor organs for therapy screening in vivo. *Biomed Phys Eng Express* 2016; 2:035009.
- [144] Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols in Immunology* 2001; Chapter 20:Unit 20.1
- [145] Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, Bastos DC, Agostini M, Rangel ALCA, et al. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. *Int J Cancer* 2008; 123:2557–65.
- [146] Bella Á, Di Trani CA, Fernández-Sendin M, Arrizabalaga L, Cirella A, Teijeira Á, et al. Mouse Models of Peritoneal Carcinomatosis to Develop Clinical Applications. *Cancers (Basel)* 2021; 13:1–11.
- [147] de Almeida LY, Mariano FS, Bastos DC, Cavassani KA, Raphelson J, Mariano VS, et al. The antimetastatic activity of orlistat is accompanied by an antitumoral immune response in mouse melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2020; 85:321–30.

- [148] Sun B, Zhang S, Zhang D, Gu Y, Zhang W, Zhao X. The influence of different microenvironments on melanoma invasiveness and microcirculation patterns: An animal experiment study in the mouse model. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133:979–85.
- [149] Singh Y, Klimpels KR, Quinn CP, Chaudhary VK, Lepplan SH. The Carboxyl-terminal End of Protective Antigen Is Required for Receptor Binding and Anthrax Toxin Activity. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266:15493–7.
- [150] Gupta P, Waheed SM, Bhatnagar R. Expression and purification of the recombinant protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Protein Expr Purif* 1999; 16:369–76.
- [151] Pavan ME, Pavan EE, Cairó FM, Pettinari MJ. Expression and refolding of the protective antigen of *Bacillus anthracis*: A model for high-throughput screening of antigenic recombinant protein refolding. *Rev Argent Microbiol* 2016; 48:5–14.
- [152] Hunke S, Betton JM. Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2003; 50:1579–89.
- [153] Strandberg L, Enfors SO. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57:1669.
- [154] Jaenicke R. Stability and folding of domain proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71:155–241.
- [155] Marbach A, Bettenbrock K. *lac* operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J Biotechnol* 2012; 157:82–8.
- [156] Owens RM, Grant A, Davies N, O'Connor CD. Copurification of the Lac repressor with polyhistidine-tagged proteins in immobilized metal affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 2001; 21:352–60.
- [157] Abeyrathne PD, Grigorieff N. Expression, purification, and contaminant detection for structural studies of *Ralstonia metallidurance* C1C protein rm1. *PLoS One* 2017; 12(7): e0180163.
- [158] Krishnanchettiar S, Sen J, Caffrey M. Expression and purification of the *Bacillus anthracis* protective antigen domain 4. *Protein Expr Purif* 2003; 27:325–30.

- [159] Gu J, Faundez V, Werner E. Endosomal Recycling Regulates Anthrax Toxin Receptor 1/Tumor Endothelial Marker 8-Dependent Cell Spreading. *Exp Cell Res* 2010; 316:1946.
- [160] Opoku-Darko M, Yuen C, Gratton K, Sampson E, Bathe OF. Tumor endothelial marker 8 overexpression in breast cancer cells enhances tumor growth and metastasis. *Cancer Invest* 2011; 29:676–82.
- [161] Kibria G, Hatakeyama H, Harashima H. A new peptide motif present in the protective antigen of anthrax toxin exerts its efficiency on the cellular uptake of liposomes and applications for a dual-ligand system. *Int J Pharm* 2011; 412:106–14.
- [162] Høye AM, Tolstrup SD, Horton ER, Nicolau M, Frost H, Woo JH, et al. Tumor endothelial marker 8 promotes cancer progression and metastasis. *Oncotarget* 2018; 9:30173.
- [163] Garlick KM, Batty S, Mogridge J. Binding of filamentous actin to anthrax toxin receptor 1 decreases its association with protective antigen. *Biochemistry* 2012; 51:1249–56.
- [164] Yang MY, Chaudhary A, Seaman S, Dunty J, Stevens J, Elzarrad MK, et al. The cell surface structure of tumor endothelial marker 8 (TEM8) is regulated by the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2011; 1813:39–49.
- [165] Go MY, Chow EMC, Mogridge J. The cytoplasmic domain of anthrax toxin receptor 1 affects binding of the protective antigen. *Infect Immun* 2009; 77:52–9.
- [166] Kareff SA, Corbett V, Hallenbeck P, Chauhan A. TEM8 in Oncogenesis: Protein Biology, Pre-Clinical Agents, and Clinical Rationale. *Cells* 2023; 12:2623.
- [167] Gong Q, Deng J, Zhang L, Zhou C, Fu C, Wang X, et al. Targeted silencing of TEM8 suppresses non small cell lung cancer tumor growth via the ERK/Bcl 2 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2021;24.
- [168] Kuo F, Histed S, Xu B, Bhadrasetty V, Szajek LP, Williams MR, et al. Immuno-PET imaging of tumor endothelial marker 8 (TEM8). *Mol Pharm* 2014; 11:3996–4006.
- [169] Quan Q, Yang M, Gao H, Zhu L, Lin X, Guo N, et al. Imaging tumor endothelial marker 8 using an ¹⁸F-labeled peptide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; 38:1806.

