ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Ángela
Turrero Braojos

Tesis doctoral

Evaluación biológica de terapias innovadoras frente al cáncer

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Medicina Molecular

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

Evaluación biológica de terapias innovadoras frente al cáncer

Ángela Turrero Braojos

Director: Anxo Vidal Figueroa

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los derechos de comercialización de los clústeres atómicos cuánticos para aplicaciones biomédicas pertenecen a Arjuna Therapeutics, que suministró los clústeres y financió parcialmente los estudios de su evaluación biológica.

El anticuerpo terapéutico SBR1 contra CCR9 es un producto desarrollado por SunRock Biopharma, que aportó el anticuerpo para los correspondientes estudios.

Ni la autora ni el director de la tesis tienen relación contractual, financiera o comercial con las citadas compañías.

Ninguna de las compañías influyó de manera directa en el diseño, ejecución o interpretación de los resultados.

Las fuentes de financiación del trabajo presentado han sido:

Clusters atómicos cuánticos de plata: mecanismos de acción biológica y aplicaciones terapéuticas. Agencia Estatal de Investigación. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Ref: MAT2017-89678-R. Investigadores principales: Anxo Vidal; Fernando Domínguez.

Inmunoterapia combinada frente al cáncer de ovario: nuevas aplicaciones terapéuticas basadas en anti-IL6/IL-6R mAbs y terapia celular adoptiva con células NK. Agencia Estatal de Investigación. Ministerio de Ciencia e Innovación. Programa Generación de Conocimiento. Ref: PID2021-124326OB-I00. Investigadores principales: Araceli Tobío; Anxo Vidal.

Desarrollo de fármacos biológicos contra CCR9 en tumores sólidos mediante la modulación del sistema inmune del paciente. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Programa Retos Colaboración. REFERENCIA: RTC-2017-6131-1. Investigadora principal: María I. Loza.

Estudio de Prueba de Concepto de una nueva nanoterapia oncológica consistente en un anticuerpo monoclonal dirigido a dianas intracelulares –Agencia Estatal de Investigación. Ministerio de Ciencia e Innovación. Programa Prueba de Concepto 2021. Investigadora Principal: María J. Alonso.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Durante la realización de la tesis su autora ha disfrutado de los siguientes contratos:
Investigadora en formación para la realización de funciones *"Clústeres atómicos cuánticos: Mecanismos de acción biológica y aplicaciones terapéuticas",* dentro del Programa de "Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores 2018 (continuación subprograma FPI)", con fecha de inicio en 2019 y fin en 2023.
Técnica Superior de Investigación, para la realización de funciones *"Estudio de la aplicación terapéutica de los anticuerpos monoclonales anti-IL6/IL-6R en el cáncer de ovario resistente a quimioterapia, así como de la terapia celular adoptiva de células mediante técnicas preclínicas"*, en relación con el proyecto de investigación "Inmunoterapia combinada frente al cáncer de ovario: nuevas aplicaciones terapéuticas basadas en anti-IL6/IL-6R mAbs y terapia celular adoptiva con células NK. - E GENERACIÓN DE CONOCIMIENTO 2021 - Proyectos investigación orientada", con fecha de inicio en 2023 hasta la actualidad.

Santiago de Compostela, 16 de mayo de 2024

Fdo.: Ángela Turrero Braojos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

«Un país sin investigación es un país sin desarrollo».
Margarita Salas

«La vida no es fácil, para nadie, pero, ¿qué más da? Hay que ser perseverante y tener confianza en una misma por encima de todo. Debemos confiar en que cada una de nosotras tiene una habilidad única que debemos potenciar».
Marie Curie

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Cuando estás acabando de escribir lo que ha conllevado tantos años de trabajo y esfuerzo, te paras a pensar y te das cuenta, ahora más que nunca, de cada una de esas situaciones en las que sin el apoyo de esas personas que tienes alrededor, no habrías llegado a la meta. El mundo de la investigación puede llegar a ser muy frustrante si tratas de emprender el camino sola y estos años me he sentido tremendamente apoyada y animada hasta que he alcanzado esta meta, que ahora pasa a ser una etapa más en el camino.

En primer lugar, quiero comenzar dando las gracias a mi director, el Dr. Anxo Vidal, por darme la oportunidad de formarme en su laboratorio, compartiendo sus conocimientos y experiencias conmigo, permitiéndome crecer en tantos aspectos a nivel profesional, así como por todo el apoyo mostrado.

De igual manera, quería agradecer a Fernando Domínguez cada una de sus ideas y de sus charlas que tanto han aportado a mis conocimientos y a este trabajo, inundándome de positividad y ánimos en tantas ocasiones.

A todas las personas que habéis sido participes de estos años de trabajo, acompañándome en cada etapa del camino. A Carmen y Ara, gracias por enseñarme todo lo que he necesitado y por compartir tantos momentos de charlas y aprendizajes juntas. A "las chicas del citómetro", Lucía y Ana, por su tiempo invertido en esos interminables experimentos, donde siempre estuvisteis dispuestas a ayudar en lo que hiciera falta; en esta línea, quería agradecer también a Pepo, David y Antón, del grupo Biofarma, por ofrecer otras alternativas en la puesta a punto del experimento y por dedicar el tiempo que hiciera falta. A todo el personal del CEBEGA y en especial a Juan y Ana, por las horas compartidas "allí abajo" y por crear un ambiente de tan buena energía que hizo que esos nervios del principio se convirtieran en enseñanzas. A los compis forzosos que invadieron el laboratorio, Samu y Leo, gracias por compartir charlas, risas, así como algún que otro reactivo. Por supuesto, a Blanca y a Vanesa, habéis sido parte indispensable para sacar este trabajo adelante, me habéis echado una mano y escuchado siempre que lo he necesitado, y os quiero agradecer de corazón todo lo

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que habéis aportado, dentro y fuera del laboratorio; ¡que vivan los cafesitos tardíos! A Pablo, que te incorporaste en la última etapa y que de igual forma hiciste que todo fuera mucho más fácil, mostrando tu apoyo en todo lo que he necesitado hasta el último momento. A Silvia, siempre tan dispuesta en ayudar en todo lo que hiciera falta. A Nere, que formaste parte de mis primeros pasos en el laboratorio, pero que pronto empezaste a ser un pilar fundamental dentro y sobre todo fuera; gracias por tanto, por compartir Galicia en su esencia, rutas, solpores, foliadas, festis, cerves, comidas, charlas e infinidad de cosas que estoy segura que nos quedan por vivir; gracias por tanto amiguiña, o aquelarre chegou para quedarse.

En general, agradecer a todas las personas que en algún momento habéis sido partícipes de este trabajo, gracias por compartir poyata y conocimientos conmigo.

Quería agradecer también a toda esa gente que desde el primer momento me habéis acogido como una más, haciendo Galicia hogar. A Laura, que nos cruzamos en el momento que ambas lo necesitábamos, haciendo más fácil tantas cosas. Estoy segura de que el destino nos sigue esperando con muchas cosas bonitas, te mereces lo mejor y sabes que tienes aquí una "gotita" para todo lo que necesites. Gracias por introducirme y dejarme conocer a todos los que se hacen llamar "odiosos", pero que de eso tienen poco (aunque alguno se lo gane a la fuerza): Carlis, Chimuelita, Óscar, calvito, Elia, Marta, Luci, Ampe… no me quiero dejar a ninguno, gracias a todos por acogerme como una "odiosa" más tantas veces, valoro mucho todos los momentos vividos.

Gracias a toda esa gente que tanto ha sumado fuera, a ese magnífico equipo brownie, Noa, Gorka, Barquiño, Sara, los momentos de risas y desconexión me han dado fuerzas en muchas ocasiones. Dejemos lo de la repostería para otro grupo y mejor nos quedamos con el pulpo, los festivales y alguna que otra rutilla para compensar. A Martita, que con su simple presencia ya te transmite esa alegría y positividad tan mágica.

A mi gallinero granaíno, con vosotras empezaron los primeros pasos en un laboratorio, pero todo lo que compartimos desde entonces, fue mucho más. Gracias por el apoyo que me habéis mostrado desde la distancia, por las visitas a Galicia y por seguir manteniendo una relación tan especial desde tantos puntos del mundo. Estoy segura de que,

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aunque sea por darnos guirnaldas y espumillones en verano, las amigas de la universidad serán para siempre. ¡Os quiero!

Mis toledanas, p*tos dinosaurios que nos hacemos llamar porque así somos y no hay quien nos arregle. Ir a casa y volver con las pilas cargadas sólo puede pasar con amigas como vosotras. Por el caballito de palo, por los choricillos y por el eo eo eh eh, que perdure por muchos años más. ¡Os querelo!

A Carlos, que en tantos momentos que he necesitado un empujón, has estado ahí. Me has transmitido paz y energía positiva cuando lo he necesitado. Gracias por escucharme y apoyarme de forma incondicional y hacer que todo parezca tan fácil. ¡Quérote!

Por último y más importante, a mi familia, a mis padres y a mi hermana: gracias por darme unos valores, formación y oportunidades que me han hecho crecer tanto como persona. La distancia a veces se hace dura, pero siempre habéis estado presentes en cada etapa de mi vida, y por supuesto lo habéis estado en esta. Gracias por creer siempre en mí, por vuestros ánimos y apoyo incondicional. Os debo todo lo que soy y cada meta alcanzada es tan vuestra como mía. Os quiero.

Gracias a ti también, si esperabas encontrar tu nombre y no está, espero no me lo tengas en cuenta. Cierro etapa habiendo crecido muchísimo a nivel profesional, pero, sobre todo, en lo personal. Porque, como bien dicen: "*camina solo y llegarás rápido, camina acompañado y llegarás más lejos*".

¡Gracias a todas y a todos, seguimos!

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

1 LISTADO DE ABREVIATURAS 2
2 RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT 4
3 INTRODUCCIÓN 7
3.1 Cáncer. 7
3.2 Terapias convencionales frente al cáncer y sus limitaciones 11
3.2.1 El problema de las resistencias en la lucha frente al cáncer 12
3.3 Nuevos avances terapéuticos frente al cáncer. 20
3.3.1 Terapias innovadoras empleadas en este trabajo. 22
4 OBJETIVOS 42
5 MATERIAL Y MÉTODOS 43
5.1 Cultivos celulares 43
5.1.1 Mantenimiento de las líneas celulares. 45
5.1.2 Desarrollo de los modelos de resistencia a CDDP. 47
5.1.3 Medida de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT: ensayos de curva dosis-respuesta. 48
5.1.4 Ensayo de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal). 50
5.1.5 Determinación de los niveles basales totales de GSH 50
5.1.6 Tratamientos con los AQCs-Ag5. 51
5.1.7 Cuantificación de platino en el extracto total celular y unido al ADN en los modelos de resistencia a CDDP. 54
5.1.8 Transfecciones de los ARNsi. 55
5.1.9 Ensayo de formación de colonias (clonogénico). 56

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2 Estudio de la expresión proteica*: western-blot*..... 58
5.3 Ensayos de citometría..... 64
5.3.1 Determinación de los niveles de ROS. 65
5.3.2 Estudio del daño en el ADN..... 65
5.3.3 Estudio de la expresión de CCR9 en la superficie celular…….67
5.3.4 Estudio de la expresión de NPL-1 68
5.4 Ensayos de ADCC en la línea PANC-1..... 69
5.4.1 Procesamiento de las muestras de sangre periférica de donantes sanos; aislamiento de las células NK 72
5.4.2 Inmunofenotipado de las células NK..... 75
5.4.3 Procesamiento de la línea tumoral PANC-1..... 76
5.4.4 Ensayos de ADCC. Cocultivo de las células tumorales con las células NK en presencia de SRB1 76
5.4.5 Análisis de las muestras de los ensayos de ADCC.….79
5.5 Experimentos *in vivo* 79
5.5.1 Ensayo de dosis máxima tolerada MTD: estudio de toxicidad…….81
5.5.2 Desarrollo del modelo subcutáneo de páncreas: estudio piloto 82
5.5.3 Estudio de eficacia antitumoral en un modelo subcutáneo de páncreas. 83
5.5.4 Estudio de eficacia antitumoral en un modelo ortotópico de pulmón..... 85
5.6 Análisis estadístico 87
6 RESULTADOS 88
6.1 Evaluación biológica de los AQCS-Ag5 en los modelos de resistencia a CDDP 89
6.1.1 Desarrollo y caracterización de los modelos de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

resistencia a CDDP. 89

6.1.2 Estudio del daño en el ADN por el tratamiento con AQCs-Ag5 y CDDP en los modelos de resistencia generados. 105

6.1.3 Cuantificación de platino en el tratamiento con AQCs-Ag5 y CDDP en los modelos de resistencia generados. 120

6.1.4 Exploración de otras vías implicadas en la acción de los AQCs-Ag5 en los modelos de resistencia generados..... 134

6.2 Evaluación biológica del potencial terapéutico de un anticuerpo monoclonal humanizado (SRB1) dirigido al receptor de quimiocina CCR9 en cáncer de páncreas 148

6.2.1 Expresión de CCR9 en las líneas celulares de adenocarcinoma ductal de páncreas: MIA PaCa-2 y PANC-1. 148

6.2.2 Estudio de la citotoxicidad directa del anticuerpo terapéutico SRB1 en las líneas celulares Mia PACA-2 y PANC-1 153

6.2.3 Ensayos de ADCC en la línea celular PANC-1.... 154

6.3 Evaluación biológica de nanosistemas en modelos tumorales *in vivo*..... 158

6.3.1 Evaluación biológica de nanosistemas cargados con ARNsi-KRAS en un modelo ortotópico de pulmón..... 158

6.3.2 Evaluación biológica de nanosistemas cargados con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} en un modelo subcutáneode páncreas…… 172

7 DISCUSIÓN 184

8 CONCLUSIONES 195

9 BIBLIOGRAFÍA 196

10 ANEXOS 222

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 LISTADO DE ABREVIATURAS

ADCC (citotoxicidad mediada por anticuerpos)
ADN (ácido desoxirribonucleico)
APC (aloficocianina)
AQCs-Ag (clústeres atómicos cuánticos de plata)
ARN (ácido ribonucleico)
ARN-si (*small interfering RNA*, en español, ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento)
CDDP (cisplatino, cis-diaminodicloroplatino (II))
CTR1 (del inglés, *copper transport protein 1;* transportador de cobre).
DSB (rotura de doble cadena del ADN)
DHE (indicador de superóxido dihidroetidio)
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium)*
DMSO (dimetilsulfóxido)
DTT (1,4-ditiotreitol)
EMT (transición epitelio-mesénquima)
Fab (fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal)
FBS (suero fetal bovino)
FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, del inglés *Food and Drug Administration*)
Fc (fragmento de la región cristalizable del anticuerpo monoclonal)
FcR (receptor del fragmento de la región cristalizable(Fc)
FBS (Suero Fetal Bovino)
GPCR (Receptor acoplado a proteínas G)
GPX4 (glutatión peroxidasa 4)
GR (glutatión reductasa)
GSH (glutatión)
H_2O_2 (peróxido de hidrógeno)
Ig (Inmunoglobulina)
IL (interleuquina)
IP (yoduro de propidio)
i.v (intravenosa)
i.p (intraperitoneal)
LNs (nanoesferas lipídicas)
LNPs (nanosistemas lipídicos)
MMTS (metilmetanosulfonato)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MT (metalotioneínas)
MTT *(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)*
NAC (N-acetil-L-cisteína)
NCs (Nanocápsulas)
NKs (células asesinas naturales, del inglés, *natural killer)*
NPL-1 (neuropilina-1)
NSCLC (Carcinoma de pulmón no microcítico)
PDAC (Adenocarcinoma pancreático ductal)
PBMCs (Células mononucleares de sangre periférica)
PEG (polietilenglicol)
PRDX (peroxirredoxina)
PRDX3 (peroxirredoxina-3)
PE (ficoeritrina)
ROS (especies reactivas de oxígeno)
SOD (superóxido dismutasa)
TGF-β (Factor de crecimiento transformante beta)
TME (del inglés, *tumor microenvironment*)
Trx (tiorredoxina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2 RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, por lo que se sigue investigando en nuevas estrategias terapéuticas que puedan ayudar a mejorar la respuesta al tratamiento y sus efectos secundarios.

En este trabajo se ha realizado una evaluación biológica de tres terapias innovadoras: clústeres atómicos cuánticos, anticuerpos monoclonales terapéuticos y nanosistemas para la entrega de agentes terapéuticos.

En primer lugar, se investigó el papel de los clústeres atómicos cuánticos de cinco átomos de plata en distintos modelos celulares de resistencia a cisplatino. Los resultados sugieren que estos clústeres pueden mejorar la eficacia de la quimioterapia en casos de resistencia.

Por otro lado, se evaluó la capacidad del anticuerpo terapéutico SRB1, con afinidad frente a la diana tumoral CCR9, de desencadenar citotoxicidad mediada por anticuerpos en 1íneas tumorales de páncreas. Nuestros resultados muestran que CCR9 es una diana terapéutica útil para inmunoterapia en este tumor, uno de los más letales y con peor pronóstico.

Por último, se realizó una evaluación biológica de nanosistemas lipídicos dirigidos frente mutaciones del oncogén KRAS en diferentes modelos in vivo, mostrando resultados positivos en la terapia dirigida frente esta oncoproteína.

En conjunto los resultados obtenidos en el transcurso de esta tesis muestran que las terapias innovadoras estudiadas suponen una estrategia prometedora frente al cáncer.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMO

O cancro é unha das principais causas de morte en todo o mundo, polo que séguense a investigar novas estratexias terapéuticas que poidan axudar a mellorar a resposta ó tratamento e os seus efectos secundarios. Neste traballo levouse a cabo unha avaliación biolóxica de tres terapias innovadoras: clústeres atómicos cuánticos, anticorpos monoclonais terapéuticos e nanosistemas para a entrega de axentes terapéuticos.

En primeiro lugar, investigouse o papel dos clústeres atómicos cuánticos de cinco átomos de prata en distintos modelos celulares de resistencia a cisplatino. Os resultados suxiren que estos clústeres poden mellorar a eficacia da quimioterapia en casos de resistencia.

Por outra banda, avaliouse a capacidade do anticorpo terapéutico SRB1, con afinidade fronte á diana tumoral CCR9, de desencadear citotoxicidade mediada por anticorpos en liñas tumorais de páncreas. Os nosos resultados amosan que CCR9 é unha diana terapéutica útil para inmunoterapia neste tumor, un dos máis letais e con peor prognóstico.

Por último, realizouse unha avaliación biolóxica de nanosistemas lipídicos dirixidos fronte a mutacións do oncoxene KRAS en diferentes modelos in vivo, amosando resultados positivos na terapia dirixida fronte esta oncoproteína. En conxunto os resultados obtidos no transcurso desta tese amosan que as terapias innovadoras estudadas supoñen unha estratexia prometedora fronte o cancro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, hence research continues into new therapeutic strategies that can help improve treatment response and side effects.

In this thesis, a biological evaluation of three innovative therapies has been carried out: atomic quantum clusters, therapeutic monoclonal antibodies and nanosystems for the delivery of therapeutic agents.

First, the role of atomic quantum clusters of five silver atoms indifferent cellular models of cisplatin resistance was investigated. The results suggest that these clusters can improve the efficacy of chemotherapy in cases of resistance.

Furthermore, the ability of the therapeutic antibody SRB1, presenting affinity against the tumor target CCR9, to trigger antibody-mediated cytotoxicity in pancreatic tumor cell lines was evaluated. Our results show that CCR9 is a useful therapeutic target for immunotherapy in this tumor, one of the most lethal tumors with the worst prognosis.

Finally, a biological evaluation of lipid nanosystems directed against mutations of the KRAS oncogene was performed in different in vivo models, showing positive results in therapy directed against this oncoprotein.

Overall, the results obtained throughout this thesis show that the innovative therapies studied represent a promising strategy against cancer.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 INTRODUCCIÓN

3.1 CÁNCER.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un término genérico utilizado para designar un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, denominándose también tumores o neoplasias malignas. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, en un proceso que se denomina metástasis. La extensión de las metástasis es la principal causa de muerte por la enfermedad[1].

Además, según la OMS el cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, atribuyéndose en 2020 casi 10 millones de muertes asociadas a la enfermedad. En ese mismo año, los cánceres más comunes en lo que se refiere a los nuevos casos, fueron de mama (2,26 millones de casos), de pulmón (2,21 millones de casos), colorrectal (1,93 millones de casos), de próstata (1,41 millones de casos), de piel (distinto del melanoma) (1,20 millones de casos) y gástrico (1,09 millones de casos). En el caso de fallecimientos, los más mortales en ese mismo año fueron de pulmón (1,8 millones de defunciones), colorrectal (916 000 defunciones), hepático (830 000 defunciones), gástrico (769 000 defunciones) y de mama (685 000 defunciones)[1].

El cáncer es una enfermedad multifactorial, que puede surgir debido a la interacción entre factores genéticos de una persona y tres categorías de agentes externos, incluidos los carcinógenos físicos (radiación ultravioleta e ionizante), los carcinógenos químicos (amianto, componentes del humo del tabaco, aflatoxinas y arsénico) y carcinógenos biológicos (infecciones por ciertos virus, bacterias o parásitos)[2]. Además de la complejidad en su origen, cada vez se investiga más sobre su desarrollo, ya que el cáncer no es sólo un conjunto de células que se dividen, invaden y se propagan al azar, sino un proceso más complejo a nivel de todo el organismo, siendo una enfermedad multidimensional con características específicas a nivel celular, tisular y organísmico que interactúan entre sí, acrecentando aún más su complejidad[3].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Douglas Hanahan y Robert Weinberg han establecido en tres revisiones lo que actualmente se conocen como las señas de identidad del cáncer *("The Hallmarks of Cancer")* donde hablan de una serie de alteraciones bioquímicas, moleculares y celulares que permiten el crecimiento del tumor, así como su diseminación en el organismo. En la primera revisión publicada en el año 2000[4], hablan de seis alteraciones básicas en la fisiología de las células que podrían dar lugar conjuntamente a su comportamiento tumorigénico:

1. Autosuficiencia en las señales de crecimiento: las células cancerosas no necesitan estimulación de señales externas (como factores de crecimiento) para multiplicarse. Por lo general, las células del cuerpo requieren hormonas y otras moléculas que actúan como señales para crecer y dividirse. Sin embargo, las células cancerosas tienen la capacidad de crecer sin estas señales externas.
2. Insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento: para controlar la división celular, las células presentan mecanismos que previenen el crecimiento y la división celular. Estos mecanismos están orquestados por proteínas codificadas por genes supresores de tumores, que su misión es garantizar que solamente las células sanas estén listas para dividirse y, de lo contrario, detendrán la división (cuando el ADN está dañado, por ejemplo). En el cáncer, estas proteínas supresoras de tumores se alteran para que no impidan eficazmente la división celular, incluso cuando la célula tiene anomalías graves.
3. Evasión de la muerte celular programada (apoptosis): la apoptosis es una forma de muerte celular programada, mecanismo por el cual las células están programadas para morir en caso de sufrir daños. Las células cancerosas se caracterizan por ser capaces de eludir este mecanismo.
4. Estimulación para formar vasos sanguíneos a través de los que se suministren nutrientes a los tumores (angiogénesis): la angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos, que las células cancerosas utilizan para asegurar el suministro continuo de oxígeno y otros nutrientes, importante en el ambiente hipóxico que caracteriza al interior del tumor.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. Potencial replicativo ilimitado: las células normales o no tumorales mueren después de un cierto número de divisiones, mientras que las células cancerosas son capaces de crecer y dividirse indefinidamente (son inmortales). La principal causa de esto se debe principalmente a que los telómeros (ADN que se encuentra al final de los cromosomas), se acortan con cada división celular, hasta que se vuelve tan corto que activa la senescencia, por lo que la célula deja de dividirse. Las células cancerosas evitan esta barrera manipulando diferentes mecanismos que aumentan la longitud de los telómeros.
6. Capacidad de invadir tejidos circundantes (metástasis): las células tumorales pueden desprenderse de su tejido u órgano de origen para invadir otros tejidos y diseminarse. Para ello, sufren una multitud de cambios que les confieren capacidades invasivas, en un proceso de varios pasos que comienza con la invasión local de las células en los tejidos circundantes, para acabar transvasando al sistema circulatorio y llegando a tejidos distantes, donde comenzarán a dividirse en el nuevo tejido.

En el 2011, Weinberg y Hanahan propusieron en su nueva revisión *"Hallmarks of cancer: the next generation"* dos nuevas señas de identidad del cáncer [5] (completando así la lista hasta 8 características del cáncer):

7. Capacidad de reprogramación o modificación del metabolismo: la mayoría de las células cancerosas utilizan vías metabólicas alternativas para la generación de energía, un hecho apreciado en 1956 por Otto Warburg, donde se explica que en lugar de producirse una oxidación completa de la glucosa mediante la respiración mitocondrial, con la que se obtendría un rendimiento energéticomayor (36 moléculas de ATP por molécula de glucosa), tenía lugar demanera predominante una glucólisis aeróbica, produciendo energía principalmente en el citosol, gracias a altas tasas de glicolisis seguidas de la fermentación láctica, es decir, la fermentación de la glucosa a lactato, que presenta un rendimiento energético marcadamente inferior (4 moléculas de ATP por molécula de glucosa). Esto se conoce como "el efecto Warburg", y este investigador postuló que el mal funcionamiento de las mitocondrias podría explicarlo, situando por lo tanto a estos orgánulos en el origen del cáncer. Este efecto es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

una característica indiscutible de muchas células cancerosas, pero hoy se sabe que no se debe necesariamente a una respiración mitocondrial dañada, ya que muchas células que muestran el metabolismo Warburg poseen la respiración mitocondrial intacta, encontrándonos incluso con determinados tipos de cáncer que dependen de la respiración mitocondrial. Sin embargo, de lo que no hay duda es de que las células cancerosas en proliferación presentan unos requerimientos metabólicos muy diferentes a la mayoría de las células diferenciadas normales, mostrándose estas dependencias metabólicas como una buena diana donde atacar a estas células.

8. Evasión del sistema inmune: a pesar de producir un aumento de la inflamación y la angiogénesis, las células tumorales son capaces de evadir el sistema inmune por diversos mecanismos.

La adquisición de todas estas características o señas de identidad de las células tumorales ocurre en diferentes etapas del proceso neoplásico a través de múltiples mecanismos, lo cual es posible gracias a dos características habilitantes principales: el desarrollo de la inestabilidad genómica en las células cancerosas (lo que genera mutaciones aleatorias que impulsan la progresión tumoral) y el proceso inflamatorio promovido por células inmunes innatas (que terminan contribuyendo a este crecimiento descontrolado). De esta manera, además del necesario conocimiento de las bases genéticas que predisponen el desarrollo del cáncer, los microambientes generados tanto alrededor de los tejidos como de los tumores deben estudiarse en profundidad tanto para la prevención como el control de la aparición de neoplasias malignas.

En la última y más reciente revisión del 2022 "*Hallmarks of Cancer: New Dimensions",* Douglas Hanahan incorpora características emergentes adicionales y que involucran nuevos conceptos como "desbloquear la plasticidad fenotípica", "reprogramación epigenética no mutacional", "microbiomas polimórficos" y "células senescentes", conceptos integradores que se incorporan en las características distintivas del cáncer para tratar de facilitar la compresión de la complejidad de este campo, para comprender más plenamente los mecanismos del desarrollo del cáncer y su progresión.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

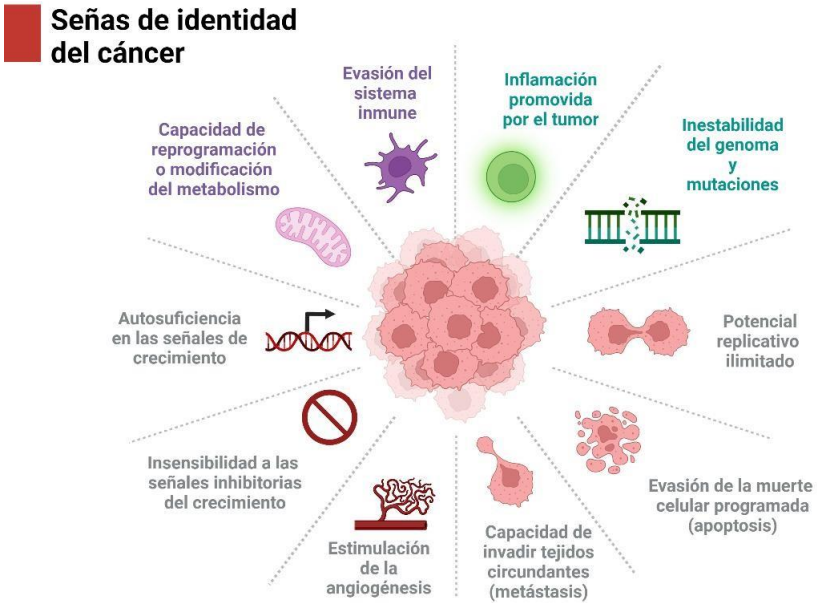


Figura 1. Gráfico que representa las características distinticas del cáncer. En gris, se integran las 6 primeras señas de identidad del cáncer publicadas por Hanahan y Weinberg[4], a las cuales se sumaron unos años más tarde dos señas más[5] (en violeta), y que en conjunto explican lo que podría dar lugar al crecimiento maligno de las células tumorales: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), estimulación para formar vasos sanguíneos a través de los que se suministren nutrientes a los tumores (angiogénesis), potencial replicativo ilimitado, capacidad de invadir tejidos circundantes (metástasis), evasión del sistema inmune y capacidad de reprogramación o modificación del metabolismo para alimentar el crecimiento y división celular. En una reciente revisión, se incorporan nuevas características emergentes adicionales que involucran nuevos conceptos[6] (en verde), como la inflamación que promueve los tumores y la inestabilidad del genoma, contribuyendo a la evolución y progresión del cáncer. Comprender estas características permite el desarrollo de terapias contra el cáncer más específicas y eficaces. Imagen creada con Biorender.com.

3.2 TERAPIAS CONVENCIONALES FRENTE AL CÁNCER Y SUS LIMITACIONES.

Como ya hemos visto, el cáncer es una enfermedad compleja, multifactorial, que continúa siendo uno de los principales retos en investigación en todo el mundo. Las aproximaciones terapéuticas convencionales frente al cáncer se engloban en tres grupos principales: la cirugía, la quimioterapia (que consisten en la administración de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fármacos citotóxicos que pueden eliminar las células tumorales) y la radioterapia (destrucción de las células cancerígenas usando partículas u ondas de alta energía). La cirugía es más eficaz en el tratamiento del tumor primario localizado, y se puede emplear tanto en el tratamiento (extirpación del tumor) como en el diagnóstico o como método de prevención. Con el avance de la radioterapia en la década de 1920 y la quimioterapia después de la década de 1940, la cirugía del cáncer se ha vuelto conservadora[7] empleando ambos tratamientos, la quimioterapia y la radioterapia en muchas ocasiones de forma complementaria. De hecho, en muchas ocasiones, se tiende a la terapia combinada, modalidad que involucra dos o más agentes terapéuticos, tratando de mejorar la eficacia antitumoral, dirigiéndose hacia vías que convergen de manera sinérgica o aditiva. Este enfoque podría reducir potencialmente la resistencia a los medicamentos y, al mismo tiempo, proporcionar beneficios terapéuticos contra el cáncer, como reducir el crecimiento tumoral y el potencial metastásico[8].

Las estrategias terapéuticas convencionales frente al cáncer más recomendadas incluyen la resección quirúrgica de los tumores seguida de radioterapia y/o quimioterapia[9], siendo eficaz la cirugía especialmente en etapas tempranas de la progresión de la enfermedad. Aunque se sigue mejorando y afinando las terapias gracias a la investigación, la radioterapia puede dañar células, órganos y tejidos sanos, al igual que la prácticamente todos los agentes quimioterapéuticos son citotóxicos no solo frente a células tumorales, si no también frente otras células sanas, especialmente las que se dividen y crecen rápidamente[10]. Esto, junto a la resistencia generada a los fármacos antitumorales (que se profundiza en el siguiente apartado), así como dificultad para seleccionar la dosis, la falta de especificidad, el metabolismo rápido del fármaco y los frecuentes efectos secundarios dañinos de la terapia convencional, hacen necesario seguir investigando en nuevas terapias frente al cáncer.

3.2.1 El problema de las resistencias en la lucha frente al cáncer.

La resistencia a las terapias contra el cáncer es un fenómeno que se observa de forma frecuente en la práctica clínica[11], siendo una de las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

principales causas del fracaso del tratamiento y la baja supervivencia de los pacientes. La capacidad de respuesta reducida de las células cancerosas es un fenómeno polifacético que puede surgir por diversos factores, como genéticos, epigenéticos y microambientales. La resistencia terapéutica del cáncer se puede clasificar en resistencia intrínseca y adquirida según el momento de aparición de la resistencia[12]. La resistencia intrínseca, también conocida como resistencia primaria, está mediada por factores endógenos que están presentes en las células o tejidos tumorales antes de aplicar cualquier tipo de terapia, lo que proporciona a las células cancerosas ventajas de supervivencia y adaptabilidad al estrés terapéutico primario [13,14,15]. Sin embargo, la resistencia adquirida a los diferentes fármacos se desarrolla después de recibir un tratamiento contra el cáncer, donde se produce un beneficio clínico inicial, pero que se ve disminuido o desaparece con el paso del tiempo, y que generalmente está mediada por alteraciones adaptativas frente a la terapia administrada en tumores que inicialmente eran sensibles, lo que compromete la efectividad del tratamiento[16–18]. La capacidad de respuesta reducida de las células tumorales puede estar asociada con varios mecanismos, que generalmente involucran factores genéticos y otros mecanismos contribuyentes no genéticos. Los factores genéticos son críticos a la hora de hablar de resistencia terapéutica, donde se podría mencionar la diversidad genética, las mutaciones adquiridas que afectan a las dianas farmacológicas y las modificaciones epigenéticas, que pueden afectar a su vez a la heterogeneidad intratumoral, la plasticidad de las células tumorales, la reparación del ADN y la susceptibilidad de las células tumorales a las vías de muerte celular, conduciendo a una resistencia mediada por numerosos factores [19–21]. Por otro lado, se pueden dar casos de resistencia a la terapia sin haber alteraciones genéticas[22], que podría estar mediada por la inactivación metabólica de los fármacos[23], la reducción de la concentración intracelular del fármaco por diversos transportadores[24–26] y la compartimentación de los fármacos, como su acumulación en los lisosomas[27]. Hay que considerar además otros factores dentro de las células tumorales, como el microambiente tumoral, (TME, del inglés, *tumor microenvironment*) que está involucrado en el desarrollo de resistencia en algunos cánceres[28].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Históricamente, uno de los principales tratamientos que se emplean es la quimioterapia, y entre otros fármacos, cabe destacar el uso del cisplatino (CDDP), que se administra comúnmente por vía intravenosa como quimioterapia de primera línea para pacientes que padecen diversas neoplasias malignas. Hace poco, en el año 2023, se produjo el 45.º aniversario de la aprobación por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, del inglés *Food and Drug Administration*) del CDDP como medicamento anticancerígeno y, en la actualidad, se sigue usando de forma muy amplia contra un espectro de tumores, como el cáncer de ovario en etapa temprana, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (generalmente desarrollado por fumadores), cáncer de cabeza y cuello y cáncer de vejiga avanzado[29]. Probablemente, los mejores resultados se obtienen contra el cáncer testicular, donde el CDDP cura con una efectividad del 100% si el diagnóstico del cáncer es temprano. Se estima que el 46% de los pacientes sometidos a quimioterapia en la clínica reciben un fármaco a base de platino[30], y que por tanto es un tema de interés creciente.

La estructura molecular del CDDP determina su principal actividad anticancerígena de manera dosis-dependiente, uniéndose al ADN y produciendo aductos de ADN[31] (Fig.2). El CDDP se activa al ingresar al citoplasma desplazando sus átomos de cloruro con moléculas de agua, formando un electrófilo con afinidad hacia los grupos sulfhidrilo de las proteínas y átomos donantes de nitrógeno en los ácidos nucleicos[32]. Esta unión selectiva de las bases purínicas con CDDP produce lo que se conoce como aductos de CDDP, desencadenando el bloqueo en la división celular e induciendo la muerte celular por apoptosis[33].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

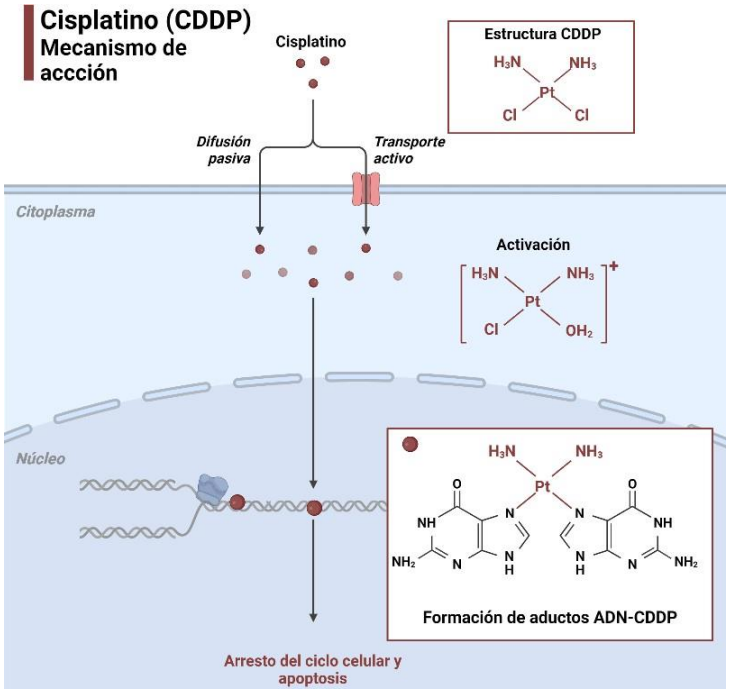


Figura 2. Mecanismo de acción del CDDP. Tras su administración, entra a la célula y uno de los ligandos de cloro es desplazado por agua (un ligando acuoso), en un proceso llamado acuación. Este ligando acuoso se desplaza con facilidad, lo que permite al átomo de platino insertarse en un lugar básico del ADN. En consecuencia, se produce una unión cruzada entre dos bases de ADN mediante el desplazamiento del otro ligando cloro, formando aductos de ADN-CDDP produciendo un arresto celular y daño irreversible que acaba desencadenando por diversas vías la muerte celular por apoptosis[34]. Imagen creada con Biorender.com.

Otro de los mecanismos de acción relacionado con el CDDP es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha demostrado que el CDDP genera ROS directa o indirectamente a través de las mitocondrias[35]. Esta citotoxicidad del CDDP se relaciona con la peroxidación lipídica (proceso que se refiere a la degradación oxidativa de los lípidos, donde los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares[36]), lo que confirma el papel de los radicales libres de oxígeno[37]. La liberación de subproductos de la peroxidación lipídica, como el malondialdehído (MDA), aumenta la carbonilación de proteínas (esto es, una oxidación severa de las mismas), induciendo daño oxidativo de las membranas celulares y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pudiendo desencadenar la apoptosis[38]. Otros estudios han demostrado su relación con el retículo endoplasmático, donde se sugiere que la salida de calcio del retículo endoplásmico regula la apoptosis inducida por CDDP en células de cáncer de cuello uterino humano [39], mostrando como el tratamiento con CDDP aumentaba los niveles de Ca^{2+} libre en el citoplasma y las mitocondrias lo que desencadenaba aún más las vías de apoptosis mediadas por las mitocondrias y asociadas al estrés del RE.

A pesar de haberse demostrado su eficacia contra diferente tipo de tumores sólidos, su tratamiento está limitado por diversos motivos. Los principales son los efectos secundarios asociados como mielotoxicidad, toxicidad gastrointestinal, neurotoxicidad, ototoxicidad, cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, trastornos respiratorios, afectación a la piel (problemas dermatológicos), vómitos o náuseas y cambios en el ciclo de sueño-vigilia, entre otros, que se deben principalmente a su distribución no específica dentro del organismo[40]. Algunos de estos efectos secundarios pueden controlarse mediante la administración combinada de inhibidores del ciclo celular (para proteger de la nefrotoxicidad)[41], agentes quelantes de metales pesados[42] y bioflavonoides[43] entre otros, para disminuir las implicaciones toxicológicas sin comprometer la acción oncolítica. Pero sin duda su principal factor limitante es la generación de resistencia que surge como respuesta al uso de este tratamiento[34,44,45], cuyos principales mecanismos de resistencia quedan resumidos en la Fig.3. Aunque haya diferencias en los diferentes mecanismos que contribuyen a la resistencia tumoral general, se conoce que más de un mecanismo de resistencia puede estar presente simultáneamente en las células tumorales resistentes a los fármacos basados en platino[46]. Los mecanismos de resistencia a CDDP son diversos, y podrían dividirse en cuatro grandes grupos, en función a cuándo se produce la resistencia[45,47]: 1) **antes de la diana**: mecanismos por los cuales las células cancerosas eluden el potencial citotóxico del CDDP antes de que se una a sus objetivos citoplasmáticos y al ADN; 2) **en la diana**: el reconocimiento de los aductos de ADN-CDDP y la consiguiente generación de una señal apoptótica a menudo se ve afectado en las células cancerosas resistentes al CDDP debido a una variedad de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mecanismos, incluyendo la capacidad de reparar aductos a un ritmo mayor o se vuelven capaces de tolerar lesiones del ADN no reparadas; 3) **fuera de la diana**: el fenotipo resistente al CDDP también puede mantenerse (si no generarse por completo) mediante alteraciones en las vías de señalización que no están directamente activadas por el CDDP, pero que compensan (y por lo tanto interrumpen) las señales letales inducidas por el CDDP; algunos ejemplos serían la autofagia, la transición epitelio mesénquima, las células senescentes o la epigenética; 4) **después de la diana**: puede ser el resultado de una gran cantidad de alteraciones, incluidos defectos en las vías de transducción de señales que normalmente provocan la apoptosis en respuesta al daño del ADN, así como problemas con la propia maquinaria ejecutora de la muerte celular.

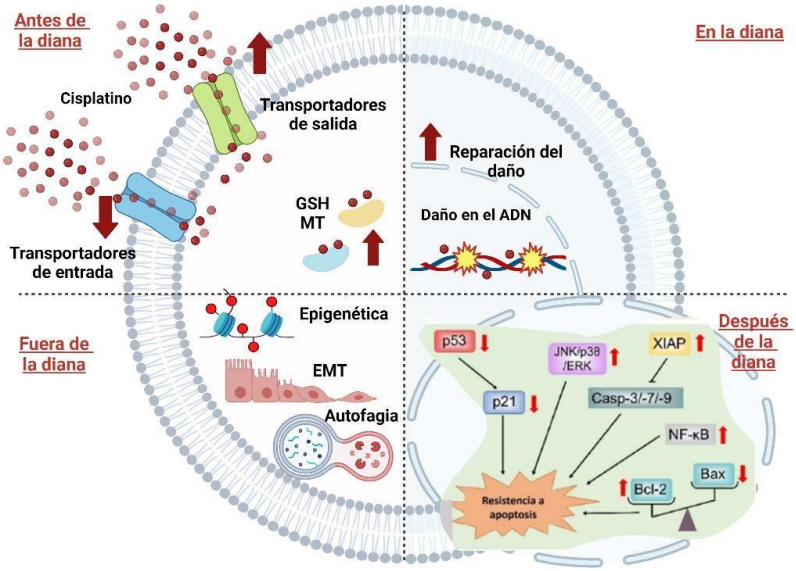


Figura 3. Esquema de los principales mecanismos que median la resistencia a CDDP en las células tumorales. Antes de la diana: disminución de los transportadores de entrada a la célula o incremento de los transportadores de salida que incrementan el eflujo del CDDP. La GSH (glutatión) o las MT (metalotioneínas) están asociadas a la resistencia también. **En la diana**: El incremento de la reparación del daño en el ADN está directamente asociado al incremento a la resistencia. **Fuera de la diana**: procesos como la transición epitelio mesénquima, la autofagia, o la epigenética inducen resistencia al CDDP. **Después de la diana**: Alteraciones que incluyen defectos en las vías de transducción de señales que normalmente provocan la apoptosis en respuesta al daño del ADN puede provocar resistencia a CDDP. Imagen creada con Biorender.com.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1) Mecanismos de resistencia "antes de la diana".

Esta resistencia se relaciona con la reducción de la entrada de CDDP a la célula o con un incremento del fármaco al espacio extracelular[44,48]. La entrada del CDDP a la célula depende de las concentraciones de iones de sodio y potasio, el pH, la presencia de agentes reductores y la acción de transportadores y canales, que están acoplados al mecanismo de difusión pasiva[44]. Entre los principales transportadores descritos cabe destacar la importancia de los transportadores de cationes orgánicos (OCT) y el transportador de cobre CTR1 (*copper transport protein 1*). En las células resistentes, se observó que el CDDP provoca una disminución en la expresión estos transportadores, disminuyendo la concentración del fármaco dentro de la célula[24,32,49,50,51,52]. Además, los transportadores que incrementan el flujo hacia fuera de la célula están asociados a la resistencia a numerosos fármacos, como es el caso de la proteína MRP2, o los miembros de la familia de *ATP-binding cassette* (ABC), como la ATP7A y ATP7B[53,54,55,12]. Otro mecanismo "pre-diana" que se conoce es la inactivación intracelular del CDDP mediante la formación de complejos con compuestos presentes en el citosol celular, principalmente aquellos que contienen grupos tiol como el glutatión reducido (GSH) o las metalotioneínas (MT)[56,57].

2) Mecanismos de resistencia "en la diana".

Una vez que el CDDP se une al ADN, la célula puede sobrevivir activando mecanismos de reparación del ADN o mediante tolerancia al daño inducido. Dentro de las vías de reparación del ADN, la reparación por escisión de nucleótidos parece desempeñar un papel clave en la eliminación del daño del CDDP. Esta vía de reparación se encarga de eliminar los enlaces formados entre el platino y el ADN mediante la acción de las proteínas ERCC1 y XPF. Estas proteínas forman un heterodímero y actúan cortando el extremo 5' de la zona de la hebra donde el platino se ha unido al ADN para permitir la posterior eliminación del aducto. Se ha descrito una relación entre el aumento de los niveles de expresión de la endonucleasa ERCC1 y la resistencia al CDDP[58,59,60,61,62]. El aumento de la tolerancia al daño en el ADN inducido por el CDDP se puede relacionar también con una pérdida de función de la vía de reparación de bases desparejadas (MMR). Durante la MMR, diferentes proteínas reconocen aductos intracatenarios,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

incluidas MSH2 y MLH1, que, junto con otras proteínas MMR, detectan daños y transmiten señales proapoptóticas; si estos genes están mutados o regulados negativamente debido a la resistencia al CDDP, no se produce la apoptosis[44]. Otra vía por la que pueden repararse los aductos es mediante el mecanismo de recombinación homóloga (HRR). En algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama y de ovario, se ha descubierto que los genes BRCA1 y BRCA2, que codifican proteínas del sistema HRR, están mutados[63]. Los tipos de cáncer que no funciona bien el sistema HRR, a menudo, son más sensibles al CDDP a los que funciona con normalidad[64]. Por último, destacar la tolerancia al daño en el ADN relacionado con ciertas clases de polimerasas que reparan el daño en el ADN (PARP), que, en los casos de resistencia, hacen que la síntesis de ADN no se bloquee y, en consecuencia, las vías apoptóticas no se activen [65,66].

3) Mecanismos de resistencia "fuera de la diana".