- [170] García-Hevia L, Soltani R, González J, Chaloin O, Ménard-Moyon C, Bianco A, et al. Carbon nanotubes targeted to the tumor microenvironment inhibit metastasis in a preclinical model of melanoma. *Bioact Mater* 2024; 34:237–47.
- [171] Jia T, Ciccione J, Jacquet T, Maurel M, Montheil T, Mehdi A, et al. The presence of PEG on nanoparticles presenting the c[RGDfK]- and/or ATWLPPR peptides deeply affects the RTKs-AKT-GSK3 β -eNOS signaling pathway and endothelial cells survival. *Int J Pharm* 2019; 568:118507.
- [172] Meng S, Su B, Li W, Ding Y, Tang L, Zhou W, et al. Enhanced antitumor effect of novel dual-targeted paclitaxel liposomes. *Nanotechnology* 2010; 21.
- [173] Hu Q, Kang T, Feng J, Zhu Q, Jiang T, Yao J, et al. Tumor Microenvironment and Angiogenic Blood Vessels Dual-Targeting for Enhanced Anti-Glioma Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016; 8:23568–79.
- [174] Janssen APCA, Schiffelers RM, Ten Hagen TLM, Koning GA, Schraa AJ, Kok RJ, et al. Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy. *Int J Pharm* 2003; 254:55–8.
- [175] Rogers MS, Christensen KA, Birsner AE, Short SM, Wigelsworth DJ, Collier RJ, et al. Mutant anthrax toxin B moiety (protective antigen) inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 2007; 67:9980–5.
- [176] Hsu KS, Dunleavy JM, Szot C, Yang L, Hilton MB, Morris K, et al. Cancer cell survival depends on collagen uptake into tumor-associated stroma. *Nat Commun* 2022; 13.
- [177] Dutta Gupta Y, Mackeyev Y, Krishnan S, Bhandary S. Mesoporous silica nanotechnology: promising advances in augmenting cancer theranostics. *Cancer Nanotechnol* 2024; 15.
- [178] Renu K, Pureti LP, Vellingiri B, Valsala Gopalakrishnan A. Toxic effects and molecular mechanism of doxorubicin on different organs – an update. *Toxin Rev* 2022; 41:650–74.
- [179] Klojdová I, Milota T, Smetanová J, Stathopoulos C. Encapsulation: A Strategy to Deliver Therapeutics and Bioactive Compounds? *Pharmaceuticals* 2023; 16:362.
- [180] Bilalis P, Tziveleka LA, Varlas S, Iatrou H. pH-Sensitive nanogates based on poly(L-histidine) for controlled drug release from mesoporous silica nanoparticles. *Polym Chem* 2016; 7:1475–85.