Estos mecanismos están relacionados con alteraciones en vías de señalización que no están directamente relacionadas con el CDDP, pero que de alguna forma interfieren con los eventos que inducen la muerte por apoptosis[48]. Por ejemplo, diferentes estudios *in vitro* sobre la autofagia (un proceso celular responsable de la degradación y el reciclaje de componentes celulares dañados) muestran que su inhibición recupera la sensibilidad al CDDP[67]. De igual forma, el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) puede contribuir significativamente a la quimiorresistencia al convertir las células epiteliales inmóviles en células mesenquimales móviles y alterar la adhesión célula-célula, así como la matriz extracelular, lo que lleva a la invasión de células tumorales[68,69]. Otro ejemplo en la resistencia al tratamiento con el CDDP es el mediado por factores epigenéticos que modifican la expresión de genes importantes en la respuesta al fármaco[47].

4) Mecanismos de resistencia "después de la diana".

La resistencia "*post-target"* incluye mecanismos que afectan a las vías de señalización que conducen a la muerte celular provocada por los aductos CDDP-ADN. Por ejemplo, la inactivación del gen TP53 (que codifica para la proteína p53 que se encuentra en el núcleo de las células y cumple una función importante en el control de la división y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

destrucción de las células), produce una pérdida de actividad apoptótica y la aparición de resistencias en el 50% de los cánceres humanos[70]. De igual forma, la inactivación de caspasas como las caspasas 3, 8 y 9, de gran importancia en el proceso de apoptosis, se ha asociado con resistencia al CDDP en diferentes tipos de cánceres como el de cabeza y cuello, ovario, mama y otros [71,72,73].

Por tanto, la resistencia a los fármacos a base de platino no sólo supone un problema de cara al tratamiento con quimioterapia, sino también un freno en la lucha contra el cáncer. El conocimiento adquirido con todas las herramientas y estudios disponibles gracias a numerosas investigaciones, están abriendo un campo de desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer cada vez más eficientes y menos tóxicas, focalizándose en la medicina cada vez más personalizada. En el siguiente apartado tratamos algunas de ellas.

3.3 NUEVOS AVANCES TERAPÉUTICOS FRENTE AL CÁNCER.

El enfoque de los tratamientos convencionales frente al cáncer, como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, siguen en uso, mientras que cada vez se siguen logrando mejores resultados y avances significativos con nuevas terapias innovadoras. Entre estas, algunas de las más sonadas en los últimos años, se encuentran la terapia con células madre, la terapia dirigida, la terapia de ablación, el uso de la nanomedicina o nanopartículas, antioxidantes naturales, terapia fotodinámica, la terapia basada en ferroptosis y la inmunoterapia[74], las cuales se desarrollan a continuación. Las células madre son células indiferenciadas presentes en la médula ósea con capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular del cuerpo. La aplicación de células madre aún se encuentra en fase clínica experimental, y su uso se está investigando, por ejemplo, en la regeneración de tejidos dañados por el cáncer, principalmente en los que afectan a las células de la sangre, como las leucemias y linfomas[75,76]. Por otro lado, las terapias dirigidas contra el cáncer se basan en fármacos u otras sustancias cuyo mecanismo de acción principal es interferir o bloquear el crecimiento y la propagación de las células tumorales[7]; entre este tipo de fármacos encontramos los anticuerpos monoclonales[77] o pequeñas moléculas inhibitorias de menos de 500 Da[78]. Otra de las técnicas novedosas empleadas en los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

últimos tiempos es la ablación, que consiste en destruir el tejido tumoral sin extirparlo, especialmente indicado en tumores de tamaño pequeño (menor a 3 cm) y cuando la cirugía está contraindicada. La ablación térmica emplea la hipertermia o hipotermia extrema para destruir el tejido tumoral concentrándose en una zona focal dentro y alrededor del tumor[79]. En esta línea de tratamientos, encontramos también la terapia fotodinámica, que se conoce hace miles de años, pero comenzó a desarrollarse en el siglo pasado. Consiste en un tratamiento de dos etapas que combina la energía luminosa con un fármaco fotosensibilizador diseñado para destruir las células tumorales al producirse la activación de la luz. Los fotosensibilizadores se activan mediante una longitud de onda específica de energía luminosa, generalmente procedente de un láser[80].

Actualmente se están desarrollando numerosos ensayos clínicos de terapia génica,de los cuales más de la mitad están relacionados con el cáncer. Se estánevaluando diferentes estrategias, como la expresión de genes proapoptóticos y quimiosensibilizantes, la expresión de genes supresores de tumores, que generen respuestas inmunitarias antitumorales específicas y el silenciamiento dirigido de oncogenes[81].

Otro tipo de tratamiento que se está investigando en modelos *in vivo* e *in vitro* es el uso de antioxidantes naturales contra el cáncer, como las vitaminas, alcaloides, flavonoides y carotenoides, que actúan como fármacos preventivos y terapéuticos mostrando propiedades antiproliferativas y proapoptóticas[82]. Sin duda, hay dos tipos de terapia que están en el punto de mira estos últimos años y que están siendo una potente herramienta frente al cáncer: la nanomedicina o nanotecnología y la inmunoterapia, que han mostrado en numerosos estudios un gran potencial antitumoral. De estas se hablará con más detenimiento a continuación, ya que se han empleado en esta tesis doctoral.

Todas estas terapias innovadoras, están cada vez más focalizadas al desarrollo de métodos seguros y eficientes, cuyos principales objetivos son claros: disminuir los efectos secundarios de la terapia convencional y prevenir la aparición de resistencias, empleando cada vez más terapias dirigidas, así como terapias combinatorias que muestren un efecto sinérgico[8].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.1 Terapias innovadoras empleadas en este trabajo.

En este trabajo se ha realizado la evaluación biológica de tres terapias innovadoras frente al cáncer, dos de ellas englobadas en el mundo de la nanomedicina: los clústeres atómicos cuánticos de cinco átomos de plata, dentro de la escala subnanométrica y diferentes nanosistemas portadores de diferentes fármacos frente a dianas tumorales específicas, así como una tercera aproximación que va ganando terreno en el mundo de la terapia frente al cáncer, como es la inmunoterapia.

3.3.1.1 Clústeres atómicos cuánticos de 5 átomos de plata frente al cáncer.

Los clústeres atómicos cuánticos (AQCs, de sus siglas en inglés *"Atomic quantum clusters"*) de metales son agrupaciones sub-nanométricas de átomos que tienen propiedades particulares muy diferentes a las del metal molecular. Algunos clústeres metálicos de pocos átomos pueden mostrar propiedades únicas que no se observan en nanopartículas más grandes[83], lo cual se debe a su tamaño reducido en la escala subnanométrica (Fig. 4), que altera las propiedades de las partículas, como resultado de un fuerte confinamiento cuántico[84]. Entre estas propiedades se incluye la luminiscencia, catálisis y otras[85,86,87,88].

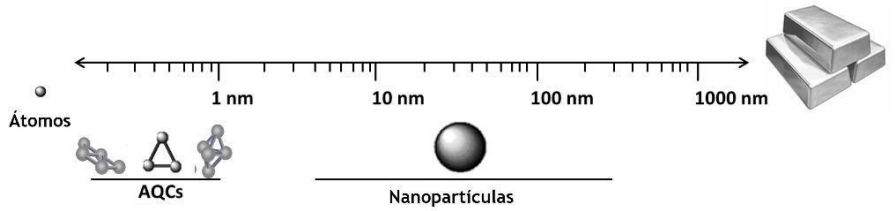


Figura 4. Escala de tamaño donde se compara los AQCs con los átomos y las nanopartículas. Imagen creada con Biorender.com.

Esas propiedades de los clústeres metálicos pequeños dependen en gran medida del número de átomos. Un claro ejemplo lo encontramos en los clústeres de átomos de plata: los AQCs-Ag3 (clústeres atómicos cuánticos de 3 átomos de plata), se intercalan en el ADN, afectando a la formación de la cromatina durante la fase S y disminuyendo así su compactación por lo que su coadministración con CDDP incrementa la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cantidad de CDDP unido al ADN de las células tumorales sin modificar los niveles de CDDP en los tejidos normales [89,90]; sin embargo, con tan sólo dos átomos más de plata, los clústeres atómicos cuánticos de cinco átomos de plata (AQCs-Ag5), tienen un mecanismo de acción completamente diferente, ya que catalizan la oxidación del azufre de grupos tioles y su actividad catalítica aumenta con diferentes especies oxidantes en el orden $O_2 \ll H_2O_2 < OH\bullet$[91].

Los AQCs-Ag5 (Fig. 5) pueden entrar a las células y mitocondrias mediante difusión pasiva como una especie no cargada y producir la oxidación selectiva de grupos tioles[91], catalizando la oxidación irreversible de proteínas como la GSH y la PRDX, alterando así la homeostasis redox y desencadenando la apoptosis celular. Además, los AQCs-Ag5 ofrecen una ventana terapéutica importante respecto a otros quimioterapéuticos, ya que actúan específicamente frente a las células cancerosas, que debido a aberraciones metabólicas y de señalización, exhiben niveles elevados de ROS, como H_2O_2[92], lo que las hace más sensibles a los AQCs-Ag5 en presencia de un entorno oxidativo intracelular, ya que se ha demostrado que los AQCs-Ag5 aceleran las reacciones oxidativas, mientras que en un ambiente intracelular reductor, los AQCs-Ag5 no tiene efectos biológicos [91].

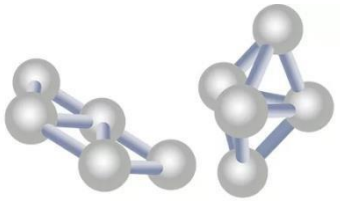


Figura 5. Simulación de la estructura conformacional de los AQCs-Ag5. Los AQCs de 5 átomos de plata, podrían establecer diferentes conformaciones, como plana o bipiramidal trigonal. Imagen tomada de Nanogap.es

Por todo esto, los AQCs-Ag5 podrían presentarse como un enfoque innovador en el tratamiento frente al cáncer, dado que existen muy pocas modalidades terapéuticas activas basadas en el balance redox celular, actuando selectivamente frente células con estrés oxidativo, como las células cancerosas. Es importante destacar que, la mayoría de las células normales en reposo, tienen un bajo nivel de estrés oxidativo y los niveles de H_2O_2 son bajos, por lo que, aunque los AQCs-Ag5 acelerasen la oxidación de los tioles de los sistemas antioxidantes (como GSH, PRDX, Trx) las células podrían mantener la homeostasis

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

redox. Sin embargo, en las células tumorales se da un entorno muy diferente, con un metabolismo más acelerado[92] y los niveles de H_2O_2 podrían pasar por encima de un umbral donde los sistemas antioxidantes no podrían contrarrestar el aumento de la tasa de oxidación de los grupos tioles causado por la presencia de los AQCs-Ag5. Por ello, los AQCs-Ag5 no inducen la muerte celular en un entorno de homeostasis redox de las células normales, pero cuando existe una producción elevada de H_2O_2 intracelular, los AQCs-Ag5 pueden catalizar la oxidación irreversible de grupos tiol de vías antioxidantes en moléculas clave como GSH o Trx[91], que en última instancia conducen al estrés oxidativo y la muerte celular.

En este trabajo, se ha realizado una evaluación biológica del tratamiento con AQCs-Ag5 en modelos de resistencia a CDDP. Dado que las mitocondrias son un componente central en la señalización de la apoptosis intrínseca, no es sorprendente que desempeñen un papel importante en la quimiorresistencia [93,94]. Se sabe que algunas vías que están directamente relacionadas con la forma de actuación de los AQCs-Ag5 tendrían relación con la resistencia a CDDP, y en estos casos los AQCs-Ag5 podrían ser de gran utilidad. Por ejemplo, la señalización Nrf2[95], factor de transcripción clave que regula la expresión de numerosas enzimas antioxidantes podría disminuir los niveles de ROS inhibiendo la muerte celular en las células cancerosas y proporcionando quimiorresistencia. Los AQCs-Ag5 podrían jugar un papel interesante en estos casos ya que se sabe que cuando se inhibe el sistema antioxidante Nrf2/GSH se incrementa la sensibilidad a la acción del CDDP[96]. Otro ejemplo que quimiorresistencia es el producido por la PRDX3, que aumenta la resistencia al CDDP en células de cáncer gástrico[97]. Los AQCs-Ag5 son capaces de oxidar la PRDX3 de forma irreversible[91], por lo que podrían sensibilizar las células resistentes.

Se sabe que las especies reactivas de oxígeno, como el H_2O_2, se generan continuamente en las células que consumen oxígeno y está bien establecido que durante la proliferación la respiración celular aumenta, por tanto, incrementando los niveles de ROS. En la respiración celular normal, en el proceso conocido como fosforilación oxidativa, los electrones procedentes de la oxidación de nutrientes en el ciclo de Krebs pasan a través de una serie de complejos mitocondriales hasta que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

llegan al aceptor terminal de electrones (O_2). En este proceso, los electrones pueden salir de la cadena de transporte de electrones en los complejos I y III y reaccionar con O_2 para producir superóxido (O_2-)[98], que se libera a la matriz mitocondrial o al espacio intermembrana, donde las enzimas superóxido dismutasas SOD1 y SOD2 lo convierten rápidamente a H_2O_2 (Fig. 6).

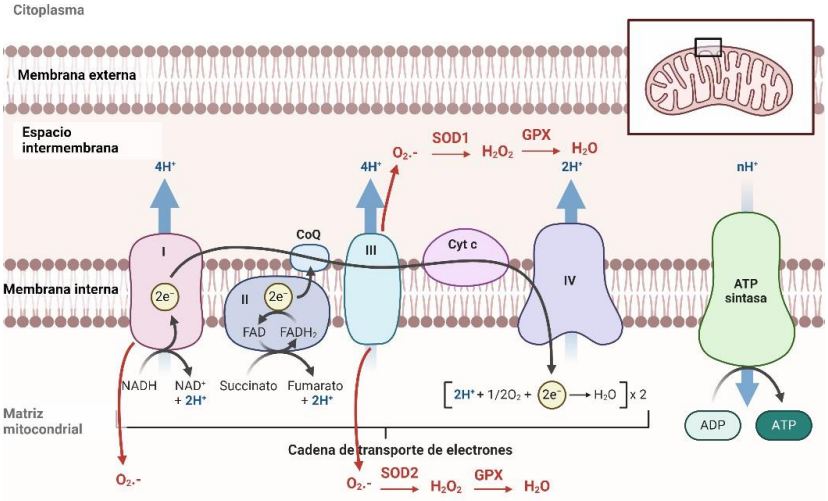


Figura 6. Producción de ROS mitocondriales durante la fosforilación oxidativa. La generación de ROS mitocondriales tiene lugar principalmente en la cadena de transporte de electrones ubicada en la membrana mitocondrial interna durante el proceso de respiración celular, en la fosforilación oxidativa. La fuga de electrones en los complejos I y III conduce a la reducción parcial del oxígeno para formar superóxido (O_2-)[99]. Posteriormente, el superóxido se dismuta rápidamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante dos dismutasas, la superóxido dismutasa 2 (SOD2) en la matriz mitocondrial y la superóxido dismutasa 1 (SOD1) en el espacio intermembrana mitocondrial. En ambos casos, tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno generados en este proceso se consideran ROS mitocondriales. Este H_2O_2 formado puede ser tóxico, por lo que se degrada principalmente por la intervención de enzimas específicas, incluyendo la vía de la Trx o la vía del GSH. Imagen creada con Biorender.com.

Este H_2O_2 formado puede ser tóxico, por lo que se degrada principalmente por la intervención de enzimas específicas, incluyendo la vía de la Trx o la vía de la GSH[100,101], como se muestra en la Fig. 7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

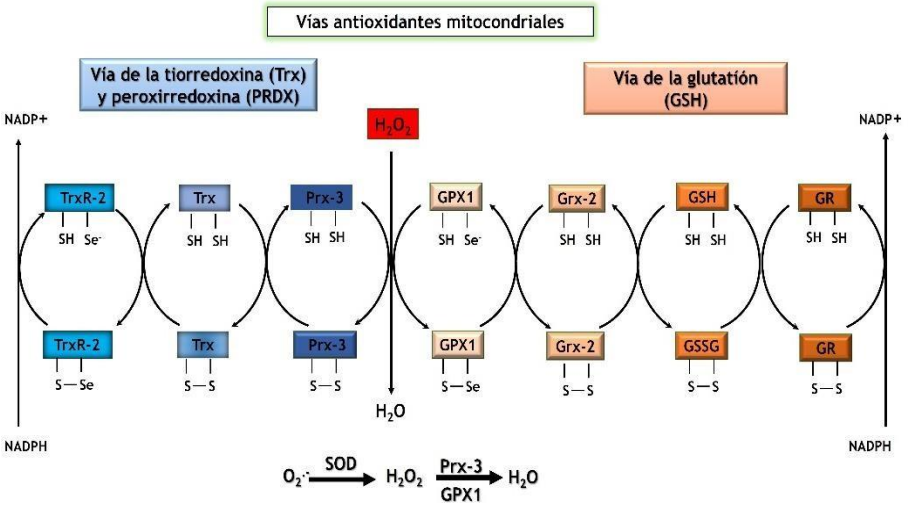


Figura 7. Principales vías antioxidantes mitocondriales. Para evitar el daño oxidativo, las especies reactivas de oxígeno se desintoxican mediante catalasas y otros dos sistemas: glutatión (GSH) y tiorredoxina (Trx) [102,103,104]. Se requiere NADPH para la regeneración de GSH y Trx a través de la glutatión reductasa (GR) y la tiorredoxina reductasa (TrxR-2), respectivamente. De esta forma, el superóxido (O2-) se transforma a H_2O_2 por la superóxido dismutasa (SOD), y este H_2O_2 se degrada a agua (H_2O) por enzimas como la glutatión peroxidasa 1 (GPX1) y peroxirredoxina (PRDX3). Figura de creación propia.

Estas vías antioxidantes que implican a la GSH y la Trx, son dos de los mecanismos más importantes y abundantes que existen y mediante los cuales las células humanas pueden mantener la homeostasis redox [105,106,102,107]. Además, las peroxirredoxinas (PRDX) son una familia muy grande y altamente conservada de peroxidasas que reducen los peróxidos gracias a un residuo de cisteína conservado [108,109].

Por todo esto, y dado que en muchos estudios se destaca el contenido mitocondrial como biomarcador de la respuesta a terapias basadas en platino y donde se propone el incremento de la producción de ROS mitocondrial para mejorar la sensibilidad a las terapias anticancerígenas basadas en CDDP[110], los AQCs-Ag5 podrían jugar un papel importante en casos de quimiorresistencia, presentándose como una interesante terapia innovadora.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.1.2 Inmunoterapia frente al cáncer: anticuerpos monoclonales terapéuticos.

La inmunoterapia contra el cáncer es una estrategia innovadora que está avanzando rápidamente en los últimos años, considerándose uno de los pilares de la terapia contra el cáncer, uniéndose a la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia y la terapia dirigida[111], y no es más que una técnica en la que emplea nuestro sistema inmunológico para combatir las células tumorales, ayudándolo a reconocer y atacar de forma específica esas células.

El sistema inmunológico se ha clasificado comúnmente en inmunidad innata y en inmunidad adaptativa o adquirida, teniendo en muchos casos funciones en común y estando íntimamente relacionados. El sistema inmunológico innato incluye a las células dendríticas, células asesinas naturales (células NK, del inglés, *natural killer*), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos; todas estas células constituyen una primera línea de defensa de actuación rápida contra antígenos extraños, ya que no requieren estimulación previa. El sistema inmunológico adaptativo incluye linfocitos B, linfocitos T auxiliares CD4+ y linfocitos T citotóxicos CD8+, y requieren una presentación previa por parte de las células presentadoras de antígenos para su activación[112]; este sistema inmunológico adaptativo es capaz de generar linfocitos de células T y B específicos de antígeno.

Se estima que una célula experimenta al día más de 20.000 eventos que dañan el ADN[113], las cuales se reparan normalmente mediante diferentes vías de reparación del ADN sin efectos duraderos[114]. Las células que no se reparan y que adquieren cambios malignos o potencialmente malignos suelen ser reconocidas y eliminadas por el sistema de inmunovigilancia tumoral, lo que implica mecanismos mediados por células que pueden diferenciar entre antígenos propios y no propios. Dado que una célula maligna puede tener más de 11.000 mutaciones genómicas, se pueden expresar muchos antígenos asociados a tumores nuevos, como por ejemplo, productos de protooncogenes mutados, genes supresores de tumores, proteínas sobreexpresadas o expresadas de manera aberrante, antígenos tumorales producidos por virus oncogénicos…[115]. Algunas células malignas pueden evadir el sistema de inmunovigilancia tumoral manipulando sus propias

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

características, así como las células de su microambiente, para convertirse en tumores que proliferan de manera exitosa, siendo estos mecanismos evasivos una de las principales áreas de interés en la investigación actual de la inmunoterapia, habiéndose propuesto esta capacidad de las células cancerosas para evadir el sistema inmune como como la octava seña de identidad del cáncer por Douglas Hanahan y Robert Weinberg[5]. Esta evasión se consigue no sólo modulando sus propias características celulares sino también creando su propio "microambiente tumoral" al reclutar células inmunes aparentemente normales, como macrófagos y células B y T reguladoras, que junto a la producción de diversas citoquinas, las células tumorales pueden generar un microambiente inmunosupresor, protumorogénico y prometastásico[116].

Algunos de los últimos avances clínicos en inmunoterapia contra el cáncer, se basan en anticuerpos monoclonales, el bloqueo de puntos de control inmunológico, la terapia celular adoptiva (como las prometedoras *CAR-T cells*), los virus oncolíticos y las vacunas[117,118], que se describen a continuación.

Normalmente, las vacunas ayudan a protegernos de las enfermedades, estimulando el sistema inmunológico para que entre en acción, reconociendo y atacando su diana cuando existe un nuevo contacto con el patógeno del que se nos ha vacunado. En contraste, las vacunas para el tratamiento del cáncer son para personas que ya tienen la enfermedad, y se vacuna para ayudar al sistema inmunológico a reconocer y atacar las células cancerosas. Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de vacunas exitosas contra el cáncer es la identificación de los antígenos más adecuados[119]. Las primeras formulaciones de vacunas consistían en péptidos cortos (generalmente sin un adyuvante eficaz que activase las células dendríticas), que dieron resultados con eficacia clínica mínima. Poco a poco se han seguido mejorando, y tiempo después se demostró la mejoría de estas vacunas al coadministrarse con estimulantes inmunitarios como la IL-2 [120]. En todo caso, dado que las proteínas completas presentan un perfil más extenso de epítopos que pudieran ser presentados a las células dendríticas, se han testado en numerosos tipos de vacunas frente al cáncer, aunque en diferentes ensayos en fase clínica II en pacientes con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cáncer de pulmón, no lograron demostrar una respuesta de supervivencia estadísticamente significativa[121]. Se han probado también vacunas de células enteras o lisados celulares como fuentes polivalentes de antígenos tumorales[122], sin embargo, incluso GVAX, la vacuna más prometedora según los primeros estudios, fracasó en los ensayos de fase III debido a una falta de eficacia clínica[123]. Además, dado que las vacunas basadas en células contienen miles de antígenos, han sido criticadas por su falta de especificidad tumoral. La vacuna ideal será aquella capaz de desencadenar la maduración de las células dendríticas a un estado en el que puedan promover la producción de células T citotóxicas CD8+ reactivas a tumores. Para ello, se necesita seguir trabajando en optimizar las condiciones para la inmunización, teniendo en cuenta que las células T específicas de un tumor aún pueden verse comprometida por los numerosos mecanismos de inmunoevasión de las células tumorales[5]. En líneas generales, el trabajo sobre las vacunas frente al cáncer debe continuar, al igual que otras formas de terapia dirigida contra el cáncer, donde el descubrimiento de biomarcadores predictivos, para la identificación de aquellos pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de una vacuna determinada, será un desafío importante para el desarrollo futuro.

Los virus oncolíticos representan un novedoso formato de terapia frente al cáncer que emplea virus nativos o modificados genéticamente que se replican selectivamente y matan las células cancerosas[124]. Varias de las "*Hallmarks* del cáncer", anteriormente descritas, como la proliferación sostenida, la evasión de la apoptosis y la insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento[4], favorecen la replicación selectiva de los virus oncolíticos en células malignas con una toxicidad mínima para los tejidos normales[125]. Lo que también ha llevado a un mayor interés en el empleo de virus para el tratamiento del cáncer es el hecho de que el genoma viral puede modificarse para aumentar la actividad antitumoral y atenuar la patogenicidad[124]. Algunos de los virus que se han probado como vectores para la inmunoterapia son naturalmente no patógenos para los humanos, como paramixovirus, el reovirus y el picornavirus. Otros, incluido el virus del herpes simple, el virus del sarampión (paramixovirus) y el virus vaccinia (poxvirus), se manipulan genéticamente para volverse no patógenos[126]. Aunque

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

prometedores, presentan también limitaciones, ya que, por ejemplo, los pacientes inmunocomprometidos podrían no ser buenos candidatos porque la inmunidad antitumoral mediada por los virus oncolíticos podría verse comprometida en estos pacientes. Además presentan limitación en cuanto a los niveles de eficiencia observados en pacientes con enfermedad más avanzada, donde la mejor opción sería su administración combinada con otros tipos de inmunoterapia[124]. Otra limitación es el hecho de que los virus oncolíticos se inyecten localmente en el tumor para evitar la inmunidad antiviral, por lo que podrían no llegar a tumores en órganos a los que es difícil acceder con una inyección[125]. A pesar de las limitaciones, la terapia con virus oncolíticos ha demostrado una relación riesgo-beneficio favorable y la aprobación por parte de la FDA de algunos de estos virus oncolíticos como el Talimogene Laherparepvec (T-VEC), para el tratamiento del melanoma avanzado es un hito considerable en este campo[127].

Las células tumorales portan una multitud de mutaciones genéticas somáticas y genes alterados epigenéticamente, cuyos productos son potencialmente reconocibles por el sistema inmunológico como antígenos extraños. Aunque se observa una respuesta inmune endógena a estas células en modelos preclínicos y en pacientes, esta respuesta no es eficiente porque los tumores inducen tolerancia entre las células T específicas del tumor y expresan ligandos que se unen a receptores inhibidores impidiendo las funciones de las células T dentro del microambiente tumoral[122,128]. Por lo tanto, para desencadenar una respuesta inmunitaria antitumoral efectiva, es donde entra en juego el "bloqueo de puntos de control inmunológico", en referencia al bloqueo de las vías inmunoinhibitorias activadas por las células cancerosas. Uno de los más destacados es CTLA-4, un receptor inhibidor que regula negativamente las etapas iniciales de la activación de las células T[129]. Por ello se ha investigado en desarrollar anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 para desencadenar la respuesta de células T[122]. Los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 desarrollados han exhibido propiedades antitumorales en varios modelos de tumores murinos,como ovario, vejiga, cerebro y fibrosarcoma, mientras que el bloqueo de CTLA-4 fue ineficaz en otros modelos, como en el carcinoma mamario SM1[130]. Uno de los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

actualmente aprobados por la FDA, Ipilimumab, se emplea como terapia de primera línea en pacientes con melanoma avanzado en fase metastásica[131]. Aunque sólo una fracción relativamente pequeña de pacientes obtiene beneficio clínico, estos estudios establecen claramente que Ipilimumab ofrece a los pacientes beneficios clínicamente significativos y la posibilidad de una supervivencia duradera en lo que normalmente es la etapa terminal de la enfermedad. Otro receptor inhibidor expresado por células T es PD1, cuya señalización inhibe la proliferación de células T, la liberación de citoquinas y la citotoxicidad celular[132]. PD1 tiene dos ligandos conocidos, PD-L1 y PD-L2[132]. En modelos tumorales, la señalización de PD1 inhibe las células T y bloquea la respuesta inmune antitumoral después de unirse a PD-L1 expresado dentro del tumor [122], y la inhibición de esta interacción puede mejorar las respuestas de lascélulas T *in vitro* y mediar la actividad antitumoral (preclínica)[133]. Algunos anticuerpos monoclonales dirigidos a PD1 o PD-L1 han llegado a la clínica e incluyen pembrolizumab y nivolumab [119]. Se hanidentificado otras múltiples vías de puntos de control inmunológico quepodrían ser el objetivo de nuevas terapias. Algunos ejemplos son las proteínas LAG3 y TIM3[134,135], cuya inhibición podría mejorar la inmunidad antitumoral al incrementar la actividad de las células T. Estas proteínas son sólo ejemplos de los numerosos agentes que podríanintervenir en el control inmunológico que se encuentran actualmente enel punto de mira, y que se prevé que mejoren las respuestas antitumorales cuando se usen en combinación con otro tipo de inmunoterapias[136].

Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) son proteínas de fusión diseñadas para dirigir las células T a los antígenos expresados en células cancerosas, y son otro formato de inmunoterapia, la llamada terapia con células CAR-T[137], que ha generado un gran entusiasmo en los recientes últimos años. Aunque no se emplean de una forma tan común como los inhibidores de puntos de control inmunológico, han demostrado la misma capacidad para erradicar leucemias y linfomas muy avanzados[138]. Desde 2017, la FDA ha aprobado varias terapias con células CAR-T para el tratamiento de tumores líquidos, como linfomas, algunas formas de leucemia y, más recientemente, mieloma múltiple[138].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A pesar del entusiasmo en torno a estas terapias, en menos de la mitad de los pacientes tratados se incrementa la supervivencia a largo plazo, además de presentar unos costes muy elevados. En líneas generales, se ha convertido en un tipo de inmunoterapia que forma parte de la medicina moderna, pero que necesita comprender los desafíosasociados a su producción, así como al fracaso de las células T, incluidala mala expansión y la resistencia tumoral. Por todo ello, se requiere aún de mucha investigación para su aplicación a gran escala, con el fin de alcanzar el máximo potencial de esta nueva terapia[138].

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos son inmunoglobulinas (Ig) que normalmente presentan dos fracciones de reconocimiento específico del antígeno (Fab) y un fragmento cristalizable (Fc) terminal que interactúa con los receptores de la superficie de las células del sistema inmune[139], que reconocen antígenos de la superficie celular expresados en las células tumorales diana y median su función a través de diversos mecanismos, como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la citotoxicidad dependiente del complemento, la modulación del sistema inmunológico…[140], los cuales quedan resumidos en la Fig.8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

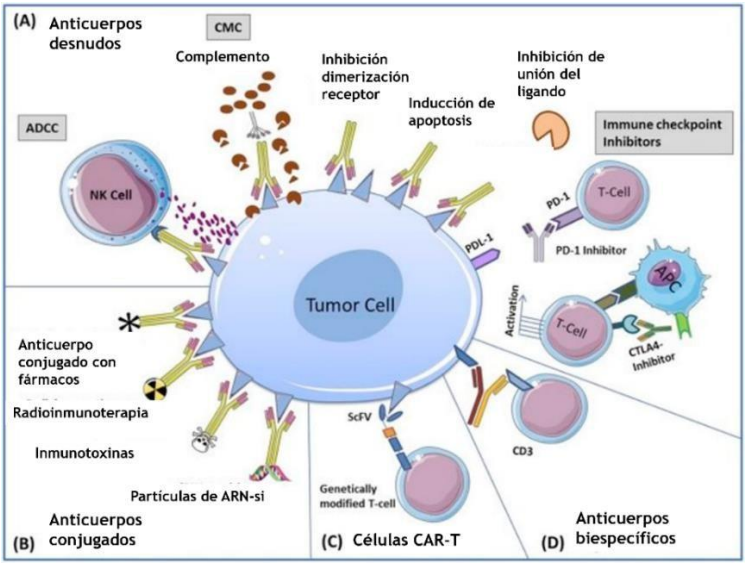


Figura 8. Mecanismos de acción de los anticuerpos con actividad terapéutica. (A) Los anticuerpos monoclonales "desnudos" o sin conjugar pueden realizar sus funciones a través de varios mecanismos, incluida la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) utilizando células efectoras inmunes como las células NK, la citotoxicidad mediada por el complemento (CMC) o CDC (citotoxicidad dependiente del complemento), mediante la inhibición de la dimerización del receptor, induciendo una señal apoptótica o afectando a las células diana bloqueando la unión del ligando, como es el caso de los inhibidores de puntos de control inmunológico, incluido PD-1, que funcionan bloqueando los receptores inhibitorios de células T. (**B**) Los anticuerpos monoclonales conjugados incluyen anticuerpos conjugados con fármacos citotóxicos frente a las células tumorales, como anticuerpos radioinmunoconjugados para administrar radioisótopos a las células tumorales, anticuerpos conjugados con inmunotoxinas y con partículas de ARNsi para regular negativamente un gen diana. **(C)** La terapia con células CAR-T emplea células T modificadas genéticamente para atacar un antígeno específico en las células tumorales. (**D**) Los anticuerpos monoclonales biespecíficos constan de dos brazos, uno de los cuales reconoce las células tumorales y el otro activa antígenos propios de células efectoras inmunitarias, incluido el CD3. Adaptado de Charmsaz *et al.*, Experimental Hematology (2017); con permiso de Elsevier, licencia de uso número 5775910687189).

Centrándonos en tres de las principales funciones efectoras que media la fracción Fc de los anticuerpos monoclonales, nos encontramos con: la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, del inglés *complement-dependent cytotoxicity*), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, del inglés *antibody-dependent cell-*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mediated cytotoxicity) y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP, del inglés *antibody-dependent cellular phagocytosis*). La CDC se produce por la interacción del componente del complemente C1q a Fc, que desencadena la vía de muerte dependiente del complemento; ADCC y ADCP son dos mecanismos mediados directamente por la interacción de la fracción Fc del anticuerpo monoclonal con el receptor FcγR, presente en la superficie de determinadas células del sistema inmunológico, en concreto, en el caso de la ADCC, es un proceso principalmente atribuido a las células NK que se activan por la interacción de su receptor FcγRIIIa con la fracción Fc del anticuerpo monoclonal[141]. Por tanto, para que elproceso de ADCC tenga lugar frente a las células tumorales, se necesitan tres requisitos primordiales: células tumorales que expresen un antígeno diana en la superficie, un anticuerpo monoclonal terapéutico que reconozca ese antígeno (preferentemente los isotipos IgG1 o IgG3, ya que estos dos tipos de anticuerpos se unen a cualquiertipo de receptor FcγR) y la célula inmune efectora que desencadene la muerte de la célula tumoral, que expresa el receptor FcγR; existen diferentes tipos de receptores FcγRs (Ia, IIa-b-c, IIIa-b), y de ellos, el receptor FcγR IIb tiene un efecto inhibitorio. Dentro de las células efectoras del sistema inmune, las células NK solamente tienen receptores FcγR activadores (FcγR IIIa, también conocido como CD16a, y el FcγR IIc, también conocido como CD32c), por lo que estascélulas están consideradas las células efectoras del sistema inmune másimportantes que desencadenan la respuesta ADCC en humanos[142].

Si hablamos del antígeno desde el punto de vista de interés terapéutico en inmunoterapia, es importante que presente características distintivas entre la célula tumoral y la célula sana, como que se encuentre sobreexpresado o se exprese de forma aberrante. En este contexto, se nos ofreció la oportunidad de investigar el tratamiento con inmunoterapia frente al receptor CCR9 en un proyecto de colaboración con la empresa SunRock Biopharma, dado que está en el punto de mira por su interés terapéutico, cuya expresión en tejidos tumorales se asocia al mal pronóstico en pacientes de varios tipos de cáncer[143,144].

CCR9 es un receptor de quimioquinas que tiene como único ligando CCL25 (también conocida como TECK8). La expresión elevada de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CCR9 y CCL25 está asociada a diversos tipos de tumores sólidos, como el cáncer de ovario[145], cáncer de mama[146], cáncer de próstata[147], cáncer de pulmón[148], cáncer de esófago[149] y cáncer de páncreas[150], existiendo una correlación negativa entre la expresión del receptor con la tasa de supervivencia[151,145]. Además, CCR9/CCL25 tienen un papel importante en la invasión tumoral, la migración y la resistencia a apoptosis, en varios tipos de tumores, como en carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, melanoma, ovario, páncreas y próstata [152,153].

Por todo esto, se han realizado numerosas investigaciones en cómo poder utilizar CCR9 como una diana terapéutica frente al cáncer. Entre ellas, la aplicación de anticuerpos monoclonales anti-CCR9 en modelos *in vivo* de leucemia han demostrado un gran potencial en la terapia dirigida frente este receptor en tumores líquidos[154,155, 156,157], pero hasta ahora poco se conoce de la terapia dirigida en tumores sólidos que altamente expresan esta diana como es el caso del adenocarcinoma de páncreas. Por ello, en este trabajo hemos querido investigar el uso de un anticuerpo monoclonal terapéutico (SRB1) que se sabe tiene alta afinidad por CCR9, sintetizado por la compañía SunRock Biopharma, para estudiar su capacidad de generar ADCC en líneas celulares de un tumor sólido como es el cáncer de páncreas, como paso previo a la terapia *in vivo*. El anticuerpo monoclonal terapéutico empleado, SRB1 (IgG2a anti-hCCR9) se generó mediante la inmunización de un ratón con un plásmido de expresión de hCCR9 unido a partículas de oro utilizando la técnica "*gene gun*", una estrategia usada previamente para la generación del anticuerpo monoclonal anti-hCCR9 91R (IgG2b) [155] y toda su caracterización se realizó como está descrito por *Somovilla-Crespo et al*.[156].

En unos resultados preliminares dentro del marco de un Proyecto colaborativo, con título "Desarrollo de fármacos biológicos contra CCR9 en tumores sólidos mediante la modulación del sistema inmune del paciente", del cual formó parte nuestro grupo, se generaron unos paneles de expresión de CCR9 en diferentes tejidos tumorales. Estos resultados fueron analizados por el grupo de Tomás García-Caballero y Rosalía Gallego, donde se pudo comprobar la positividad en algunos de los tejidos que más frecuentemente han sido caracterizados como positivos para CCR9 de acuerdo con la literatura. En el caso del cáncer

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de páncreas, se pudo demostrar una intensa positividad en un elevado porcentaje de las membranas de las células tumorales (Fig. 9). En general el grado de positividad en muestras tumorales fue más alto que en tejidos sanos. La expresión de CCR9 no apareció distribuida por igual en todos los tejidos tumorales a lo largo de toda la población y también hubo muestras negativas. Se pudo concluir que la expresión de CCR9 en los tejidos tumorales mostró mayor intensidad y homogeneidad que en los tejidos sanos asociados. Con estos resultados en el cáncer de páncreas, CCR9 podría presentarse como una potencial diana terapéutica.

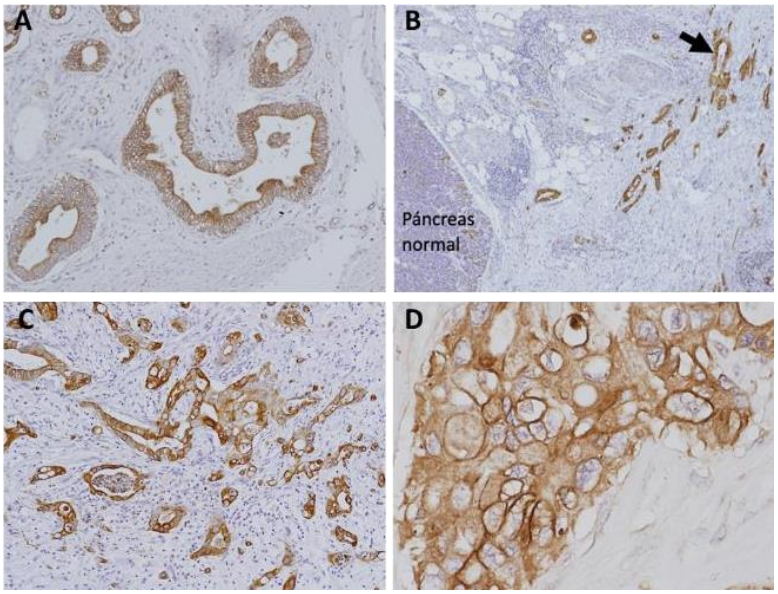


Figura 9. Imágenes representativas de la inmunotinción de los casos analizados de adenocarcinoma de páncreas. A pequeño aumento (**A-C**) se muestra la positividad de las células tumorales para CCR9 que contrasta con la ausencia de tinción en el estroma fibrovascular. En **B**) se aprecia la evidente diferencia existente en la expresión de CCR9 entre el tejido normal y las células tumorales que muestran una intensa positividad para CCR9 (**flecha**, aumento de 4x). A gran aumento se observa la inmunorreactividad de membrana frecuentemente incompleta y de intensidad alta (**D**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.1.3 Nanoterapia frente al cáncer: nanosistemas dirigidos frente oncogenes.

La nanomedicina y los nanosistemas de administración de fármacos son una ciencia relativamente nueva, pero que está en continuo desarrollo, donde se emplean materiales en el rango de la nanoescala (normalmente entre 1 y 100 nm) para servir como herramienta de diagnóstico o para administrar agentes terapéuticos a sitios específicos de manera controlada[158]. El uso de materiales de gran tamaño en la administración de fármacos plantea desafíos importantes, como la inestabilidad *in vivo*, la mala biodisponibilidad, la baja solubilidad y una mala absorción en el cuerpo, lo cual hace que existan probables efectos adversos de los medicamentos. Por lo tanto, el uso de nuevos sistemas de administración de fármacos del mundo "nano" podría utilizarse como agentes que encapsulan fármacos y se dirijan al tejido u órgano diana con una mayor precisión y con una liberación controlada, resolviendo así todos estos problemas[159,160].

La aplicación de la nanotecnología al campo del cáncer pretende mejorar el seguimiento, diagnóstico y tratamiento. Entre todos los tipos de sistemas de administración de nanopartículas se ha prestado especial interés en el desarrollo de nanoesferas lipídicas (LNs), que son "portadores" coloidales biocompatibles y biodegradables compuestos por matrices lipídicas y que son sólidos a temperatura ambiente. Las LNs presentan numerosas ventajas, como excelente tolerabilidad y absorción a nivel intestinal, protección de los fármacos lábiles incorporados frente a la degradación, estabilidad física y la liberación controlada, al tiempo que se reducen los posibles inconvenientes asociado a otros sistemas de administración como por ejemplo los liposomas, como la fuga de los fármacos, la estabilidad física limitada de las dispersiones liposomales y la eliminación no específica por parte del sistema fagocítico mononuclear[161]. Existen numerosas técnicas para realizar las formulaciones de las nanocápculas (NCs) portadoras y los esfuerzos en investigación y refinamiento de los métodos están llevando a mejoras, como el incremento de la biodisponibilidad del fármaco tras una sola administración oral, así como su alcance a zonas que presentan grandes barreras biológicas y físicas, como el cerebro en el sistema nervioso central[162].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Generalmente, los nanosistemas entran de forma pasiva y se acumulan en la zona tumoral y en el tejido inflamado debido al incremento en la permeabilidad, lo cual es el resultado de la angiogénesis inducida por las células tumorales. Cuando se forma el tumor, se producen rápidamente nuevos vasos sanguíneos para recibir más oxígeno, nutrientes y otros factores de crecimiento; pero estos vasos sanguíneos, debido a su rápida formación, presentan un epitelio discontinuo, con fenestraciones más grandes de 100 nm[163], lo que permite a los nanosistemas atravesar al espacio intersticial del tumor (que suelen tener tamaños de entre 1 y 100 nm como describimos anteriormente). Además, el tejido tumoral se caracteriza por la falta de un drenaje adecuado por parte del sistema linfático, lo que permite que los compuestos albergados por los nanosistemas se retengan durante períodos más largos que lo que se observa en tejidos normales, incrementando la eficacia terapéutica, gracias a lo que se conoce como efecto EPR[164]. Dado que los tejidos sanos, no presentan estas fenestraciones en los vasos sanguíneos y tienen un sistema linfático funcional, los nanosistemas no atravesarán a tejidos sanos, por lo que los efectos secundarios se minimizarían[163,164]. Sin embargo, también existen una serie de factores que disminuyen la acumulación de los nanosistemas en el tejido tumoral a las dosis requeridas para hacer efecto, como la alta presión del líquido intersticial en los tumores, el drenaje linfático deficiente, la penetración en el tejido, el tejido tumoral no vascularizado y la acumulación en el hígado y el bazo[164]. Hay que tener en cuenta también características propias de los nanosistemas, como la carga, tamaño y forma. El tamaño idóneo sería entre 10 y 100 nm, dado que con un tamaño inferior a 10 nm se eliminan rápidamente por los riñones y los de tamaño superior a 100 nm se acumulan en el hígado y en el bazo debido al tamaño de sus fenestraciones en el epitelio vascular (de 200 a 500 nm). Para mejorar la acumulación y la retención de los nanosistemas en el tejido tumoral diana, se pueden vehiculizar empleando moléculas que recubran los nanosistemas que interaccionan específicamente con los biomarcadores o receptores sobreexpresados en las células tumorales[165], como, por ejemplo, la acumulación de ciertos nanosistemas cubiertos con tLyP1 en el tejido tumoral mejora gracias al reconocimiento del receptor neuropilina-1 (NPL-1)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

sobreexpresado en ciertas células tumorales[166]. Otro factor importante a tener en cuenta con los nanosistemas es lo rápido que se metabolizan y se eliminan del torrente sanguíneo; para evitar este inconveniente, la superficie de los nanosistemas se puede recubrir con un polímero hidrófilo inerte, como el polietilenglicol (PEG) que es el más empleado, reduciendo su opsonización o la agregación, aumentando el tiempo que se mantiene en la circulación y por tanto la probabilidad de llegar y acumularse en los tumores[167].

El oncogén sarcoma de rata de Kirsten (KRAS) es una pequeña GTPasa que actúa como un interruptor molecular para regular varios procesos biológicos celulares, como la supervivencia, proliferación y diferenciación celular[168,169]. Se han encontrado alteraciones en KRAS en el 25% de todos los cánceres humanos, siendo el cáncer de páncreas (90%), el cáncer colorrectal (45%) y el cáncer de pulmón (35%) los tipos de cáncer con mayores tasas de mutación[168,169]. Las mutaciones oncogénicas de KRAS no solo son responsables de la transformación de células malignas y el desarrollo de tumores, sino que también están relacionadas con un mal pronóstico, una baja tasa de supervivencia y la resistencia a la quimioterapia[170,171,172]. Aunque se han desarrollado diferentes estrategias para atacar específicamente esta oncoproteína en las últimas décadas, casi todas han fracasado. Los principales motivos del fracaso terapéutico se deben a la complejidad y pequeño tamaño de la proteína KRAS, así como a su estructura sin unos bolsillos bien delimitados donde se puedan unir los diferentes fármacos[173]. Otro asunto que complica aún más la terapia dirigida es que KRAS alberga un número considerable de modificaciones postranscripcionales, uniéndose estrechamente a GTP, lo que dificulta bastante el bloqueo de su hiperactivación en el caso de los diferentes cánceres con mutaciones de KRAS[174]. Todas estas dificultades se ven reflejadas en que el primer compuesto aprobado por la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) y la EMA (Agencia Europea de Medicamentos), el Sotorasib, empleado para tratar la mutación G12C de KRAS localizada en cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), no llegó hasta el año 2021. Es por todo esto, que el campo de la nanomedicina podría aportar una solución a la falta de especificidad y eficacia de la terapia

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

convencional frente KRAS, tratando de mejorar el índice terapéutico de otros fármacos.

En este trabajo, en colaboración con el grupo de María José Alonso, nos hemos centrado en dos enfoques terapéuticos actuales de la nanotecnología, empleando nanosistemas lipídicos que albergan anticuerpos monoclonales y ARNsi, con un mismo objetivo: la terapia dirigida frente a KRAS[168].

En numerosas investigaciones en este campo se ha prestado mucha atención al desarrollo de terapias basadas en moléculas de ARN. Las moléculas de ARN de interferencia, se encargan del silenciamiento de genes de secuencias específicas en un proceso de regulación postranscripcional endógeno conocido globalmente como ribointerferencia o interferencia por ARN, que consiste en ARN no codificantes como microARN, pequeños ARN de interferencia (ARNsi), ARN largos no codificantes y ARN circulares, que se dirigen y silencian los ARN mensajeros reconociendo secuencias específicas de ciertos genes[175]. Esta función principal de los ARNsi en las células de regular negativamente la expresión de su gen objetivo y, por lo tanto, las proteínas codificadas, podría emplearse para mejorar las terapias convencionales del cáncer[176]. Se sabe que las nanopartículas lipídicas (LNs) son el tipo de nanosistemas de "*delivery*" más eficientes para transportar ARNsi a su diana[177,178], aunque su aplicación clínica se limita al tratamiento de enfermedades hepáticas y a la administración de vacunas debido a la importante acumulación del ARN cargado por las LNs en el al hígado y en el lugar de la inyección tras la administración parenteral[177,178,179,180]. Por ello, para mejorar el alcance de LNs-ARNsi a otros órganos, se han realizado numerosas investigaciones en la optimización de la composición lipídica[179,180,181], la modulación del ratio entre la carga positiva/negativa de los lípidos de las LNs [182], la introducción de ligandos que recubren las LNs frente moléculas específicas de las células tumorales como tLyp-1[183,184], así como la modulación de la corona proteica [181,185]. Por ejemplo, en estudios previos se ha visto que LNs de ARNsi frente KRAS cubiertas con tLyp-1 incrementan su acumulación en tejido tumoral en comparación con LNs no cubiertas, y que además reducen significativamente el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo* de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

páncreas subcutáneo, cuando se combinan las LNs junto con quimioterapia convencional como Gemcitabina[186].

Por otro lado, el uso de anticuerpos monoclonales frente a dianas tumorales concretas podría considerarse como una terapia alternativa interesante para alcanzar dianas intracelulares como KRAS. La combinación de la nanotecnología para permitir a estos anticuerpos lidiar con las barreras biológicas, junto con la especificidad de los anticuerpos monoclonales frente a diana podrían traer resultados esperanzadores. Por ejemplo, el uso de nanosistemas que albergan anticuerpos monoclonales frente la oncoproteína c-MYC ha demostrado la disminución del tamaño tumoral sin efectos secundarios, en un modelo *in vivo* murino de carcinoma colorrectal empleando la línea CT26[187]. De igual forma, empleando el mismo tipo de nanotecnología se han conseguido resultados prometedores en el cáncer de mama: empleando nanosistemas que albergan anticuerpos monoclonales específicos frente a la proteína Gasdermina B, considerada como un biomarcador de mal pronóstico clínico en carcinomas de mama HER2+, se reduce la migración celular e incrementa la sensibilidad a la terapia *in vitro*, y se reduce el crecimiento tumoral así como la metástasis pulmonar en un modelo ortotópico de cáncer de mama[188]. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos en investigación en este tipo de aproximaciones terapéuticas, hasta ahora no se ha conseguido llegar exitosamente frente a la mutación $KRAS^{G12V}$, que presenta una de las mayores incidencias en tumores sólidos como en el cáncer de páncreas, con mal pronóstico[189]. Por ello, en este estudio se investigó la eficacia de nanosistemas que albergan anticuerpos monoclonales frente a este tipo de mutaciones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4 OBJETIVOS

Evaluación biológica de tres terapias innovadoras frente al cáncer en la búsqueda de nuevos tratamientos, en concreto:

1. Estudio *in vitro* del potencial terapéutico de los clústeres atómicos cuánticos de 5 átomos de plata (AQCs-Ag5) en diferentes modelos de resistencia a cisplatino.

2. Estudio *in vitro* del potencial terapéutico de un anticuerpo monoclonal humanizado (SRB1) dirigido al receptor de quimioquina CCR9 en cáncer de páncreas.

3. Evaluación de la eficacia antitumoral *in vivo* de nanosistemas lipídicos portadores de anticuerpos monoclonales o de ARN pequeño de interferencia (ARNsi) frente al oncogen KRAS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 CULTIVOS CELULARES

Reactivos:

- Líneas celulares: A2780-cis (Sigma (Ref.: 93112517-1VL), A2780 WT (Sigma (Ref.: 93112519-1VL), H358 (*Culture Collections* (Ref.: 95111733), A549 (DMSZ, (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany,* n.º ACC 107), MIA PaCa-2 y PANC-1 (proporcionadas por la compañía SunRock Biopharma, ATCC n.º CRL-1420 y CRL-1469 respectivamente), MOLT-4, (ATCC n.º CRL-1582*)*, CFPAC-1 (ATCC, n.º CRL-1918), cultivo primario derivado de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), proporcionada por el laboratorio del profesor Juan Bautista Zalvide Torrente, de la Universidad de Santiago de Compostela, A549-Luc, (ATCC, n.º CCL-185-LUC2), LLC1 (*Lewis lung carcinoma*, o en español carcinoma de pulmón de Lewis, ATCC, n.º CRL-1642)
- Medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose* (DMEM bajo en glucosa) (Sigma, Cat. N. º D6046)
- Medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose* (DMEM alto en glucosa) (Sigma, Cat. N. º D6429)
- Medio RPMI-1640 (Sigma, Cat. N. º R5886)
- Medio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), (Thermo Fisher, Cat. N. º 12440053)
- Medio de células endoteliales (Sigma, Cat. N.º 211-500)
- Medio para cultivar células NK: *CTS NK Xpander medium* (ThermoFisher, Cat. N.º A5019001)
- Suplemento para cultivar células NK: *CTS NK-Xpander Supplement* (ThermoFisher, Cat. N.º A49120-01)
- Suero AB humano (ThermoFisher, Cat. N.º 11405055)
- IL-2 (Miltenyi Biotec, Cat. N.º 130093955)
- IL-5 (Miltenyi Biotec, Cat. N.º 130097742)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma, Cat. N.º D8537)
- Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco, Cat. N. º 10270-106)
- Penicilina/Estreptomicina (P/S) (Gibco, Cat. N. º 15140-122)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- L- Glutamina (Gibco, Cat. N. º 25030-024)
- Tripsina (2.5% Tripsina-EDTA 10X) (Gibco, Cat. N.º 15090046)
- DMSO (Sigma, Cat. N. º D8418)
- BSA liofilizada (Sigma, Cat. N. º A2153)
- Azul de Tiazolil Tetrazolio Bromuro (MTT) (Sigma, Cat. N. º M2128)
- Solución de solubilización (SDS/0,1 N HCl)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Sigma, Cat. N. º 512813)
- N-Acetil-L-cisteína (NAC) (Sigma, Cat. N. º A9165)
- Cisplatino (Sigma, Cat. N. º P4394)
- Bleomicina sulfato (MedChem Express, Cat. N.º HY-17565)
- Factor de crecimiento transformante β (TGF-β) (Sigma, Cat. N.º T7039)
- AQCs-Ag5 (proporcionados por NANOGAP SUB-NM-POWER S.A.)
- ABT-737 (MedChemExpress, Cat. N.º HY-50907)
- RSL3 (MedChemExpress, Cat. N.º HY-100218A)
- X-Gal (Promega, Cat. N.º V3947)
- Kit de medida de glutatión total (GSH-T) y oxidada (GSSG) (MyBioSource, Cat. N.º MBS2563954)
- Cristal violeta (Sigma, Cat. N.º C3886)
- Formaldehído (Sigma, Cat. N.º 252549)
- Ácido acético glacial (Merck, Cat. N.º MC1000632500)
- Metanol (Panreac, Cat. N.º 16110911211)
- HNO_3 (Sigma, Cat. N.º 309079)
- Kit de purificación de ADN, ARN y proteínas (*NucleoSpin® Tissue*, Macherey-Nagel, Cat. Nº. 740952.50)
- Medio Opti-MEM (Gibco, Cat. N.º 31985-047)
- *Lipofectamine RNAiMax/siRNA* (Invitrogen, Cat. N.º 13778-030)
- NCs con los ARNsi-KRAS a testar, desarrolladas por el investigador Shubaash Anthiya, del grupo Nanobiofar
- Agua Mili-Q
- Hielo

Materiales:

- Cámara de flujo laminar
- Incubador InCuSafe Panasonic (MCO-18AC-PE)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Incubador IN30 Memmmert (DE 66812464)
- Centrífuga (Thermo Scientific Sorvall ST 16R)
- Lector de placas CLARIOstar®
- Contador automático LUNA-II™ (Logos Biosystems, Ref. L40001)
- Pipetas de 10 ml (Corning, Cat. N.º 4488)
- Pipetas de 5 ml (Corning, Cat. N.º 356543)
- Pipetas de 2 ml (Corning, Cat. N.º 4486)
- Baño de agua Fisher Isotemp, modelo 2341
- Vortex ZX3 Advanced Vortex Mixer (Velp® Scientific)
- Tubos de 2 ml (Eppendorf, Cat. N.º 0030120094)
- Tubos de 1,5 ml (Eppendorf Cat. N.º 0030120086)
- Micropipetas de volumen ajustable monocanal (Socorex, Nº Cat. 825.0020, 825.0200 y 825.1000)
- Pipeteador Stripettor (Thermo Fisher, Cat. N. º 15536304)
- Placas de 100 mm de diámetro (Corning, Cat. N.º 430167)
- Placas de 60 mm de diámetro (Corning, Cat. N.º 430196)
- Placas de 35 mm de diámetro (Corning, Cat. N.º 353001)
- Placas de 96 pocillos (Corning, Cat. N.º 3595)
- Placas de 24 pocillos (Corning, Cat. N.º 3524)
- Placas de 12 pocillos (Corning, Cat. N.º 3513)
- Placas de 6 pocillos (Corning, Cat. N.º 3516)

Protocolos:

5.1.1 Mantenimiento de las líneas celulares.

Las líneas celulares A549, A549-luc, LLC1, LLC1-luc y H358 se mantuvieron en el medio de cultivo DMEM bajo en glucosa, las líneas A2780 WT, A2780-cis y MOLT-4 se mantuvieron en el medio de cultivo RPMI, las líneas MIA PaCa-2, PANC-1 y CFPAC-1 se mantuvieron en DMEM alto en glucosa y las células HUVEC se mantuvieron en medio para células endoteliales durante unos pocos pases celulares. Estos medios se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de L- glutamina (200 mM) y penicilina y estreptomicina (10.000 U/mL). Además, la línea A2780-cis cada 3 pases celulares se añadió 1µM de CDDP para mantener la resistencia al fármaco.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 º C con 5 % de CO_2 y se crecieron en placas de cultivo de 100 mm. 2-3 veces por semana, se les retiró el medio, se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se empleó una mezcla de tripsina/EDTA para despegar las células que derivan de tumores sólidos y crecen de forma adherente como una monocapa en la placa. Finalmente, las células se volvieron a suspender en el medio de cultivo correspondiente y se pasaron a placas de cultivo nuevas, sembrando a una confluencia adecuada según indicaciones de cada línea celular.

Cuando fue necesario, las células se contaron usando una cámara de Neubauer o el contador automático LUNA-II™. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar. Se fue comprobando periódicamente que las líneas celulares empleadas estuvieran libres de micoplasma. Las líneas celulares se almacenaron congeladas en medio completo suplementado con 5-10 % DMSO(según requerimiento de cada línea celular) en nitrógeno líquido.

Las células NK aisladas de los donantes en ciertas situaciones se mantuvieron en cultivo para realizar nuevos experimentos, y son células que requieren unas condiciones de cultivo especiales, así como la preparación de medios específicos para su crecimiento y expansión. Las células NK obtenidas del aislamiento de las célulaspolimorfonucleares (PBMCs) se mantuvieron en el medio *CTS™ NK-Xpander™*, suplementado con suero humano AB al 5 % y un suplemento especial para cultivar células NK (*CTS NK-Xpander Supplement)* al 2 %. Además, se añadió las citoquinas humanas IL-2 e IL-15 500 U/ml en las placas de cultivo.

Para comenzar el cultivo de las células NK, se sembraron 1 x 10^5 células/ml, y se dejaron a 37 º C con 5 % de CO_2 sin manipularlas durante los 5 primeros días de cultivo. Al sexto día, se contaron, y se completó con medio fresco si la densidad celular estaba entre 0.5 x 10^5 y 1 x 10^5 células/ml o se expandieron a más placas si la densidad celular era mayor, para mantener la densidad celular óptima. Se continuó monitorizando las células diariamente y se completaron con medio completo y citoquinas cuando fue necesario, así como su división a mayor número de placas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.2 Desarrollo de los modelos de resistencia a CDDP.

Se emplearon tres modelos de resistencia a CDDP para realizar la evaluación biológica de los AQCS-Ag5: células que por sobreexposición al fármaco generan resistencia (línea de cáncer de ovario, A2780-cis), células senescentes (la línea A549 tratada con bleomicina) y la línea celular H358, inducidas al proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT). Como controles, en paralelo se emplearon sus líneas parentales sensibles al CDDP, las líneas A2780 WT, A549 y H358 respectivamente.

- Modelo de resistencia a CDDP por sobreexposición al fármaco.La línea A2780-cis (resistente a CDDP) se adquirió de forma comercial. Para mantener la resistencia al fármaco, cada 3 pases celulares se añadió CDDP 1µM en el medio completo.
- Modelo de resistencia a CDDP en células senescentes.La senescencia celular es un proceso que está relacionado con laresistencia a CDDP [190]. Además de la ausencia de proliferación, las células senescentes exhiben otras características cuyo conjunto define el fenotipo senescente. Entre otras características, está la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal); se cree que esta actividad deriva de la enzima lisosomal β-galactosidasa y refleja un incremento en la biogénesis lisosomal, hecho que se produce de forma característica en células senescentes [191] .

La línea celular A549 fue tratada durante 5 días con el antibiótico inductor de senescencia bleomicina 35 µM. Se comprobó la inducción de células senescentes mediante la tinción β-galactosidasa, cuya actividad está incrementada en estas células, y se comprobó también el incremento de resistencia a CDDP respecto a las células control A549 sin tratar con bleomicina.

1) Se sembraron 21.000 células/cm² de A549 en una placa de 60 mm y se incubaron durante 24 h a 37 º C.
2) Se añadió el tratamiento con bleomicina (35µM) durante 5 días en DMEM completo.
3) Al cuarto día de incubación con bleomicina, se sembró en paralelo el control de A549.

Finalizado el tiempo de tratamiento con bleomicina:
- Se realizó la tinción de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

β-gal) en las dos placas de 35mm (control y tratadas con bleomicina) como se indica en el apartado de "Ensayo de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia".
- Se recogieron las células tripsinizando la placa de 60 mm con 500 µl y arrastrando dos veces con 3 ml de medio de cultivo y se sembraron en una placa de 96 pocillos para comprobar su mayor resistencia a CDDP mediante varios ensayos de curva dosis-respuesta, empleando elensayo con MTT.
- Modelo de resistencia a CDDP en células inducidas a EMT. La activación del proceso EMT por diversas señalizaciones celulares enlas células tumorales está asociado a la resistencia al CDDP[192]. Una delas formas más conocidas para inducir este proceso es con el tratamientode TGF-β, que induce EMT en un proceso reversible en líneas de NSCLC [193]. En este trabajo, se empleó la línea celular H358, que fue tratada durante 48 horas con TGF-β 100 pM en DMEM 0,5% de FBS. Se comprobó la inducción de EMT, por los cambios morfológicos observados al microscopio, así como por los marcadores involucrados en EMT, como E-cadherina y vimentina, que se midieron por *western blot*. Para dar por válido este modelo, se comprobó también el incremento de resistencia a CDDP respecto a las células control H358 sin tratar con TGF-β comparando las curvas dosis-respuesta al fármaco mediante el ensayo con MTT.

5.1.3 Medida de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT: ensayos de curva dosis-respuesta.

El ensayo con MTT se empleó para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, pudiéndose estudiar la citotoxicidad de un compuesto sobre una línea celular en unas condiciones determinadas, así como realizar ensayos de curva dosis-respuesta para calcular su IC_{50} (definida por la FDA como la concentración de un fármaco que se requiere *in vitro* para una inhibición del crecimiento celular del 50%). El procedimiento general queda resumido en la Fig.10.

1) Se sembraron las líneas celulares en placas de 96 pocillos a una densidad adecuada y se incubaron durante 24 horas a 37 º C. Cada condición se sembró por cuadruplicado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2) Se trataron las células con los compuestos de estudio y se incubaron las placas a 37 º C con 5 % de CO_2 hasta el día siguiente.
3) Para medir la viabilidad celular, se añadieron 10 µl de solución de MTT (5 mg/L) por pocillo, protegiendo las placas de la luz. Tras 4 horas se añadieron 100 µl de la solución de solubilización (SDS/0,1 N HCl) y se dejaron incubando durante 18 horas a 37 º C. Se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®.

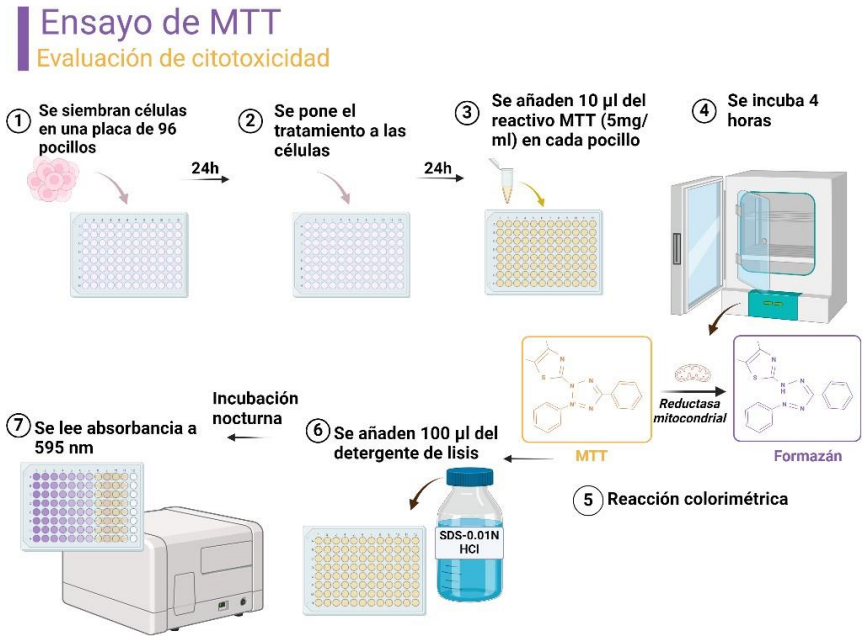


Figura 10. Representación esquemática del ensayo de MTT para medir viabilidad celular. Para realizar el ensayo, se siembran células en una placa de 96 pocillos y se dejan adherir a la placa 24 horas en el incubador. Al día siguiente se pone el tratamiento del cual se desea conocer la citotoxicidad producida en unas determinadas condiciones y se deja la placa en el incubador hasta que termine el tiempo de tratamiento. Se añade 10 µl/pocillo del reactivo MTT (5mg/ml), y se deja incubando 4 horas a 37 º C y en oscuridad para que se produzca la reacción colorimétrica, para luego añadir 100 µl/pocillo del detergente de lisis (SDS-HCl 0.1 N). Al día siguiente se lee la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®, y se calcula la viabilidad celular empleando el control positivo de células sin tratar. Imagen creada con Biorender.com.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.4 Ensayo de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal).

Se comprobó la generación de células senescentes mediante la tinción β-galactosidasa.

1) Las células A549 se sembraron en placas de 35 mm, a razón de 21.000 células/cm² (200.000 células/placa) y se incubaron durante 24 horas 24 h a 37 º C.
2) Se añadió el tratamiento con bleomicina (35µM) durante 5 días en DMEM completo.
3) Al cuarto día de incubación con bleomicina, se sembró en paralelo el control negativo de A549 para sincronizar los tiempos de tinción de ambas placas.
4) Se lavaron las placas dos veces con PBS y a continuación se fijaron durante 5 minutos con 2% formaldehido/0,2% glutaraldehído en PBS, a temperatura ambiente.
5) Se lavaron las placas tres veces con PBS y se incubaron a 37ºC en oscuridad durante 24 horas con 1 mL de la mezcla de reacción (20 mg/mL X-gal en dimetilformamida, tampón fosfato de sodio/ácido cítrico 0.2 M a pH=6.0, 100 mM ferrocianuro potásico, 100 mM ferricianuro potásico, cloruro de sodio 5M, cloruro de magnesio 1M).
6) Se realizaron fotografías con el Microscopio Digital Invertido Leica DMI 6000 B. Se cuantificó el número de células "azules" presentes (células SAβgal+) analizando diferentes campos por condición experimental.

5.1.5 Determinación de los niveles basales totales de GSH.

El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina y es el tiol intracelular más común. En las células puede existir en dos formas diferentes, una forma reducida (GSH) y otra oxidada (GSSG), aunque bajo condiciones fisiológicas, más del 98% del glutatión intracelular es GSH, dado que el GSSG es rápidamente reducido a GSH por la glutatión reductasa, por lo que su función principal es el mantenimiento de la homeostasis redox[194]. Está bien descrito, que una de las vías por las que se puede producir resistencia a CDDP es mediante la detoxificación del fármaco, dado que GSH se une

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

al mismo y evita que cause el daño en el ADN para inducir la muerte celular[56]. Por ello, en este trabajo se estudió los niveles de GSH en los distintos modelos de resistencia a CDDP. Para ello, se empleó el Kit colorimétrico *Total Glutathione (T-GSH)/Oxidized Glutathione (GSSG) Colorimetric Assay* (*MyBioSource*), de acuerdo con las instrucciones de fabricante.

1) Se tripsinizaron y se contaron 1,5 x 10^6 células por cada línea celular y se realizaron dos lavados en 1 ml de PBS.
2) Se centrifugaron las células a 1000 G durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Sobre el *pellet* de células se añadió el reactivo 3 (precipitador de proteínas), en una ratio de 1:400 por cada 1,5 x 10^6 células.
3) Se sonicaron las muestras con una amplitud del 30% empleando un sonicador BRANSON "SFX 150 DIGITAL" y se centrifugaron a 10.000 G durante 10 minutos, tras lo cual se preservó el sobrenadante para la detección de GSH y se descartó el precipitado.
4) Para medir la T-GSH (GSH total) de las muestras anteriormente procesadas, se realizaron los siguientes pasos, según el protocolo de la casa comercial:
   a. Se prepararon el blanco, estándar y las muestras, añadiendo respectivamente a cada tubo 40 µl del reactivo 3, del estándar de GSSG (8 µmol/L) y de cada una de las muestras.
   b. Sobre lo anterior se añadió 600 µl del reactivo de solución de trabajo y se incubó 5 minutos a 25 º C.
   c. Se añadieron 200 µl del reactivo 9 (substrato de la reacción), se mezcló bien y se incubó a 25 º C durante 25 minutos.
   d. Se añadieron 400 µl del reactivo 10 a cada tubo (solución de parar la reacción) y se leyeron las absorbancias a 412 nm ajustando el espectrofotómetro a cero con agua destilada

5.1.6 Tratamientos con los AQCs-Ag5.

Los tratamientos con los AQCs-Ag5 se realizaron empleando medio sin FBS durante 1 hora, a menos que se indique lo contrario. El resto de los tratamientos con los que se combinaron, como ABT-737, CDDP o RSL3 se realizaron en medio completo. Los protocolos de los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tratamientos realizados en combinación con los AQCs-Ag5 quedan detallados a continuación.

5.1.6.1 Terapia combinada de AQCs-Ag5 y CDDP

Este estudio se realizó con el fin de investigar si el pretratamiento con los AQCs-Ag5 sensibiliza las células resistentes a CDDP de los modelos generados a la terapia con CDDP empleando dosis subletales de ambos compuestos. Para ello:

1) Se sembraron las células en una placa de 96 pocillos (4.000 células/pocillo para A549 y H358 y 10.000 células/pocillo para las A2780) y se dejaron incubando durante 24 h a 37 º C. Cada condición se sembró por cuadruplicado.
2) Se lavaron los pocillos con medio sin FBS para después poner el tratamiento con los AQCs-Ag5 en medio sin FBS durante 1 h a 37ºC.
3) Se retiró el tratamiento con AQCs-Ag5 y se trató con CDDP durante 24 h a 37 º C.
4) Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT: se añadieron en cada pocillo 10 µl de solución de MTT (5 mg/L), protegiendo las placas de la luz. Tras 4 horas se agregaron 100 µl de la solución de solubilización (SDS/0,1 N HCl) y se dejaron incubando durante 18 horas a 37 º C. Se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®.

5.1.6.2 Terapia combinada AQCs-Ag5 y ABT-737

El análisis de esta vía se llevó a cabo mediante el estudio del efecto ejercido por el inhibidor ABT-737 (un mimético de BH3 capaz de sensibilizar las células a la apoptosis bloqueando la actividad de las proteínas de la familia BCL-2 que favorecen la supervivencia[195]) sobre la viabilidad de células tratadas con los AQCs-Ag5. El tratamiento del inhibidor ABT-737 se combinó con el tratamiento posterior de las células con los AQCs-Ag5. Para ello:

1) Se sembraron las líneas celulares en placas de 96 pocillos (4.000 células/pocillo para A549 y H358 y 10.000 células/pocillo para las A2780), y se dejaron incubando durante 24 horas a 37 º C. Cada condición se sembró por cuadruplicado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2) Se trató con el agente proapoptótico ABT-737 durante 24 horas en medio completo a diferentes concentraciones: 0.5, 1, 5 y 10 μM y se incubaron placas a 37 º C con 5 % de CO_2.
3) Se retiró el tratamiento con el inhibidor y se lavaron los pocillos con medio sin FBS para después poner el tratamiento con los AQCs-Ag5 en medio sin FBS durante 1 hora: 0,5 y 0,8 μM para la línea A2780 y 1,5 y 2 μM para la línea A549 y H358. Pasada la hora de tratamiento se retiraron los AQCs-Ag5, se puso medio completo y se incubaron placas a 37 º C con 5 % de CO_2 durante 24 horas.
4) Para medir la viabilidad celular, se añadieron 10 μl de solución de MTT (5 mg/L) por pocillo, protegiendo las placas de la luz. Tras 4 horas se añadieron 100 μl de la solución de solubilización (SDS/0,1 N HCl) y se dejaron incubando durante 18 horas a 37 º C. Se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®.

5.1.6.3 Terapia combinada AQCs-Ag5 y RSL3

Otro de los posibles mecanismos implicados en la muerte celular mediada por AQCs-Ag5 es la ferroptosis, por lo que el análisis de esta vía se llevó a cabo mediante el estudio del efecto ejercido por el inhibidor RSL3 (un agente proferroptótico que se une a GPX4 y la inhibe[196], impidiendo la protección de la membrana plasmática de la peroxidación lipídica) sobre la viabilidad de células que tras ser tratadas con los AQCs-Ag5, sobreviven ("células persistentes") y podrían ser más sensibles a la muerte celular por ferroptosis que las que no son tratadas con los AQCs-Ag5 al presentar una mayor sensibilidad a la ferroptosis por inhibición de GPX4[197]. Para ello:

1) Se sembraron las líneas celulares A2780 WT y A2780-cis en placas de 96 pocillos a razón de 10.000 células/pocillo y se dejaron incubando durante 24 horas a 37 º C. Cada condición se sembró por cuadruplicado.
2) Se trató con los AQCs-Ag5 durante 1 hora a las concentraciones de 0,3 y 0,5 μM en medio sin FBS, se retiró el tratamiento para poner medio completo durante 24 horas y se incubaron placas a 37 º C al 5 % de CO_2.
3) Las células que sobrevivieron al tratamiento con los AQCs-Ag5 se trataron con el compuesto proferroptótico RSL3 a las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

concentraciones de 5 y 10 nM en medio completo durante 24 horas incubando las placas a 37 º C con 5 % de CO_2.

4) Para medir la viabilidad celular, se añadieron 10 µl de solución de MTT (5 mg/L) por pocillo, protegiendo las placas de la luz. Tras 4 horas se añadieron 100 µl de la solución de solubilización (SDS/0,1 N HCl) y se dejaron incubando durante 18 horas a 37 º C. Se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®.

5.1.7 Cuantificación de platino en el extracto total celular y unido al ADN en los modelos de resistencia a CDDP.

Para conocer si los AQCs-Ag5 tienen alguna implicación en la accesibilidad del CDDP a la cromatina en la terapia combinada, se estudió la cantidad de platino (Pt) tanto en célula total (extractos celulares) como unido al ADN de los diferentes modelos de resistencia que fueron tratados con CDDP y AQCs-Ag5, empleando las mismas condiciones que las que se usaron para el estudio del daño en el ADN. La cuantificación de Pt se ha determinado en el grupo en anteriores ocasiones y se realizó como está descrito [198].

1) Se sembraron placas de 100 mm (1 x 10^6 células/placa para A549 y H358 y 2 x 10^6células/placa para A2780); se dejó incubando a 37ºC durante 24 horas.
2) Se añadió el tratamiento correspondiente con CDDP durante 4 horas en medio completo (50 y 80 µM para las líneas A549 y H358 y 15 y 40 µM para la línea A2780) y durante 1 hora en medio sin suero con los AQCs-Ag5 (0,5 µM para las líneas A549 y H358 y 0,4 µM para la línea A2780). En los casos de terapia combinada, se puso primero en tratamiento de AQCs-Ag5 y luego el CDDP.
3) Se lavaron las células tres veces con PBS, se tripsinizaron, se centrifugaron y se descartó el sobrenadante, dividiendo en dos partes el *pellet* celular:
   3.1) una parte para la cuantificación de Pt en el extracto total celular. Para ello, se almacenó a -20ºC hasta su digestión con 300 µl de HNO_3.
   3.2) una parte para cuantificación de Pt en ADN nuclear, para lo que se llevó a cabo la purificación del ADN con el kit *NucleoSpin® Tissue* (Macherey-Nagel), según las instrucciones del fabricante:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las células se resuspendieron en 300 µl de *buffer* de lisis (150 mM Tris pH 8; 100 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl; 0.5% SDS) y 10 µl de Proteinasa K (20 µg/µl). Se incubó a 56 º C 2 horas y se añadió acetato de sodio 3M y fenol/cloroformo/alcohol-isoamil (proporciones 0.1:1) y se agitó fuertemente durante 1 minuto. Se centrifugaron entonces las muestras a 16.000 G 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes. Para precipitar el ADN, se añadieron dos volúmenes de etanol frío al 10% y se centrifugó a 16.000 G 10 minutos a 4 º C. Por último, se descartaron los sobrenadantes y se añadió 1 ml de etanol frío al 70%, se agitó 5 segundos y se volvió a centrifugar a 16.000 G 10 minutos a 4 º C. Los *pellets* se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 0.1 ml de *buffer* TE. La concentración de ADN se determinó empleando el espectrofotómetro NanoDrop 2000. Finalmente, el TE se eliminó por evaporación empleando un *speed-vac* y el ADN aislado fue resuspendido en 200 µl de HNO_3.

La cuantificación de Pt se realizó por la Unidad de Análisis Instrumental del Campus de Lugo, empleando un espectrómetro de masas ICP-MS BRUCKER 820-MS.
Cabe destacar que en el caso de los extractos totales sólo se cuantificó la cantidad de Pt, mientras que para el ADN aislado se cuantificó el Pt y también el fósforo, para realizar así la corrección de Pt/cantidad de fósforo (equivalente a la cantidad de ADN).

5.1.8 Transfecciones de los ARNsi.

Se testaron diferentes candidadatos de ARNsi-KRAS en un *screening* inicial empleando nanosistemas desarrollados por el investigador Shubaash Anthiya, del grupo Nanobiofar dirigido por María José Alonso, para identificar tanto la concentración óptima como el ARNsi candidato más apropiado para en ensayo de eficacia *in vivo*. Estos ensayos se realizaron en la línea de carcinoma de pulmón de ratón LLC1, analizando la capacidad para silenciar KRAS, así como su capacidad de disminuir la proliferación celular mediante ensayos de formación de colonias. Los ensayos de silenciamiento se realizaron como se describe a continuación:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1) La tarde del día previo a realizar las transfecciones, se sembraron 25.000 células/cm^2, en placas de 6 pocillos (250.000 células LLC1/pocillo).
2) Aproximadamente 12 horas más tarde, se retiró el medio en el que se había sembrado las células y se pusieron los tratamientos:
   2.1) Se preparó el control positivo (ARNsi-KRAS) y negativo (ARNsi-GFP) con lipofectamina *RNAiMax/siRNA* en el medio Opti-MEM. Para ello se mezcló Lipofectamina con *RNAiMax* a la concentración deseada (100 nM) y se incubó durante 5 minutos. Sobre esto se añadieron los ARNsi controles (ARNsi-KRAS y ARNsi-GFP), se mezcló bien y se incubó durante 5 minutos.
   2.2) Las diferentes formulaciones (LNPs) de ARNsi-KRAS a testar se diluyeron en Opti-MEM a la concentración deseada.
3) Se incubaron las células con las LNPs de ARNsi-KRAS y los controles con Lipofectamina durante 4 horas a 37 ° C, añadiendo 800 µl de tratamiento/pocillo.
4) Se retiraron los tratamientos, se añadió medio completo y se dejó incubando 48 horas a 37 ° C.
5) Se recogieron las células para los ensayos de formación de colonias y medida la expresión de KRAS y ERK 1/2, como se detalla en los siguientes apartados.

5.1.9 Ensayo de formación de colonias (clonogénico).

El ensayo clonógenico o ensayo de formación de colonias (Fig. 11) es un ensayo donde se mide la capacidad de proliferación y supervivencia celular *in vitro* basado en la capacidad de una sola célula para convertirse en una colonia, donde cada una de esas colonias consta de al menos 50 células[199]. Se realizaron estos ensayos para determinar la capacidad de proliferación de las células tratadas con las formulaciones de los diferentes ARNsi-KRAS. El procedimiento se siguió como está descrito[199].

1) Las células LLC1 tratadas con las LNPs de los candidatos de ARNsi-KRAS se recogieron tripsinizando y arrastrando con medio de cultivo, tras lo cual se centrifugaron durante 5 minutos a 300 G, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 5-10 ml de medio completo para contarlas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2) Se contaron las células empleando el Contador automático LUNA-II™ y se sembraron las células procedentes de cada tratamiento por triplicados en placas de 6 pocillos, sembrando 100 células/pocillo.
3) Se mantuvieron creciendo en el incubador humidificado a 37 º C con 5% de CO_2, dejando las primeras 48 horas sin tocar las placas, y a continuación, se renovó el medio completo celular periódicamente cada 2-3 días. Las colonias se dejaron crecer hasta que las células en los pocillos control hubieran formado clones suficientemente grandes (en torno a 10-15 días).
4) Se realizó la fijación y tinción de los clones retirando el medio celular, lavando 2-3 veces con PBS y añadiendo una mezcla de formaldehído y ácido acético glacial al 4%, metanol al 60% y cristal violeta al 1 %. Se dejó incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5) Se retiró la solución de tinción y se lavó 3 veces con PBS, haciendo un último lavado con H_2O_{MQ} para evitar la formación de cristales y tener una imagen más limpia de las colonias.
6) Se dejaron secando las placas boca abajo a temperatura ambiente y se contaron las colonias empleando un microscopio Leica DM2000.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

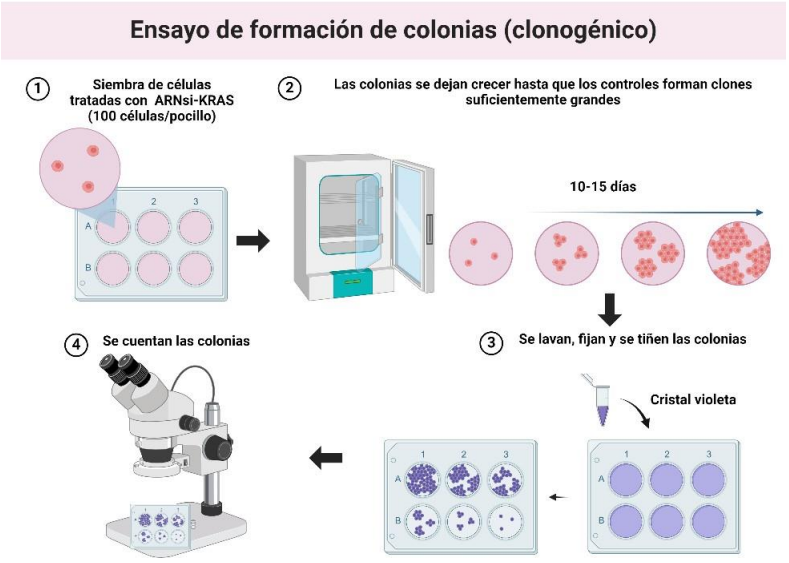


Figura 11. Ensayo de formación de colonias (clonogénico). Las células LLC1 tratadas con las LNPs de diferentes ARNsi-KRAS se sembraron en placas de 6 pocillos, a razón de 100 células/pocillo (**1**). Se mantuvieron creciendo en el incubador humidificado a 37ºC con 5% de CO_2, dejando las primeras 48 horas sin tocar las placas, y a continuación, se renovó el medio completo celular periódicamente cada 2-3 días. Las colonias se dejaron crecer hasta que las células en los pocillos control hubieran formado clones suficientemente grandes (en torno a 10-15 días) (**2**). Se fijaron y tiñeron de los clones con una mezcla de formaldehído (4%), ácido acético glacial (4%), metanol (60%) y cristal violeta (1%) durante 30 minutos (**3**) y se contaron las colonias empleando un microscopio Leica DM2000 (**4**). Imagen creada con BioRender.com.

5.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA*: WESTERN-BLOT*

Reactivos:

- Patrón de seroalbúmina bovina (BSA) (Thermo Fisher, Cat. N.º 23209)
- Reactivo Coomassie (Bradford) (Thermo Fisher, Cat. N.º 23200)
- Bis-acrilamida (Thermo Fisher, Cat. N. º BP1408-1)
- Tris (tris (hidroximetil) aminometano) 1,5%
- APS (amonio persulfato) (Thermo Fisher, Cat. N. º A/P470/46)
- TEMED (Sigma, T9281)
- Inhibidores de proteasas (Sigma, Cat. N.º P8340)
- SDS (Fisher Scientific, Cat. N.º BP166-500)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Deoxicolato sódico (Sigma, Cat. N.º D6750)
- Ortovanadato sódico (Sigma, S6508)
- NaF (Sigma, Cat. N.º S7920)
- PMSF (Thermo Fisher, Cat. N.º 36978)
- DTT (Thermo Fisher, Cat. N.º R0862)
- Metilmetanosulfonato (MMTS) (Sigma, Cat. N.º 64306)
- Soluciones transferencia: A (Tris Base 25mM y ácido aminocaproico 40mM), B (Tris Base 25 mM) y C (Tris Base 250 mM)
- Leche en polvo desnatada (Sigma, Cat. N.º M7409)
- 2-mercaptoetanol (β-mercaptoetanol) (Sigma, Cat. N. º M3148)
- Sustrato para inmunotransferencia (Western Blotting) de ECL Pierce (Thermo Fisher, Cat. N.º 32106)
- Anticuerpos empleados:

Anticuerpos primarios	Referencia	Dilución	Incubación
E-cadherina	SCBT, Cat. N.º 67A4	1:1000	Toda la noche a 4ºC
Vimentina	SCBT, Cat. N.º H84	1:1000	
N-cadherina	SCBT, Cat. N.º K20	1:1000	
GAPDH	Milipore, Cat. N.º 6C5	1:7500	
PRDX-3	Abcam, Cat. N.º ab129206	1:1000	
CCR9	Abcam, Cat. N.º ab32556	1:1000	
pan-RAS	Sigma, Cat. N.º OP40	1:200	
fosfo-p44/42 MAPK (fosfo-ERK)	Cell Signaling, Cat. N.º 4377	1:1000	
p44/42 (ERK total)	Cell Signaling, Cat. N.º 9102S	1:1000	
Neuropilina-1	Invitrogen, Cat. N.º MA5-32179	1:1000	

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en el desarrollo de este trabajo.

Anticuerpos secundarios	Referencia	Dilución	Incubación
Anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa	GE HealthCare, Cat. N.º NA931VS	1:5000	45 minutos a temperatura ambiente
Anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa	GE HealthCare, Cat. N.º NA934V	1:5000	

Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados en el desarrollo de este trabajo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Materiales:

- Frascos de 30 ml (Deltalab, Cat. N.º 309222)
- Tubos de 2 ml (Eppendorf, Cat. N.º 0030120094)
- Tubos de 1,5 ml (Eppendorf Cat. N.º 0030120086)
- Micropipetas de volumen ajustable monocanal (Socorex, N.º Cat. 825.0020, 825.0200 y 825.1000)
- Pipeteador Stripettor (Thermo Fisher, Cat. N.º 15536304)
- Placas de 100 mm de diámetro (Corning, Cat. N.º 430167)
- Placas de 60 mm de diámetro (Corning, Cat. N.º 430196)
- Pipetas de 10 ml (Corning, Cat. N.º 4488)
- Pipetas de 5 ml (Corning, Cat. N.º 356543)
- Pipetas de 2 ml (Corning, Cat. N.º 4486)
- Microcentrífuga (Centrífuga 5424 Eppendorf)
- Centrífuga Beckman Coulter Avanti® J-26S XPI
- Termobloque AccublockTM (Labnet)
- Agitador ROTAMAX 120 Heidolph™
- Sonicador BRANSON "SFX 150 DIGITAL"
- Baño de agua Fisher Isotemp, modelo 2341
- Espectrofotómetro ThermoSpectronic, modelo BioMate-3
- Cubeta y fuente de Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham Biosciences)
- Sistema de imágenes de gel de alta definición Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (BIO-RAD)
- Membranas de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) (Amersham GE Healthcare N.º. Cat. 4315A1)
- Papeles de transferencia Whatman (Cytiva, Cat. N.º 3030-917)
- Películas revelado (Fujifilm, N.º Cat. 47410 19289)
- Casetes de autorradiografía Amersham hypercassette 18 x 24 cm (Amersham Bioscience N.º. Cat. 10499404)
- Mortero con maza de porcelana para moler tejidos

Protocolo:

Para el estudio de la expresión de diferentes proteínas se empleó la técnica de *western blot*. Para ello, se realizaron los siguientes pasos en común en todos los ensayos. Especial mención al ensayo de la PRDX3 oxidada, donde se recogieron los extractos proteicos en condiciones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

especiales para evitar la oxidación-reducción de las proteínas de estudio, al igual que se empleó un buffer de carga sin DTT, cuya receta se describe en el apartado de electroforesis. El resto del procedimiento se realizaron como se describe en los demás apartados.

Extracción proteica total:

Para la obtención de los extractos proteicos totales, se sembraron las células en placas de 60 o 100 mm a la densidad adecuada según el requerimiento del estudio y la línea celular y se incubaron a 37 º C durante 24 horas. En el caso de los modelos *in vivo*, los extractos proteicos se obtuvieron moliendo los tumores empleando morteros de porcelana que se mantuvieron fríos sobre una capa de hielo seco, hasta que se obtuvo un disgregado completo de cada tumor que se resuspendió en *buffer* de lisis, como se detalla a continuación.

- Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con 50 o 100 µl de tampón de lisis (RIPA), mientras que los tumores homogeneizados se lisaron con 200-500 µl de tampón de lisis enfunción a su tamaño, cuya composición es: 150 mM NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.1% SDS; 1% Tritón X-100; 5mM EDTA; 0.5% deoxicolato sódico, suplementado con un *cocktail* de inhibidores de fosfatasas (ortovanadato de sodio 1 mM y fluoruro sódico 5 mM); inhibidores de proteasas (PMSF 1mM e inhibidor de proteasas 1X) y DTT 1 mM. Los lisados se mantuvieron en tubos en hielo durante 10- 15 minutos.
- Se sonicaron las muestras 3 veces con una amplitud del 30% y se centrifugaron a >14.000 rpm durante 20 minutos a 4ºC.
- Se recogieron los sobrenandantes (donde se encuentran las proteínas de interés) y se conservaron a -20ºC hasta su uso.

En el caso de los extractos para el estudio de **PRDX-3 oxidada**, el ensayo se realizó como está descrito[200]. Para ello, los extractos celulares se recogieron rápidamente tras los diferentes tratamientos y se incubaron las células 10 minutos con metilmetanosulfonato (MMTS) 80 mM en hielo, que se une y bloquea la oxidación de las cisteínas de las proteínas. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS frío y se lisaron las células con el *buffer* de lisis anteriormente descrito

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(RIPA), en condiciones no reductoras (sin DTT, para evitar la reducción de las proteínas) y que contiene MMTS 80 mM. Se dejó actuar durante 20 minutos antes de recogerlas y, por último, las muestras se sonicaron y centrifugaron como se ha descrito anteriormente.

Cuantificación de la concentración proteica:
La concentración de proteínas de cada muestra se determinó mediante el método colorimétrico basado en el cambio diferencial de color del reactivo Coomassie en respuesta a distintas concentraciones de proteínas. Para ello, se mezcló 2µl de cada muestra con 1ml del reactivo Coomasie (1X) y en paralelo se realizó una recta patrón con diferentes concentraciones de BSA. Con las absorbancias obtenidas de las diferentes concentraciones de BSA se obtuvo una recta patrón en la cual, mediante interpolación lineal de las absorbancias de las muestras se obtuvo la concentración de proteína.

Electroforesis SDS-PAGE
Se prepararon muestras de entre 30-50 µg de proteínas. Para las muestras de PRDX-3, se empleó un buffer de carga especial, eliminando el DTT de la receta para evitar así la reducción de las proteínas de la muestra. Para el resto de las muestras, se empleó el mismo buffer de carga, pero con DTT, como se detalla a continuación: 250 mM Tris-HCl, pH 6.8; 8% SDS; 200mM DTT; 0.1% de azul de bromofenol; 40% (v/v) de glicerol. Una vez preparadas las muestras, se aplicó un shock térmico durante 5 minutos a 95ºC, empleando el Termobloque AccublockTM, tras lo cual se cargaron en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE. Para ello se emplearon geles de entre 7,5 y 15 % de acrilamida (en función del peso molecular de las proteínas de interés) y se hicieron correr durante aproximadamente 2 horas aplicando una corriente de 25mA por gel.

Transferencia a membranas de PVDF
Tras separar las muestras en la electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (PVDF) con poros de 0,45 µm empleando papeles de filtro empapados en diferentes tampones de isopropanol 20% y concentraciones crecientes de Tris base, colocándolos en el aparato

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de transferencia. Para ello se siguieron los siguientes pasos:
1) Se activó la membrana de PVDF durante 1 minuto con metanol y luego se lavó 5 minutos en agua.
2) La membrana de nitrocelulosa y 3 papeles de filtro Whatman se pasaron a la solución de transferencia B y 6 papeles a las soluciones A y C, y se dejaron incubar durante 5 minutos.
3) Se realizó el montaje de transferencia poniendo de la siguiente forma: ánodo, 6 filtros incubados con Tris Base 25 mM y ácido aminocaproico (solución A), gel de acrilamida, membrana de PVDF, 3 filtros incubados con Tris Base 25 mM (solución B), 6 filtros incubados con Tris Base 250 mM (Solución C) y el cátodo. Se cerró el "sándwich" formado dentro del "Semi-Dry Blotter" y se sometió a una corriente de 44 mA por membrana (55,2 cm^2) durante 1 hora y 30 minutos.