- [181] Jafari S, Derakhshankhah H, Alaei L, Fattahi A, Varnamkhasti BS, Saboury AA. Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic/diagnostic applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019; 109:1100–11.
- [182] Shafiee M, Abolmaali S, Abedanzadeh M, Abedi M, Tamaddon A. Synthesis of Pore-Size-Tunable Mesoporous Silica Nanoparticles by Simultaneous Sol-Gel and Radical Polymerization to Enhance Silibinin Dissolution. *Iran J Med Sci* 2021; 46:475.
- [183] Jia L, Shen J, Li Z, Zhang D, Zhang Q, Duan C, et al. Successfully tailoring the pore size of mesoporous silica nanoparticles: Exploitation of delivery systems for poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* 2012; 439:81–91.
- [184] Yang C, Shi Z, Feng C, Li R, Luo S, Li X, et al. An Adjustable pH-Responsive Drug Delivery System Based on Self-Assembly Polypeptide-Modified Mesoporous Silica. *Macromol Biosci* 2020; 20(6):e2000034.
- [185] Kardys AY, Bharali DJ, Mousa SA. Amino-functionalized silica nanoparticles: In vitro evaluation for targeted delivery and therapy of pancreatic cancer. *J Nanotechnol* 2013.
- [186] Qi G, Shi G, Wang S, Hu H, Zhang Z, Li Z, et al. A Novel pH-Responsive Iron Oxide Core-Shell Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticle (M-MSN) System Encapsulating Doxorubicin (DOX) and Glucose Oxidase (Gox) for Pancreatic Cancer Treatment. *Int J Nanomedicine* 2023; 18:7133–47.
- [187] Nguyen TN, Nguyen TT, Nghiem THL, Nguyen DT, Tran TTH, Vu D, et al. Optical Properties of Doxorubicin Hydrochloride Load and Release on Silica Nanoparticle Platform. *Molecules* 2021; 26(13), 3968.
- [188] Day CM, Sweetman MJ, Song Y, Plush SE, Garg S. Functionalized mesoporous silica nanoparticles as delivery systems for doxorubicin: Drug loading and release. *Applied Sciences (Switzerland)* 2021; 11:6121.
- [189] Fosca M, Rau J V., Uskoković V. Factors influencing the drug release from calcium phosphate cements. *Bioact Mater* 2022; 7:341–63.
- [190] Lin CY, Yang CM, Lindén M. Dissolution and morphology evolution of mesoporous silica nanoparticles under biologically relevant conditions. *J Colloid Interface Sci* 2022; 608:995–1004.
- [191] Braun K, Pochert A, Beck M, Fiedler R, Gruber J, Lindén M. Dissolution kinetics of mesoporous silica nanoparticles in different simulated body fluids. *J Solgel Sci Technol* 2016; 79:319–27.

- [192] Giovaninni G, Moore CJ, Hall AJ, Byrne HJ, Gubala V. pH-Dependent silica nanoparticle dissolution and cargo release. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018; 169:242–8.
- [193] Spitzmüller L, Nitschke F, Rudolph B, Berson J, Schimmel T, Kohl T. Dissolution control and stability improvement of silica nanoparticles in aqueous media. *Journal of Nanoparticle Research* 2023 25:3 2023; 25:1–17.
- [194] Racles C, Zaltariov MF, Peptanariu D, Vasiliu T, Cazacu M. Functionalized Mesoporous Silica as Doxorubicin Carriers and Cytotoxicity Boosters. *Nanomaterials* 2022; 26;12(11):1823.
- [195] Rahmani S, Durand JO, Charnay C, Lichon L, Férid M, Garcia M, et al. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles and nanorods: Application to doxorubicin delivery. *Solid State Sci* 2017; 68:25–31.
- [196] Qi G, Shi G, Wang S, Hu H, Zhang Z, Li Z, et al. A Novel pH-Responsive Iron Oxide Core-Shell Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticle (M-MSN) System Encapsulating Doxorubicin (DOX) and Glucose Oxidase (Gox) for Pancreatic Cancer Treatment. *Int J Nanomedicine* 2023;18:7133–47.
- [197] Li J, Shen S, Kong F, Jiang T, Tang C, Yin C. Effects of pore size on in vitro and in vivo anticancer efficacies of mesoporous silica nanoparticles. *RSC Adv* 2018;8:24633–40.
- [198] Amin MU, Ali S, Ali MY, Fuhrmann DC, Tariq I, Seitz BS, et al. Co-delivery of carbonic anhydrase IX inhibitor and doxorubicin as a promising approach to address hypoxia-induced chemoresistance. *Drug Deliv* 2022;29:2072–85.
- [199] Yan J, Xu X, Zhou J, Liu C, Zhang L, Wang D, et al. Fabrication of a pH/Redox-Triggered Mesoporous Silica-Based Nanoparticle with Microfluidics for Anticancer Drugs Doxorubicin and Paclitaxel Codelivery. *ACS Appl Bio Mater* 2020;3:1216–25.
- [200] Yang Y, Zhao W, Tan W, Lai Z, Fang D, Jiang L, et al. An Efficient Cell-Targeting Drug Delivery System Based on Aptamer-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2019;14.
- [201] Arun R, Dhivya S, Abraham SK, Premkumar K. Low-dose chemotherapeutic drugs induce reactive oxygen species and initiate apoptosis-mediated genomic instability. *Toxicol Res (Camb)* 2016;5:547.

- [202] Blagosklonny M V., Blagosklonny, V. M. Selective protection of normal cells from chemotherapy, while killing drug-resistant cancer cells. *Oncotarget* 2023;14:193–206.
- [203] Lüpertz R, Wätjen W, Kahl R, Chovolou Y. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology* 2010;271:115–21.
- [204] Lima IB, Alvarenga M, Santos De Tótaro PI, Boratto F, Leite EA, Pires P, et al. Improved antiproliferative activity of doxorubicin-loaded calcium phosphate nanoparticles against melanoma cells. *Braz. arch. biol. technol.* 2023;66.
- [205] Bi D, Zhao L, Yu R, Li H, Guo Y, Wang X, et al. Surface modification of doxorubicin-loaded nanoparticles based on polydopamine with pH-sensitive property for tumor targeting therapy. *Drug Deliv* 2018;25:564.
- [206] Derieppe M, Escoffre J-M, Denis de Senneville B, van Houtum Q, Barten-van Rijbroek A, van Der Wurff-Jacobs K, et al. Assessment of Intratumoral Doxorubicin Penetration after Mild Hyperthermia-mediated Release from Thermosensitive Liposomes 2019:2645928.
- [207] Hosseinpour A, Soltani M, Souri M. Improving tumor treatment through intratumoral injection of drug-loaded magnetic nanoparticles and low-intensity ultrasound. *Scientific Reports* 2024;14:1–18.
- [208] Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013;65:157–70.
- [209] Abdelgawad IY, Grant MKO, Popescu FE, Largaespada DA, Zordoky BN. Doxorubicin Paradoxically Ameliorates Tumor-Induced Inflammation in Young Mice. *Int J Mol Sci* 2021; 22(16):9023.
- [210] Kanehira Y, Togami K, Tada H, Chono S. Tumor distribution and anti-tumor effect of doxorubicin following intrapulmonary administration to mice with metastatic lung tumor. *J Drug Deliv Sci Technol* 2016;33:143–8.
- [211] Böckelmann L, Starzonek C, Niehoff AC, Karst U, Thomale J, Schlüter H, et al. Detection of doxorubicin, cisplatin and therapeutic antibodies in formalin-fixed paraffin-embedded human cancer cells. *Histochem Cell Biol* 2020;153:367–77.
- [212] Stucke-Ring J, Ronnacker J, Brand C, Höltke C, Schliemann C, Kessler T, et al. Combinatorial effects of doxorubicin and retargeted tissue factor by

intratumoral entrapment of doxorubicin and proapoptotic increase of tumor vascular infarction. *Oncotarget* 2016;7:82458–72.

[213] Murphy EA, Majeti BK, Barnes LA, Makale M, Weis SM, Lutu-Fuga K, et al. Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:9343–8.

[214] Liu F, Peng B, Li M, Ma J, Deng G, Zhang S, et al. Targeted disruption of tumor vasculature via polyphenol nanoparticles to improve brain cancer treatment. *Cell Rep Phys Sci* 2022; 19; 3(1): 100691.

[215] Siemann DW. The Unique Characteristics of Tumor Vasculature and Preclinical Evidence for its Selective Disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat Rev* 2011; 37:63.

[216] Jorge AF, Aviñó A, Pais AACC, Eritja R, Fàbrega C. DNA-based nanoscaffolds as vehicles for 5-fluoro-2'-deoxyuridine oligomers in colorectal cancer therapy. *Nanoscale* 2018; 10:7238–49.