Inmunodetección

A continuación, la membrana de PVDF se incubó con la solución de bloqueo (TNT 0.05% al 5% de leche o BSA) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TNT 0.05% y se incubó con los anticuerpos primarios durante toda la noche. Tras 3 lavados con TNT 1%, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario durante 45 minutos a temperatura ambiente. Por último, la membrana se lavó 3 veces con TNT 0.5% durante 10 minutos.

Revelado de imágenes

Las bandas de proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia empleando el sistema de detección ECL, según las instrucciones de proveedor. Se emplearon dos sistemas diferentes: 1) películas radiográficas, que se expusieron sobre las membranas de PVDF y se revelaron en un procesador de películas radiográficas automático y 2) el sistema de obtención de imágenes ChemiDoc (BioRad), donde se introdujeron directamente las membranas para detectar la quimioluminiscencia emitida. La cuantificación de las bandas correspondientes se realizó por densitometría empleando el software Image J o el programa Image Lab.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3 ENSAYOS DE CITOMETRÍA

Reactivos:

- MitoSOX (Thermo Fisher, Cat. N.º 36008)
- Ioduro de propidio (Calbiochem, Cat. N.º 537059)
- Etopósido (Sigma, Cat. N.º 341205)
- ARNasa (Sigma, Cat. N.º R6513)
- BSA liofilizada (Sigma, Cat. N. º A2153)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma, Cat. N.º D8537)
- Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco, Cat. N. º 10270-106)
- Tripsina (2.5% Tripsina-EDTA 10X) (Gibco, Cat. N.º 15090046)
- Anticuerpo anti-fosfohistona H2AX de ratón conjugado con FITC (Sigma, Cat. N.º 16-202A)
- Anticuerpo monoclonal anti-NPL-1 conjugado con PerCP-eFluor™ 710 (Thermo Fisher, Cat. N.º 46-3049-42)
- Isotipo de ratón IgG1k conjugado con PerCP-eFluor™ 710 (Thermo Fisher, Cat. N.º 46-4714-82)
- Anticuerpo anti-CCR9 conjugado con ficoeritrina (PE) (ThermoFisher, Cat. N.º 12-1999-42)
- Isotipo de ratón IgGk-1 conjugado con ficoeritrina (PE) (ThermoFisher, Cat. N.º 12-4714-82)

Materiales:

- Contador automático LUNA-II™ (Logos Biosystems, Ref. L40001
- Pipetas de 10 ml (Corning, Cat. N.º 4488)
- Pipetas de 5 ml (Corning, Cat. N.º 356543)
- Pipetas de 2 ml (Corning, Cat. N.º 4486)
- Baño de agua Fisher Isotemp, modelo 2341
- Tubos de 2 ml (Eppendorf, Cat. N.º 0030120094)
- Tubos de 1,5 ml (Eppendorf Cat. N.º 0030120086)
- Micropipetas de volumen ajustable monocanal (Socorex, Nº Cat. 825.0020, 825.0200 y 825.1000)
- Pipeteador Stripettor (Thermo Fisher, Cat. N. º 15536304)
- Placas de 96 con fondo en “U” (Corning, Cat. N.º CLS3917)
- Citómetro Guava EasyCyte
- Citómetro de flujo BD FACSCalibur

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Protocolos:

5.3.1 Determinación de los niveles de ROS.

Para medir los niveles de ROS de las diferentes líneas celulares, se empleó la sonda MitoSOX, que nos permite detectar el superóxido (O_2-) mitocondrial de células vivas ya que su oxidación produce una fluorescencia roja. La oxidación de estas moléculas se monitorizó midiendo el incremento de fluorescencia mediante citometría de flujo empleando el citómetro Guava EasyCyte. Se estudiaron los niveles de el $O_2 - mitocondrial$ de los diferentes modelos de resistencia:

1) Se sembraron las células en placas de 12 pocillos (50.000 células/pocillo para A549 y H358 y 100.000 células/pocillo para A2780) y se dejaron incubando durante 24 h a 37 º C.
2) Se recogieron las células de los pocillos en *eppendorfs* de 1.5 ml, añadiendo 300 µl de tripsina y arrastrando dos veces con 0,7 ml de medio de cultivo.
3) Se centrifugaron durante 5 minutos a 300 G, se retiró el sobrenadante, y los pellets se lavaron con 1 ml de PBS.
4) Se centrifugaron de nuevo durante 5 minutos a 300 G, y se tiñeron con la sonda MitoSOX, a una concentración de 5 µM en PBS. (Recordar, que para situar la población una vez que se realice la citometría, es imprescindible dejar una muestra de células control sin teñir). Se dejaron incubando las muestras a 37 º C y en oscuridad durante 30 minutos.
5) Se centrifugaron durante 5 minutos a 300 G, se retiró el sobrenadante, y los pellets se lavaron con 1 ml de PBS.
6) Se evaluó la fluorescencia presente en las células mediante citometría de flujo (Guava EasyCyte, Millipore).

5.3.2 Estudio del daño en el ADN.

Se estudió el daño directo sobre el ADN provocado por el tratamiento con los AQCs-Ag5 y el CDDP. Se sabe que la fosforilación de la histona H2AX en la Ser 139 (γH2AX) es un marcador de daño en ADN, especialmente si el daño se produce por rotura de la doble hélice [201]. Se empleó un ensayo de medida de la fosforilación de la histona

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

H2AX (γH2AX) como está descrito[202], empleando un anticuerpo frente γH2AX marcado con FITC, pudiendo detectar así la cantidad de daño producido en el ADN en las diferentes muestras. Como control positivo de daño se empleó etopósido, un agente muy bien caracterizado de daño en ADN[203]. Además, los diferentes estados del ciclo celular se identificaron tiñendo el ADN con yoduro de propidio (IP), teniendo así una doble tinción.

1) Se sembraron placas de 24 pocillos, empleando para ello mitad de la placa con la línea resistente y la otra mitad con la línea sensible (60.000 células/pocillo para A549 y H358 y 80.000 células/pocillo para A2780); se dejó incubando a 37 º C durante 24 horas.
2) Se añadió el tratamiento correspondiente con los AQCs-Ag5 (durante 1 hora en medio sin suero) y con el CDDP (durante 4 horas en medio completo) poniendo cada condición por duplicado, y empleando como control positivo de daño en el ADN etopósido 24 µM (durante 1 hora). En los casos de terapia combinada, se puso primero en tratamiento de AQCs-Ag5, se retiró y luego se puso el tratamiento con el CDDP.
3) Se recogieron las células tripsinizando y resuspendiendo con medio de cultivo, tras lo cual se centrifugaron durante 5 minutos a 300 G, se retiró el sobrenadante y se lavaron en 1 ml de PBS frío. A partir de este momento se mantuvieron en hielo en todo momento.
4) Las células se resuspendieron en 50 µl de buffer de fijación (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% tritón X-100, 10mM EDTA, 0.1 g/l BSA, 100 mM NaF, 1 mM Na_2MoO_4, 1 mM $NaVO_3$, 0.2% PFA) durante 5 minutos, en oscuridad.
5) Para la tinción de γ-H2AX, se añadió sobre lo anterior 150 µl de Block-9 *buffer* (0.1 g/l RNAsa, 0.1% tritón X-100, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na_2MoO_4, 1 mM $NaVO_3$, 0.05% NaN_3) con 0,6 µg/ml de anticuerpo anti γ-H2AX conjugado con FITC y se incubó 3 horas a 4 º C protegido de la luz (recordar, que para situar la población una vez que se realice la citometría, es imprescindible dejar una muestra de células control sin teñir).
6) Se lavaron las células con PBS-0.5% BSA y por último se incubaron durante toda la noche a 4 º C con yoduro de propidio (0,01 mg/ml).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Esta co-tinción final se realizó para conocer el estado del ciclo celular frente a cada uno de los tratamientos.

7) Se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 300 G, se retiró el sobrenadante y resuspendieron los *pellets* celulares en 100 µl de PBS.
8) Se evaluó la fluorescencia presente en las células mediante citometría de flujo (Guava EasyCyte, Millipore).

5.3.3 Estudio de la expresión de CCR9 en la superficie celular.

Para investigar la expresión en la superficie de las líneas de interés, MIA PaCa-2 y PANC-1, se empleó citometría de flujo, cuantificándose la señal de CCR9 en las células diferenciando tres condiciones diferentes: células sin teñir, células teñidas con el isotipo y células teñidas frente CCR9. Se empleó la línea celular de leucemia linfoblástica aguda MOLT-4 como control positivo, ya que expresa el receptor de forma muy abundante[157].

1) Se sembraron placas de 60 mm con diferentes densidades celulares de MIA PaCa-2 y PANC-1 (25.000 células/cm², 40.000 células/ cm² y 80.000 células/cm²) y se dejaron incubando a 37 º C durante 24 horas.
2) Se tripsinizaron las diferentes condiciones sembradas en las placas de 60 mm empleando 500 µl de tripsina y recogiendo las células en 1 ml de medio completo.
3) Se centrifugaron a 300 G 5 minutos y se contaron empleando el contador automático LUNA-II™, y se sembraron duplicados por cada condición, poniendo entre 5 x 10^5 y 1 x 10^6 células/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo cónico (en forma de V) en un volumen de 200 µl.
4) Se centrifugaron las células a 300 G durante 5 minutos a temperatura ambiente y se bloqueó empleando 100 µl de PBS 1% BSA por pocillo.
5) Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad en 100 µl del anticuerpo anti-CCR9 (1.25 x 10^{-3} µg/µl) conjugado con ficoeritrina o del isotipo marcado con ficoeritrina (1.25 x 10^{-3} µg/µl) en PBS al 2% FBS; las condiciones de células sin teñir se resuspendieron en 100 µl de PBS al 2% FBS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6) Se realizó un lavado con 100µL de PBS al 2 % FBS y se centrifugó a 300 G durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7) Se resuspendieron las muestras en 300 µL de PBS al 2% FBS y se analizaron mediante citometría de fujo, en el citómetro de flujo BD FACSCalibur, manteniendo las muestras en hielo y oscuridad. Para ello se ajustó la población y la autofluorescencia de las líneas celulares con la muestra sin teñir, y se midió la señal de las muestras teñidas con el isotipo y con el anticuerpo específico frente CCR9.

5.3.4 Estudio de la expresión de NPL-1

Los niveles de expresión de NPL-1 son importantes para la actuación de las NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V}, por ello, se estudió la expresión de NPL-1 en la línea celular CFPAC-1 por citometría de flujo como se detalla a continuación. Se empleó como control positivo de expresión las células HUVEC. Se emplearon tres condiciones por línea celular para cada ensayo: células sin teñir para ajustar las poblaciones y la autofluorescencia, células teñidas con el anticuerpo anti-NPL-1 y el isotipo.

1) Se tripsinizaron las células mantenidas en placas de 100 mm empleando 1 ml de tripsina y recogiendo las células en 5 ml de medio completo.
2) Se centrifugaron a 300 G 5 minutos y se contaron empleando el contador automático LUNA-II™, y se sembraron duplicados por cada condición, poniendo entre 5 x 10^5 y 1 x 10^6 células/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo cónico (en forma de V) en un volumen de 200 µl.
3) Se centrifugaron las células a 300 G durante 5 minutos a temperatura ambiente y se bloqueó empleando 100 µl de PBS 1% BSA por pocillo.
4) Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad en 100 µl del anticuerpo anti-NPL1- PerCP o del isotipo IgG1k-PerCP en PBS al 2% FBS, empleando la concentración recomendada por la casa comercial (0,06µg/100µl); las condiciones de células sin teñir se resuspendieron en 100 µl de PBS al 2% FBS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5) Se realizó un lavado con 100µL de PBS al 2 % FBS y se centrifugó a 300 G durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6) Se resuspendieron las muestras en 300 µL de PBS al 2% FBS y se analizaron empleando el citómetro de flujo BD FACSCalibur, manteniendo las muestras en hielo y oscuridad. Para ello se ajustó la población y la autofluorescencia de las líneas celulares con la muestra sin teñir, y se midió la señal de las muestras teñidas con el isotipo y con el anticuerpo específico frente NPL-1.

5.4 ENSAYOS DE ADCC EN LA LÍNEA PANC-1

Estos ensayos se realizaron bajo la autorización del Comité de Ética de Investigación de Santiago-Lugo, que permitieron el desarrollo de la investigación titulada "Desarrollo de fármacos biológicos contra CCR9 en tumores sólidos mediante modulación del sistema inmune del paciente", con el Código de Registro 2019/054.

Reactivos:

- Línea celular PANC-1 (proporcionadas por la compañía SunRock Biopharma, ATCC n.º CRL-1420)
- Medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose* (DMEM alto en glucosa) (Sigma, Cat. N. º D6429)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma, Cat. N.º D8537)
- Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco, Cat. N. º 10270-106)
- Tripsina (2.5% Tripsina-EDTA 10X) (Gibco, Cat. N.º 15090046)
- *Kit* de aislamiento de células NK (Miltenyi Biotec, Cat. N.º 130-092-657)
- Medio para cultivar células NK: *CTS NK Xpander medium* (ThermoFisher, Cat. N.º A5019001)
- Suplemento para cultivar células NK: *CTS NK-Xpander Supplement* (ThermoFisher, Cat. N.º A49120-01)
- Suero AB humano (ThermoFisher, Cat. N.º 11405055)
- IL-2 (Miltenyi Biotec, Cat. N.º 130093955)
- IL-5 (Miltenyi Biotec, Cat. N.º 130097742)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Anticuerpo-anti CD3 humano conjugado con ficoeritrina (IgG2a αCD3-PE) (BioLegend, Cat. N.º 300308)
- Anticuerpo-anti CD56 humano conjugado con aloficocianina (IgG1k αCD56-APC) (BioLegend, Cat. N.º 308310)
- Anticuerpo Isotipo de ratón (IgG2a) conjugado con ficoeritrina (BioLegend, Cat. N.º 400212)
- Anticuerpo Isotipo de ratón (IgG1k) conjugado con aloficocianina (BioLegend, Cat. N.º 400122)
- Anticuerpo anti-CCR9 humanizado (SRB1) (proporcionado por SunRock Biopharma)
- Isotipo IgGk1 (Abcam, Cat. N.º 206202)
- Isotipo IgGk1 (MedChem Express, Cat. N.º HY-P99001)
- Anticuerpo anti-CCR9 conjugado con ficoeritrina (PE) (ThermoFisher, Cat. N.º 12-19999-42)
- Isotipo de ratón IgGk1 conjugado con ficoeritrina (PE) (ThermoFisher, Cat. N.º 12-4714-82)
- BSA liofilizada (Sigma, Cat. N. º A2153)
- Aqua (Invitrogen, Cat. N.º L34957)

Materiales:

- Contador automático LUNA-II™ (Logos Biosystems, Ref. L40001
- Pipetas de 10 ml (Corning, Cat. N.º 4488)
- Pipetas de 5 ml (Corning, Cat. N.º 356543)
- Pipetas de 2 ml (Corning, Cat. N.º 4486)
- Baño de agua Fisher Isotemp, modelo 2341
- Tubos de 2 ml (Eppendorf, Cat. N.º 0030120094)
- Tubos de 1,5 ml (Eppendorf Cat. N.º 0030120086)
- Micropipetas de volumen ajustable monocanal (Socorex, Nº Cat. 825.0020, 825.0200 y 825.1000)
- Pipeteador Stripettor (Thermo Fisher, Cat. N. º 15536304)
- Placas de 100 mm de diámetro (Corning, Cat. N.º 430167)
- Placas de 96 pocillos (Corning, Cat. N.º 3595)
- Placas de 96 con fondo en “U” (Corning, Cat. N.º CLS3917)
- Placas de 48 pocillos (Corning, Cat. N.º 10065370)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Tubos extracción de sangre BD Vacutainer CPT (BD, Cat. N.º 362761)
- Columna LS (Miltenyi Biotec Cat. N.º 130-042-401)
- Separador magnético midiMACS (*Miltenyi Biotec* Cat. N.º 130-042-302)
- Citómetro Luminex Amnis CellStream (serie CS113)

Protocolos:

Los anticuerpos terapéuticos dirigidos frente dianas de células tumorales han permitido el desarrollo de la inmunoterapia contra el cáncer, redirigiendo las células efectoras inmunitarias (como las células NK) para eliminar las células tumorales. Estos anticuerpos permiten la unión simultánea de antígenos de superficie de las células tumorales (como es el caso de CCR9) y receptores activadores de células del sistema inmune innato, como las células NK, que median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)[204].

En este estudio se quiso comprobar la capacidad del anticuerpo terapéutico SRB1 con afinidad frente a la diana tumoral CCR9, de desencadenar ADCC en presencia de células NK en la línea celular PANC-1. Para ello, se aislaron células NK de sangre periférica de donantes sanos y se pusieron en cocultivo con las células tumorales de la línea PANC-1 en presencia del anticuerpo terapéutico anti-CCR9 SRB1. Un esquema del protocolo completo de los ensayos de ADCC se observa en la Fig.12.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

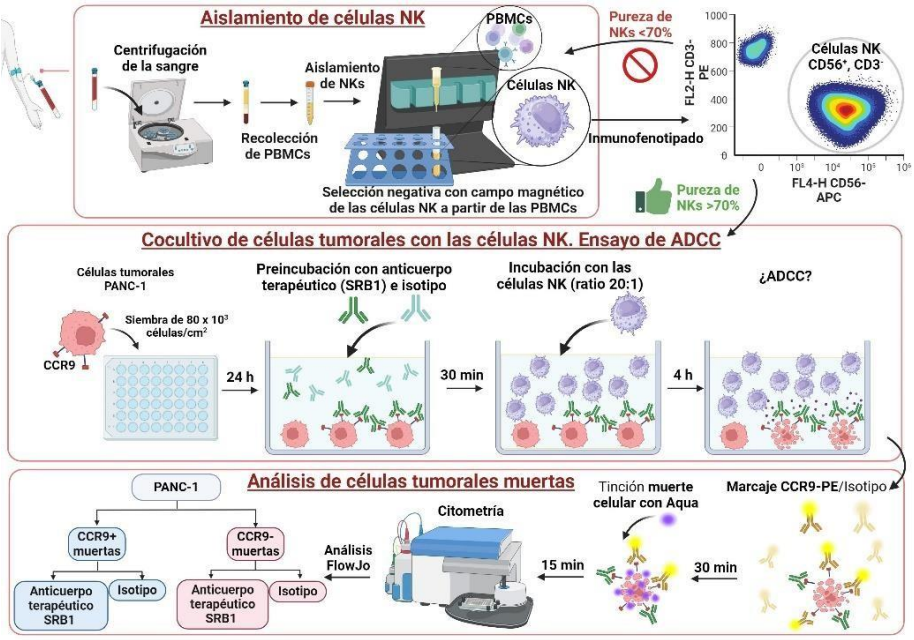


Figura 12. Esquema del diagrama de trabajo en los ensayos de ADCC. Primero, las células NK se aíslan a partir de las PBMCs de la sangre periférica de donantes sanos, y se realiza su inmunofenotipado para trabajar con una pureza superior al 70% de células NKs. Las células tumorales PANC-1 son pretratadas con el anticuerpo terapéutico SRB1 o su isotipo durante media hora, y a continuación se realiza el cocultivo con las células NK durante 4 horas (en una ratio 20 células NK por 1 célula tumoral). Para distinguir las células CCR9 positivas de las negativas, se tiñen las células tumorales del cocultivo con un anticuerpo anti-CCR9 marcado con PE (y su isotipo como control negativo) durante 30 minutos, y por último se añade el marcaje de muerte celular Aqua. Finalmente se analizan los datos en el software FlowJo, seleccionando primero la población de células positivas o negativas para CCR9, ajustando con el isotipo de CCR9 y luego, dentro de cada una de las poblaciones, las células muertas se identificaron como Aqua positivas para ambos grupos. Se comparó el grupo tratado con el anticuerpo terapéutico SRB1 o su isotipo y se calculó la muerte celular específica como está descrito en otros ensayos de ADCC15: 100 × [(% de células diana muertas en muestra (SRB1) – % de células diana muertas espontáneas (isotipo SRB1)) / (100 – % de células diana muertas espontáneas (isotipo SRB1))]. Imagen creada con BioRender.com.

5.4.1 Procesamiento de las muestras de sangre periférica de donantes sanos; aislamiento de las células NK.

Para obtener las células NK necesarias para el experimento de ADCC, se procedió de la siguiente forma:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1) Las extracciones de muestras de sangre de donantes sanos fueron realizadas por personal del Servicio de Vigilancia de la USC. Se emplearon tubos *Vacutainer CPT* de 8ml que presentan un gradiente de ficol y permiten el aislamiento de PBMCs; las muestras fueron almacenadas a 4ºC hasta su procesamiento dentro de las 2 horas siguientes a la extracción de sangre.
2) Los tubos fueron suavemente invertidos 8-10 veces y se centrifugaron a 1500 G durante 15 minutos a temperatura ambiente; la centrifugación se realizó sin freno, ya que la fase monocitaria es tan lábil que con una desaceleración brusca se rompería y no se podrían obtener las PMBCs.
3) Se recogió la capa que contenía las PBMCs (Fig. 13), entre las cuales se encuentran las células NK, desechando el resto. Se realizaron dos lavados con 15mL de PBS centrifugando 15 minutos a 400 G a temperatura ambiente. Por último, se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo y se contaron con el Contador automático LUNA-II™ auto para proceder al aislamiento de las células NK.

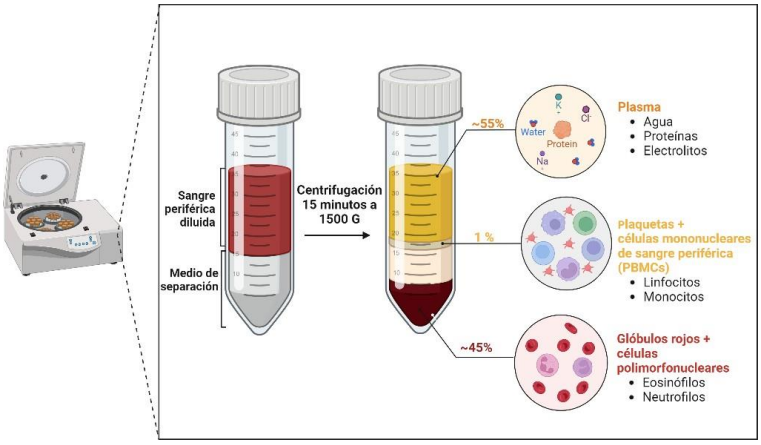


Figura 13. Aislamiento de PBMCs por centrifugación en gradiente de densidad. Los tubos con sangre periférica se centrifugaron a 1500 G durante 15 minutos. Debido a su densidad más elevada, los eritrocitos, los granulocitos y las células muertas pasan por la capa de ficol mientras que los linfocitos y los monocitos, debido a una menor densidad, se acumularán en la barrera gradiente de plasma. Imagen creada con BioRender.com.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4) Para aislar las células NK se empleó el Kit *Miltenyi Biotec*, que nos permite trabajar con hasta 10^7 células. En caso de tener menor número de PBMCs, se realizaron los cálculos oportunos.
5) Se centrifugaron las PBMCs que se habían contado 5 minutos a 300 G, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado de células en 40 µl de *buffer* (PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA) por cada 10^7 células + 10 µl de *Biotin-Ab Cocktail* por cada 10^7 células. Se mezcló bien y se incubó 5 minutos a 4 º C. En este paso, todas las células que no fueran células NK quedarían unidas a los diferentes anticuerpos con biotina.
6) Se añadió sobre lo anterior 30 µl de *buffer* (PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA) por cada 10^7 células + 20 µl de *NK cell Microbead Cocktail* por cada 10^7 células. Se mezcló bien y se incubó 10minutos a 4ºC. En este paso, todas las células que no sean células NK quedarían también unidas con los anticuerpos conjugados con partículas magnéticas (o "*microbeads*").
7) Para separar las células NK del resto de PBMCs, se colocó la columna *LS* en el Separador magnético *midiMACS* y se activó pasando 3 ml de *buffer* (PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA) a través de esta, dejándolo caer por gravedad a un tubo de 15ml (Fig. 14). Tras esto, se aplicó la suspensión de PBMCs en la columna y se añadieron 3ml más de *buffer* (PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA) que se volvió a dejar caer por gravedad, recogiendo así células NK en un tubo de 15 ml. Se trata de un proceso de selección negativa de las células NK, ya que el *Biotin-Ab Cocktail* se une a todas las PBMCs menos las células NK, que al unirse al *NK cell Microbead Cocktail* se quedan unidas a la columna al pasarlas por el campo magnético y así obtenemos las células NK sin haberlas manipulado y evitando posibles modificaciones en las mismas (como su

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

activación).

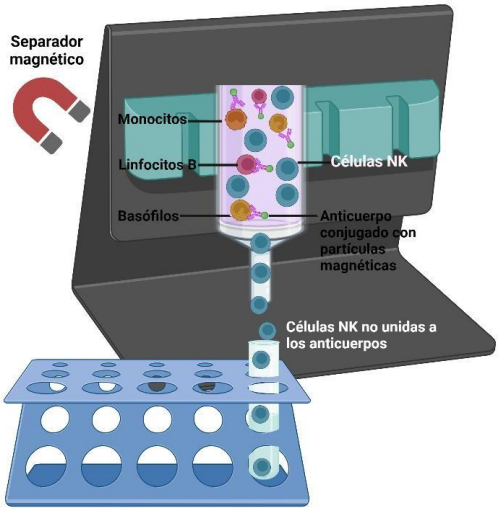


Figura 14. Separación magnética de las células NK del resto de PBMCs. Todas las PBMCs menos las células NKs quedan atrapadas en la columna colocada en el campo magnético, al estar unidas primero a anticuerpo conjugado con biotina más un anticuerpo conjugado con partículas magnéticas que las atrapa en la columna. Las células NK son separadas a un tubo nuevo al añadir un buffer eluyente a la columna. Imagen creada con BioRender.com.

5.4.2 Inmunofenotipado de las células NK.

Las células NK que fueron aisladas del resto de PBMCs, fueron inmunofenotipadas antes de realizar los ensayos de ADCC, para confirmar que se estuviera trabajando con una población lo más pura posible de células NK y evitar que otras células, como linfocitos B y T pudieran estar interfiriendo o produciendo una muerte basal independiente del objeto de estudio, que es la ADCC producida en la línea PANC-1 por las células NK en presencia del anticuerpo terapéutico SRB1. En caso de que la pureza de las células NK fuera inferior al 70 % de la población, se repitió el aislamiento. Se sabe que las células NK expresan en superficie CD56 pero no CD3 (son CD56 + y CD3 -), por lo que se emplearon anticuerpos frente estasdos proteínas de superficie para distinguirlas del resto de células:

1) Se sembraron en una placa de fondo en U de 96 pocillos entre 2 x 10^5 y 1 x 10^6 células/ condición, en función a la cantidad de células

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

obtenidas del donante y teniendo en cuenta las requeridas para el ensayo de ADCC.

2) Se centrifugaron a 300 G 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS al 1% de BSA.
3) Se volvieron a centrifugar a 300 G 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron las células con cada condición de tinción en 100 µL de PBS al 2 % FBS y se incubaron 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente:
   - células sin teñir (para ajustar la población y autofluorescencia)
   - células teñidas con el anticuerpo anti-CD3-PE (1.25 x 10^{-3} µg/µl)
   - células teñidas con el isotipo del anticuerpo anti-CD3-PE (1.25 x 10^{-3} µg/µl
   - células teñidas con el anticuerpo anti-CD56-APC (1.25 x 10^{-3} µg/µl)
   - células teñidas con el isotipo del anticuerpo anti-CD56-APC (1.25 x 10^{-3} µg/µl)
4) Se centrifugaron las células a 300 G 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 2 % FBS/pocillo.
5) Por último, se resuspendieron en 300 µL de PBS 2 % FBS/pocillo y se mantuvieron en hielo y oscuridad, para pasarlas por el Citómetro de flujo BD FACSCalibur tan rápido como fue posible.

5.4.3 Procesamiento de la línea tumoral PANC-1.

La línea tumoral PANC-1 se sembró el día previo a la donación de sangre y aislamiento de las células NK, para dejar las células adherirse a la placa durante 24 horas antes de realizar los ensayos de ADCC. Las células se tripsinizaron como ya se ha descrito, y se sembraron a una densidad de 80.000 células/cm² en 500 µl de medio completo, en una placa de 48 pocillos y se dejó incubando a 37 º C y 5 % de CO_2 durante 24 horas.

5.4.4 Ensayos de ADCC. Cocultivo de las células tumorales con las células NK en presencia de SRB1.

Para investigar si el anticuerpo monoclonal terapéutico SRB1 era capaz de inducir ADCC en las células PANC-1 CCR9+ en presencia de las células NK asiladas, se realizó el siguiente abordaje:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1) Se retiraron los 500 µl en los que se sembraron las células tumorales PANC-1 y se realizó una preincubación con el anticuerpo terapéutico SRB1 (10 µg/ml) o con el isotipo IgGk1 del anticuerpo terapéutico (10 µg/ml) durante 30 minutos a 37 º C en el medio de las células tumorales (DMEM alto en glucosa). Esta preincubación se realizó para permitir al anticuerpo terapéutico unirse a su diana (CCR9) antes de añadir las células efectoras NK, como está descrito[155].
2) Se añadieron las células NK aisladas en una ratio 1:20 (por cada célula tumoral 20 células NK) y se completó con medio de cultivo hasta los 600 µl de volumen final. Se dejó incubando durante 4 horas a 37 º C y 5 % de CO_2, como se refleja en la Fig.15.

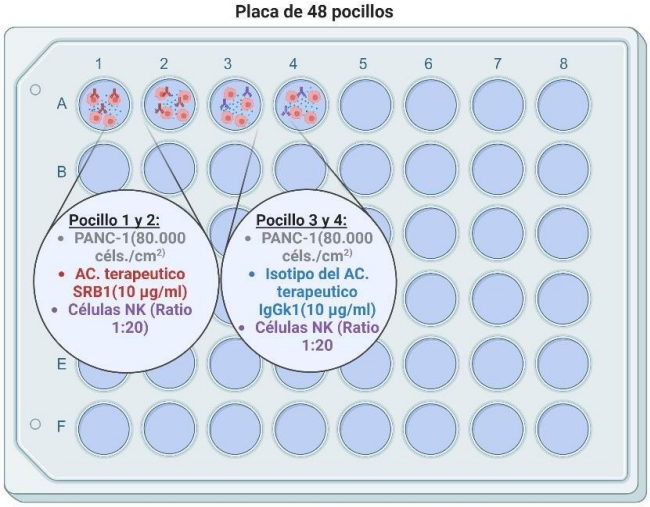


Figura 15. Contenido de las placas de 48 pocillos, mostrándose el esquema de cómo se realizó el cocultivo de células tumorales PANC-1 con las células NK en presencia del anticuerpo terapéutico SRB1 o su isotipo. Imagen creada con BioRender.com.

3) Pasadas las 4 horas, se tripsinizaron las células en 200 µl de tripsina y se recogieron en 400 µl de medio completo. Se centrifugó a 300 G 5 minutos y cada condición de tratamiento se resuspendió en PBS 2% de FBS para pasarlas a una placa de fondo en U de 96 pocillos para marcar el receptor CCR9 y así distinguir las células CCR9+ de las CCR9-.
4) Para ello, como se pusieron duplicados del cocultivo con el tratamiento de SRB1 y con el isotipo de SRB1, se tiñó un pocillo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

con el anticuerpo anti-CCR9 y el otro con su isotipo; además, para ajustar las tinciones simples en el citómetro, se emplearon unas 100.00 células de PANC-1/condición: condición sin teñir, tinción con CCR9, tinción con el isotipo de CCR9 y el control positivo de muerte con Aqua (Fig.16). Primero se realizaron las tinciones con el anticuerpo anti-CCR9 y su isotipo, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad:

- Tinción de CCR9: 5 µL de anticuerpo-antiCCR9 + 95µL PBS 2 % FBS/pocillo (1.25 x 10^{-3} µg/µl).
- Tinción del isotipo de CCR9: 0.625 µL de isotipo IgGk1-antiCCR9 + 99,375 µL PBS 2 % FBS/pocillo (1.25 x 10^{-3} µg/µl).

Además, durante estos 30 minutos, se introdujo un vial con células en una estufa a 60 º C que serviría como control positivo de muerte.

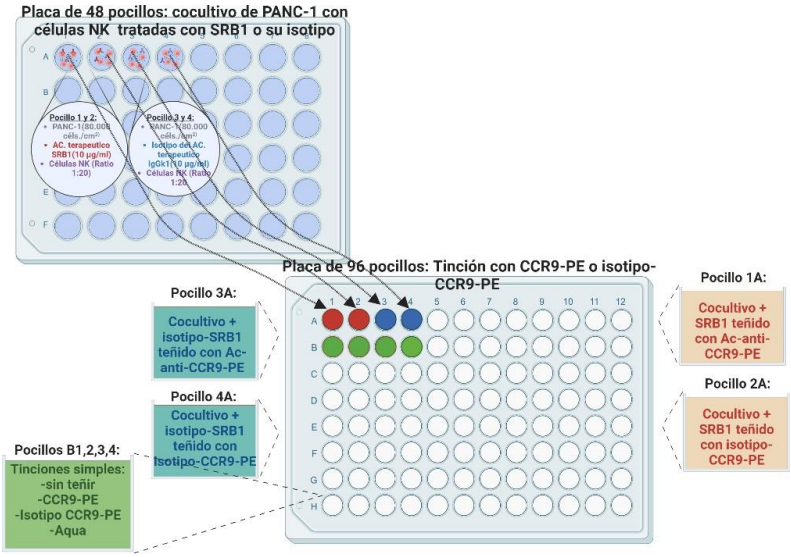


Figura 16. Esquema de cómo se pasaron las muestras en las diferentes condiciones del cocultivo de PANC-1 con las células NK en presencia del anticuerpo terapéutico SRB1 o su isotipo a la placa de 96 de fondo en U para la tinción con el anticuerpo anti-CCR9 o su isotipo. Pasadas las 4 horas del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y sembradas en una placa de 96 pocillos para realizar la tinción de CCR9, para distinguir así las células CCR9+ de las CCR9- (Pocillos A1,2,3,4). Como controles, se emplearon 4 pocillos con las tinciones simples para ajustar los marcajes en juego en el citómetro, (pocillos B1,2,3,4): células PANC-1 sin teñir, teñidas con CCR9-PE, isotipo-CCR9-PE y control de muerte Aqua. Imagen creada con BioRender.com.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5) Pasados los 30 minutos de tinción de CCR9, se centrifugó la placa a 300 G 5 minutos, y se realizó la tinción con el marcador de muerte Aqua en todos los pocillos menos en la condición sin teñir. Para ello, se diluyó Aqua 1 µL en 2 ml de PBS, y de ahí se cogió un volumen de 100 µL/pocillo. Se incubó durante 15 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Este colorante entra en células con membranas comprometidas, reaccionando con aminas libres tanto en el interior de la célula como en su superficie, lo que provoca una intensa tinción fluorescente, mientras que, en células viables, la reactividad del colorante está limitada a las aminas de la superficie celular, lo que se traduce en una fluorescencia menos intensa.
6) Por último, se centrifugó la placa y se resuspendieron todas las muestras en 100 µL de PBS al 2% de FBS y se pasaron por el citómetro Luminex Amnis CellStream (serie CS113).

5.4.5 Análisis de las muestras de los ensayos de ADCC.

Las muestras se analizaron con el software FlowJo™:

1) Se seleccionó la población de células positivas o negativas para CCR9, ajustando con el isotipo de CCR9.
2) Dentro de cada una de las poblaciones, las células muertas se identificaron como Aqua positivas para ambos grupos. Se comparó el grupo tratado con el anticuerpo terapéutico SRB1 o su isotipo y se calculó la muerte celular específica como está descrito en otros ensayos de ADCC[155]: 100 × [(% de células diana muertas en muestra *(SRB1)* – % de células diana muertas espontáneas *(isotipo SRB1)*) / (100 – % de células diana muertas espontáneas *(isotipo SRB1)*)].

5.5 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Estos experimentos se realizaron en el Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA), inscrito en el Registro de centros de cría, suministradores y usuarios con el número ES150780292901 bajo el Proyecto Autorizado según el Real Decreto 53/2013 con el número 15012/2023/007 tras el dictamen positivo del Comité de Bioética de la USC, bajo la responsabilidad de Anxo Vidal Figueroa, como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

investigador principal. El trabajo fue realizado por la autora de la tesis con n.º de certificado de capacitación para trabajar con animales CAP0700216.

Reactivos:

- Líneas celulares: CFPAC-1 (ATCC, n.º CRL-1918), A549-Luc, (ATCC, n.º CCL-185-LUC2), LLC1 (*Lewis lung carcinoma*, o en español carcinoma de pulmón de Lewis, ATCC n.º CRL-1642) y LLC1-luc (ATCC n.º CRL-1642-LUC2)
- Medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose* (DMEM bajo en glucosa) (Sigma, Cat. N. º D6046)
- Medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose* (DMEM alto en glucosa) (Sigma, Cat. N. º D6429)
- Medio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), (Thermo Fisher, Cat. N. º 12440053)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Sigma, Cat. N.º D8537)
- Tripsina (2.5% Tripsina-EDTA 10X) (Gibco, Cat. N.º 15090046)
- Matrigel (Gibco, Cat. N.º A14132-02)
- Ratones Swiss (suministrados por el CEBEGA inscrito en el Registro de centros de cría, suministradores y usuarios con el número ES150780292901)
- Ratones desnudos de la cepa Rj:NMRI-Foxn1 nu/nu - Hembras - Janvier Labs (de 6 a 8 semanas de edad) de Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia)
- Gemcitabina Accord
- Docetaxel Accord (20mg/mL), versión genérica aprobada en la Unión Europea. Código del producto: 08470006917190
- NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} (desarrolladas por la investigadora Ana María López Estévez, del grupo Nanobiofar, dirigido por María José Alonso, CIMUS)
- LNPs cargadas con ARNsi-KRAS (desarrolladas por el investigador Shubaash Anthiya, del grupo Nanobiofar, dirigido por María José Alonso, CIMUS)
- Isofluorano (Isoflutek 1000 mg/g, Ref. 055152)
- Luciferina (Sigma, Cat. N.º L9504)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Materiales:

- Cámara de flujo laminar
- Incubador InCuSafe Panasonic (MCO-18AC-PE)
- Centrífuga (Thermo Scientific Sorvall ST 16R)
- Contador automático LUNA-II™ (Logos Biosystems, Ref. L40001)
- Microscopio Digital Invertido Leica DMI 6000 B
- Microscopio Leica DM 2000
- Frascos de 150 ml (Deltalab, Cat. N.º 409726)
- Frascos de 30 ml (Deltalab, Cat. N.º 309222)
- Tubos de 2 ml (Eppendorf, Cat. N.º 0030120094)
- Tubos de 1,5 ml (Eppendorf Cat. N.º 0030120086)
- Micropipetas de volumen ajustable monocanal (Socorex, N.º Cat. 825.0020, 825.0200 y 825.1000)
- Pipeteador Stripettor (Thermo Fisher, Cat. N.º 15536304)
- Placas de 100 mm de diámetro (Corning, Cat. N.º 430167)
- Pipetas de 10 ml (Corning, Cat. N.º 4488)
- Pipetas de 5 ml (Corning, Cat. N.º 356543)
- Pipetas de 2 ml (Corning, Cat. N.º 4486)
- Agujas de 30 G (BD Microbalance, Cat. N.º 30400)
- Agujas de 25 G (BD Microbalance, Cat. N.º 300600)
- Jeringas de plástico de 1ml sin aguja (BD Plastipak, Cat. N.º 303172)
- Jeringas de 1 ml con aguja (BD Plastipak Cat. N.º 305502)
- Material quirúrgico de disección (bisturí, tijeras y pinzas)
- IVIS® Spectrum (sistema de imagen *in vivo*), Xenogen
- Calibre digital (OreWork Ref. 346213)

Procedimientos:

5.5.1 Ensayo de dosis máxima tolerada MTD: estudio de toxicidad

En este estudio se realizó una evaluación de la toxicidad a dosis repetidas de las nanocápsulas (NCs) blancas del anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} a la máxima concentración posible, (3,2 mg/ml) empleando 4 ratones en el grupo de tratamientos y 3 ratones en el grupo control, a los cuales se les inyectó PBS. Para ello, se emplearon ratones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inmunocompetentes (ratones Swiss, suministrados por el CEBEGA) y se inyectaron 2 veces por semana, durante 2 semanas, 100µl de las NCs vía intravenosa empleando agujas de 25G y se evaluaron todos los días los síntomas clínicos empleando la escala de Grimace. Se consideró como dosis tóxica aquella en la que los ratones perdieron el 20% de su peso inicial y en la que los ratones mostraron signos visibles de dolor, como piloerección, parálisis de las extremidades, debilidad, falta de movilidad y apetito. Además, se realizaron análisis bioquímicos y hematológicos en el punto final de los ratones, comparando los grupos tratados con los controles sin tratar.

5.5.2 Desarrollo del modelo subcutáneo de páncreas: estudio piloto.

Antes de realizar el estudio de eficacia, se realizó una prueba piloto para optimizar el número de células CFPAC-1 más apropiado para la inyección subcutánea, así como las dosis de Gemcitabina que se iban a administrar en la terapia combinada con las NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V}. El modelo tumoral se desarrolló en ratones hembra desnudos de la cepa Rj:NMRI-Foxn1 nu/nu (Janvier Labs), de edades comprendidas entre 6-8 semanas. Se mantuvieron en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*, específico libre de patógenos) con unas condiciones controladas de fotoperiodo (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), temperatura (20-24 º C) y con agua y comida *ad libitum.*

Para el desarrollo del tumor del ensayo piloto, se realizaron 2 grupos de animales a los cuales se les inyectó de manera subcutánea en el flanco derecho diferente número de células: un grupo con 1 x 10^6 células inyectadas por ratón, y otro grupo con 3 x 10^6 células; a su vez, esos dos grupos se subdividieron cuando los tumores alcanzaron el tamaño apropiado como se detalla a continuación en 3 subgrupos de 6 ratones cada uno, diferenciando los subgrupos control (sin tratamiento), tratado con 20 mg/kg de Gemcitabina y tratado con 50 mg/kg de Gemcitabina.

En primer lugar, los ratones se durmieron en una cámara de inducción empleando isofluorano al 4-5%, mientras que para el mantenimiento de la anestesia se empleó una máscara para roedor con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

isofluorano al 1-2%. Los ratones se inyectaron con 200 µl de las células CFPAC-1 resuspendidas en PBS (1:1 matrigel) en el flanco derecho, empleando una aguja de 30G. Para hacer el seguimiento de la evolución y crecimiento del tumor, se evaluaron los signos clínicos, se pesaron los ratones y se midieron los tumores empleando un calibre digital dos veces a la semana. La medida de los tumores se realizó midiendo el ancho y el largo del tumor y luego se calculó el volumen usando la fórmula $(L \times W^2)/2$, donde L es el largo del tumor, y W es el ancho del tumor.

Cuando los tumores alcanzaron 100 mm^3, se realizaron los subgrupos de tratamiento (control sin tratar, Gemcitabina 20 mg/kg y Gemcitabina 50 mg/kg) distribuyendo los ratones haciendo grupos con una media de tamaño tumoral semejante, y descartando los animales fuera de la media ± la desviación calculada; se añadió un grupo más de tratamiento en el grupo inyectado con 1×10^6 células, donde se testó 10 mg/kg de Gemcitabina. Los grupos se trataron durante 4 semanas, realizando un tratamiento a la semana, inyectando la Gemcitabina intraperitoneal y monitorizando el crecimiento del tumor y el estado de los ratones como se detalló anteriormente: pesaje, evaluación de signos clínicos y medida de los tumores dos veces por semana. En cualquier caso, si algún tumor alcanzó el tamaño de 1000 mm^3 o si tras la evaluación del estado de los animales presentaron síntomas de dolor o sufrimiento fueron eutanasiados.

Tras las 4 semanas de tratamientos, se sacrificaron los ratones empleando una cámara de CO_2 y se tomaron muestras de los tumores de cada uno de los grupos y subgrupos realizados para realizar extractos proteicos y determinar si se mantiene la expresión de NPL-1. Para ello, se tomaron muestras de los tumores, empleando material quirúrgico, y se almacenaron a – 80 º C hasta su procesamiento.

5.5.3 Estudio de eficacia antitumoral en un modelo subcutáneo de páncreas.

El estudio de eficacia antitumoral se desarrolló en ratones hembra desnudos de la cepa Rj:NMRI-Foxn1 nu/nu (Janvier Labs), de edades comprendidas entre 6-8 semanas. Se mantuvieron en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*, específico libre de patógenos) con unas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

condiciones controladas de fotoperiodo (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), temperatura (20-24 º C) y con agua y comida *ad libitum.*

En primer lugar, los ratones se durmieron en una cámara de inducción empleando isofluorano al 4-5%, mientras que para el mantenimiento de la anestesia se empleó una máscara para roedor con isofluorano al 1-2%. Para el desarrollo del tumor se inyectaron en el flanco derecho 3 x 10^6 células CFPAC-1 en 200 µl de PBS (1:1 matrigel), empleando una aguja de 30G. Para hacer el seguimiento de la evolución y crecimiento del tumor, se evaluaron los signos clínicos, se pesaron los ratones y se midieron los tumores empleando un calibre digital 2-3 veces a la semana. La medida de los tumores se realizó midiendo el ancho y el largo del tumor y luego se calculó el volumen usando la fórmula $(L \times W^2)/2$, donde L es el largo del tumor, y W es el ancho del tumor. Cuando los tumores alcanzaron los 100 mm^3, se realizaron los cinco grupos de tratamiento del ensayo de eficacia (considerando día 0 del ensayo el comienzo de los tratamientos), distribuyendo los ratones haciendo grupos con una media de tamaño tumoral semejante y descartando los animales fuera de la media ± la desviación calculada, empleando 8 animales por grupo:

- Grupo 1: Control sin tratar
- Grupo 2: Gemcitabina 10 mg/kg
- Grupo 3: NCs cargadas con el blanco del anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} 10 mg/kg
- Grupo 4: NCs cargadas con el anticuerpo monoclonalantiKRAS^{G12V} 10 mg/kg
- Grupo 5: NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} 10 mg/kg + Gemcitabina 10 mg/kg

Los grupos se trataron durante 3 semanas, empleando las siguientes pautas:

- Gemcitabina (10 mg/kg): 1 vez/semana, administración intraperitoneal en un volumen de 100 µl.
- NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} o las NCs cargadas con el blanco del anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} (10 mg/kg): 2 veces/semana, administración intravenosa en un volumen de 100 µl.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Durante todo el transcurso del ensayo, se fue monitorizando el crecimiento del tumor midiéndolo con un calibre digital y el estado de los ratones, valorando su peso y evaluando los signos clínicos 2-3 veces por semana. En cualquier caso, si algún tumor alcanzó el tamaño de 1000 mm^3 o tras la evaluación del estado de los animales presentaron criterios de punto final fueron eutanasiados.
Tras las 3 semanas de tratamientos, se sacrificaron los ratones empleando una cámara de CO_2 y se tomaron muestras de los tumores de cada uno de los grupos.

5.5.4 Estudio de eficacia antitumoral en un modelo ortotópico de pulmón

El modelo tumoral se desarrolló como está descrito[183], empleando ratones hembra desnudos de la cepa Rj:NMRI-Foxn1 nu/nu (Janvier Labs), de edades comprendidas entre 6-8 semanas. Se mantuvieron en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*, específico libre de patógenos) con unas condiciones controladas de fotoperiodo (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), temperatura (20-24 º C) y con agua y comida *ad libitum.*

Para implantar el tumor en el pulmón de los ratones, se emplearon células A549-Luc (que expresan la enzima luciferasa, por lo que, al inyectar luciferina, se produce una señal luminiscente y así podemos monitorizar el crecimiento del tumor). En primer lugar, los ratones se durmieron en una cámara de inducción empleando isofluorano al 4-5%, mientras que para el mantenimiento de la anestesia se empleó una máscara para roedor con isofluorano al 1-2%. A continuación, se inyectaron 1 x 10^6 células tumorales A549-Luc resuspendidas en PBS (2 % FBS) con una jeringa de 30G en el espacio intercostal en el pulmón izquierdo. A diferentes tiempos, se inyectó luciferina (150 mg/kg por ratón) vía intraperitoneal, aproximadamente 5 minutos antes de tomar las imágenes de la luminiscencia emitida por los tumores. Las imágenes se adquirieron empleando un IVIS® *Spectrum*, monitorizando de esta forma el crecimiento del tumor primario y su diseminación de una forma semi-cuantitativa. A día 13 los tumores estaban completamente desarrollados y en algunos casos se comenzó a detectar la diseminación de las células tumorales, por lo que se establecieron los grupos de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tratamiento (considerando el inicio de tratamientos como día 0 del experimento), distribuyendo los ratones haciendo grupos con una media de luminicencia semejante y descartando los animales fuera de la media ± la desviación calculada, realizando cinco grupos con unos 6-7 ratones por grupo, descartando los que el crecimiento del tumor no había sido exponencial o la inyección de células tumorales había sido incorrecta (fuera del pulmón):

- Grupo 1: Control sin tratar
- Grupo 2: NCs ARNsi-KRAS- tLyP1 (2mg/kg)
- Grupo 3: Docetaxel (5 mg/kg)
- Grupo 4: NCs ARNsi-KRAS- tLyP1 (2mg/kg) + Docetaxel (5 mg/kg)
- Grupo 5: NCs ARNsi-KRAS (2mg/kg) + Docetaxel (5 mg/kg)

Los diferentes grupos se trataron durante 3 semanas, empleando las siguientes pautas:

- Docetaxel (5 mg/kg): 1 vez/semana, administración intravenosa en un volumen de 50 µl.
- NCs ARNsi-KRAS- tLyP1 o NCs ARNsi-KRAS (2mg/kg): 2 veces/semana, administración intravenosa en un volumen de 50 µl.
- Los grupos en los que se realizó tratamiento combinado de NCs ARN-si + Docetaxel, se mezclaron 50 µl de NCs + 50 µl de Docetaxel y se realizó la administración intravenosa en un volumen final de 100 µl.

Durante las tres semanas que duraron los tratamientos, se fue monitorizando el estado de los ratones, así como el crecimiento de los tumores, haciendo medidas en el IVIS® *Spectrum*. En cualquier caso, si tras la evaluación del estado de los animales presentaron criterios de punto final fueron eutanasiados. Tras las 3 semanas de tratamientos, se sacrificaron los ratones empleando una cámara de CO_2 y se tomaron muestras de los tumores de cada uno de los grupos y se extrajeron extractos de proteínas de las muestras del tejido tumoral (pulmón izquierdo) para ver expresión de KRAS por *western blot*, como ya se ha descrito en el anterior apartado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software *GraphPad Prism* versión 6.01 (*GrahPad Software*, Inc., La Jolla,USA). Las diferencias fueron consideradas significativas para *p<0.05, **p< 0.01 y muy significativas para *** p < 0.001. Los resultados se expresaron como la media ± la desviación estándar (SD).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6 RESULTADOS

En este trabajo se ha realizado una evaluación biológica de tres terapias innovadoras en el tratamiento del cáncer. En primer lugar, se ha estudiado el papel de los AQCs-Ag5 en diferentes modelos generados de resistencia a CDDP *in vitro*, investigando su uso como una alternativa interesante en los casos donde la terapia convencional no responde.

En segundo lugar, se ha evaluado la inmunoterapia con el anticuerpo monoclonal terapéutico SRB1 frente a la diana tumoral CCR9 como una potencial estrategia en el cáncer de páncreas, analizando su capacidad de generar ADCC *in vitro*.

Por último, se han empleado diferentes nanosistemas portadores de anticuerpos monoclonales o ARNsi para testar *in vivo* su capacidad alcanzar mutaciones de la proteína RAS, una de las mutaciones más frecuentes en numerosos tipos de cáncer asociada a un mal pronóstico en la clínica.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1 EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS AQCS-AG5 EN LOS MODELOS DE RESISTENCIA A CDDP

6.1.1 Desarrollo y caracterización de los modelos de resistencia a CDDP.

Las terapias basadas en platino, y más concretamente el CDDP, se emplean en numerosos tipos de tumores sólidos, como pulmón, ovario, colon, vejiga…y a pesar de una buena respuesta inicial, en muchos casos se acaba generando resistencia al fármaco por múltiples procesos que pueden estar involucrados [44]. En este trabajo, en colaboración con el grupo de Fernando Domínguez, se evaluó la acción de los AQCs-Ag5 en modelos de resistencia a CDDP, solos y en terapia combinada con CDDP, así como su mecanismo de acción. Para ello se generaron modelos de resistencia siguiendo diferentes aproximaciones en base a lo que está descrito.

Dado que los efectos de los AQCs-Ag5, así como del CDDP son diferentes dependiendo de si las células proliferan o están paradas, es importante señalar que en los controles se ha tenido en cuenta el efecto que los tratamientos tienen sobre el ciclo celular.

6.1.1.1 Células que generan resistencia al fármaco por sobreexposición al mismo.

Las células A2780-cis se adquirieron de forma comercial, y su resistencia a CDDP se generó como está descrito, sometiendo las células a continua exposición al fármaco en el tiempo, seleccionando sólo los clones resistentes[205]. Se mantuvo su resistencia añadiendo CDDP 1 μM a las placas de mantenimiento cada 3 pases celulares. La línea A2780 WT se empleó como línea parental sensible al CDDP.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

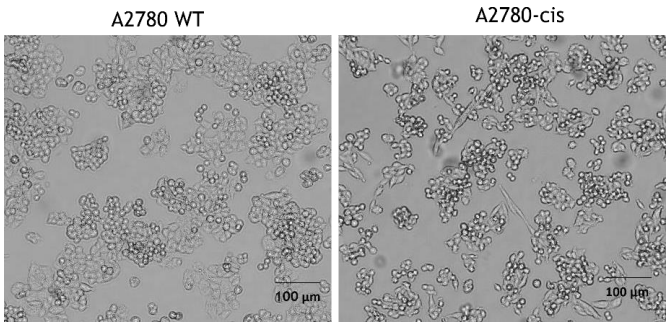


Figura 17. Morfología de las líneas A2780 WT y A2780-cis. Células visualizadas bajo una magnificación de 10X. Las células sensibles a CDDP (A2780 WT) tienen una morfología redonda y crecen como clústeres de células cohesionadas. Las células resistentes a CDDP (A2780-cis) presentan una apariencia más alargada y menor contacto intercelular.

6.1.1.2 Células senescentes.

Es bien conocido que las células senescentes contribuyen a la quimiorresistencia a diversos tipos de tratamientos, entre ellos el CDDP[190]. Por ello, se empleó la línea A549 tratada con bleomicina como modelo de resistencia al CDDP.

Las células senescentes se generaron como está descrito[206], tratándolas durante 5 días con el antibiótico inductor de senescencia, bleomicina 35 µM, empleando como control células de esa misma línea sin el tratamiento (Fig. 18A). Se comprobó la inducción de células senescentes mediante la tinción β-galactosidasa, cuya actividad está incrementada en estas células y es un marcador característico para definir el estado senescente[207], además de poder verse una morfología más grande y aplanada a simple vista (Fig. 18B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

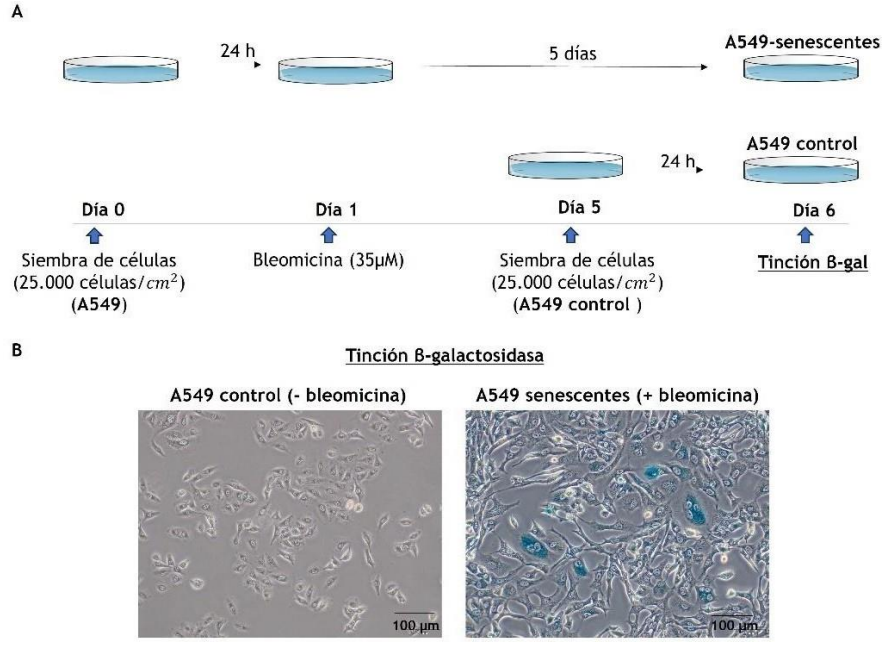


Figura 18. Las células A549 se trataron con bleomicina 35 μM durante 5 días para inducir senescencia (**A**), lo cual se comprobó realizando la tinción β-galactosidasa (**B**), donde se puede apreciar un color azulado, debido al incremento de la actividad β-galactosidasa, así como un cambio en la morfología, con células con una apariencia más "aplanada", núcleos agrandados y a menudo de forma irregular y abundantes granularidades citoplasmáticas. Células visualizadas bajo una magnificación de 10X. Figura de creación propia.

6.1.1.3 Células inducidas al proceso de EMT.

Otro mecanismo celular relacionado con la resistencia al CDDP es la transición epitelio-mesénquima (EMT), contribuyendo significativamente a la quimiorresistencia al convertir las células epiteliales inmóviles en células mesenquimales móviles y alterar la adhesión célula-célula promoviendo la invasión de células tumorales[69]. La EMT se generó como está descrito[193] en células H358, que fueron tratada durante 48 horas con TGF-β 100 pM en DMEM 0,5% FBS, empleando como control la misma línea sin tratamiento en DMEM 0,5% FBS (Fig. 19A). Se comprobó la inducción de EMT, por los cambios morfológicos observados al microscopio, presentando una morfología más alargada (Fig. 19B), así como por los marcadores observador por *western blot*, pudiéndose apreciar un incremento

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

considerable de vimentina, mientras que otros marcadores, como E-cadherina no parecieron presentar cambios apreciables (Fig. 19C).

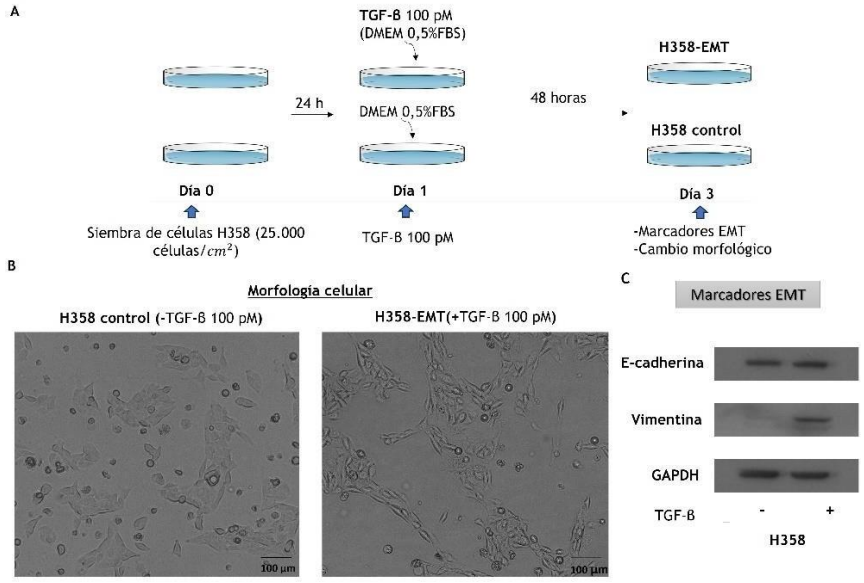


Figura 19. Las células H358 se trataron durante 48 horas con TGF-ß 100 pM para inducir el proceso de EMT (**A**), lo cual se comprobó tanto por el cambio morfológico observado al microscopio, donde se aprecia un aspecto más alargado en las H358-EMT en comparación con su control sin TGF-ß (**B**), tanto por los marcadores observados por *western blot*, donde se aprecia un incremento considerable de vimentina, mientras que E-cadherina no parece presentar cambios apreciables (**C**). Figura de creación propia.

6.1.1.4 Efecto citotóxico del CDDP sobre los modelos de resistencia generados.

Una vez desarrollados los modelos de estudio, se comprobó que efectivamente fueran más resistentes a CDDP. Para la evaluación de la citotoxicidad celular, se realizaron curvas dosis-respuesta empleando diferentes concentraciones de CDDP y se calcularon las IC_{50}, definida por la FDA como la concentración de un fármaco que se requiere in vitro para una inhibición del crecimiento celular del 50 %.

Como cabía esperar, en todos los casos, las líneas generadas fueron significativamente más resistentes a la acción del CDDP (Fig. 20), donde las IC_{50} fueron (en términos µM) 23,69 ± 2,55 en las A549 frente a 101,23 ± 12,09 en las A549-senescentes, 13,66 ± 0,52 en las A2780-WT frente a 41,66 ± 1,74 en las A2780-cis y 124,38 ± 11,02 en las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

H358 frente a 256,10 ± 13,73 en las H358-EMT cuyas IC_{50} quedan resumidas en la Tabla 3.

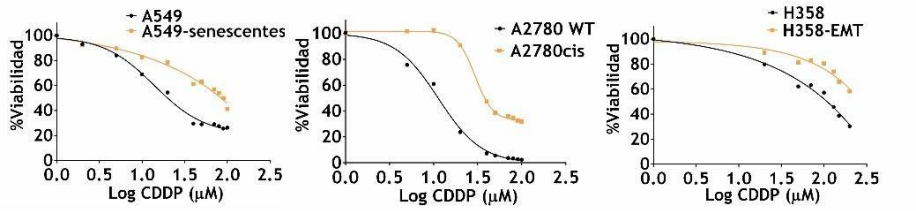


Figura 20. Curva dosis-respuesta de los modelos de resistencia frente a su línea parental al CDDP. Las células senescentes (**A**), las H358-EMT (**B**), así como las A2780-cis (**C**) presentan una mayor resistencia al tratamiento con CDDP. Las células fueron tratadas durante 24 horas con CDDP a diferentes dosis y se midió la viabilidad celular por el ensayo del MTT. Las gráficas son representativas del comportamiento de 3 experimentos independientes.

IC_{50} CDDP (μM)	Línea sensible	Línea resistente	Mann-Whitney test (p valor)
A549	23,69 ± 2,55	101,23 ± 12,09	*** p < 0.001
A2780	13,66 ± 0,52	41,66 ± 1,74	*** p < 0.001
H358	124,38 ± 11,02	256,10 ± 13,73	*** p < 0.001

Tabla 3. Valores de IC_{50} de los modelos de resistencia frente a su línea parental al CDDP. Se muestra la media de 3 experimentos independientes obtenidos a partir de los datos de las curvas dosis-respuestas al fármaco. Las células H358 resultaron ser las más resistentes a la acción del CDDP. Valores obtenidos con el programa de *GraphPad Prism*.

Una vez que se caracterizaron los modelos de resistencia y se comprobó que efectivamente fueran más resistentes a la acción del CDDP, quisimos ver el efecto de los AQCs-Ag5 sobre los mismos.

6.1.1.5 Efecto citotóxico de los AQCs-Ag5 sobre los modelos de resistencia generados.

Se estudió a continuación el efecto que los AQCs-Ag5 tenía sobre las diferentes líneas resistentes. Para evaluar la citotoxicidad celular, se empleó el mismo procedimiento que con el CDDP. Cabe destacar que la síntesis de los AQCs-Ag5 está aún siendo optimizada, dado que se trata de un compuesto novedoso, por lo que se pueden obtener variaciones de la IC_{50} entre experimentos dependiendo del lote de AQCs-Ag5 con el que se trabaje.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las líneas resistentes fueron significativamente más resistentes a la acción de los AQCs-Ag5 (Fig. 21), donde las IC_{50} fueron (en términos μM) 1,04 ± 0,17 en las A549 frente a 1,74 ± 0,25 en las A549-senescentes, 0,33 ± 0,03 en las A2780-WT frente a 0,61 ± 0,05 en las A2780-cis y 0,91 ± 0,07 en las H358 frente a 1,28 ± 0,18 en las H358-EMT (cuyas IC_{50} quedan resumidas en la Tabla 4).

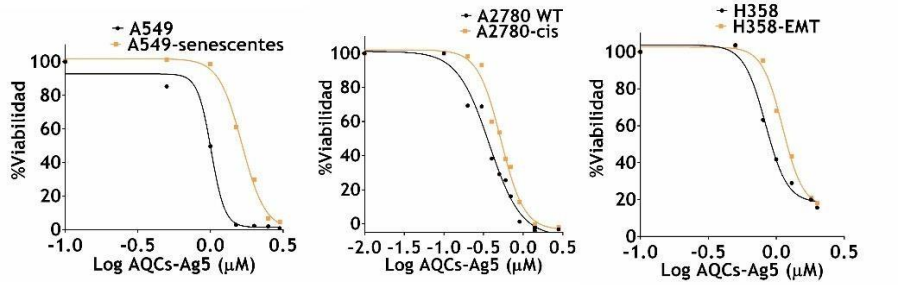


Figura 21. Curva dosis-respuesta de los modelos de resistencia frente a su línea parental a los AQCs-Ag5. Las células senescentes (**A**), las H358-EMT (**B**), así como las A2780-cis (**C**) presentan una mayor resistencia al tratamiento con los AQCs-Ag5. Las células fueron tratadas durante 24 horas con los AQCs-Ag5 a diferentes dosis y semidió la viabilidad celular por el ensayo del MTT. Las gráficas son representativas del comportamiento de 3 experimentos independientes.

En términos molares, los AQCs-Ag5 son al menos 20 veces más activos que el CDDP en todas las situaciones estudiadas. La línea más resistente a la acción de los AQCs-Ag5 fueron las células senescentes, con una IC_{50} de 1,74 μM, seguida de la línea H358-EMT, con una IC_{50} de 1,28 μM.

IC_{50} AQCs-Ag5 (μM)	Línea sensible	Línea resistente	Mann-Whitney test (p valor)
A549	1,04 ± 0,17	1,74 ± 0,25	*** p < 0.001
A2780	0,33 ± 0,03	0,61 ± 0,05	*** p < 0.001
H358	0,91 ± 0,07	1,28 ± 0,18	* p < 0.05

Tabla 4. Valores de IC_{50} de los modelos de resistencia frente a su línea parental a los AQCs-Ag5. Se muestran los resultados obtenidos a partir de los datos de las curvas dosis-respuestas al fármaco. Las células A549-senescentes resultaron ser las más resistentes. Valores obtenidos con el programa de *GraphPad Prism*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1.1.6 Determinación de los niveles de ROS, GSH y PRDX3 en los modelos de resistencia generados.

Dado que existen determinados parámetros que pueden variar la sensibilidad de las diferentes líneas al tratamiento con AQCs-Ag5 o al CDDP, quisimos determinar los niveles basales de ROS, GSH y PRDX3 para estudiar su correlación con la sensibilidad.

En primer lugar, se midieron los niveles de ROS. Para ello se empleó la sonda MitoSOX, que nos permite detectar el superóxido (O_2-) mitocondrial de células vivas ya que su oxidación produce una fluorescencia roja que se puede monitorizar por citometría de flujo. Para ello, se generaron los diferentes modelos de resistencia y se sembraron las diferentes líneas en placas de 12 pocillos, dejando que se adhirieran a la placa durante 24 horas, tras lo cual se tiñeron con MitoSOX y se pasaron por el citómetro (Figura 22). Las células A549-senescentes presentaron los niveles más elevados de ROS (182,40 ± 48,60), que fueron significativamente más elevados que los de su línea sensible A549 (23,78 ± 5,41), seguidos de los de la línea H358 y H358-EMT, que no presentaron diferencias, cuyos valores fueron respectivamente 90,47 ± 26,50 y 114,52± 45,27. Las células A2780 WT presentaron mayores niveles de ROS (71,10 ± 12,97) en comparación con su línea resistente A2780-cis (16,91 ± 7,97).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

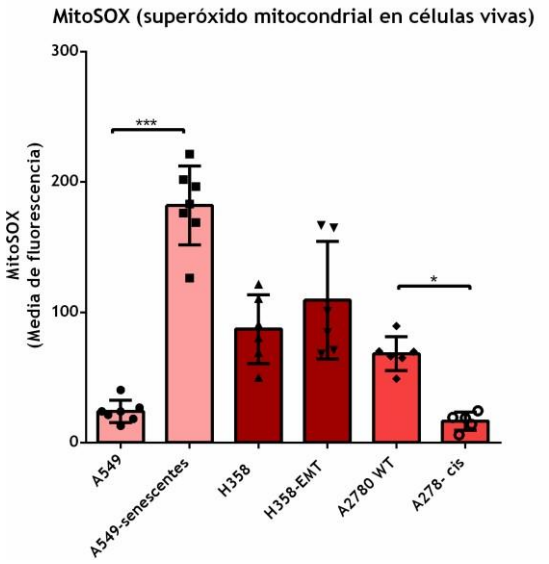


Figura 22. Determinación de los niveles basales de ROS en las líneas sensibles (A549, H358 y A2780 WT) y resistentes (A549-senesecntes, H358-EMT y A2780-cis) a CDDP. Los niveles de ROS mitocondriales se determinaron por la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo al teñir las células con la sonda MitoSOX. Se compararon las diferencias entre las líneas resistentes y sus correspondientes líneas sensibles. Las células que presentaron mayores niveles de ROS mitocondriales fueron las células A549-senescentes (182,40 ± 48,60), que fueron significativamente más altos que los de su línea sensible A549 (23,78 ± 5,41). No existieron diferencias en los niveles de ROS entre H358 (90,47 ± 26,50) y H358-EMT (114,52± 45,27), mientras que las células A2780 WT presentaron mayores niveles de ROS (71,10 ± 12,97) en comparación con su línea resistente A2780-cis (16,91 ± 7,97). Los datos representan la media ± SD de al menos 4 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Cabría esperar que las líneas más sensibles a la acción de los AQCs-Ag5 serían las que mayores niveles de ROS presentaron. En ese sentido, los niveles de ROS de A2780 WT correlacionan con su mayor sensibilidad a los AQCs-5 que su correspondiente línea resistente A2780-cis. Sin embargo, no ocurre lo mismo en todos los casos. La línea con niveles más altos de ROS fueron las A549-senescentes, lo cual encaja con una de las características principales asociadas a la senescencia que contribuyen a la degeneración tisular relacionada con la edad junto con los elevados niveles de SASP (fenotipo secretor

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

asociado a la senescencia)[208]. Además, las células H358 y H358-EMT presentaron en segundo lugar los niveles más elevados, lo cual no sorprende tampoco dado que está ampliamente descrito que niveles altos de ROS desencadenan el proceso de EMT[209,210]. Sin embargo, esto no correlaciona con la sensibilidad a los AQCs-Ag5, dado que, por el contrario, son las células más resistentes al efecto de los AQCs-Ag5 (Tabla 4), por lo que no podemos concluir que el mecanismo de acción sea tan sencillo. De esta manera, con esta aproximación inicial no podemos establecer que el mecanismo de muerte desencadenado por los AQCs-Ag5 sólo esté relacionado con los niveles de ROS celulares, por lo que se estudian otras vías que podrían estar implicadas en los siguientes apartados.

En segundo lugar, se midieron los niveles de GSH, que es una proteína que en las células puede existir en dos formas diferentes, una forma reducida (GSH) y otra oxidada (GSSG), aunque bajo condiciones fisiológicas, más del 98% del glutatión intracelular es GSH, dado que el GSSG es rápidamente reducido a GSH por la glutatión reductasa, por lo que su función principal es el mantenimiento de la homeostasis redox[194]. Esta función de la GSH depende principalmente de la reactividad de su grupo tiol; los tioles pueden unirse a metales, alquilarse a tioéteres, pero también pueden oxidarse a disulfuros. En el caso del glutatión, dos moléculas de GSH reducido pueden oxidarse para formar disulfuro de glutatión (GSSG), que volvería a su forma reducida gracias a la glutatión reductasa (GR) que emplea como cofactor NADPH. Al estar presente en concentraciones milimolares en la mayoría de los organismos, la GSH se conoce como el "tampón redox" de la célula, y su disminución o pérdida puede provocar una alteración de la homeostasis redox, como en el caso de las GPx, con efectos como la muerte celular por ferroptosis inducido por la falta de actividad de GPx4[211,212].

Además, se conoce que una de las vías por las que se puede producir resistencia a CDDP es mediante la detoxificación del fármaco, dado que GSH se une al CDDP y evita que cause el daño en el ADN para inducir la muerte celular[56]. Por todas estas implicaciones de la GSH se estudiaron los niveles basales en las diferentes líneas celulares. Los niveles de GSH, fueron en valores absolutos de absorbancia, 0,09 ± 0,01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en las células A549, 0,08 ± 0,01 en las células A549-senescentes, 0,08 ± 0,01 en las H358, 0,09 ± 0,01 en las H358-EMT, 0,03 ± 0,01 en las A2780-WT y 0,04 ± 0,01 en las A2780-cis. Como se muestra en la figura 23, las líneas A549, A549-senescentes, H358 y H358-EMT presentaron niveles más elevados de GSH que las líneas A2780 WT y A2780-cis. Además, es de resaltar que la inducción de EMT se acompaña de un incremento de GSH respecto a su línea sensible.

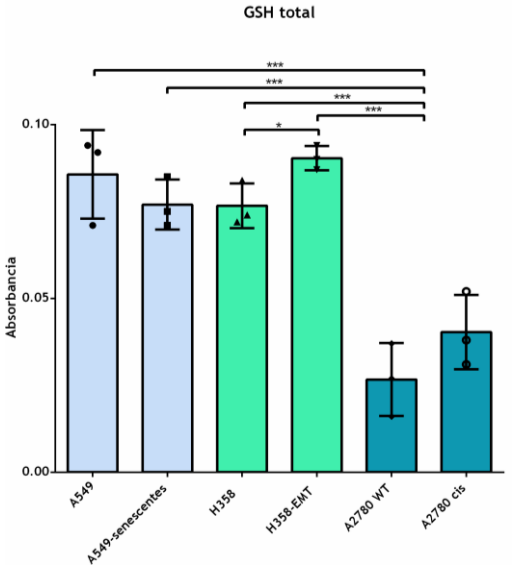


Figura 23. Niveles basales de GSH total en las líneas sensibles (A549, H358 y A2780 WT) y resistentes (A549-senesecntes, H358-EMT y A2780-cis) a CDDP. Los niveles totales de GSH se midieron empleando un ensayo colorimétrico recogiendo las medidas de absorbancia con un espectrofotómetro. Se compararon los niveles de GSH entre todas las líneas. Las líneas A549 (0,09 ± 0,01), senescentes (0,08 ± 0,01), H358 (0,08 ± 0,01) y H358-EMT (0,09 ± 0,01) presentaron niveles más elevados de GSH que las A2780 WT (0,03 ± 0,01) y las A2780-cis (0,04 ± 0,01). Además, la inducción de EMT incrementa los niveles de GSH respecto a su línea sensible. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

En base a estos resultados podemos concluir que, en primer lugar, los niveles altos de GSH sí que podrían tener relación con la resistencia a CDDP y AQCs-Ag5 en el caso de la inducción de EMT, pero no si comparamos entre el resto de las líneas sensibles y resistentes. Además,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

hay una correlación entre los niveles más altos de GSH en las líneas A549 y H358 con su mayor resistencia a la acción de los AQCs-Ag5 y del CDDP, en comparación con las A2780 que son mucho más sensibles y que presentan niveles considerablemente más bajos.

Por último, se midieron los niveles de PRDX3, dado que, al igual que la GSH, cabría esperar que mayores niveles de PRDX3 estarían asociados a menor sensibilidad a los AQCs-Ag5 y además está asociada en algunos casos a quimiorresistencia con CDDP[97]. Para ello, se recogieron extractos proteicos para *western blot* de las diferentes líneas celulares y se estudió la expresión basal de PRDX3 y del factor de transcripción Nrf2, que promueve la expresión de PRDX3 entre otras proteínas antioxidantes como se describe en la Fig.24.

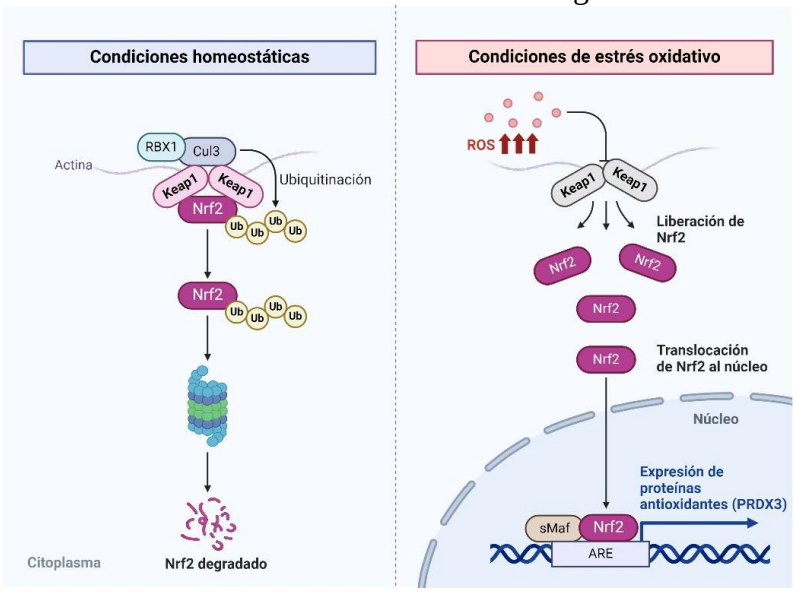


Figura 24. Regulación de la vía Nrf2 en células tumorales. Bajo condiciones de ausencia de estrés oxidativo (niveles bajos de ROS), Nrf2 se mantiene en niveles bajos mediante la actividad del proteosoma, siendo secuestrado por Keap1 en el citosol, lo que produce la ubiquitinación mediante la formación del complejo Keap1-Cul3-Rbx1, que induce la degradación proteasomal de Nrf2. Por el contrario, en presencia de niveles elevados de ROS, Nrf2 se libera de la unión de Keap1, se transloca al núcleo y se une a secuencias del gen ARE, lo que permite la activación de genes antioxidantes como PRDX3. Imagen creada con BioRender.com.

Mientras que no se observaron diferencias apreciables de Nrf2, las líneas A2780-cis y A549-senescentes presentaron niveles más elevados

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de PRDX3 respecto a sus líneas sensibles, mientras que en la línea H358 no presentó cambios significativos en ninguno de los casos (Fig. 25)

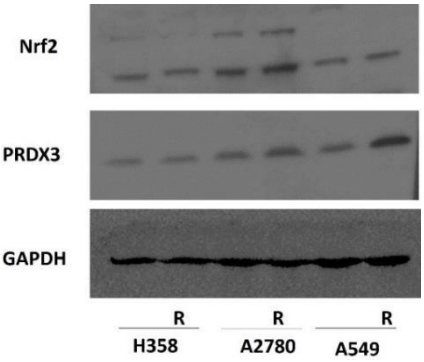


Figura 25. Expresión de Nrf2 y PRDX3 en los modelos de resistencia a CDDP. Se recogieron extractos de las líneas resistentes (R) y sensibles y se estudió la expresión de PRDX3 y Nrf2. Mientras que en Nrf2 no se apreciaron cambios aparentes en ningún caso, las líneas resistentes (R) A2780-cis y A549-senescentes presentaron niveles de PRDX3 más elevados que sus respectivas líneas sensibles, mientras que la línea H358 no presentó ningún cambio.

En base a estos resultados podemos concluir que, los niveles altos de PRDX3 sí que podrían tener relación con la resistencia a CDDP y AQCs-Ag5 en el caso de las células A2780-cis y A549-senescentes, mientras que la resistencia a ambos tratamientos en el caso de las H358-EMT no es por esta vía.

6.1.1.7 La terapia combinada de AQCs-Ag5 + CDDP incrementa la mortalidad de las células tumorales resistentes al CDDP.

Se estudió a continuación si el tratamiento con los AQCs-Ag5 podría ser una herramienta terapéutica eficaz en los casos donde las células han desarrollado resistencia al cisplatino. Para determinar la capacidad de los AQCs-Ag5 de sensibilizar las células tumorales resistentes se emplearon dosis subletales por encima de la IC_{50} de ambos compuestos, para evitar una excesiva mortalidad de cualquiera de ellos. Se realizó un pretratamiento con los AQCs-Ag5 durante 1h en medio sin FBS y después se trató con el CDDP en medio completo durante 24h y se determinó la citotoxicidad de la terapia combinada mediante el ensayo del MTT.

En un primer estudio, se midió la viabilidad de las células A2780 WT y A2780-cis, pretratando las células con dos dosis diferentes de AQCs-Ag5 (0,28 µM y 0,37 µM) y posteriormente con dos dosis diferentes de CDDP (5 µM y 10 µM para la línea sensible A2780 WT y 10 µM y 20 µM para la línea resistente A2780-cis) (Fig.26).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

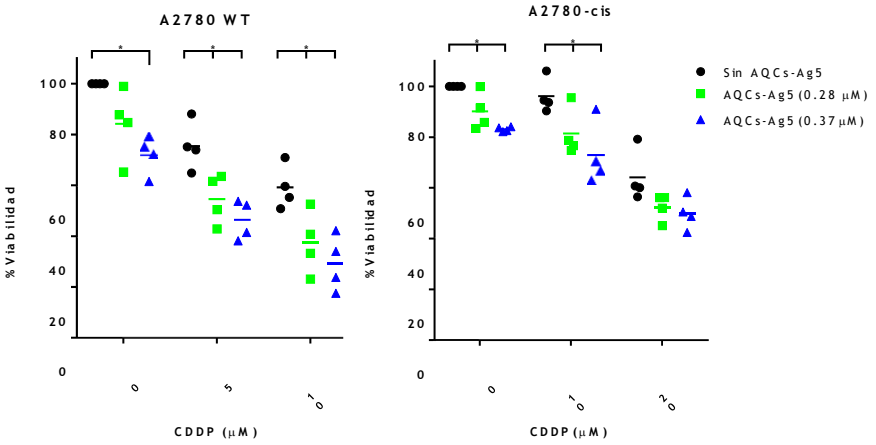


Figura 26. Tratamiento combinado de AQCs-Ag5 + CDDP en las líneas A2780 WT y A2780-cis. Ambas líneas se pretrataron durante 1 hora con dos dosis de AQCs-Ag5 (0,28 y 0,37 µM) y posteriormente durante 24 horas con dos dosis de CDDP: 5 y 10 µM para la línea sensible A2780 WT y 10 y 20 µM para la línea resistente A2780-cis. La línea A2780 WT presenta un incremento significativo de la mortalidad con todas las dosis probadas, mientras que la línea resistente A2780-cis sólo presenta un incremento significativo al combinar las dos dosis de AQCs-Ag5 con 10 µM de CDDP. Los datos representan la media ± SD de 4 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

El pretratamiento con AQCs-Ag5 sensibilizó a la línea A2780 WT al tratamiento con CDDP con todas las concentraciones probadas, mientras que la línea resistente, a la máxima dosis de CDDP probado los AQCs-Ag5 no sensibilizaron las células al tratamiento. El efecto es dosis dependiente, ya que incrementando la dosis de AQCs-Ag5, aumenta el efecto de la misma dosis de CDDP. Como cabía esperar, la línea A2780-cis presentó mayor resistencia a la terapia combinada, ya que con las mismas dosis de tratamiento de AQCs-Ag5, pero mayor concentración de CDDP, la mortalidad en todos los casos fue menor que en la línea sensible. Por tanto, se decidió probar en la línea resistente un nuevo abordaje, incrementando la dosis de AQCs-Ag5 (0,45 µM, 0,50 µM y 0,64 µM) pero disminuyendo la concentración de CDDP (5 µM y 10 µM) (Fig. 27), que es lo que se buscaría en la terapia clínica para disminuir los efectos secundarios del CDDP. En este caso, las células A2780-cis fueron más sensibles a la terapia combinada, lo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cual podría ser una gran ventaja en la terapia clínica para disminuir los efectos adversos del fármaco.

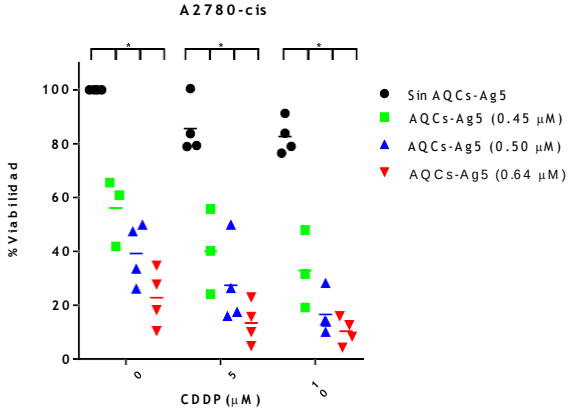


Figura 27. Tratamiento combinado de AQCs-Ag5 + CDDP en la línea resistente a CDDP A2780-cis. Las células se pretrataron durante 1 hora con tres dosis diferentes de AQCs-Ag5 (0,45 y 0,50 y 0,64 µM) y posteriormente durante 24 horas con dos dosis diferentes de CDDP: 5 y 10 µM. Con menos dosis de CDDP, pero incrementado la dosis de AQCs-Ag5 se consigue un incremento significativo de la mortalidad celular en todos los casos. Los datos representan la media ± SD de 4 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

En segundo lugar, se estudió si la terapia combinada sensibilizaba las células resistentes senescentes. Las células se pretrataron con tres dosis de AQCs-Ag5 (1,0 µM, 1,2 µM y 1,4 µM) y posteriormente con dos dosis diferentes de CDDP (80 µM y 100 µM) como se muestra en la Fig. 28, los AQCs-Ag5 no incrementaron el efecto del CDDP, por lo que la terapia combinada no incrementó la sensibilidad en las condiciones empleadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

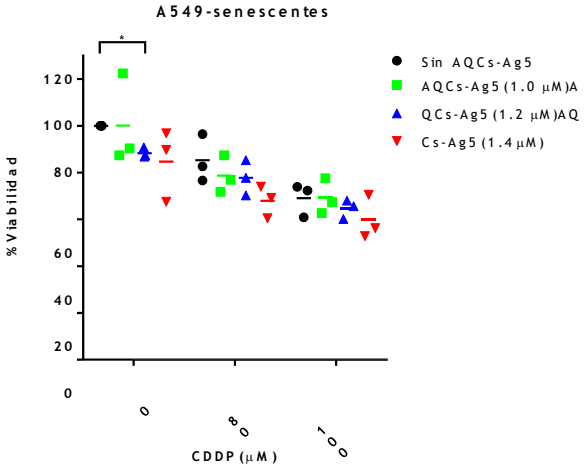


Figura 28. Tratamiento combinado de AQCs-Ag5 + CDDP en la línea resistente a CDDP A549-senescentes. Las células se pretrataron durante 1 hora con tres dosis diferentes de AQCs-Ag5 (1,0 y 1,2 y 1,4 µM) y posteriormente durante 24 horas con dos dosis diferentes de CDDP: 80 y 100 µM. La terapia combinada no aumentó la sensibilidad de las células senescentes en las condiciones empleadas. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Se probó, al igual que con las A2780-cis, a incrementar la dosis de AQCs-Ag5 (1,4 µM, 2,0 µM y 2.5 µM), pero disminuyendo la concentración de CDDP a concentraciones muy por debajo de la IC_{50} (20 µM y 50 µM). Como se observa en este caso, el efecto citotóxico producido viene principalmente por la acción de los AQCs-Ag5, incrementándose la mortalidad en la mayoría de los casos en los que se combinó con CDDP (Fig.29).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

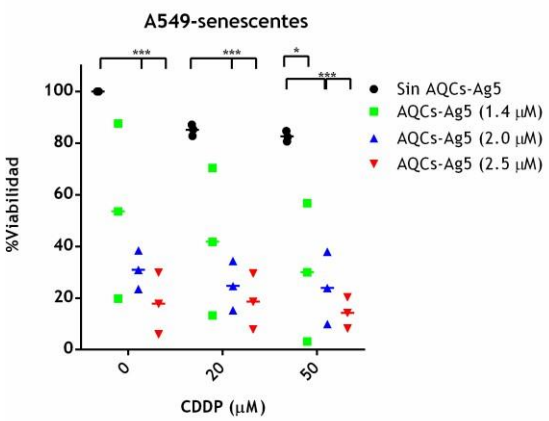


Figura 29. Tratamiento combinado de AQCs-Ag5 + CDDP en la línea resistente a CDDP A549-senescentes. Las células se pretrataron durante 1 hora con tres dosis diferentes de AQCs-Ag5 (1,4 y 2,0 y 2,5 µM) y posteriormente durante 24 horas con dos dosis diferentes de CDDP: 20 y 50 µM. Disminuyendo la dosis de CDDP, pero incrementado la dosis de AQCs-Ag5 se consigue un incremento significativo de la mortalidad celular en la mayoría de los casos. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Por último, se estudió la terapia combinada en las células H358-EMT. Para ello, se pretrataron las células con AQCs-Ag (1,5, 2,0 y 2,5 µM) y posteriormente durante 24 horas con dos dosis diferentes de CDDP: 80 y 100 µM. En este caso, como se observar en la Fig. 30, el efecto citotóxico producido viene principalmente por la acción de los AQCs-Ag5, ya que por sí solo es considerable lo cual es muy interesante dado las limitaciones de tratamientos y su baja sensibilidad al CDDP.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

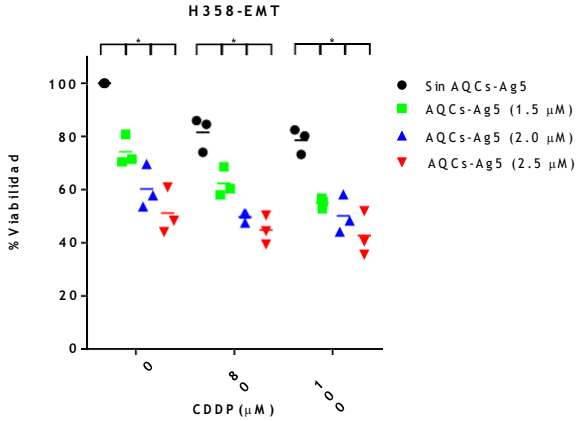


Figura 30. Tratamiento combinado de AQCs-Ag5 + CDDP en la línea resistente a CDDP H358-EMT. Las células se pretrataron durante 1 hora con tres dosis diferentes de AQCs-Ag5 (1,5, 2,0 y 2,5 µM) y posteriormente durante 24 horas con dos dosis diferentes de CDDP: 80 y 100 µM. La mortalidad producida viene principalmente de la acción de los AQCs-Ag5 y en todos los casos de la terapia combinada se produce un incremento significativo de la mortalidad de las células tumorales. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Dados los resultados obtenidos, los AQCs-Ag5 podrían ser una herramienta interesante en los en los casos que las células generan resistencia al cisplatino, sensibilizando las células al tratamiento.

6.1.2 Estudio del daño en el ADN por el tratamiento con AQCs-Ag5 y CDDP en los modelos de resistencia generados.

Dado que el CDDP produce su efecto terapéutico por el daño inducido en el ADN[213], quisimos estudiar el papel de los AQCs-Ag5 en este aspecto. Para ello, se empleó un anticuerpo conjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (conocida como γH2AX), un marcador de daño en el ADN que ocurre en sitios que flanquean las roturas de doble cadena (DSB) y que puede proporcionar una medida del número de DSB dentro de una célula[202] . Las muestras se analizaron por citometría de flujo, empleando como control positivo de daño el agente etopósido[203]. Además, se realizó una co-tinción con yoduro de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

propidio (IP) para conocer la distribución de los ciclos celulares con cada uno de los tratamientos.

En primer lugar, se realizaron tres experimentos independientes para estudiar el daño producido por el CDDP en el ADN y las diferencias entre las líneas sensibles y resistentes.

En un segundo abordaje, se realizaron tres nuevos experimentos en los que se analizó la influencia del tratamiento con AQCs-Ag5 en las diferentes líneas, y, además, se analizaron los perfiles de ciclo para ver su estado con cada tratamiento realizado.

Una imagen representativa de la información obtenida con estos experimentos se muestra en la Fig. 31, donde se analizó el estado del ciclo celular y el daño producido por cada uno de los tratamientos realizados en las diferentes líneas.

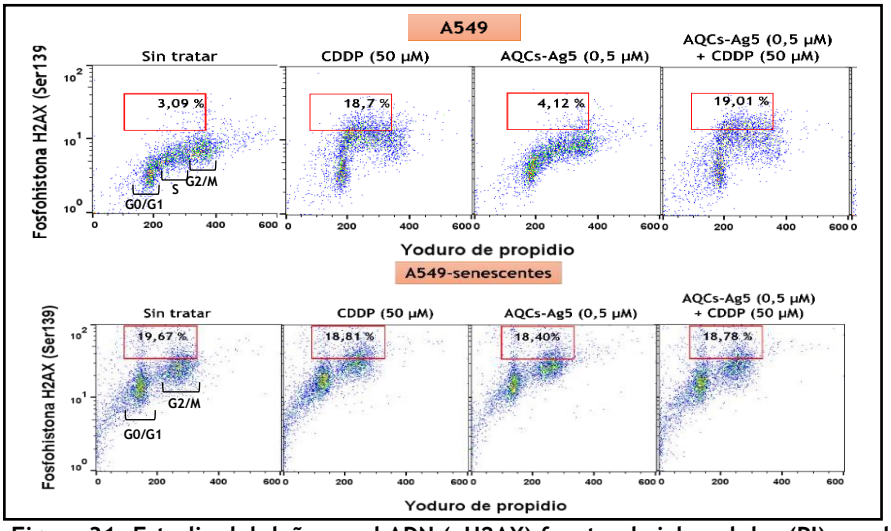


Figura 31. Estudio del daño en el ADN (γH2AX) frente al ciclo celular (PI) en el tratamiento de CDDP y AQCs-Ag5 en las células A549 y A549-senescentes. Las células se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 (0,5 µM) y 4 horas con CDDP (50 µM). Pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (γH2AX) y con PI y se midió la señal fluorescente por citometría. Las células A549 (arriba) en fase S presentaron un daño producido únicamente por el CDDP. Las células senescentes (abajo), tratadas con bleomicina que bloquea la transición G1/S y G2/M[263], presenta un daño inicial que se mantiene inalterable frente a los demás tratamientos. Figura creada con el software FlowJo™: las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

A continuación, se desglosa cada uno de los ensayos realizados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1.2.1 Estudio del daño en el ADN en los modelos de resistencia a CDDP en el tratamiento con CDDP.