[217] Fàbrega C, Clua A, Eritja R, Aviñó A. Oligonucleotides Carrying Nucleoside Antimetabolites as Potential Prodrugs. *Curr Med Chem* 2023; 30:1304–19.

[218] Clua A, Fàbrega C, García-Chica J, Grijalvo S, Eritja R. Parallel G-quadruplex Structures Increase Cellular Uptake and Cytotoxicity of 5-Fluoro-2'-deoxyuridine Oligomers in 5-Fluorouracil Resistant Cells. *Molecules* 2021; 26(6): 1741.

[219] Gmeiner WH, Dominijanni A, Haber AO, Ghiraldeli LP, Caudell DL, D'Agostino R, et al. Improved Antitumor Activity of the Fluoropyrimidine Polymer CF10 in Preclinical Colorectal Cancer Models through Distinct Mechanistic and Pharmacologic Properties. *Mol Cancer Ther* 2021; 20:553–63.

[220] Wang CX, Xiong HF, Wang S, Wang J, Nie X, Guo Q, et al. Overexpression of TEM8 promotes ovarian cancer progression via Rac1/Cdc42/JNK and MEK/ERK/STAT3 signaling pathways. *Am J Transl Res* 2020 ;12:3557–76.

[221] Gong Q, Liu C, Wang C, Zhuang L, Zhang L, Wang X. Effect of silencing TEM8 gene on proliferation, apoptosis, migration and invasion of XWLC 05 lung cancer cells. *Mol Med Rep* 2018; 17:911–7.

[222] Liu S, Schubert RL, Bugge TH, Leppla SH. Anthrax toxin: structures, functions and tumour targeting. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3:843–53.

- [223] Scobie HM, Rainey GJA, Bradley KA, Young JAT. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:5170–4.
- [224] Chen KH, Liu S, Leysath CE, Miller-Randolph S, Zhang Y, Fattah R, et al. Anthrax Toxin Protective Antigen Variants That Selectively Utilize either the CMG2 or TEM8 Receptors for Cellular Uptake and Tumor Targeting. *J Biol Chem* 2016; 291:22021–9.
- [225] Sim BKL, Li M, Osorio M, Wu Y, Wai TT, Peterson JW, et al. Protection against inhalation anthrax by immunization with *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a stably producing protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Npj Vaccines* 2017; 2:1–7.
- [226] Żakowska D, Graniak G, Rutyna P, Naylor K, Głowacka P, Niemcewicz M. Protective antigen domain 4 of *Bacillus anthracis* as a candidate for use as vaccine for anthrax. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2019; 26:392–5.
- [227] Sharma S, Bahl V, Srivastava G, Shamim R, Bhatnagar R, Gaur D. Recombinant full-length *Bacillus Anthracis* protective antigen and its 63 kDa form elicits protective response in formulation with addavax. *Front Immunol* 2023; 13:1075662.
- [228] Merkel TJ, Perera PY, Lee GM, Verma A, Hiroi T, Yokote H, et al. Protective-antigen (PA) based anthrax vaccines confer protection against inhalation anthrax by precluding the establishment of a systemic infection. *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9:1841.

ARTÍCULOS

- Márquez-López A, Fanarraga ML. AB Toxins as High-Affinity Ligands for Cell Targeting in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 7;24(13):11227. doi: 10.3390/ijms241311227. PMID: 37446406; PMCID: PMC10343017.
- Andrés Ramos Valle, Arnau Domínguez, Natalia Navarro, Ana Márquez-López, Anna Aviñó, Ramon Eritja, Carme Fàbrega, Lorena García-hevia and Mónica.L.Fanarraga. Targeted Tumor Microenvironment Delivery of 5-FU Prodrug via Soluble Silica Nanoparticles in Malignant Melanoma as a Model for Aggressive Cancer Treatment. Preparado para enviar a revisión.
- Ana Márquez-López, Lorena-González Legarreta, Rafael Valiente and Mónica.L.Fanarraga. Nanoparticle-Mediated Treatment of Melanoma Using Ligands Inspired by Anthrax Toxin. En preparación.