Dada la diferencia entre la sensibilidad al tratamiento con CDDP entre las líneas sensibles y resistentes, nos preguntamos si el daño producido en el ADN sería diferente. Para realizar este estudio, se eligieron dos dosis subletales para cada línea: 50 y 80 µM para las A549, A549-senescentes, H358 y H358-EMT y 15 y 40 µM para las A2780 WT y A2780-cis. Se trataron las células durante 4 horas, empleando etopósido 24 µM durante 1 hora como control positivo de daño en el ADN, con el único fin de asegurarnos que la técnica funcionó correctamente, por lo que no se comparó con ninguna de las condiciones de tratamiento.

Las células A549 presentaron un incremento del daño en el ADN con ambas dosis de CDDP, presentando los siguientes valores de daño: 3,10 ± 2,37 en las células sin tratar, 23,20 ± 7,41 en el tratamiento con CDDP a la dosis menor y 23,23 ± 7,35 en el tratamiento con la dosis mayor de CDDP. Su correspondiente línea resistente, las células A549-senescentes, donde ya el control sin tratamiento con CDDP presentaba un daño basal producido por el tratamiento con bleomicina que causa roturas en la doble hélice de ADN [214], no presentó un incremento del daño con ninguna de las condiciones probadas de CDDP, cuyos valores de daño fueron 21,35 ± 12,44 en las células sin tratar, 22,88 ± 11,04 en el tratamiento con CDDP a la dosis menor y 24,00 ± 6,32 en el tratamiento con la dosis mayor de CDDP (Fig. 32).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

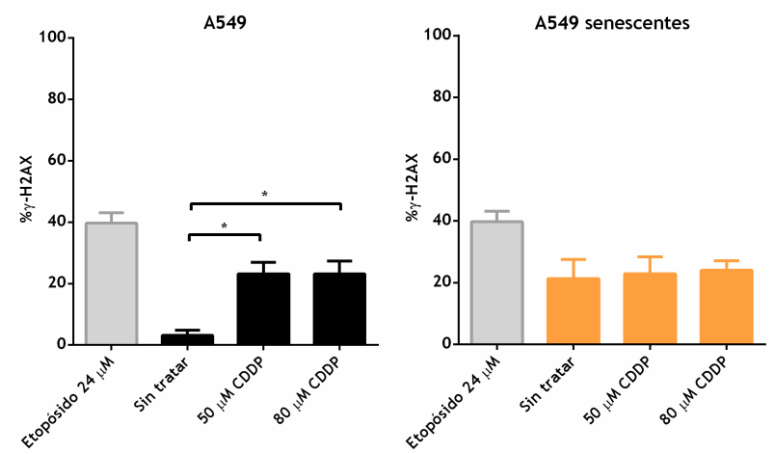


Figura 32. Medida del daño producido en el ADN (γH2AX) por el tratamiento con CDDP en A549 y A549-senescentes. Las diferentes líneas celulares se trataron durante 4 horas con CDDP (50 y 80 μM) y pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (γH2AX) y se midió la señal fluorescente por citometría. Empleando las mismas dosis de CDDP para ambas líneas, la línea sensible presenta un incremento del daño en el ADN respecto a su control sin tratar, mientras que la línea resistente no se ven afectada a esas mismas dosis. Además, las células senescentes, presentan un daño inicial producido por la bleomicina[214] que se mantiene constante y no se incrementa con los tratamientos a las diferentes dosis de CDDP. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

De igual manera, las células A2780 WT, presentaron un incremento del daño con ambas dosis de CDDP, cuyos valores fueron: 1,07 ± 0,34 en las células sin tratar, 30,03 ± 11,11 en el tratamiento con CDDP a la dosis menor y 39,78 ± 5,30 en el tratamiento con la dosis mayor de CDDP. Su correspondiente línea resistente, las células A2780-cis, no presentó un incremento del daño con ninguna de las condiciones probadas de CDDP, cuyos valores de daño fueron 1,20 ± 0,49 en las células sin tratar, 14,30 ± 7,85 en el tratamiento con CDDP a la dosis menor y 15,19 ± 4,56 en el tratamiento con la dosis mayor de CDDP (Fig. 33).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

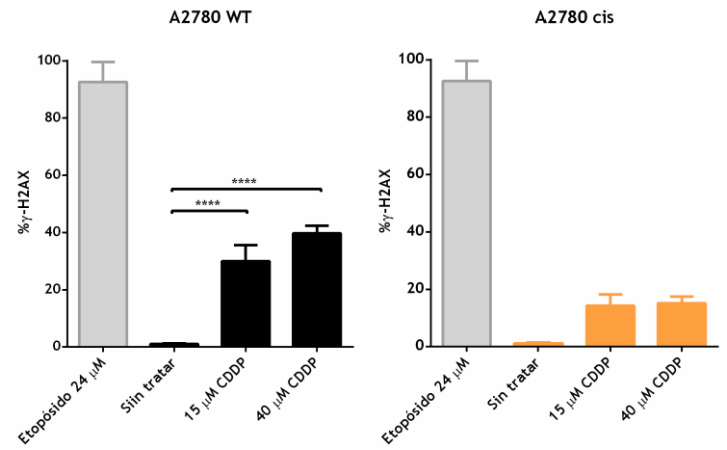


Figura 33. Medida del daño producido en el ADN (γH2AX) por el tratamiento con CDDP en A2780 WT y A2780-cis. Las diferentes líneas celulares se trataron durante 4 horas con CDDP (15 y 40 μM) y pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (γH2AX) y se midió la señal fluorescente por citometría. Empleando las mismas dosis de CDDP para ambas líneas, la línea sensible presenta un incremento del daño en el ADN respecto a su control sin tratar, mientras que la línea resistente no se ve afectada a esas mismas dosis. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Por último, se estudió el daño producido por el tratamiento con CDDP en las células H358, donde la línea sensible presentó un incremento del daño con ambas dosis de CDDP, con los siguientes valores: 4,17 ± 1,07 en las células sin tratar, 24,25 ± 5,00 en el tratamiento con CDDP a la dosis menor y 23,65 ± 5,70 en el tratamiento con la dosis mayor de CDDP. Su correspondiente línea resistente, las células H358-EMT, no presentaron un incremento del daño con ninguna de las condiciones probadas de CDDP, siendo los valores 7,46 ± 1,76 en las células sin tratar, 10,95 ± 3,65 en el tratamiento con CDDP a la dosis menor y 11,03 ± 5,07 en el tratamiento con la dosis mayor de CDDP (Fig. 34).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

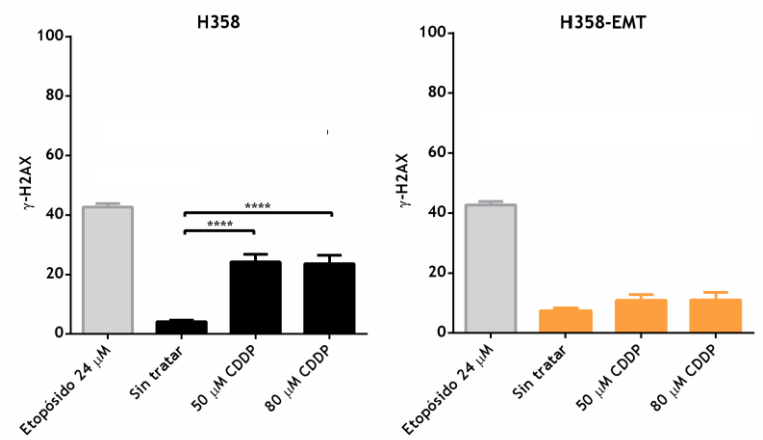


Figura 34. Medida del daño producido en el ADN (γH2AX) por el tratamiento con CDDP en H358 y H358-EMT. Las diferentes líneas celulares se trataron durante 4 horas con CDDP (50 y 80 μM) y pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (γH2AX) y se midió la señal fluorescente por citometría. Empleando las mismas dosis de CDDP para ambas líneas, la línea sensible presenta un incremento del daño en el ADN respecto a su control sin tratar, mientras que la línea resistente no se ven afectadas a esas mismas dosis. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

En los tres modelos de resistencia a CDDP se obtuvieron los mismos resultados: las tres líneas sensibles (A549, A2780 WT y las H358) presentaron un incremento significativo del daño en el ADN en comparación al control sin tratamiento. En cambio, en las líneas resistentes (A549-senescentes, A2780-cis y las H358-EMT), empleando las mismas dosis de tratamientos de CDDP no se observó un incremento del daño en el ADN.

6.1.2.2 Estudio del daño en el ADN en los modelos de resistencia a CDDP en el tratamiento con AQCs-Ag5 o en la terapia combinada.

Una vez conocimos que los modelos generados de resistencia presentaban un menor daño en el ADN al tratar con CDDP que sus respectivas líneas sensibles, quisimos estudiar lo que ocurría en la terapia combinada con los AQCs-Ag5, para evaluar su posible

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

implicación en el daño en el ADN. Para ello, realizamos nuevos experimentos en los que las diferentes líneas fueron pretratadas 1 hora con los AQCs-Ag5 (0,5 µM en las líneas A549 y H358 y 0,4 µM en la línea A2780) solos o en combinación con la menor dosis de CDDP empleada en el primer estudio, para evitar un incremento elevado de la citotoxicidad (50 µM para las líneas A549 y H358 y 15 µM para la línea A2780), durante 4 horas. Se empleó etopósido 24 µM durante 1 hora como control positivo de daño, pero nuevamente no se comparó con el resto de los tratamientos ya que no era el fin del estudio.

Las células A549 sin tratar (3,09 ± 0,73) presentaron un incremento del daño en el ADN con el CDDP (18,70 ± 5,50), pero no con los AQCs-Ag5 (4,12 ± 1,21), por lo que en la terapia combinada el daño fue producido solamente por el CDDP (19,02 ± 4,29). Su correspondiente línea resistente, las células A549-senescentes, donde ya el control sin tratamiento con CDDP presentaba un daño basal producido por el tratamiento con bleomicina [214], no presentó un incremento del daño con ninguna de las condiciones probadas, donde los valores de daño fueron 19,68 ± 6,02 en las células sin tratar, 18,82 ± 10,04 en el tratamiento con CDDP, 18,41 ± 5,41 en el tratamiento con los AQCs-Ag5 y 18,79 ± 10,42 en la terapia combinada (Fig. 35).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

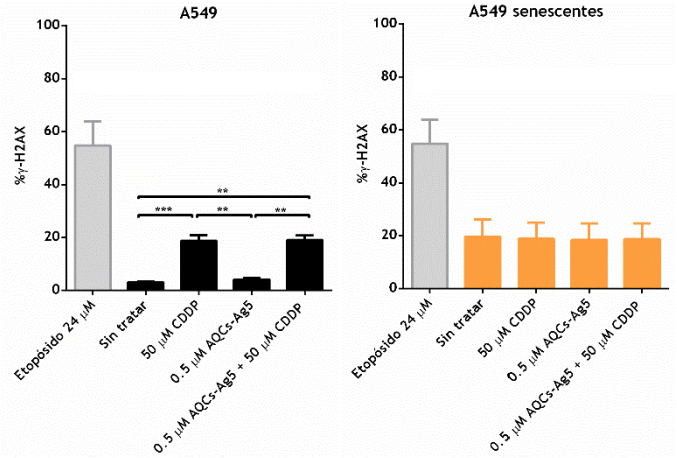


Figura 35. Medida del daño producido en el ADN (γH2AX) por el tratamiento con CDDP y AQCs-Ag5 en combinación y por separado en A549 y A549-senescentes. Las células se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 (0,5 μM) y 4 horas con CDDP (50 μM). Pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (γH2AX) y se midió la señal fluorescente por citometría. En la línea A549 se incrementa el daño en el ADN al tratar con CDDP, que es el mismo daño que se produce en la terapia combinada, por lo que los AQCs-Ag5 ni en monoterapia ni en terapia combinada incrementan el daño; su respectiva línea resistente (A549-senescentes) presenta un daño inicial producido por la bleomicina que se mantiene constante al tratar con CDDP y AQCs-Ag5. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Las células A2780 WT sin tratar (1,54 ± 0,46) presentaron un incremento del daño en el ADN con el CDDP (24,30 ± 7,13) y la terapia combinada (31,18 ±4,31), pero no con los AQCs-Ag5 solos (10,07 ± 4,71). Sin embargo, en la línea resistente A2780-cis, se produjo un incremento del daño en las células sin tratar (2,18 ± 0,87) únicamente con la terapia combinada (23,15 ± 10,54), mientras que la terapia con CDDP (8,03 ±6,14) y los AQCs-Ag5 (6,71 ±3,02) solos no incrementaron el daño (Fig. 36).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

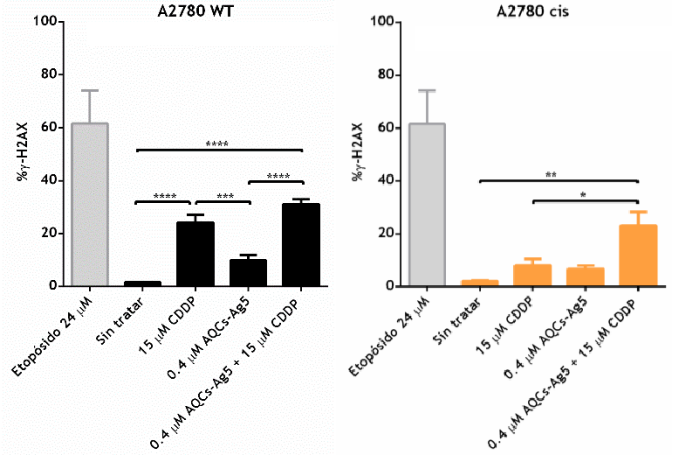


Figura 36. Medida del daño producido en el ADN (γH2AX) por el tratamiento con CDDP y AQCs-Ag5 en combinación y por separado en A2780 y A2780-cis. Las células se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 (0,4 μM) y 4 horas con CDDP (15 μM). Pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (γH2AX) y se midió la señal fluorescente por citometría. En la línea A2780 WT se incrementa significativamente el daño en el ADN con el tratamiento de CDDP y con la terapia combinada, mientras que, en su respectiva línea resistente, A2780-cis, hay un incremento del daño sólo con la terapia combinada de AQCs-Ag5 + CDDP. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Por último, se estudió el daño producido en las células H358. La línea sensible sin tratar (3,33 ± 0,80) presentó un incremento del daño en el ADN con el CDDP (19,97 ± 10,50), pero no con los AQCs-Ag5 (5,90 ± 1,68), por lo que en la terapia combinada el daño fue producido solamente por el CDDP (23,75 ± 1,87). Sin embargo, la línea resistente H358-EMT no presentó un incremento del daño con ninguna de las condiciones probadas, donde los valores de daño fueron 3,33 ± 1,45 en las células sin tratar, 5,52 ± 2,42 en el tratamiento con CDDP, 2,97 ± 1,72 en el tratamiento con los AQCs-Ag5 y 3,63 ± 1,87 en la terapia combinada (Fig. 37).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

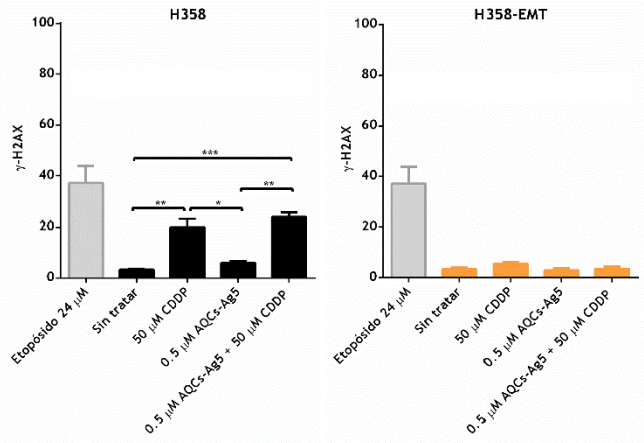


Figura 37. Medida del daño producido en el ADN (γH2AX) por el tratamiento con CDDP y AQCs-Ag5 en combinación y por separado H358 y H358-EMT. Las células se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 (0,5 μM) y 4 horas con CDDP (50 μM). Pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con un anticuerpoconjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (γH2AX) y se midió la señal fluorescente por citometría. En la línea H358 se incrementa el daño en el ADNal tratar con CDDP, que es el mismo daño que se produce en la terapia combinada, por lo que los AQCs-Ag5 ni en monoterapia ni en terapia combinada incrementan el daño, mientras que la línea resistente H358-EMT no se ve afectada en ninguno de loscasos. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Con estos resultados obtuvimos la siguiente información: por un lado, confirmamos lo que observamos en el primer estudio, donde solamente en las líneas sensibles al CDDP (A549, A2780 WT y H358) se incrementó el daño en el ADN empleando la misma dosis de CDDP que en sus respectivas líneas resistentes. En segundo lugar, el tratamiento como monoterapia de AQCs-Ag5 respecto a los controles sin tratar no incrementó el daño en el ADN en ninguna de las líneas. Por último, cabe destacar el comportamiento diferente de las células A2780-cis, donde la terapia combinada de AQCs-Ag5 + CDDP sí que incrementó el daño en el ADN respecto a la monoterapia con CDDP y las células sin tratar.

Dado que únicamente las células A2780-cis presentaron un comportamiento diferente, mostrando un incremento del daño en el ADN al tratar con la terapia combinada de realizamos un estudio más

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

para confirmar los hechos. Para ello, pretratamos con la misma dosis de AQCs-Ag5, pero incrementando los tiempos con CDDP, durante 4,8 o 24 horas, incluyendo también a la línea A2780-WT como control.

Las células A2780 WT sin tratamiento tuvieron un incremento del daño en el ADN solamente en la terapia con CDDP en los 3 tiempos de tratamiento. Los valores del daño fueron a 4 horas 2,46 ± 1,24 en las células sin tratar, 31,65 ± 2,47 del CDDP, 8,32 ± 2,37 de los AQCs-Ag5 y 38,35 ± 2,05 de la terapia combinada (Fig. 38 A). Los valores del daño fueron a 8 horas 1,33 ± 0,71 en las células sin tratar, 40,15 ± 2,33 del CDDP, 2,52 ± 0,76 de los AQCs-Ag5 y 42,15 ± 5,30 de la terapia combinada (Fig. 38 B). El tratamiento a 24 horas nos dio los valores de daño de 1,64 ± 0,06 en las células sin tratar, 54,5 ± 9,33 del CDDP, 4,80 ± 0,86 de los AQCs-Ag5 y 69,00 ± 1,70 de la terapia combinada (Fig. 38 C). Así, confirmamos los resultados obtenidos anteriormente.

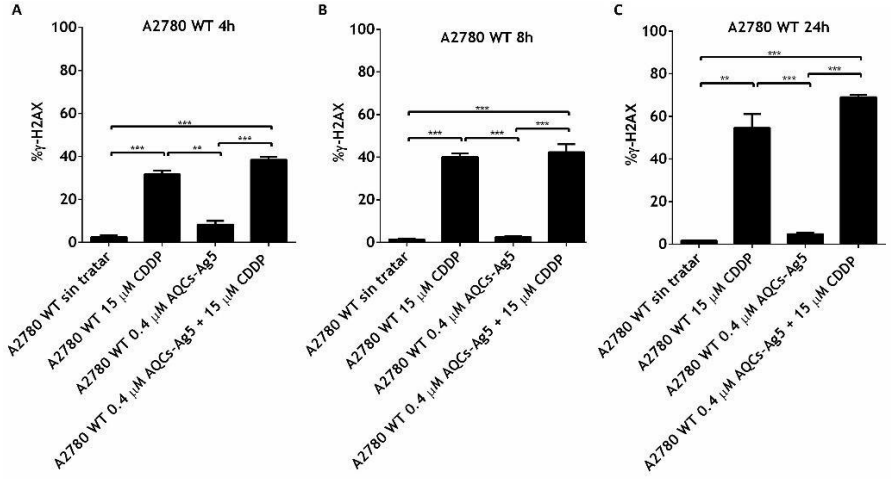


Figura 38. Medida del daño producido en el ADN (γH2AX) por el tratamiento con CDDP y AQCs-Ag5 en combinación y por separado en la línea A2780 WT. Las células A2780 WT se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 0,4 μM y 4, 8 y 24 horas con CDDP 15 μM. Pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (γH2AX) y se midió la señal fluorescente por citometría. Las células A2780 WT sin tratamiento tuvieron un incremento del daño en el ADN solamente en la terapia con CDDP en los 3 tiempos de tratamiento. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las células A2780-cis sin tratamiento presentaron un incremento del daño en el ADN con la terapia combinada y con el CDDP a 4 y 8 horas, incrementando los AQCs-Ag5 el efecto del CDDP por sí solo. A 24 horas el daño producido fue únicamente por el CDDP. Los valores del daño fueron a 4 horas 2,23 ± 0.15 en las células sin tratar, 10,75 ± 0,49 del CDDP, 3,66 ± 0,90 de los AQCs-Ag5 y 19,25 ± 2,05 de la terapia combinada (Fig. 39 A). Los valores del daño fueron a 8 horas 1,65 ± 0,03 en las células sin tratar, 10,15 ± 0,07 del CDDP, 2,23 ± 0,47 de los AQCs-Ag5 y 15,15 ± 0,64 de la terapia combinada (Fig. 39 B). El tratamiento a 24 horas nos dio los valores de 2,03 ± 0,08 en las células sin tratar, 48,3 ± 5,09 del CDDP, 4,38 ± 1,20 de los AQCs-Ag5 y 58,05 ± 1,63 de la terapia combinada (Fig. 39 C). Con estos resultados, confirmamos lo que habíamos visto anteriormente, donde únicamente en la línea A2780-cis, observamos un incremento del daño en el ADN producido por la terapia combinada con AQCs-Ag5 + CDDP respecto a la monoterapia con CDDP (a 4 y 8 horas), desapareciendo las diferencias a 24 horas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

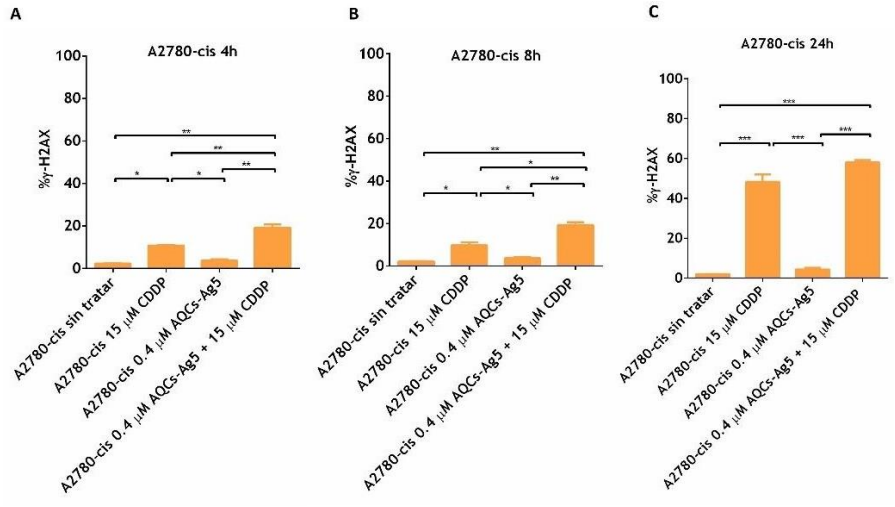


Figura 39 Medida del daño producido en el ADN (γH2AX) por el tratamiento con CDDP y AQCs-Ag5 en combinación y por separado en la línea A2780-cis. Las células A2780-cis se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 0,4 μM y 4, 8 y 24 horas con CDDP 15 μM. En los casos de terapia combinada, se trató primero con los AQCs-Ag5 y luego con el CDDP. Pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con FITC que reconoce la histona H2AX fosforilada (γH2AX) y se midió la señal fluorescente por citometría. Se incrementa significativamente el daño al tratar con CDDP y en el tratamiento combinado en todos los tiempos, así como en la terapia combinada frente al CDDP solo a 4 y 8 horas (**A** y **B**) aunque la diferencia no es significativa a 24 horas. Los datos representan la media ± SD de tres experimentos diferentes. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Dado que las muestras además de teñirse para ver el daño en el ADN se tiñeron con IP, se analizaron los perfiles de ciclo empleando un análisis Dean-Jett-Fox. Por ello, tras aplicar los diferentes tratamientos con AQCs-Ag5 y CDDP como se explicó anteriormente, se recogieron las células, se fijaron y además de teñir para medir el daño se empleó IP.

En primer lugar, se analizó el estado del ciclo celular en la línea A549. Las células sensibles no presentaron grandes cambios en el ciclo celular bajo ninguno de los tratamientos (Fig. 40 A). Las células senescentes, que están paradas en G1 y G2/M, parecen presentar una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

acumulación en G2/M en el tratamiento con CDDP y AQCs-Ag5 (Fig. 40 B).

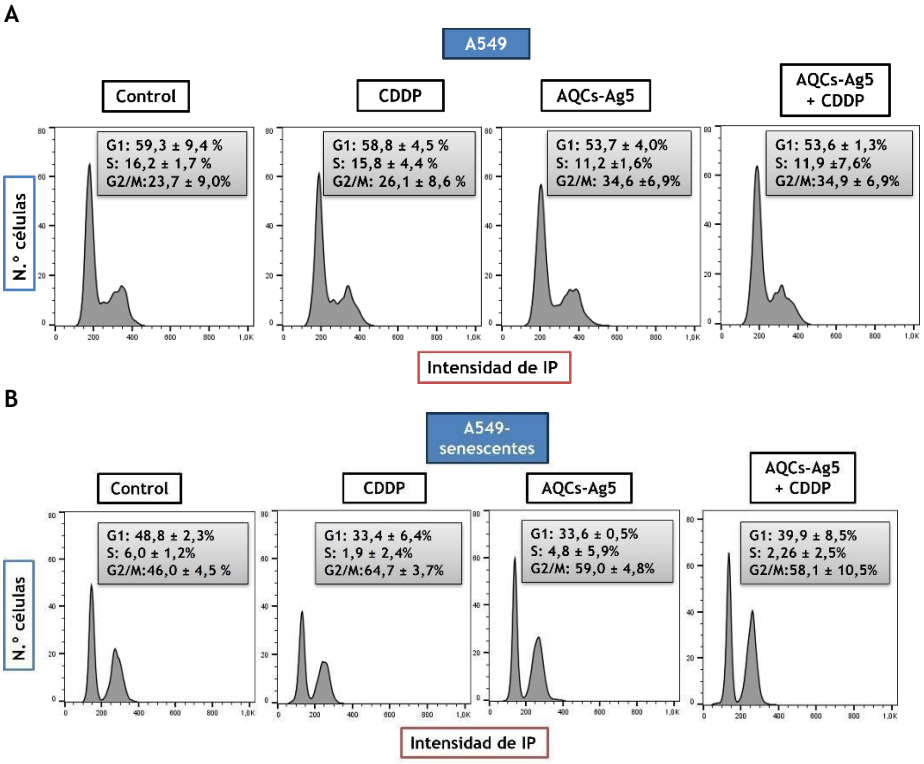


Figura 40. Ciclo celular de las células A549 y A549-senescentes. Las células se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 (0,5 μM) y 4 horas con CDDP (50 μM). Pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con IP. La línea A549 no presenta cambios en el ciclo celular bajo ninguno de los tratamientos (**A**). Las células senescentes que están paradas en G1 y G2/M, parecen incrementar la acumulación de células en G2/M en el tratamiento con CDDP y AQCs-Ag5. Figura creada con el software FlowJo™: Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Las células A2780 WT no presentaron grandes cambios en el ciclo celular con el tratamiento de CDDP, mientras que los AQCs-Ag5 y la terapia combinada incrementaron el porcentaje de células en G2/M (Fig. 41 A). Las células A2780-cis, que parecen presentar un porcentaje de la población con poliploidías como está descrito[215], no presentaron cambios en el ciclo con el tratamiento del CDDP mientras que el tratamiento con los AQCs-Ag5 y la terapia combinada incrementa el número de células en G2/M (Fig. 41 B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

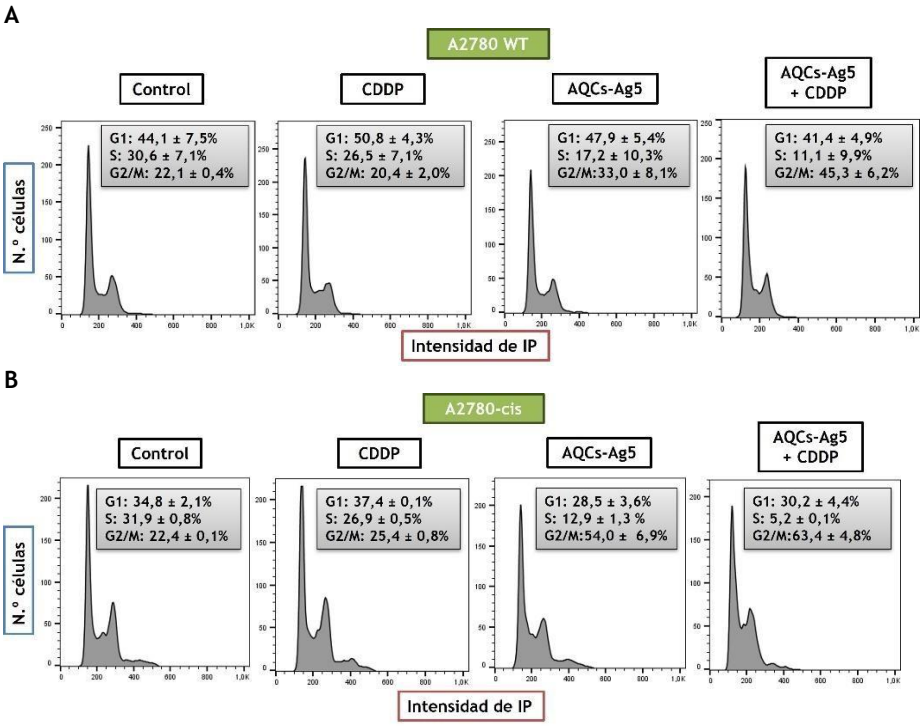


Figura 41. Ciclo celular de las células A2780 WT y A2780-cis. Las células se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 (0,4 μM) y 4 horas con CDDP (15 μM). Pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con IP. La línea A2780 no presentan cambios en el ciclo celular al tratar con CDDP, pero los AQCs-Ag5 y la terapia combinada incrementan el número de células en G2/M (**A**). Las células A2780-cis, que presentan un porcentaje de la población con poliploidias[215], no presenta cambios en el ciclo con el tratamiento del CDDP mientras que el tratamiento con los AQCs-Ag5 y la terapia combinada incrementa el número de células en G2/M. Figura creada con el software FlowJo™: Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Las células H358 debido a las condiciones establecidas para generar el modelo de estudio se encuentran serodeprivadas, por lo que están en su mayoría paradas en G0/G1, por lo que no se pudieron establecer los valores de forma fiable. En todo caso, la comparativa de los perfiles es muy semejante en todos los casos (Fig. 42 A y B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

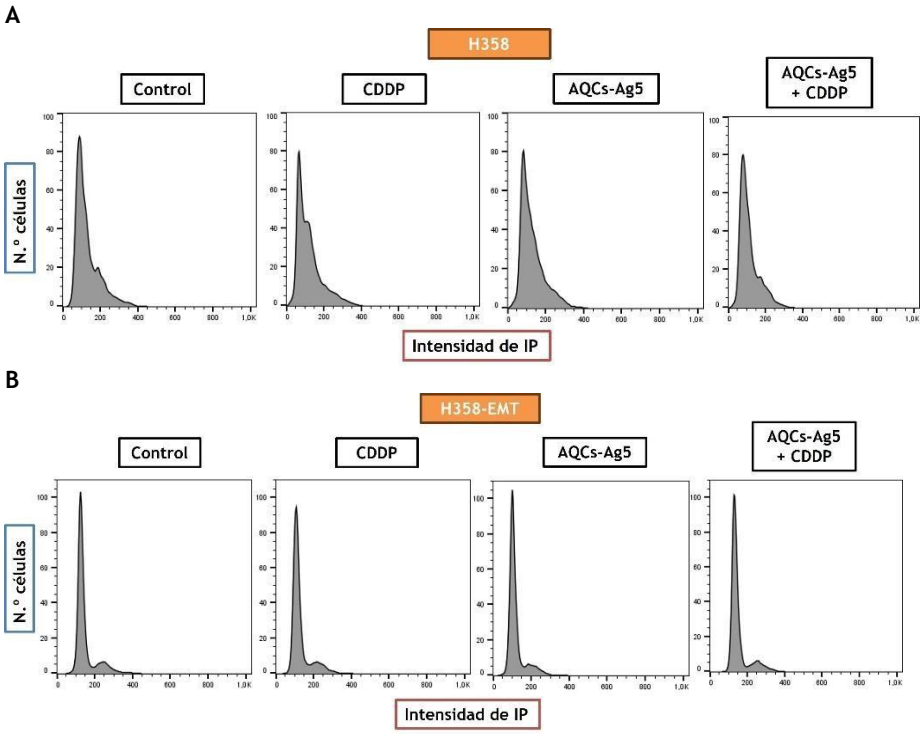


Figura 42. Ciclo celular de las células H358 y H358-EMT. Las células se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 (0,5 µM) y 4 horas con CDDP (50 µM). Pasado ese tiempo, se recogieron las células y se tiñeron con IP. Las células se encuentran serodeprivadas, por lo que están en su mayoría paradas en G0/G1 en ambos casos, lo cual no permitió realizar cuantificaciones fiables. En todo caso, la comparativa de los perfiles es muy semejante en todos los casos. Figura creada con el software FlowJo™: Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Debido a estos resultados, para seguir investigando el papel de los AQCs-Ag5 en los modelos de resistencia, decidimos estudiar la cantidad de platino presente en la célula y unido al ADN bajo cada una de estas condiciones de tratamiento para obtener más información.

6.1.3 Cuantificación de platino en el tratamiento con AQCs-Ag5 y CDDP en los modelos de resistencia generados.

En base a los resultados del daño en el ADN, quisimos determinar si los AQCs-Ag5 podrían modificar la entrada de CDDP a la célula. Por ello, se cuantificó la cantidad de platino (Pt) tanto en célula total

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(extractos celulares) como en el ADN aislado, en los diferentes modelos de resistencia que fueron tratados con CDDP y AQCs-Ag5. En el caso de la cuantificación del Pt unido al ADN, se midió también el fósforo (P), ya que el Pt se cuantificó corregido por la cantidad de P, proporcionando una medida de la cantidad de ADN.

Destacar que, los resultados con CDDP solo y con la terapia combinada con AQCs-Ag5 se muestras desglosados por cuestión de claridad a la hora de interpretar los resultados, pero las gráficas que a continuación se muestran son el resultado de 3 experimentos independientes, con dos réplicas por muestra en cada experimento.

6.1.3.1 Cuantificación de Pt en los modelos de resistencia generados en el tratamiento con CDDP.

En esta primera aproximación, se emplearon las mismas condiciones de tratamiento con CDDP que en el estudio de daño en el ADN: 50 y 80 μM para las líneas A549 y H358 y 15 y 40 μM para la línea A2780, durante 4 horas. Cada condición se dividió en dos partes para analizar por un lado el extracto total celular y por otro el ADN aislado. Tras esto, las muestras se recogieron y se digirieron en HNO_3 y se mandaron a cuantificar a la Unidad de Análisis Instrumental del Campus de Lugo, empleando un espectrómetro de masas ICP-MS BRUCKER 820-MS.

En primer lugar, se estudió la línea A549. En cuanto a la línea sensible, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en μg/L): en las células sin tratar 0,04 ± 0,02, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 16,36 ± 7,24 y en el tratamiento con 80 μM 23,34 ± 12,10. En las células resistentes, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en μg/L): en las células sin tratar 0,03 ± 0,01, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 12,53 ± 3,86 y en el tratamiento con 80 μM 16,95 ± 4,26. En ambos casos, hubo un incremento de la entrada de CDDP a la célula de forma dosis-dependiente (Fig. 43 A).

De igual forma, se estudió en esta línea la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P): en la línea sensible, los valores fueron en las células sin tratar 0,01 ± 0,00, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 0,31 ± 0,04 y en el tratamiento con 80 μM 0,46 ± 0,02. En las células resistentes, la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P) fue: en las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

células sin tratar 0,02 ± 0,00, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 0,17 ± 0,03 y en el tratamiento con 80 μM 0,30 ± 0,04. En ambos casos, la cantidad de Pt que se unió al ADN fue dependiente de la dosis de CDDP. Además, cabe destacar, que la cantidad de Pt unido al ADN en la línea sensible fue mayor con ambas dosis de CDDP en comparación a la línea resistente, lo cual nos estaría dando una respuesta de porqué se producía menor daño en la resistente empleando la misma dosis (Fig. 43 B).

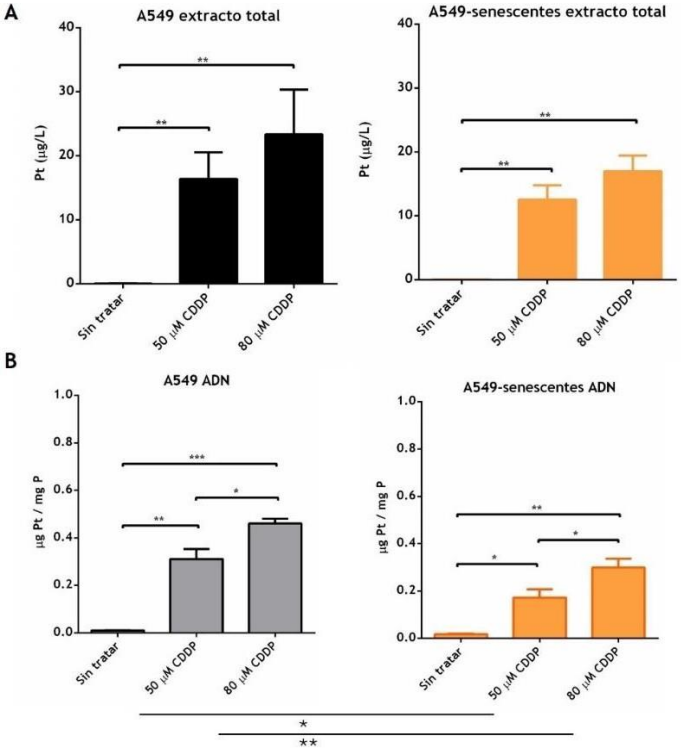


Figura 43. Cuantificación de platino por espectrometría de masas en las líneas A549 y A549-senescentes en el extracto total celular (A) y unido al ADN (B) al tratar con CDDP. Las células A549 y A549-senescentes se trataron con CDDP (50 y 80 μM) durante 4 horas y se cuantificó la cantidad de platino en extracto total celular (A) o unido al ADN (**B**). La cantidad de Pt que entra a la célula es dosis dependiente en ambas líneas, al igual que la cantidad de Pt unida al ADN. Cabe destacar que la cantidad de Pt unido al ADN en la línea sensible fue mayor con ambas dosis de CDDP en comparación a la línea resistente. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En segundo lugar, se realizó este estudio en la línea A2780. En cuanto a la línea sensible, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en μg/L): en las células sin tratar 0,03 ± 0,01, en el tratamiento con 15 μM de CDDP 4,18 ± 2,72 y en el tratamiento con 40 μM 10,21 ± 6,91. En las células resistentes, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en μg/L): en las células sin tratar 0,07 ± 0,09, en el tratamiento con 15 μM de CDDP 2,03 ± 0,10 y en el tratamiento con 40 μM 6,34 ± 1,74. En ambos casos, hubo un incremento de la entrada de CDDP a la célula de forma dosis-dependiente (Fig. 44 A).

De igual forma, se estudió en esta línea la cantidad de Pt unido al ADN (en μg Pt/mg P): en la línea sensible, los valores fueron en las células sin tratar 0,01 ± 0,00, en el tratamiento con 15 μM de CDDP 0,22 ± 0,0 y en el tratamiento con 40 μM 0,64 ± 0,01. En las células resistentes, la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P) fue: en las células sin tratar 0,03 ± 0,02, en el tratamiento con 15 μM de CDDP 0,11 ± 0,02 y en el tratamiento con 40 μM 0,17 ± 0,00. En ambos casos, la cantidad de Pt que se unió al ADN fue dependiente de la dosis de CDDP. Cabe destacar la gran diferencia en la cantidad de Pt unido ADN con la dosis de 40 μM de CDDP entre la línea sensible y resistente, donde observamos que es casi 4 veces más alta en la línea A2780 WT que en la línea A2780-cis (0,64 ± 0,01 μg Pt/mg P frente a 0,17 ± 0,00 μg Pt/mg P) (Fig. 44 B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

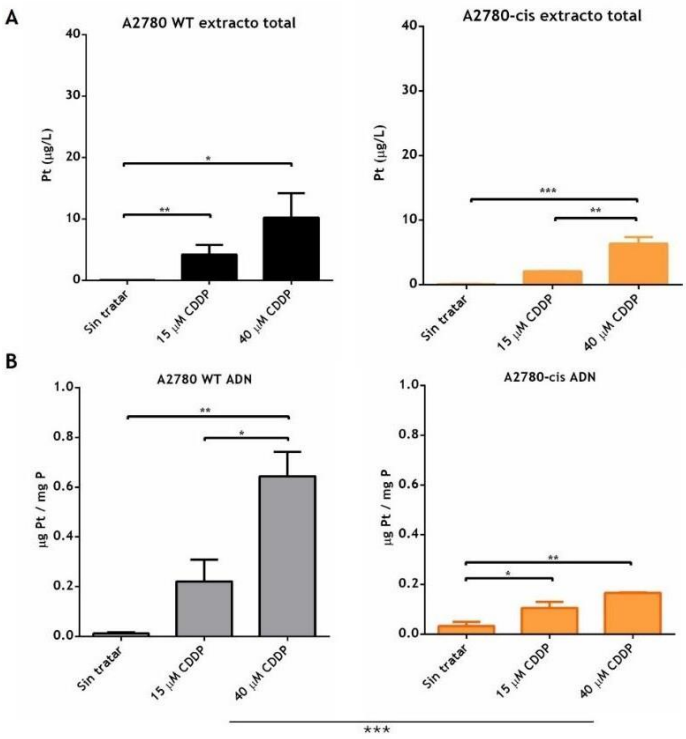


Figura 44. Cuantificación de platino por espectrometría de masas en las líneas A2780 WT y A2780-cis en el extracto total celular (A) y unido al ADN (B) al tratar con CDDP. Las células A2780 WT y A2780-cis se trataron con CDDP (15 y 40 µM) durante 4 horas y se cuantificó la cantidad de platino en extracto total celular (**A**) o unido al ADN (**B**). La cantidad de Pt que entra a la célula es dosis dependiente en ambas líneas, al igual que la cantidad de Pt unida al ADN. Cabe destacar que la cantidad de Pt unido al ADN en la línea sensible fue casi 4 mayor con la dosis de 40 µM de CDDP en comparación a la línea resistente (0,64 ± 0,01 µg Pt/mg P frente a 0,17 ± 0,00 µg Pt/mg P). Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Por último, se realizó este estudio en la línea H358. En cuanto a la línea sensible, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en µg/L): en las células sin tratar 0,04 ± 0,02, en el tratamiento con 50 µM de CDDP 20,15 ± 2,99 y en el tratamiento con 80 µM 30,52 ± 7,16. En las células resistentes, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en µg/L): en las células sin tratar 0,03 ± 0,02, en el tratamiento con 50 µM de CDDP

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

12,63 ± 3,46 y en el tratamiento con 80 μM 19,41 ± 6,47. En ambos casos, hubo un incremento de la entrada de CDDP a la célula de forma dosis-dependiente (Fig. 45 A).

De igual forma, se estudió en esta línea la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P): en la línea sensible, los valores fueron en las células sin tratar 0,02 ± 0,02, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 0,48 ± 0,03 y en el tratamiento con 80 μM 0,67 ± 0,03. En las células resistentes, la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P) fue: en las células sin tratar 0,01 ± 0,00, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 0,25 ± 0,01 y en el tratamiento con 80 μM 0,35 ± 0,01. En ambos casos, la cantidad de Pt que se unió al ADN fue dependiente de la dosis de CDDP. Además, cabe destacar, que la cantidad de Pt unido al ADN en la línea sensible fue mayor con ambas dosis de CDDP en comparación a la línea resistente (Fig. 45 B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

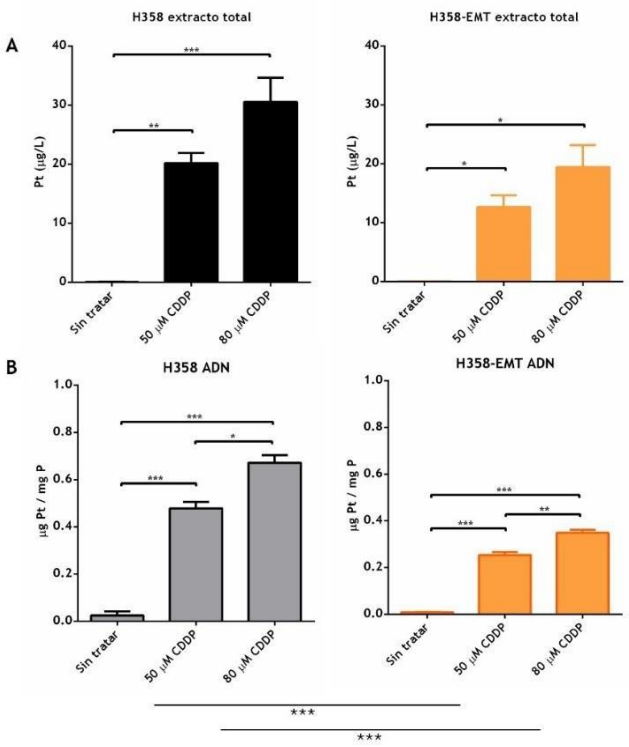


Figura 45. Cuantificación de platino por espectrometría de masas en las líneas H358 y H358-EMT en el extracto total celular (A) y unido al ADN (B) al tratar con CDDP. Las células H358 y H358-EMT se trataron con CDDP (50 y 80 µM) durante 4 horas y se cuantificó la cantidad de platino en extracto total celular (**A**) o unido al ADN (**B**). La cantidad de Pt que entra a la célula es dosis dependiente en ambas líneas, al igual que la cantidad de Pt unida al ADN. Cabe destacar que la cantidad de Pt unido al ADN en la línea sensible fue mayor con ambas dosis de CDDP en comparación a la línea resistente. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

A continuación, se muestra una tabla resumen comparando la cantidad de Pt en las diferentes líneas, en el extracto total, así como unido al ADN (Tablas 5, 6 y 7).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Extracto total: Pt (µg/L)				Pt unido al ADN (µg Pt/mg P)			
	A549	A549-senescentes	Mann-Whitney test ¿p <0,05?		A549	A549-senescentes	Mann-Whitney test ¿p <0,05?
Sin tratar	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	No	Sin tratar	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	No
50 µM CDDP	16,36 ± 7,24	12,53 ± 3,86	No	50 µM CDDP	0,31 ± 0,04	0,17 ± 0,03	Si (*)
80 µM CDDP	23,34 ± 12,10	16,95 ± 4,26	No	80 µM CDDP	0,46 ± 0,02	0,30 ± 0,04	Si (**)

Tabla 5. Cuantificación de Pt en extracto total (izquierda) y unido al ADN (derecha) en las líneas A549 y A549-senescentes. Se compara ambas líneas. En la línea sensible se une más Pt al ADN en las dos dosis probadas. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Extracto total: Pt (µg/L)				Pt unido al ADN (µg Pt/mg P)			
	A2780 WT	A2780-cis	Mann-Whitney test ¿p <0,05?		A2780 WT	A2780-cis	Mann-Whitney test ¿p <0,05?
Sin tratar	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,09	No	Sin tratar	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,02	No
15 µM CDDP	4,18 ± 2,72	2,03 ± 0,10	No	15 µM CDDP	0,22 ± 0,0	0,11 ± 0,02	No
40 µM CDDP	10,21 ± 6,91	6,34 ± 1,74	No	40 µM CDDP	0,64 ± 0,01	0,17 ± 0,00	Si (***)

Tabla 6. Cuantificación de Pt en extracto total (izquierda) y unido al ADN (derecha) en las líneas A2780 WT y A2780-cis. Se compara ambas líneas. En la línea sensible se une más Pt al ADN con la dosis más alta de CDDP. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Extracto total: Pt (µg/L)				Pt unido al ADN (µg Pt/mg P)			
	H358	H358-EMT	Mann-Whitney test ¿p <0,05?		H358	H358-EMT	Mann-Whitney test ¿p <0,05?
Sin tratar	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02	No	Sin tratar	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,00	No
50 µM CDDP	20,15 ± 2,99	12,63 ± 3,46	No	50 µM CDDP	0,48 ± 0,03	0,25 ± 0,01	Si (***)
80 µM CDDP	30,52 ± 7,16	19,41 ± 6,47	No	80 µM CDDP	0,67 ± 0,03	0,35 ± 0,01	Si (***)

Tabla 7. Cuantificación de Pt en extracto total (izquierda) y unido al ADN (derecha) en las líneas H358 y H358-EMT. Se compara ambas líneas. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. En la línea sensible se une más Pt al ADN en las dos dosis probadas. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

En resumen, con estos resultados podemos concluir que si bien a todas las dosis probadas de CDDP y en todas las líneas, la entrada de Pt a la célula, así como su unión al ADN fue dosis-dependiente, las líneas resistentes presentaron menor cantidad de Pt unido al ADN en todos los casos (menos en las células A2780 a la dosis de 15µM de CDDP). Estos resultados van en consonancia con los encontrado en el apartado 6.1.2.1, donde en los tres modelos de resistencia a CDDP se obtuvieron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los mismos resultados: las tres líneas sensibles (A549, A2780 WT y las H358) presentaron un incremento significativo del daño en el ADN en comparación al control sin tratamiento. Sin embargo, seguimos sin tener una explicación al comportamiento diferente de las A2780-cis. Por ello, quisimos estudiar si el tratamiento de los AQCs-Ag5 podría modificar de alguna forma la entrada del CDDP a la célula y por tanto incrementar el daño en el ADN.

6.1.3.2 Cuantificación de Pt en los modelos de resistencia generados en el tratamiento con CDDP y AQCs-Ag5.

El objetivo de esta segunda aproximación fue investigar si los AQCs-Ag5 podrían de alguna forma modificar la entrada de CDDP a la célula. Para ello, se emplearon las mismas condiciones de tratamiento que en el estudio de daño en el ADN: 1 hora de pretratamiento con los AQCs-Ag5 (0,5 μM para las líneas A549 y H358 y 0,4 μM para la línea A2780) en combinación con la menor dosis de CDDP (50 μM para las líneas A549 y H358 y 15 μM para la línea A2780), durante 4 horas.

En primer lugar, se estudió la línea A549. En cuanto a la línea sensible, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en μg/L): en las células sin tratar 0,04 ± 0,02, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 16,36 ± 7,24 y en el tratamiento con la terapia combinada 13,09 ± 1,87. En las células resistentes, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en μg/L): en las células sin tratar 0,03 ± 0,01, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 12,53 ± 3,86 y en el tratamiento con la terapia combinada 9,85 ± 0,92. En ningún caso, los AQCs-Ag5 incrementaron la cantidad de Pt que entró a la célula (Fig. 46 A).

De igual forma, se estudió en esta línea la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P): en la línea sensible, los valores fueron en las células sin tratar 0,01 ± 0,00, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 0,31 ± 0,04 y en el tratamiento con la terapia combinada 0,32 ± 0,04. En las células resistentes, la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P) fue: en las células sin tratar 0,02 ± 0,00, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 0,17 ± 0,03 y en el tratamiento con la terapia combinada 0,22 ± 0,06. En ningún caso, los AQCs-Ag5 incrementaron la cantidad de Pt que se unió al ADN (Fig. 46 B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

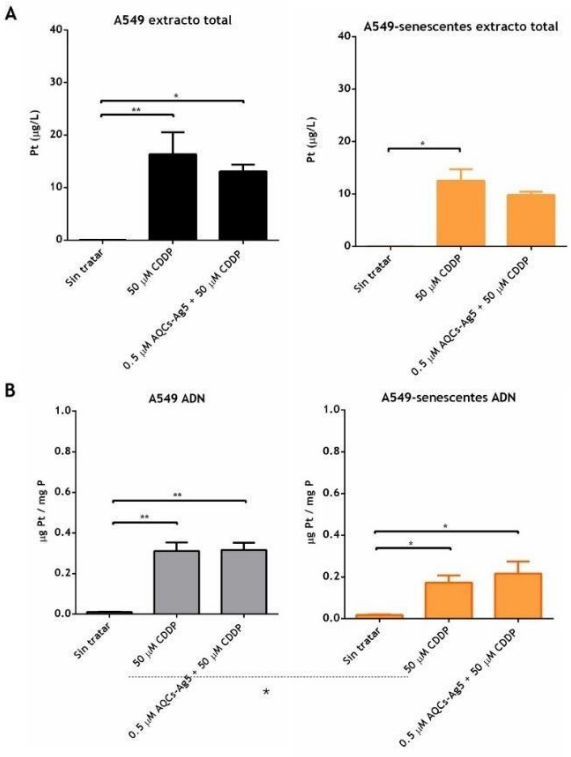


Figura 46. Cuantificación de platino por espectrometría de masas en las líneas A549 y A549-senescentes al tratar con CDDP o en combinación con AQCs-Ag5. Las células A549 y A549-senescentes se trataron con los AQCs-Ag5 (0,5 µM) durante 1 hora y CDDP (50 µM) durante 4 horas y se cuantificó la cantidad de platino en extracto total celular (**A**) o unido al ADN (**B**). Los AQCs-Ag5 no incrementan la cantidad de Pt que entra en la célula ni la que se une al ADN. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

En segundo lugar, se realizó este estudio en la línea A2780. En cuanto a la línea sensible, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en µg/L): en las células sin tratar 0,03 ± 0,01, en el tratamiento con 15 µM de CDDP 4,18 ± 2,72 y en el tratamiento con la terapia combinada 3,21 ± 0,03. En las células resistentes, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en µg/L): en las células sin tratar 0,07 ± 0,09, en el tratamiento con 15 µM de CDDP 2,03 ± 0,10 y en el tratamiento con la terapia

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

combinada 2,09 ± 0,07. En ningún caso los AQCs-Ag5 incrementaron la cantidad de Pt que entró a la célula (Fig. 47 A).

De igual forma, se estudió en esta línea la cantidad de Pt unido al ADN (en μg Pt/mg P): en la línea sensible, los valores fueron en las células sin tratar 0,01 ± 0,00, en el tratamiento con 15 μM de CDDP 0,22 ± 0,00 y en el tratamiento con la terapia combinada 0,32 ± 0,02. En las células resistentes, la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P) fue: en las células sin tratar 0,03 ± 0,02, en el tratamiento con 15 μM de CDDP 0,11 ± 0,02 y en el tratamiento con la terapia combinada 0,08 ± 0,01. Los AQCs-Ag5 en combinación con el CDDP no incrementaron tampoco la cantidad de Pt unido al ADN (Fig. 47 B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

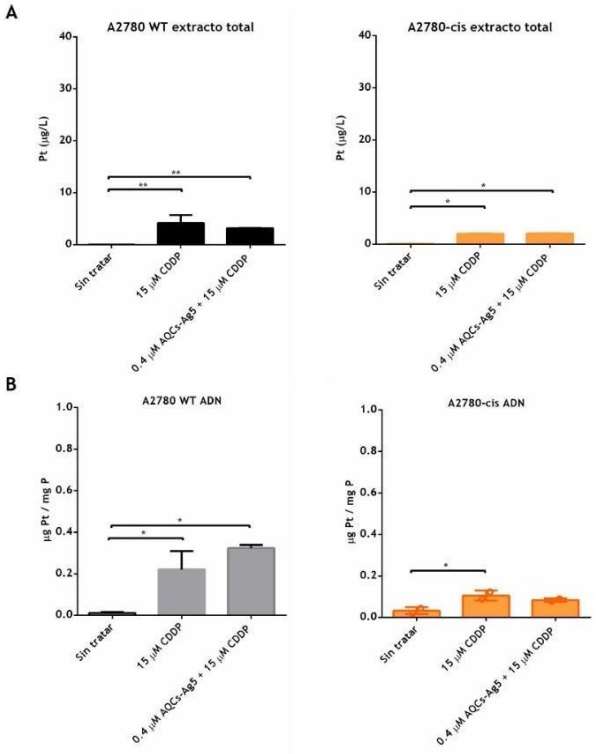


Figura 47. Cuantificación de platino por espectrometría de masas en las líneas A2780 WT y A2780-cis al tratar con CDDP o en combinación con AQCs-Ag5. Las células se trataron con los AQCs-Ag5 (0,4 µM) durante 1 hora y CDDP (15 µM) durante 4 horas y se cuantificó la cantidad de platino en extracto total celular (**A**) o unido al ADN (**B**). Los AQCs-Ag5 no incrementan la cantidad de Pt que entra en la célula ni la que se une al ADN. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Por último, se realizó este estudio en la línea H358. En cuanto a la línea sensible, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en µg/L): en las células sin tratar 0,04 ± 0,02, en el tratamiento con 50 µM de CDDP 20,15 ± 2,99 y en el tratamiento con la terapia combinada 18,66 ± 0,63. En las células resistentes, la cantidad de Pt que entró a la célula fue (en µg/L): en las células sin tratar 0,03 ± 0,02, en el tratamiento con 50 µM de CDDP 12,63 ± 3,46 y en el tratamiento con la terapia combinada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

11,79 ± 0,84. En ningún caso la terapia combinada incrementó la cantidad de Pt que entró a la célula (Fig. 48 A).

De igual forma, se estudió en esta línea la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P): en la línea sensible, los valores fueron en las células sin tratar 0,02 ± 0,02, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 0,48 ± 0,03 y en el tratamiento con la terapia combinada 0,54 ± 0,03. En las células resistentes, la cantidad de Pt unida al ADN (en μg Pt/mg P) fue: en las células sin tratar 0,01 ± 0,00, en el tratamiento con 50 μM de CDDP 0,25 ± 0,01 y en el tratamiento con la terapia combinada 0,26 ± 0,03. Tampoco se observó ninguna modificación en la cantidad de Pt que se unió al ADN en la terapia combinada (Fig. 48 B).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

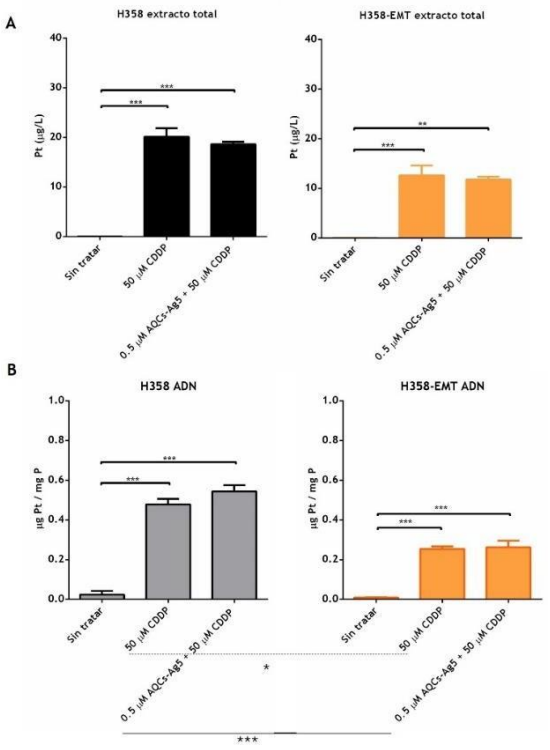


Figura 48 Cuantificación de platino por espectrometría de masas en las líneas H358 y H358-EMT al tratar con CDDP o en combinación con AQCs-Ag5. Las células se trataron con los AQCs-Ag5 (0,5 µM) durante 1 hora y CDDP (50 µM) durante 4 horas y se cuantificó la cantidad de platino en extracto total celular (**A**) o unido al ADN (**B**). Los AQCs-Ag5 no incrementan la cantidad de Pt que entra en la célula ni la que se une al ADN. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

A continuación, se muestra una tabla resumen con las cantidades de Pt en las diferentes líneas, en el extracto total, así como unido al ADN, comparando la diferencia en la terapia sola con CDDP o en la terapia combinada con AQCs-Ag5.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Extracto total: Pt (µg/L)				Pt unido al ADN (µg Pt/mg P)			
	CDDP	AQCs-Ag5 + CDDP	Mann-Whitney test ¿p <0,05?		CDDP	AQCs-Ag5 + CDDP	Mann-Whitney test ¿p <0,05?
A549	16,36 ± 7,24	13,09 ± 1,87	No	A549	0,31 ± 0,04	0,32 ± 0,04	No
A549-senescentes	12,53 ± 3,86	9,85 ± 0,92	No	A549-senescentes	0,17 ± 0,03	0,22 ± 0,06	No
A2780 WT	4,18 ± 2,72	3,21 ± 0,03	No	A2780 WT	0,22 ± 0,00	0,32 ± 0,02	No
A2780-cis	2,03 ± 0,10	2,09 ± 0,07	No	A2780-cis	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,01	No
H358	20,15 ± 2,99	18,66 ± 0,63	No	H358	0,48 ± 0,03	0,54 ± 0,03	No
H358-EMT	12,63 ± 3,46	11,79 ± 0,84	No	H358-EMT	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,03	No

Tabla 8. Resumen de la cantidad de Pt en extracto total (izquierda) y unido al ADN (derecha) comparando la terapia con CDDP frente a la terapia combinada con AQCs-Ag5. En ningún caso los AQCs-Ag5 modifican la entrada de Pt a la célula ni su unión al ADN. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

En base a estos resultados, podemos concluir que 1) las líneas sensibles al CDDP presentan más daño en el ADN porque se une mayor cantidad de Pt y 2) los AQCs-Ag5 no incrementan la cantidad de Pt unido al ADN, por lo que los efectos observados en la línea A2780-cis (que, a pesar de presentar menos Pt unido al ADN, se incrementa el daño en la terapia combinada) no se explican por este motivo. Por ello, decidimos seguir investigando otras vías que expliquen estos resultados.

6.1.4 Exploración de otras vías implicadas en la acción de los AQCs-Ag5 en los modelos de resistencia generados.

Los resultados previos hasta ahora nos dicen que únicamente en la línea A2780-cis la terapia combinada incrementa el daño al ADN, por lo que una vez descartado que el daño sea debido al incremento de Pt unido al ADN, nos preguntamos si el incremento de ROS producido en el interior de la célula por el tratamiento con los AQCs-Ag5[91] podría ser el responsable. Para ello, investigamos el estado de oxidación de la PRDX3 en los diferentes modelos en presencia de AQCs-Ag5, que como ya se ha descrito, puede ser oxidada por acción de los AQCs-Ag5[91].

6.1.4.1 Estado de oxidación de la PRDX3 al tratar con AQCs-Ag5 en los modelos de resistencia generados.

Para ello, se trataron las células 1 hora con los AQCs-Ag5 a diferentes concentraciones, y en algunos casos se empleó como control

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

negativo Ag+ a la máxima concentración que se trataron con los AQCs-Ag5, mientras que el H_2O_2 (200 μM) se empleó como control positivo de oxidación de PRDX3. Dado que la muerte celular de los AQCs-Ag5 está mediada por la oxidación de los grupos tioles, este efecto tóxico podría ser inhibido por los agentes reductores de los grupos tioles, como el 1,4-ditiotreitol (DTT) y la N-acetil-L-cisteína (NAC) [216], por lo que se trató con NAC (0,5 μM) para tener este control.

La oxidación de PRDX3 en las células A549 y A549-senescentes (Fig. 49) incrementó proporcionalmente a la concentración del tratamiento con los AQCs-Ag5, mientras que la máxima concentración de Ag+ (3 μM) no tuvo efecto. Como esperábamos, al tratar con el agente reductor NAC la banda de PRDX3 reducida se recuperó. Cabe destacar que las células A549-senescentes presentaron una oxidación basal de la PRDX3 sin tratamiento con los AQCs-Ag5 mayor que la de las A549 proliferantes, que probablemente se deba a sus elevados niveles de ROS basales (Ver apartado 6.1.1.6). Es por ello, que apreciamos una mayor oxidación de la PRDX3 al tratar con los AQCs-Ag5 en las células senescentes en comparación con las células A549 proliferantes. Sin embargo, estas células siguen siendo más resistentes a la acción de los AQCs-Ag5 (Ver apartado 6.1.1.5).

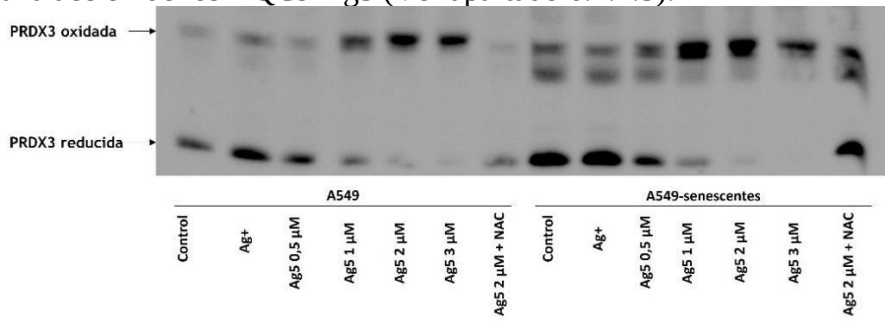


Figura 49. Oxidación de la proteína PRDX3 en las células A549 y A549-senescentes tras 1 hora de añadir AQCs-Ag5. Se analizó por *western blot* la oxidación de PRDX3 en las líneas A549 y A549-senescentes tras tratar con AQCs-Ag5 a diferentes concentraciones crecientes (0.5, 1, 2 y 3 μM) y Ag+ (3 μM). Se trató simultáneamente con NAC y AQCs-Ag5 para revertir el efecto de oxidación de los tioles. Las células A549-senescentes presentaron una mayor oxidación de PRDX3 basal como tras los diferentes tratamientos que las A549.

Las células A2780 WT y A2780-cis se trataron con concentraciones crecientes de AQCs-Ag5 (0.5, 1 y 3 μM) y se empleó H_2O_2 (200 μM)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

como control positivo de oxidación de PRDX3, así como NAC 0,5 μM para revertir el efecto de los AQCs-Ag5; como control también se empleó Ag+ (3 μM) (Fig. 50). En esta ocasión, la línea más sensible a los AQCs-Ag5 (A2780 WT) mostró una mayor oxidación de PRDX3 al ser tratada con las mismas concentraciones de AQCs-Ag5 que la línea resistente A2780-cis y en ambas líneas se incrementaron los niveles de PRDX3 oxidada con el incremento de la concentración del tratamiento.

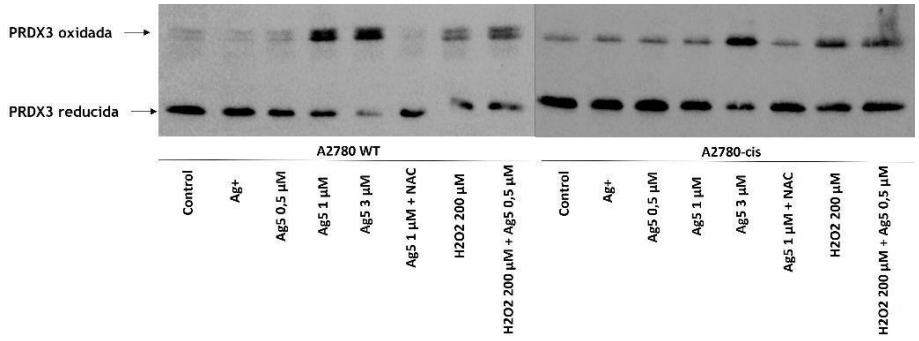


Figura 50. Oxidación de la proteína PRDX3 en las células A2780 WT y A2780-cis tras 1 hora de añadir AQCs-Ag5. Se analizó por *western blot* la oxidación de PRDX3 en las líneas A2780 WT y A2780-cis tras tratar con AQCs-Ag5 a diferentes concentraciones crecientes (0.5, 1 y 3 μM) y Ag+ (3 μM). Se trató simultáneamente con NAC y AQCs-Ag5 para revertir el efecto de oxidación de los tioles y se empleó H_2O_2 (200 μM) solo o en combinación con los AQCs-Ag5 como control positivo y potenciador de los AQCs-Ag5. Las células A2780 WT presentaron una mayor oxidación de PRDX3 que las A2780-cis a las mismas concentraciones de tratamiento con 1 y 3 μM.

Por último, se estudió la oxidación de PRDX3 en la línea H358 (Fig. 51) tras diferentes tratamientos con los AQCs-Ag5. En este caso no se apreciaron grandes diferencias en el patrón de oxidación de ambas líneas, aunque se apreció un incremento en la oxidación de la PRDX3 con las mismas dosis en la línea resistente (H358-EMT), en ambas incrementó la oxidación al incrementar la concentración de tratamiento y se revirtió al emplear NAC (0,5 μM).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

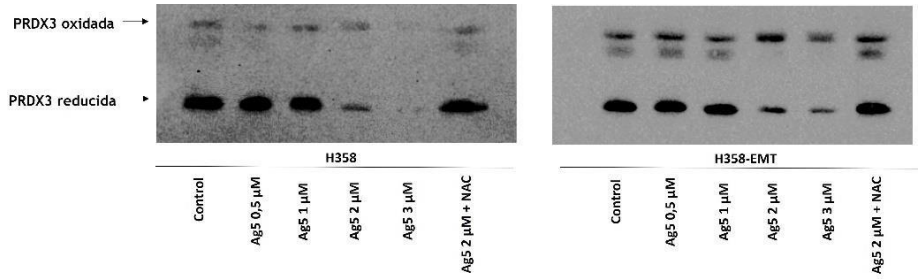


Figura 51. Oxidación de la proteína PRDX3 en las células H358 y H358-EMT tras 1 hora de añadir AQCs-Ag5. Se analizó por *western blot* la oxidación de PRDX3 en las líneas H358 y H358-EMT tras tratar con AQCs-Ag5 a diferentes concentraciones crecientes (0.5, 1, 2 y 3 µM). Se trató simultáneamente con NAC y AQCs-Ag5 para revertir el efecto de oxidación de los tioles. Las células H358-EMT presentan ligeramente una mayor oxidación de PRDX3 que las H358 a las mismas concentraciones de tratamiento.

En todos los casos, en mayor o menor medida, los AQCs-Ag5 produjeron la oxidación de la PRDX3, con el consecuente incremento de ROS al inactivar las principales vías antioxidante que tienen las células. Por lo tanto, no podemos concluir que esta sea la fuente que incrementa el daño en el ADN en la terapia combinada en las células A2780-cis, ya que si no del mismo modo lo haría en otras líneas. Por ello se decidieron seguir estudiando otras vías.

6.1.4.2 Estudio de la muerte celular por apoptosis

El fenómeno de apoptosis se define como la muerte celular programada y para que se produzca, es importante el equilibrio entre las proteínas antiapoptóticas y pro-apoptóticas [217] (Fig. 52).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

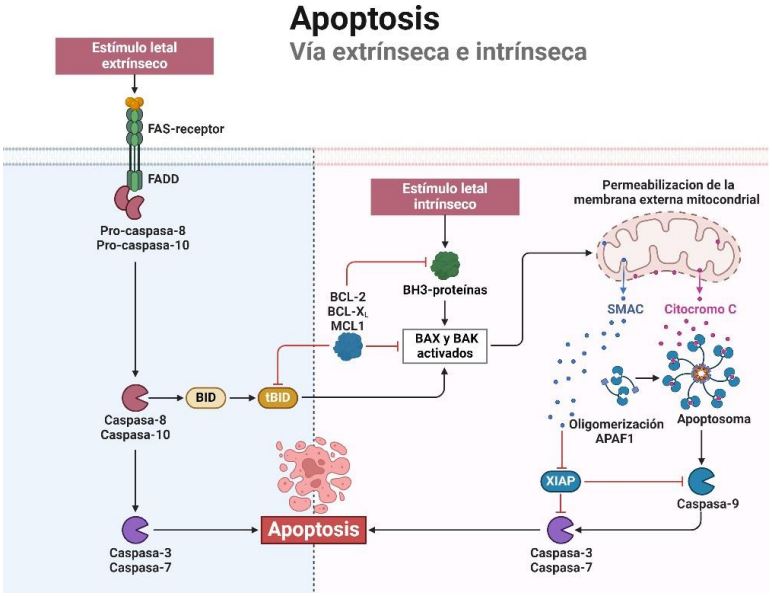


Figura 52. Vía intrínseca y extrínseca de activación de la apoptosis. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que puede desencadenarse a través de dos vías: extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca comienza con señales externas que se unen a los receptores de muerte en la superficie celular (receptor FAS), activando una cascada de caspasas que conduce a la muerte celular. Por el contrario, la vía intrínseca se inicia desde el interior de la célula debido a señales de estrés, lo que hace que las mitocondrias liberen proteínas pro-apoptóticas, como SMAC y citocromo C, que activan las caspasas y provocan la apoptosis. Imagen creada con Biorender.com.

Los miméticos de BH3 son agentes que pueden sensibilizar las células a la apoptosis bloqueando la actividad de las proteínas de la familia BCL-2 que favorecen la supervivencia, como es el caso de ABT-737 [195]. Se sabe alguna de las líneas celulares empleadas presentan resistencia a la muerte celular por este mecanismo, como es el caso de las células senescentes[218,219].

Por ello, se quiso investigar la vía de muerte celular por apoptosis, empleando el compuesto proapoptótico ABT-737, en combinación con los AQCs-Ag5. Para ello, los modelos de resistencia a CDDP generados y sus líneas sensibles (A549, A549-senescentes, H358, H358-EMT y A2780 WT y A2780-cis) fueron pretratados durante 24 horas con el inhibidor ABT-737 (0.5, 1, 5 y 10 μM) y tratados posteriormente con los AQCs-Ag5 durante 1 hora a diferentes concentraciones como se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

detalla a continuación. Su viabilidad se determinó mediante el ensayo del MTT.

En la Fig. 53 podemos ver la mortalidad causada por el inhibidor de BCL-2, ABT-737 (A), por los AQCs-Ag5 (B) y por la combinación de ambos (C), en las células A549 y A549-senescentes. Se puede observar cómo existen grandes diferencias en el efecto que tiene el compuesto ABT-737 sobre las células A549-senescentes y las A549 proliferantes, incrementando significativamente la mortalidad de las senescentes, como se ha descrito. Estos resultados nos muestran que la resistencia a AQCs-Ag5 en las células senescentes está mediada, en parte, por la familia BCL-2 ya que al tratar con ABT-737 el efecto de AQCs-Ag5 se ve claramente incrementado y que la combinación de ambos tratamientos tiene un efecto mayor que cada uno aisladamente.

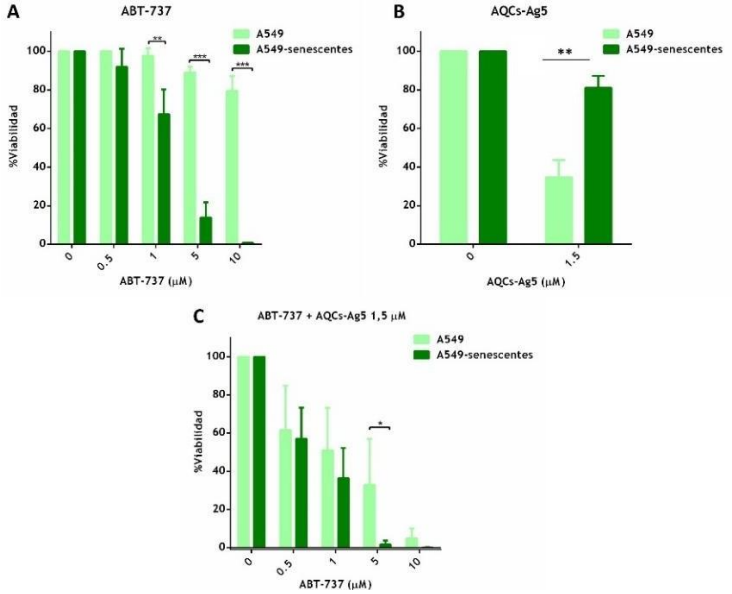


Figura 53. Células A549 y A549-senescentes se trataron durante 24 horas con el inhibidor de BCL-2, ABT-737 (0.5, 1, 5 y 10 μM) (**A**), con los AQCs-Ag5 1 hora (1,5) μM (B) y con la terapia combinada (**C**). La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT 24 h después. Se observa que las células A549-senescentes presentan una sensibilidad mucho mayor al tratamiento con ABT-737 que las células A549 proliferantes, y en ambos casos la combinación con AQCs-Ag5 incrementa aún más la mortalidad celular. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

De igual forma, se estudió el efecto sobre la mortalidad causada por el inhibidor de BCL-2, ABT-737 (A), por los AQCs-Ag5 (B), por la combinación de ABT-737 + AQCs-Ag5 1.5 μM (C) y por la combinación de ABT-737 + AQCs-Ag5 2 μM (D) en las células A2780 WT y A2780-cis (Fig. 54). En este caso, las células A2780 WT y A2780-cis no parecen responder al tratamiento con el inhibidor ABT-737, por lo que la terapia combinada no incrementó la citotoxicidad, probablemente debido a la dispersión entre los distintos experimentos. Sin embargo, la tendencia parece apuntar que A2780 WT es más sensible a la combinación de ABT-373, lo que podría descartar que la resistencia de A2780-cis al CDDP estuviese afectado por la familia BCL-2, más experimentos son ahora necesarios para comprobar este hecho.

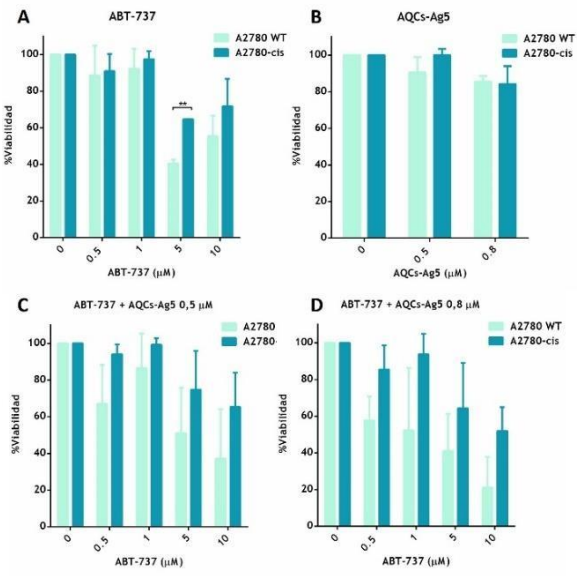


Figura 54. Células A2780 WT y A2780-cis se trataron durante 24 horas con el inhibidor de BCL-2, ABT-737 (0.5, 1, 5 y 10 μM) (**A**), una hora con AQCs-Ag5 (0,5 y 0,8 μM) (**B**), o con la combinación de ABT-737 + AQCs-Ag5 0.5 μM (**C**) y de ABT-737 + AQCs-Ag5 0,8 μM (**D**). La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT 24 h después. En estecaso, las células A2780 WT y A2780-cis no parecen responder al tratamiento con el inhibidor ABT-737, por lo que la terapia combinada no incrementó la citotoxicidad. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por último, se estudió el efecto del inhibidor de BCL-2, ABT-737 (A), de los AQCs-Ag5 (B), de la combinación de ABT-737 + AQCs-Ag5 1,5 µM (C) y de la combinación de ABT-737 + AQCs-Ag5 2 µM (D) en las células H358 y H358-EMT (Fig. 55). Como ocurrió con la línea A2780, las células H358 y H358-EMT no presentaron sensibilidad al tratamiento con el compuesto proapoptótico ABT-737 excepto a la concentración más elevadas, además la EMT parece no afectar al efecto de ABT-737. Sin embargo, cuando el insulto apoptótico es mayor como con la terapia combinada con AQCs-Ag5, que incrementó la citotoxicidad en ambos casos de una manera dosis-dependiente, el efecto es menor tras EMT. Todo ello parece indicar que la línea H358 constitutivamente presenta resistencia a apoptosis mediada por la familia BCL-2 y que esa resistencia se puede ver incrementada tras la EMT. Explorar mejor esta vía necesita de nuevos experimentos.

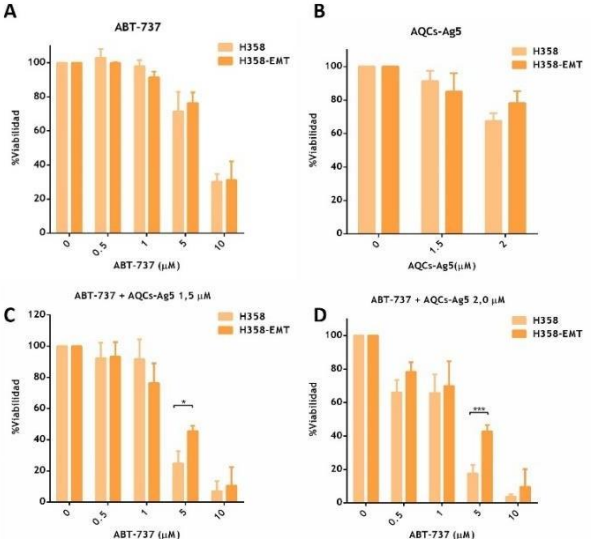


Figura 55. Células H358 y H358-EMT se trataron durante 24 horas con el inhibidor de BCL-2, ABT-737 (0.5, 1, 5 y 10 µM) (**A**), una hora con AQCs-Ag5 (1,5 y 2 µM) (**B**), o con la combinación de ABT-737 + AQCs-Ag5 1,5 µM (**C**) y de ABT-737 + AQCs-Ag5 2 µM (**D**). La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT 24 h después. La máxima dosis testada de ABT-737 (10 µM) incrementa la mortalidad en ambas líneas, y la terapia combinada con los AQCs-Ag5 incrementa la citotoxicidad de ambas terapias individuales de una manera dosis-dependiente. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Dado que las células A549-senescentes presentaron la mayor respuesta al tratamiento con ABT-737 quisimos comprobar si esta línea presentaba mayores niveles de BCL-2. Para ello, se recogieron extractos de la línea sensible y resistente para el estudio de expresión de esta proteína por *western blot* (Fig.56).

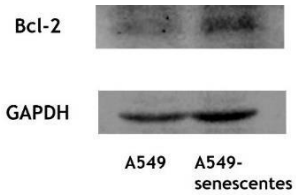


Figura 56. Expresión de BCL-2 en la línea A549 y A549-senescentes. Se generó la línea resistente a CDDP A549-senescentes y se estudió los niveles de BCL-2 en la línea A549 y A549-senesentes. Las células senescentes presentan niveles más altos de BCL-2. Imagen representativa de 2 experimentos independientes.

Estos resultados concuerdan con algunos estudios donde se ha visto que proteínas de la familia BCL-2 están elevadas en células senescentes y proporcionan resistencia a la apoptosis y el tratamiento con ABT-737 induce apoptosis en estas células[220]. Estos resultados muestran que la terapia combinada de inhibidores de proteínas prosupervivencia, como ABT-737 en combinación con los AQCs-Ag5, podría incrementar la citotoxicidad de células tumorales resistentes a CDDP.

6.1.4.3 Estudio de la muerte celular por ferroptosis.

Una de las principales diferencias encontradas entre la línea A2780 y las otras dos líneas (A549 y H358) fueron sus bajos niveles de GSH (ver Fig. 23 en el apartado 6.1.1.6). El papel principal de la GSH es el mantenimiento de la homeostasis redox[102] y su disminución o pérdida puede alterar este equilibrio, como en el caso de las GPx, con efectos como la muerte celular por ferroptosis inducido por la falta de actividad de la glutatión peroxidasa 4 lipídica (GPX4)[196,221]. Debido a este hecho, quisimos estudiar también el papel de la ferroptosis en el tratamiento con los AQCs-Ag5. El proceso de ferroptosis es una forma de muerte celular programada, que es genética, bioquímica y morfológicamente diferente de la necrosis, autofagia y apoptosis, caracterizada por ser una muerte celular oxidativa dependiente de hierro

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y de ROS[222]. Este proceso se caracteriza por la peroxidación de lípidos que se revierte por acción de GPX4 (Fig. 57). GPX4 es una de las ocho diferentes glutatión peroxidasas que tienen los mamíferos, y es una enzima hidroperoxidasa lipídica, cuya función principal es la protección de la membrana plasmática celular de la peroxidación lipídica, ya que reduce los ácidos grasos oxidados y los hidroperóxidos lipídicos, empleando GSH como cofactor[223].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

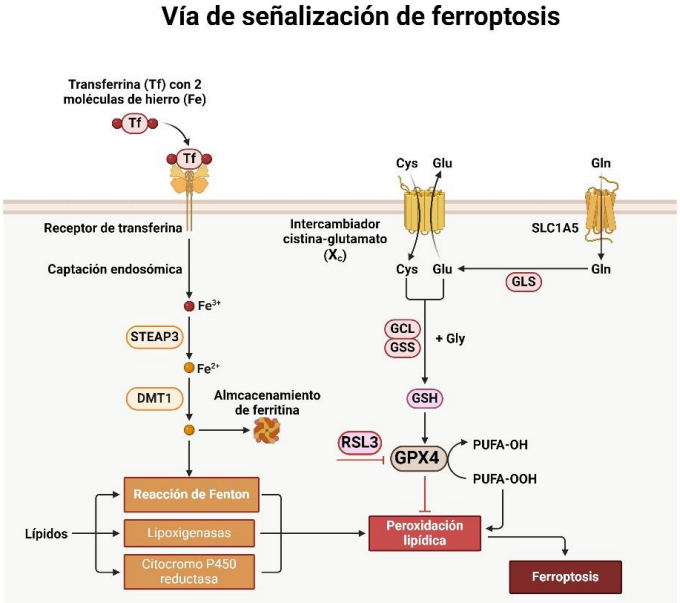


Figura 57. Vía de señalización de la muerte celular por ferroptosis. La ferroptosis se desencadena por la excesiva peroxidación lipídica. La disponibilidad de cisteína (Cys) y de GSH está regulada por el sistema intercambiador de cisteína-glutamato (Xc), que es un sistema de transporte de la membrana plasmática responsable de internalizar cisteína a la célula y liberar glutamato al medio. Gracias a esta vía se puede sintetizar GSH mediante la interconversión de cisteína y homocisteína. La glutamina (Gln) puede transportarse al espacio intracelular mediante el transportador SLC1A5 y luego convertirse en glutamato mediante la glutaminasa (GLS) para afectar la disponibilidad de GSH, que es un cofactor clave de GPX4 para eliminar los peróxidos lipídicos. La supresión del sistema Xc por ciertos inhibidores como RSL3, afecta a la actividad de GPX4, desencadenando la ferroptosis celular. Otro factor importante en la vía ferroptótica y la peroxidación de los PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) es el exceso de hierro, que puede producirse por su absorción a través del receptor TFR1 (proteína receptora de transferrina 1), donde gracias a la STEAP3 se convierte el hierro de una forma férrica insoluble a una forma ferrosa soluble y gracias a la proteína DMT1 que interviene en su paso del endosoma al citoplasma o a la degradación de las reservas de hierro de ferritina, se incrementan las reservas de hierro lábil, siendo las células más susceptibles a la ferroptosis a través de la generación de hidroperóxidos lipídicos (PUFA-OOH) a partir de una reacción similar a la reacción de Fenton. Además, con el incremento de hierro en la célula se incrementa la actividad de las lipoxigenasas, una familia de enzimas que contienen un grupo de hierro no-hémico, y que son las encargadas de catalizar la adición de oxígeno molecular a los PUFAS, o la peroxidación lipídica por parte de la citocromo P450 oxidorreductasa [224], generando como productos los hidroperóxidos correspondientes[225,221]. Imagen creada con Biorender.com.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Debido a los bajos niveles de la GSH en la línea A2780 en comparación con las líneas A549 y H358 y su posible implicación en la muerte celular por ferroptosis, quisimos estudiar esta vía en esta línea celular. Para ello, y debido a la importancia de GPX4 en la vía ferroptótica, se empleó RSL3, un agente proferroptótico que se une a GPX4 y la inhibe[196], impidiendo la protección de la membrana plasmática de la peroxidación lipídica. Sabemos que los AQCs-Ag5 no causan la peroxidación lipídica necesaria para que se produzca la muerte por ferroptosis por estudios previos en nuestro grupo[91], donde tras tratar con los AQCs-Ag5, se midió la peroxidación lipídica por tres métodos diferentes (ensayo de BODIPY, TBARS y fluorescencia de ácido parinárico) y en ninguno de ellos se observó este fenómeno. Sin embargo, nos preguntamos si, las células que sobreviven al tratamiento con los AQCs-Ag5 (células persistentes) -que de acuerdo con el mecanismo de acción de AQCs-Ag5 debieran tener niveles de ROS aumentados-, podrían ser más sensibles a la muerte celular por ferroptosis, como se ha descrito con células persistentes con otras terapias[197].

Para ello, se trataron las células durante una hora con los AQCs-Ag5 y al día siguiente, las células que sobrevivieron se trataron con el inhibidor de GPX4 (RSL3) durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo del MTT.

En primer lugar, se realizó una curva dosis-respuesta del RSL3 con las dos líneas celulares A2780 WT y A2780-cis. Para ello se sembraron 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, se trataron las células con el compuesto proferroptótico RSL3 durante 24 horas, y se midió la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT. Como se puede observar en la Fig. 58, la línea resistente a CDDP A2780-cis, resultó ser más sensible al tratamiento con RSL3 y por tanto a la muerte celular por ferroptosis. El motivo de esta diferencia no la hemos caracterizado.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

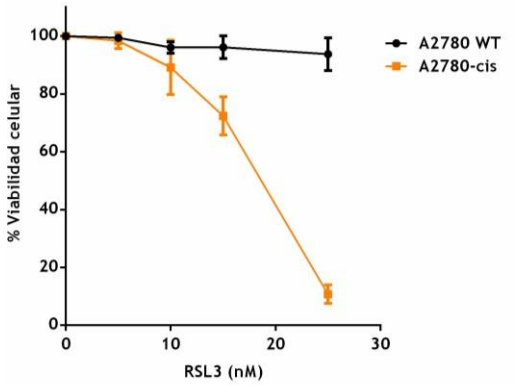


Figura 58. Curva dosis-respuesta de las líneas A2780 WT y A2780-cis al tratamiento con RSL3. Las células fueron tratadas durante 24 horas con RSL3 a diferentes dosis y se midió la viabilidad celular por el ensayo del MTT. Las células A2780-cis son más sensibles al tratamiento con el compuesto proferroptótico RSL3 que las células A2780-WT. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica.

Para ver si podíamos potenciar aún más este efecto en las células resistentes a CDDP, combinamos la terapia con dosis subletales de RSL3 y AQCs-Ag5, pretratando primero 1 hora con los AQCs-Ag5 0,3 y 0,5 μM, dejando las células 24 horas recuperándose y a continuación, las células que sobrevivieron ("células persistentes") se trataron durante 24 horas con RSL3, midiendo la citotoxicidad mediante el ensayo del MTT. Como se muestra en la Fig.59, las células que son tratadas con los AQCs-Ag5 y sobreviven al tratamiento son más sensibles a la muerte por ferroptosis, de una manera dosis-dependiente al tratarlas durante 24 horas con RSL3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

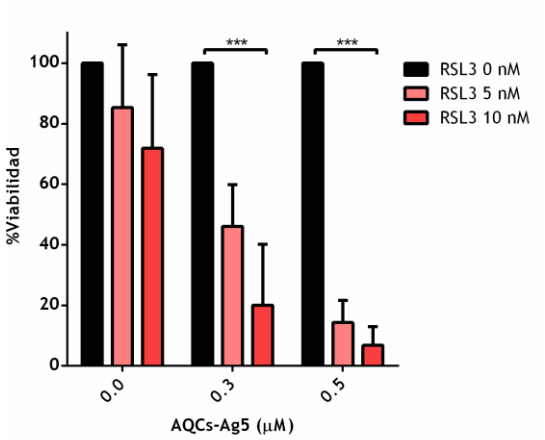


Figura 59. Viabilidad de las "células persistentes" A2780-cis que sobreviven al tratamientocon los AQCs-Ag5 que posteriormente son tratadas con el inhibidor RSL3. Las células A2780-cis se trataron durante 1 hora con los AQCs-Ag5 con las dosis subletales0,3 y 0,5 μM. Se dejaron recuperando durante 24 horas y las células que sobrevivieron("células persistentes"), se trataron con el compuesto proapoptótico RSL3 5 y 10 nM durante 24 horas. Las células que son tratadas con los AQCs-Ag5 y sobreviven al tratamiento son más sensibles a la muerte por ferroptosis. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes, representados por puntos en la gráfica. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para
***p < 0,001.

Estos resultados muestran que la terapia combinada donde se realiza un pretratamiento con los AQCs-Ag5 en la línea resistente a CDDP A2780-cis sensibiliza las "células persistentes" al tratamiento con el RSL3, incrementando la citotoxicidad de las células tumorales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2 EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL HUMANIZADO (SRB1) DIRIGIDO AL RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR9 EN CÁNCER DE PÁNCREAS

En este trabajo se ha investigado el papel del receptor de quimiocina CCR9 en el cáncer de páncreas, uno de los tumores sólidos que, aunque no es de los más comunes, la tasa de supervivencia general una vez diagnosticado es de las más bajas (un 24% el primer año y un 9% en los 5% primeros años)[226].

CCR9 es un receptor acoplado a proteína G (GPCR), responsable del desarrollo y maduración de las células T, cuyo único ligando conocido es la quimiocina TECK (quimiocina expresada en el timo, conocida como CCL25)[144]. La expresión de CCR9 está restringida a las células linfoides del timo, células infiltrantes en el intestino delgado, un pequeño subconjunto de linfocitos T de memoria circulantes (CCR9+α4β7hi), células plasmáticas secretoras de IgA1 y células dendríticas plasmocitoides [155]. El eje receptor-ligando CCR9/CCL25 no solo es responsable del reclutamiento de células inmunitarias en el intestino y el timo, siendo fundamental en el desarrollo de células T, sino que también se ha demostrado que contribuye a la invasividad, la progresividad y la metástasis en tumores sólidos [143].

En este trabajo, se estudió primero la expresión del receptor CCR9 en las líneas de PDAC, Mia PACA-2 y PANC-1 y luego se evaluó la utilidad de un anticuerpo monoclonal terapéutico (SRB1) frente a CCR9, desarrollado por la compañía SunRock Biopharma, testando en primer lugar el efecto citotóxico del anticuerpo en las líneas tumorales de páncreas y luego su capacidad de desarrollar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

6.2.1 Expresión de CCR9 en las líneas celulares de adenocarcinoma ductal de páncreas: MIA PaCa-2 y PANC-1

En primer lugar, se evaluó la expresión de CCR9 en las líneas de PDAC Mia PACA-2 y PANC-1. Se estudió la expresión de CCR9 total de la célula mediante la técnica de *western blot*, así como la expresión en la superficie celular mediante citometría de flujo, empleando un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

anticuerpo anti-CCR9 unido al fluorocromo ficoeritrina (PE).

6.2.1.1 Estudio de la expresión total de CCR9

La cantidad total de CCR9 expresada en las líneas Mia PACA-2 y PANC-1 se midió por *western blot*. Dado que resultados previos del grupo mostraron en otras líneas la expresión dependiente de densidad, se estudiaron diferentes condiciones crecientes, sembrando 25.000 células/cm^2, 40.000 células/cm^2 y 80.000 células/cm^2, para tratar de obtener la densidad celular óptima de mayor expresión del receptor para los estudios de ADCC, empleando como control positivo la línea celular MOLT-4, cuya expresión de CCR9 se sabe es muy elevada. Las células se sembraron y a las 24 horas se recogieron los extractos celulares. Como se aprecia en la Fig. 60, la línea PANC-1 parece incrementar claramente la expresión del receptor en las condiciones de mayor densidad celular, obteniendo la mayor cantidad de expresión sembrando 80.000 células/cm^2, mientras que la línea Mia PACA-2 parece tener valores más bajos, sin ser dependientes del incremento dela densidad celular.

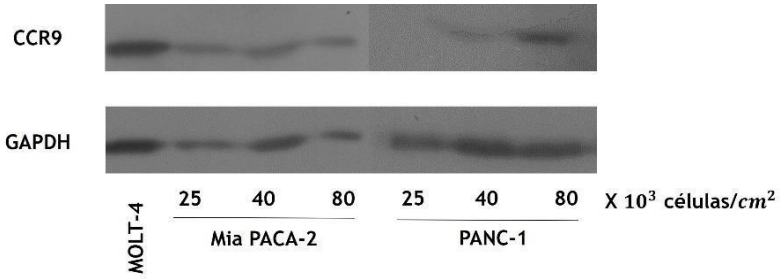


Figura 60. *Western blot* de la expresión de CCR9 total en las líneas celulares Mia PACA-2 y PANC-1. La línea celular PANC-1 incrementa la expresión de CCR9 con el incremento de densidad celular, revelando la mayor expresión a 80 x 10^3 células/cm^2. La línea Mia PACA-2 expresa niveles bajos de CCR9 en todas las condiciones de siembra de densidad celular probadas. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

6.2.1.2 Estudio de la expresión de CCR9 en la superficie celular

Una vez determinados los valores de expresión total del receptor CCR9 en las líneas Mia PACA-2 y PANC-1, se quiso estudiar

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

si el incremento de expresión se mantenía también en el exterior de la célula, dado que, para la terapia con anticuerpos monoclonales dirigidos a una diana específica como CCR9, es crucial la expresión en la membrana. Para ello, se estudió por FACS la expresión a las diferentes condiciones testadas por *western blot*, (25.000 células/cm^2, 40.000 células/cm^2 y 80.000 células/cm^2), sembrándolas durante 24 horas, y recogiendo las células para teñirlas en una placa de 96 pocillos de fondo en U, empleando un anticuerpo anti-CCR9 conjugado con PE, y su isotipo conjugado con PE para el análisis. MOLT-4 se empleó en todos los ensayos como positivo, que como se aprecia en la Fig. 61, la totalidad de la población expresa el receptor CCR9 en superficie.

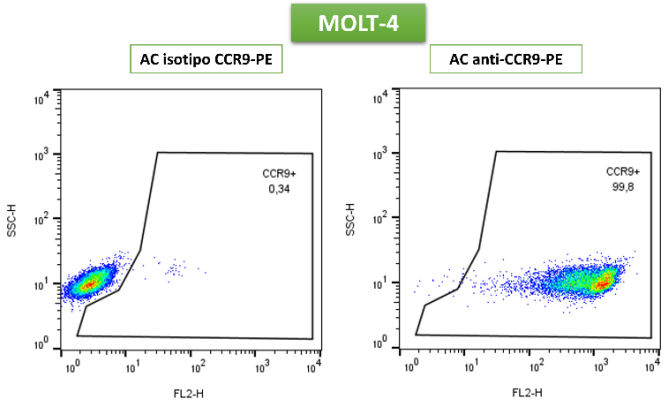


Figura 61. Expresión de CCR9 en la línea MOLT-4. La expresión de CCR9 en la superficie celular de MOLT-4 se empleó como control positivo para todos los ensayos de FACS, dado que independientemente de la densidad celular, la línea altamente expresa el receptor. Imagen representativa creada con el software FlowJo™.

Se estudió primero la expresión del receptor en la línea PANC-1, y acorde con los resultados obtenidos por *western blot*, la línea incrementa su expresión también en superficie a la mayor densidad celular estudiada (80.000 células/cm^2), como se muestra en la Fig. 62. De igual forma se estudió la expresión del receptor en la línea Mia PACA-2 (Fig. 63), y en este caso, el incremento no fue significativo (probablemente debido a la variabilidad entre ensayos).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

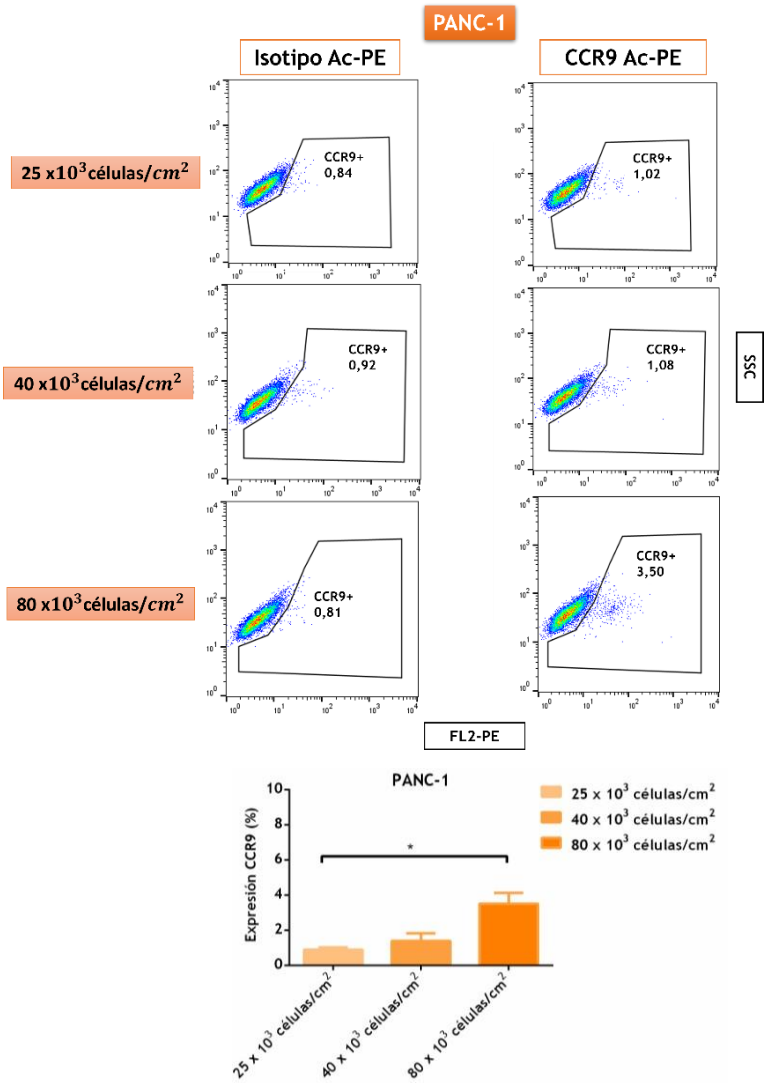


Figura 62. Expresión de CCR9 en la línea PANC-1 en diferentes condiciones de densidad celular. La expresión de CCR9 en superficie incrementa a mayor densidad celular, obteniéndose la máxima expresión con 80.000 células/cm^2, como sucedía con la expresión total. Se muestran imágenes representativas de los ensayos de FACS obtenidas con el software FlowJo™ a las diferentes densidades, y en último lugar la media de los 3 experimentos independientes con su desviación. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

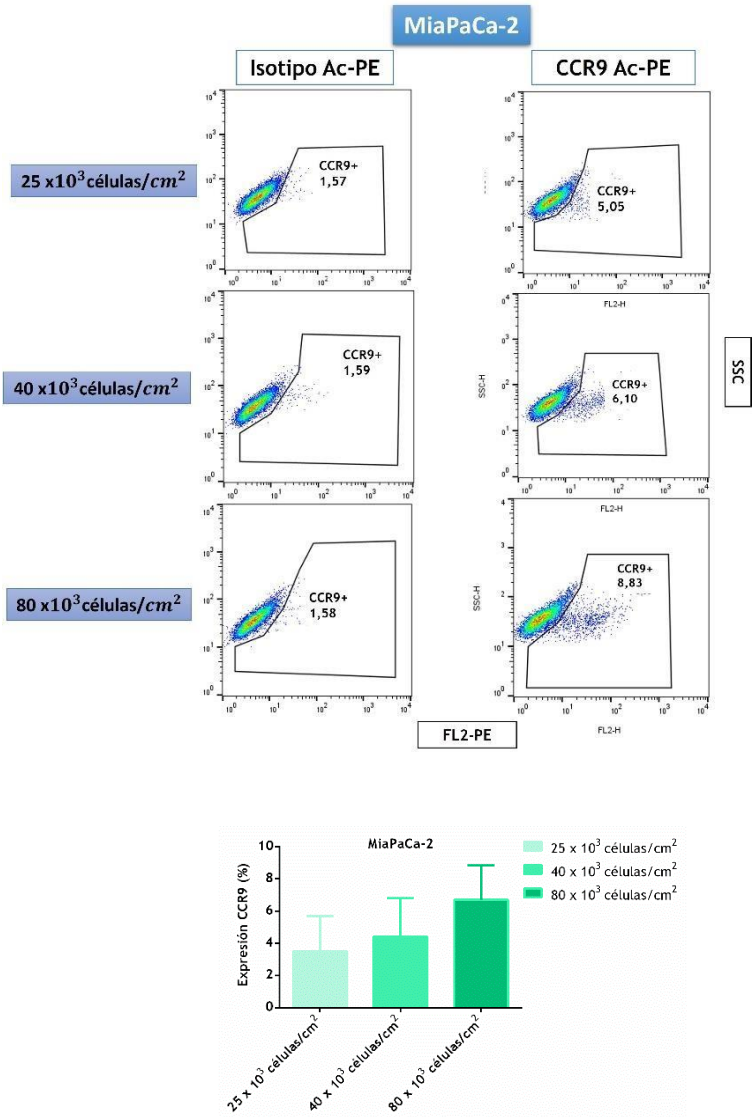


Figura 63. Expresión de CCR9 en la línea Mia PACA-2 en diferentes condiciones de densidad celular. La expresión de CCR9 en superficie no incrementa significativamente en función a la densidad celular. Se muestran tres imágenes representativas de los ensayos de FACS obtenidas con el software FlowJo™ a las diferentes densidades, y en último lugar la media de las 3 repeticiones independientes con su desviación. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En base a estos resultados, se decidió emplear en los ensayos de ADCC la línea PANC-1, dado que se incrementó la expresión del receptor a mayor densidad celular y además descartamos la línea Mia PACA-2 debido a las variaciones entre ensayos, probablemente debido a la heterogeneidad de las células en cultivo[227]. En todo caso, aunque la expresión del receptor fue baja, consideramos que nos permitiría el estudio de la subpoblación de células CCR9+ en las condiciones de cultivo a la máxima densidad celular probada.

6.2.2 Estudio de la citotoxicidad directa del anticuerpo terapéutico SRB1 en las líneas celulares Mia PACA-2 y PANC-1

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos dirigidos a dianas tumorales específicas (como CCR9) en tumores sólidos y líquidos representan la inmunoterapia más empleada, cuya importancia radica en sus efectos directos e indirectos sobre las células tumorales, facilitados por el fragmento de unión al antígeno (Fab) y el fragmento de la región cristalizable (región Fc) del anticuerpo monoclonal, donde el Fab puede modular la función de la diana en la superficie celular en las células tumorales de manera agonista o antagonista, mientras que la región Fc puede ser reconocida por un receptor Fc (FcR) de los leucocitos a través del cual se realizan diversas funciones efectoras, como la ADCC, donde son clave las células asesinas NK [77].

Antes de determinar si el anticuerpo monoclonal SRB1 era capaz de inducir ADCC en presencia de células NK, primero se quiso estudiar la posible citotoxicidad directa en las líneas celulares de estudio, Mia PACA-2 y PANC-1. Para ello, se sembraron las células en placas de 96 pocillos a razón de 4.000 células/pocillo durante 24 horas y se trataron con el anticuerpo terapéutico SRB1 durante 24 horas a diferentes concentraciones: 0, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/ml, determinándose la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Como se observa en Fig. 64, no se obtuvo ningún efecto citotóxico directo del anticuerpo SRB1 sobre las líneas celulares Mia PACA-2 y PANC-1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

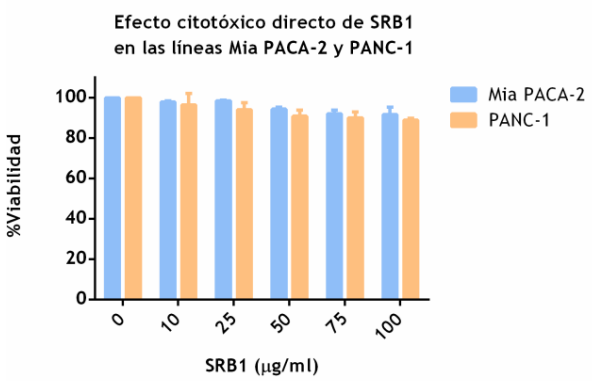


Figura 64. Tratamiento de SRB1 en las líneas Mia PACA-2 y PANC-1 durante 24 horas. Las células se trataron con el anticuerpo terapéutico SRB1 durante 24 horas a diferentes concentraciones: 0, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/ml, determinándose la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Ninguna de las líneas bajo ninguna de las concentraciones empleadas de tratamiento de SRB1 presenta un incremento de la mortalidad respecto al control sin tratar. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes.

6.2.3 Ensayos de ADCC en la línea celular PANC-1

Dado que el anticuerpo terapéutico SRB1 no produjo ningún efecto citotóxico directo significativo sobre las líneas celulares Mia PACA-2 y PANC-1, se quiso determinar si era capaz de inducir ADCC en presencia de células NK, dado que tenemos evidencias previas por resultados de nuestro grupo en líneas de cáncer de ovario que apuntaban a que las células NK eran efectoras de ADCC.

En el proceso de ADCC, las células efectoras del sistema inmunológico (donde las células NK son consideradas las células más importantes en desencadenar este proceso[77,204]), lisa una célula diana tumoral, mediante anticuerpos dirigidos a un antígeno concreto en la superficie de la membrana. Para que se desencadene el proceso de ADCC, por tanto, se requiere de la célula que exprese los antígenos diana, el anticuerpo que reconozca esos antígenos y las células efectoras inmunes que expresan los receptores frente a Fc del anticuerpo (FcR)[142] (Fig. 65).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

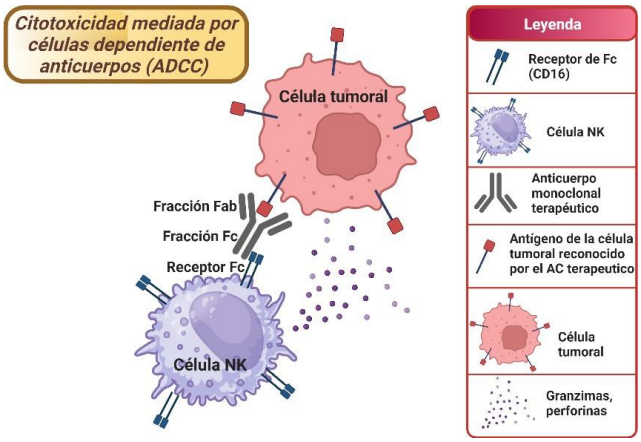


Figura 65. Esquema representativo del proceso de ADCC. El anticuerpo monoclonal terapéutico se une a su diana de la célula tumoral por la región Fab, mientras que la región Fc del anticuerpo es reconocido por el receptor Fc de la célula NK, desencadenando ADCC y la lisis de la célula tumoral. Figura creada con Biorender.com.

Para realizar este estudio de ADCC, en primer lugar, se obtuvieron las células NK a partir de sangre de donantes sanos, y se aislaron empleando un *kit* comercial de *Miltenyi Biotec*. Para comprobar el correcto aislamiento de estas células frente el resto de PBMCs, se realizó su inmunofenotipado. Las células NK constituyen entre el 7 y el 15 % del total de linfocitos en sangre periférica y se conocen diferentes subpoblaciones de células NK, cuya morfología se define como linfocitos grandes granulares y que no expresan el marcador CD3 pero sí la molécula CD56 [228]. Por ello, se empleó una pequeña parte de las células NK aisladas para conocer su pureza, y se realizó un ensayo de FACS donde se emplearon dos anticuerpos, uno frente CD3 marcado con el fluorocromo ficoeritrina (PE) y otro frente CD56, marcado con el fluorocromo aloficocianina (APC). Para ajustar la población se empleó una condición sin teñir, y cada uno de los canales del citómetro fueron ajustados a cero con el isotipo de CD3-PE y el isotipo de CD56-APC. Con la muestra en la que se emplearon los dos anticuerpos, se obtuvo el porcentaje de células CD3- y CD56+. La Fig. 66 es una imagen representativa de los resultados obtenidos tras aislar las células NK del resto de PBMCs, donde se puede ver que la mayoría de las células son CD3- y CD56 +. Sólo se continuó con el ensayo de ADCC

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y se emplearon las células NK que tras el inmunofenotipado se obtuviera como mínimo una pureza de un 70 % de células NK CD3- y CD56+ para evitar alteraciones en el ensayo por la presencia de otros linfocitos que pudieran inducir la muerte de las células tumorales, como por ejemplo los linfocitos T citotóxicos.

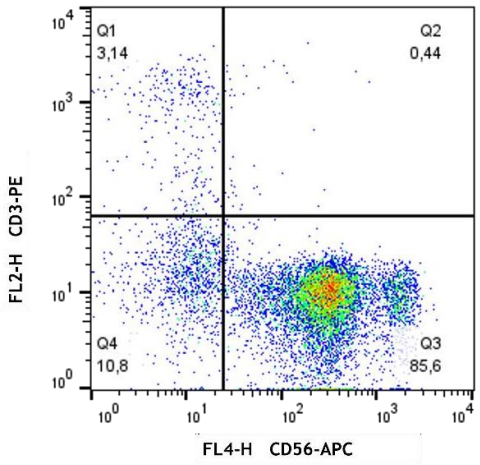


Figura 66. Inmunofenotipado de las células aisladas tras emplear el kit de aislamiento de células NK de *Miltenyi Biotec*. Las células NK son CD3- y CD56+[228], por ello se emplearon dos anticuerpos, CD3-PE y CD56-APC para marcar las células aisladas, que se pasaron por el citómetro de flujo BD FACSCalibur para obtener las medidas de fluorescencia de cada marcador, y conocer así la pureza de las células NK de interés. Imagen representativa de los inmunofenotipados realizados, creada con el software FlowJo™:

Una vez se inmunofenotiparon las células NK aisladas, y se conoció que la pureza era superior al 70% de la población, se continuó con el ensayo de ADCC, poniéndose en cocultivo con las células tumorales PANC-1, en presencia del anticuerpo terapéutico SRB1. Se decidió emplear para estos ensayos únicamente la línea celular PANC-1, y se descartó Mia PACA-2 por diversos motivos, como se comentó anteriormente, como la heterogeneidad de la línea en cultivo, que conllevaba una mayor variación en los ensayos, pudiendo complicar así el análisis de los resultados finales, debido a la complejidad de este. Como se muestra en la Fig.67, el anticuerpo SRB1 anti-CCR9 causó una lisis específica de 45,54 ± 6,35 % (n=3) en la población CCR9+, mientras que el efecto en la población CCR9- fue de 0,56 ± 0,062 %. Estos resultados muestran que el cocultivo de SRB1 (10 µg/mL), con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

células NK durante 4 horas, induce citotoxicidad dirigida específicamente a la población CCR9+ en PANC-1, mientras que la población CCR9- no se ve afectada en ningún caso. Las muestras se analizaron con el software FlowJo™, seleccionando primero la población positiva o negativa de CCR9 y luego, las células muertas se identificaron como Aqua-positivas para ambos grupos. Se comparó el grupo tratado con el anticuerpo monoclonal SRB1 o su isotipo y se calculó la lisis celular específica.

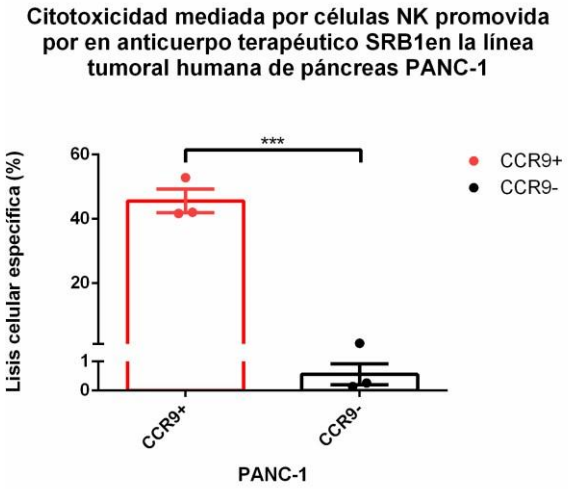


Figura 67. Citotoxicidad mediada por células NK promovida por SRB1 en la línea celular PANC-1. El anticuerpo monoclonal-antiCCR9 SRB1 induce significativamente la lisis celular específica en células PANC-1 CCR9+, mientras que no afecta la viabilidad de las células CCR9-. Las muestras se analizaron con el software FlowJo™, seleccionando primero la población CCR9 positiva o negativa, y dentro de cada una de las poblaciones, las células muertas se identificaron como Aqua positivas para ambos grupos. Se comparó el grupo tratado con el anticuerpo terapéutico SRB1 o su isotipo y se calculó la muerte celular específica como está descrito en otros ensayos de ADCC[155]: 100 × [(% de células diana muertas en muestra (*SRB1)* – % de células diana muertas espontáneas (*isotipo SRB1*)) / (100 – % de células diana muertas espontáneas (*isotipo SRB1*))]. Se muestra la media de 3 repeticiones independientes con su desviación. Se realizó una prueba t no pareada; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Con estos resultados en el cáncer de páncreas, CCR9 podría presentarse como una potencial diana terapéutica.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3 EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NANOSISTEMAS EN MODELOS TUMORALES *IN VIVO*

Aunque sea una de las proteínas oncogénicas alterada con mayor frecuencia en tumores sólidos, el oncogén RAS sigue siendo difícil de abordar como diana terapéutica. El fracaso de la terapia se debe principalmente a su ubicación intracelular, que lo hace poco accesible [229], así como a su complejidad y pequeño tamaño donde se puedan unir los fármacos[173] y al número considerable de modificaciones postranscripcionales[174]. Por este motivo, la nanotecnología ofrece una gran oportunidad para permitir abordar este tipo de dianas intracelulares.

En este trabajo, en colaboración con el grupo Nanobiofar de María José Alonso, se ha querido evaluar la eficacia *in vivo* de nanosistemas que albergan anticuerpos monoclonales o ARNsi, los cuales han sido desarrollados previamente por los investigadores Ana María López y Shubaash Anthiya respectivamente, frente a diferentes mutaciones de esta oncoproteína.

Los LNPs que albergaron los ARNsi-KRAS se formularon basados en tres lípidos de condensación diferentes: DOTAP, cKK-E12 y C12-200 donde se probaron diferentes surfactantes como Tween® 80, DMG-PEG2000 y DSPE-PEG-Maleimida. Por otro lado, los nanosistemas portadores de los anticuerpos monoclonales se crearon empleando la tecnología de HANAs.

Dado que KRAS sigue siendo una de las mutaciones impulsora más comunes en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y de páncreas, asociadas a un mal pronóstico [230,231,232,233,234], en este trabajo se han empleado un modelo subcutáneo de tumor pancreático y un modelo ortotópico de pulmón metastatizado.

6.3.1 Evaluación biológica de nanosistemas cargados con ARNsi-KRAS en un modelo ortotópico de pulmón

Para realizar este estudio, se eligió una secuencia de ARNsi-KRAS de la literatura[186], y se probaron diferentes modificaciones químicas para su eficacia *in vitro*, donde se testó su capacidad de silenciamiento de KRAS y fosfo-ERK así como su capacidad anti proliferativa. Una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vez seleccionado el ARNsi candidato se cargó dentro de nanosistemas lipídicos (LNPs) funcionalizados o no y en base a estudios de biodistribución y toxicidad previos[186] se emplearon las concentraciones adecuadas para hacer los estudios de eficacia antitumoral.

Se evaluó la eficacia in vitro en las células LLC1 de ratón, ya que la idea inicial era trasladar estos resultados a un modelo de eficacia combinando los nanosistemas del ARNsi candidato con inmunoterapia empleando un modelo singénico. Por tanto, en este estudio se evaluó la eficacia *in vitro* e *in vivo* de LNPs cargados con ARNsi-KRAS, empleando líneas que albergan mutaciones para dicha oncoproteína[235,236].

6.3.1.1 Evaluación *in vitro* de LNPs cargadas con ARNsi-KRAS en la línea LLC1

El principal objetivo de este estudio fue evaluar diferentes variantes de ARNsi-KRAS modificado químicamente para determinar la capacidad de silenciamiento del oncogén KRAS. Los diferentes ARNsi fueron vehiculizados en las LNPs como está descrito[186]. De esta forma se realizó un *screening* inicial en la línea LLC1 donde se evaluó la capacidad para silenciar KRAS y otra proteína por debajo de la vía de señalización, ERK 1/2 [230] (Fig. 68), así como su capacidad de disminuir la proliferación celular mediante ensayos de clonogénico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

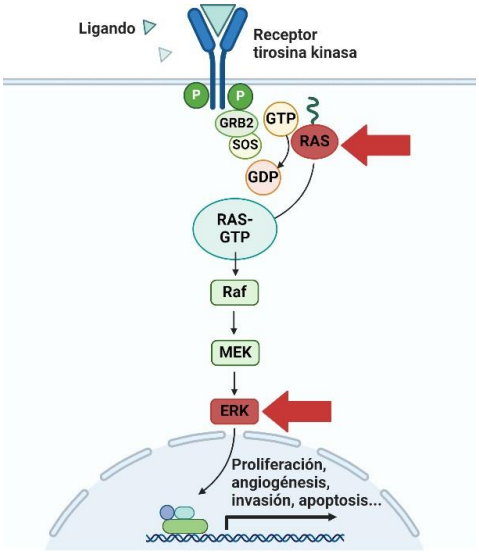


Figura 68. Vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK en la aparición y desarrollo del cáncer. Esta vía puede ser inducida por diversas causas, dando lugar a la activación persistente de la cascada ERK/MAPK en algunos tipos de cáncer [237]. Grb2 (una proteína adaptadora), se une a un dominio de tipo SH2/SH3 fosforilado en el receptor tirosina kinasa y a Sos (un factor intercambiador de nucleótido de guanina), que activa la GTPasa Ras intercambiando un GDP por un GTP. Así se inicia la vía de señalización intracelular MAP quinasa, donde Ras puede activar Raf por fosforilación, que a su vez fosforila a MEK, que a su vez puede fosforilar a ERK. Las proteínas ERK activadas se translocan al núcleo, donde fosforilan y regulan varios factores de transcripción que conducen a cambios en la expresión genética, como proliferación, angiogénesis, apoptosis… Cada quinasa a lo largo de la ruta canónica de la MAP quinasa tiene otros sustratos potenciales además del siguiente en la secuencia MAPK, por lo que la variedad de respuestas celulares que pueden iniciarse por esta vía es muy amplia. Imagen creada con Biorender.com.

Para evaluar la capacidad de las LNPs de ARNsi-KRAS de silenciar su diana, a partir de las mismas células que se recogieron tras los tratamientos para sembrar los clonogénicos, se recogieron extractos celulares para realizar *western blot* y medir la expresión de RAS y una de las proteínas que está por debajo en la vía de señalización, fosfo-Erk 1/2. Para ello se sembraron 250.000 células LLC1/pocillo en placas de 6 pocillos y al día siguiente se incubaron con las LNPs cargadas con los diferentes ARNsi-KRAS; para tener un control positivo del ensayo, se transfectó con ARNsi-KRAS (Lipo-siKRAS) 100 nM, mientras que como control negativo se realizó una transfección con ARNsi-GFP

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Lipo-siGFP) 100 nM, empleando *Lipofectamine RNAiMax/siRNA*. Se incubaron durante 4 horas, se retiraron los tratamientos, se puso el medio completo de las células y se esperó 48 horas para recoger las células de los diferentes tratamientos. Los diferentes ARNsi empleados[186] quedan registrados en la Tabla 9, con el nombre completo y la abreviatura empleada para todos los estudios:

Formulación de ARNsi empleado	Abreviatura
ARNsi-GFP	ARNsi-GFP
ARNsi-KRAS-ESC+	ARNsi-ESC+
ARNsi-KRAS-ESC+[Chol]	ARNsi-Chol.
ARNsi-KRAS-ESC+[LNA]	ARNsi-LNA
ARNsi-KRAS-ESC+[Chol] free	ARNsi-Chol. free

Tabla 9. Variantes de las diferentes formulaciones de ARNsi-KRAS empleadas en los ensayos *in vitro*. Se muestra el nombre completo del ARNsi, así como la abreviatura que se utiliza para cada uno de ellos. Cada una de las modificaciones químicas está descrita Anthiya *et al*. 2023[186].

En primer lugar, se testó la capacidad de silenciamiento de las LNPs con ARNsi-KRAS-ESC+ (100 nM), empleando como control positivo la transfección con lipofectamina de ARNsi-KRAS (Lipo-siKRAS) y como control negativo se empleó ARNsi-GFP (Lipo-siGFP). Como muestra la Fig. 69, las LNPs- ARNsi-KRAS-ESC+ (100 nM), fueron capaces inhibiendo tanto KRAS como la proteína por debajo de la cascada de señalización fosfo-Erk 1/2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

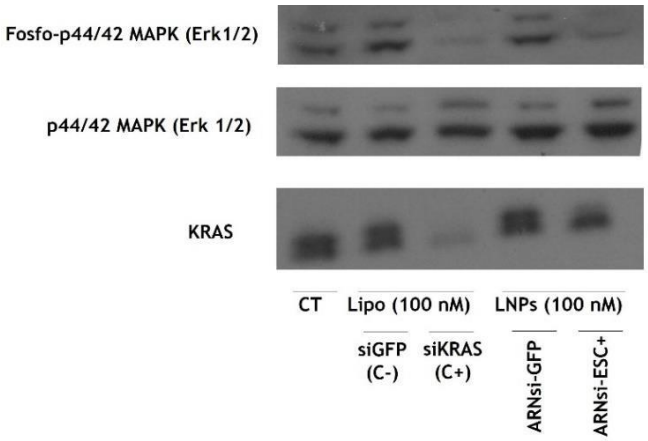


Figura 69. Expresión de KRAS y de Erk 1/2 al tratar las células LLC1 con las LNPs ARNsi-ESC (100 nM). Células LLC1 se trataron durante 4 horas con las LNPs ARNsi-KRAS-ESC+ (100 nM) y se empleó como control negativo y positivo las transfecciones de ARNsi-GFP y ARNsi-KRAS 100 nM respectivamente, empleando *Lipofectamine RNAiMax*; se retiraron los tratamientos y se dejaron las células en el incubador durante 48 horas. La expresión de KRAS y de ERk 1/2 se determinó por *western blot*. Las LNPs- ARNsi-KRAS-ESC+ (100 nM) fueron eficaces inhibiendo tanto KRAS como la proteína por debajo de la cascada de señalización fosfo-Erk 1/2. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes.

En la búsqueda del ARNsi candidato, se evaluaron otras LNPs de ARNsi-KRAS para determinar la capacidad de silenciamiento de KRAS, y en esta ocasión además se acompañaron de ensayos de formación de colonias para ver su capacidad de afectar a la proliferación y supervivencia tras los tratamientos. Para ello, se sembraron 250.000 células LLC1/pocillo en placas de 6 pocillos y al día siguiente se incubaron con las LNPs cargadas con los diferentes ARNsi-KRAS: ARNsi-ESC+ (200 nM), ARNsi-LNA (200 nM), ARNsi-Chol. y ARNsi-Chol. free (200 y 1000 nM); para tener un control positivo y negativo del ensayo, se transfectó con ARNsi-KRAS y ARNsi-GFP 100 nM. Se incubaron durante 4 horas, se retiraron los tratamientos, se puso el medio completo de las células y se esperó 48 horas para recoger las células para realizar los extractos para *western blot* y para hacer el ensayo del ensayo clonogénico, en el cual se sembraron 100 células/pocillo en placas de 6 pocillos, sembrando cada tratamiento por triplicado. Los ensayos de clonogénico se dejaron creciendo en el incubador durante 10-15 días, y se tiñeron con una solución de ácido

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

acético glacial al 4%, metanol al 60% y cristal violeta al 1 % durante media hora, se retiró y por último se contaron las colonias empleando un microscopio Leica DM 2000. Si comparamos con las células sin tratar, como se aprecia en la Fig.70, las LNPs ARNsi-ESC+ (200 nM) fueron las que mayor silenciamiento de KRAS indujeron (n.º colonias en células sin tratar= 66,00 ± 8,72), reflejado en la mayor inhibición del crecimiento de las colonias en el ensayo clonogénico (barra amarilla, n.º colonias= 27,32 ± 6,02), seguido de las LNPs ARNsi-LNA (200 nM) que produjeron en menor medida el silenciamiento de KRAS, inhibiendo en menor proporción el crecimiento de colonias del ensayo clonogénico (barra verde, n.º colonias= 44,62 ± 6,57); en ninguno de los casos se observaron grandes diferencias en ERK 1/2 en la cascada se señalización. El resto de los ARNsi no produjeron ningún tipo de respuesta.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

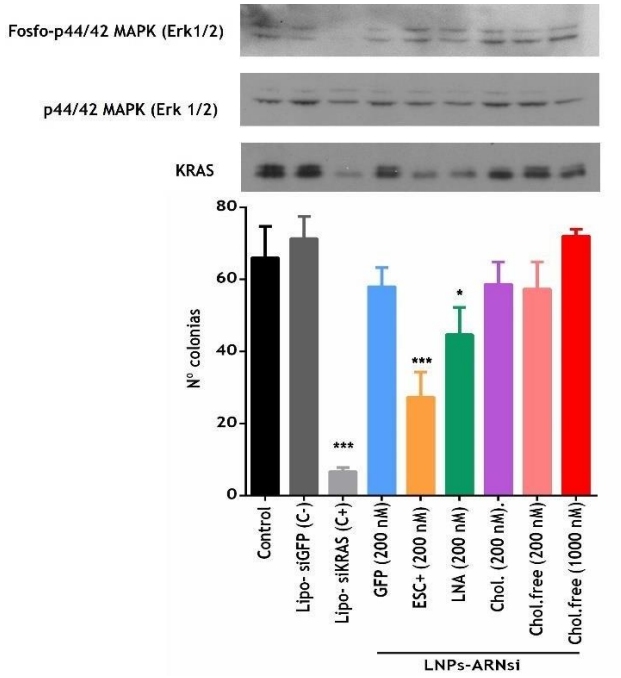


Figura 70. Tratamiento con las LNPs cargadas con ARNsi-KRAS: ARNsi-ESC+ (200 nM), ARNsi-LNA (200 nM), ARNsi-Chol. y ARNsi-Chol. free (200 y 1000 nM). Las células LLC1 se trataron durante 4 horas con las diferentes LNPs de ARNsi-KRAS, donde se empleó como control negativo y positivo las transfecciones de ARNsi-GFP y ARNsi-KRAS 100 nM respectivamente; se retiraron los tratamientos y se dejaron las células en el incubador durante 48 horas, para luego recoger las células para medir la expresión de KRAS y de ERk 1/2 por *western blot* (parte de arriba de la figura) y se sembraron 100 células/pocillo en placas de 6 pocillos por triplicados para el ensayo clonogénico. Comparando con las células sin tratar, las NPLs ARNsi-ESC+ (200nM) produjeron el mayor silenciamiento de KRAS, que se refleja en la mayor inhibición del crecimiento de las colonias en el ensayo clonogénico (barra amarilla, n.º de colonias = 27,32 ± 6,02), seguido de las NPLs ARNsi-LNA 200 nM (barra verde,n.º de colonias= 44,62 ± 6,57). El resto de LNPs ARNsi no produjeron silenciamiento de KRAS. La imagen de *western* blot es representativa de 3 experimentos independientes. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Dado que las LNPs cargadas con con ARNsi-ESC+ y ARNsi-LNA fueron las que más eficazmente silenciaron KRAS, reflejado en la inhibición de la proliferación de las células LLC1 en el ensayo clonogénico, se repitió un último ensayo para confirmar la eficacia de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estas. Para ello, se empleó las LNPs ARNsi-ESC+ (100 y 200 nM) y de los ARNsi-LNA se formularon en dos LNPs diferentes, LNP1 (vehiculizada) y LNP2 (sin vehiculizar), probando igualmente las concentraciones de 100 y 200 nM para ambas. Se procedió como en el anterior ensayo, valorando su capacidad de silenciar KRAS y la inhibición de la proliferación de colonias mediante el ensayo clonogénico. Si comparamos con las células sin tratar, como se aprecia en la Fig.71, las LNPs ARNsi-ESC+ (200 nM) fueron las que mayor silenciamiento de KRAS indujeron (n.º colonias en células sin tratar= 58 ± 7,55), reflejado en la mayor inhibición del crecimiento de las colonias en el ensayo clonogénico (barra amarilla oscura, n.º colonias= 7,00 ± 6,93), seguido de las LNP1 ARNsi-LNA 100 nM (barra verde claro, n.º colonias= 11,00 ± 6,24) y las LNP1 ARNsi-LNA 200 nM (barra verde oscuro, n.º colonias= 18,00 ± 3,00). Las LNP de ARNsi-LNA sin vehiculizar inhibieron también el crecimiento de las colonias en menor medida, al igual que el silenciamiento de RAS (barras moradas), siendo el número de colonias para las concentraciones de 100 y 200 nM 36,67 ± 3,51 y 36,00 ± 6 respectivamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

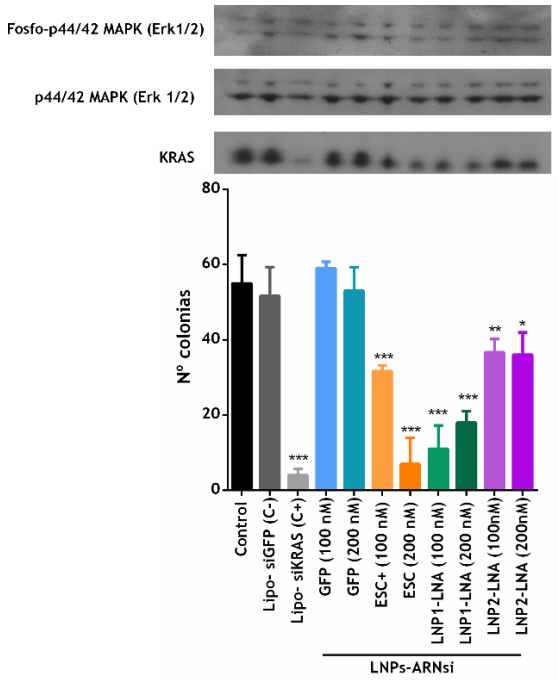


Figura 71. Tratamiento con las LNPs cargadas con ARNsi-KRAS: ARNsi-ESC+ (100 y 200 nM), LNP1 (vehiculizado) o LNP2 (no vehiculizado) ARNsi-LNA (100 y 200 nM). Las células LLC1 se trataron durante 4 horas con las NCs, donde se empleó como control negativo y positivo las transfecciones de ARNsi-GFP y ARNsi-KRAS 100 nM respectivamente; se retiraron los tratamientos y se dejaron las células en el incubador durante 48 horas, para luego recoger las células para medir la expresión de KRAS y de ERk 1/2 por *western blot* (parte de arriba de la figura) y se sembraron 100 células/pocillo en placas de 6 pocillos por triplicados para el ensayo clonogénico (parte de debajo de la figura). Comparando con las células sin tratar, las NPLs ARNsi-ESC+ (200 nM) produjeron el mayor silenciamiento de KRAS, que se refleja en la mayor inhibición del crecimiento de las colonias en el ensayo clonogénico. El resto de NPLs también fueron eficaces en inhibir el crecimiento de los clones, aunque las LNP2 (no vehiculizadas) no mostraron una gran inhibición de RAS en el western blot con ninguna de las concentraciones probadas. La imagen de *western* blot es representativa de 3 experimentos independientes. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3.1.2 Estudio de eficacia antitumoral de LNPs cargadas con ARNsi-KRAS en un modelo ortotópico de pulmón ya establecido.

La idea inicial consistía en emplear las LNPs que mejor funcionaran en los estudios previos *in vitro* para combinarlas con inmunoterapia en un modelo singénico con ratones inmunocompetentes. Para ello, se trató de poner a punto un modelo ortotópico de pulmón empleando células LLC1-luc (que expresan la enzima luciferasa, por lo que, al inyectar luciferina, se produce una señal luminiscente y así podemos monitorizar el crecimiento del tumor). Para ello, se inyectaron en el espacio intercostal del pulmón izquierdo diferentes números de células resuspendidas en PBS 2 % FBS en base a lo descrito[238,239]. A diferentes tiempos, se inyectó luciferina (150 mg/kg por ratón) vía intraperitoneal y las imágenes se adquirieron empleando un IVIS® *Spectrum*, monitorizando de esta forma el crecimiento del tumor primario y su diseminación de una forma semi-cuantitativa. Inicialmente se inyectaron 2 x 10^5 células, pero los animales a los 10 días aproximadamente tuvieron que ser sacrificados por el mal estado a causa de los tumores. Se consideró disminuir el número de células a inyectar a la mitad, empleándose así 1 x 10^5 células inyectadas/animal. Sin embargo, a partir de los 7-8 días de la implantación tumoral los ratones no presentaron mejorías respecto al anterior número de células inyectadas, por lo que los animales tuvieron que ser sacrificados. Por último, se decidió disminuir una vez más el número de células, inyectando 1 x 10^4 células/ratón, consiguiendo alargar el ensayo hasta el día 18, momento en el que se tuvo que establecer el punto final por cuestiones de bienestar animal. En todos los casos, a pocos días de la implantación tumoral se observó una intensa señal de las células tumorales en los pulmones, así como señal de que las células tumorales habían metastatizado a los ganglios de mediastino, encontrando en algunas ocasiones que el tumor ya estaba incluso más diseminado por la cavidad torácica (Fig. 72).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

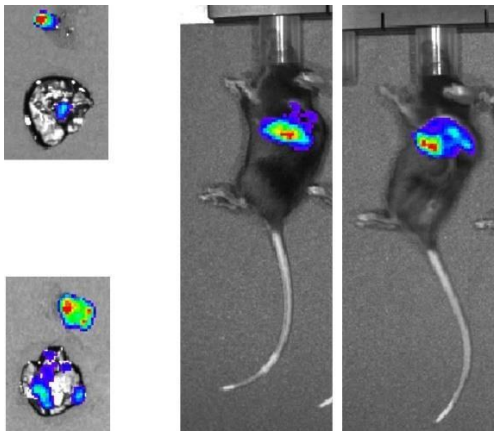


Figura 72. Imagen representativa de muestras y animales generados en el modelo ortotópico de pulmón inyectando células LLC1-luc. En la parte izquierda de la imagen se observa dos muestras *ex vivo* de pulmones y ganglios de mediastino, a pocos días de la implantación tumoral, en todos los casos probados. En la parte derecha de la imagen se observa la señal emitida por la zona de la implantación tumoral. Imágenes adquiridas con *IVIS® Spectrum*, tras inyectar luciferina (150 mg/kg por ratón) vía intraperitoneal.

Consideramos que no era conveniente seguir disminuyendo la cantidad de células a inyectar dado que las variaciones en el experimento podrían incrementar de forma significativa. Esto sumado a la escasa ventana terapéutica que se encontró en todos los casos probados, nos hizo replantearnos el modelo de estudio.

Nos planteamos entonces utilizar un modelo bien caracterizado en el laboratorio[183], que es el modelo ortotópico de pulmón inyectando células A549-luc. En este caso, se tuvieron que emplear ratones inmunodeprimidos, y las LNPs se combinaron con un agente quimioterapéutico (Docetaxel). Dado que, en esta línea, por estudios previos, se conocía que los nanosistemas que mejor funcionaron para silenciar RAS eran las LNPs ARNsi-LNA, se emplearon estas para el ensayo de eficacia. En concreto, se emplearon LNPs de ARNsi-LNA, una de ellas vehiculizada (LNPs ARNsi-KRAS- tLyP1, de 68 nm de tamaño) y otra sin vehiculizar (LNPs ARNsi-KRAS de 56 nm de tamaño).

Para ello, se inyectaron 1 x 10^6 células tumorales A549-Luc en el espacio intercostal del pulmón izquierdo, y a día 13 los tumores estaban completamente desarrollados, por lo que se establecieron los grupos de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tratamiento, con 6-7 animales por grupo (considerando ese día como día 0 del experimento al comenzar los tratamientos): 1) Control sin tratar, 2) LNPs ARNsi-KRAS- tLyP1 (2mg/kg), 3) Docetaxel (5 mg/kg), 4) LNPs ARNsi-KRAS- tLyP1 (2mg/kg) + Docetaxel (5 mg/kg) y 5) LNPs ARNsi-KRAS (2mg/kg) + Docetaxel (5 mg/kg).
Las pautas de tratamiento que se pusieron fueron, durante 3 semanas: Docetaxel (1 vez/semana) y LNPs ARNsi-KRAS- tLyP1 o LNPs ARNsi-KRAS (2 veces/semana). Todas las administraciones fueron vía intravenosa. La representación esquemática del diseño experimental queda detallada en la Fig. 73 A.

En el ensayo de eficacia solamente se compararon datos con un tamaño muestral suficiente, por ello, se representaron los datos hasta el día 30. Durante todo el transcurso del ensayo de eficacia se realizó un estudio de supervivencia, que duró hasta el día 38, donde los ratones murieron o tuvieron que ser sacrificados por el mal estado a causa del tumor. Se observó mediante medidas de bioluminiscencia *in vivo* el comportamiento de los 5 grupos analizando el promedio del tamaño de los tumores desde la inyección ortotópica hasta el punto final (Fig. 73 B) y como indicativo de toxicidad se pesaron los ratones a lo largo de todo el experimento (Fig. 73 C)

Solamente el Docetaxel fue capaz de reducir significativamente el crecimiento tumoral respecto al control, mientras que el tratamiento con las LNPs ARNsi-KRAS- tLyP1 (2mg/kg) solas o la combinación de LNPs ARNsi-KRAS- tLyP1 (2mg/kg) + Docetaxel (5 mg/kg) y LNPs ARNsi-KRAS (2mg/kg) + Docetaxel (5 mg/kg) no tuvieron ningún efecto (Fig. 73 B). En ningún caso se observaron síntomas de toxicidad entre los grupos (Fig. 73 C).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

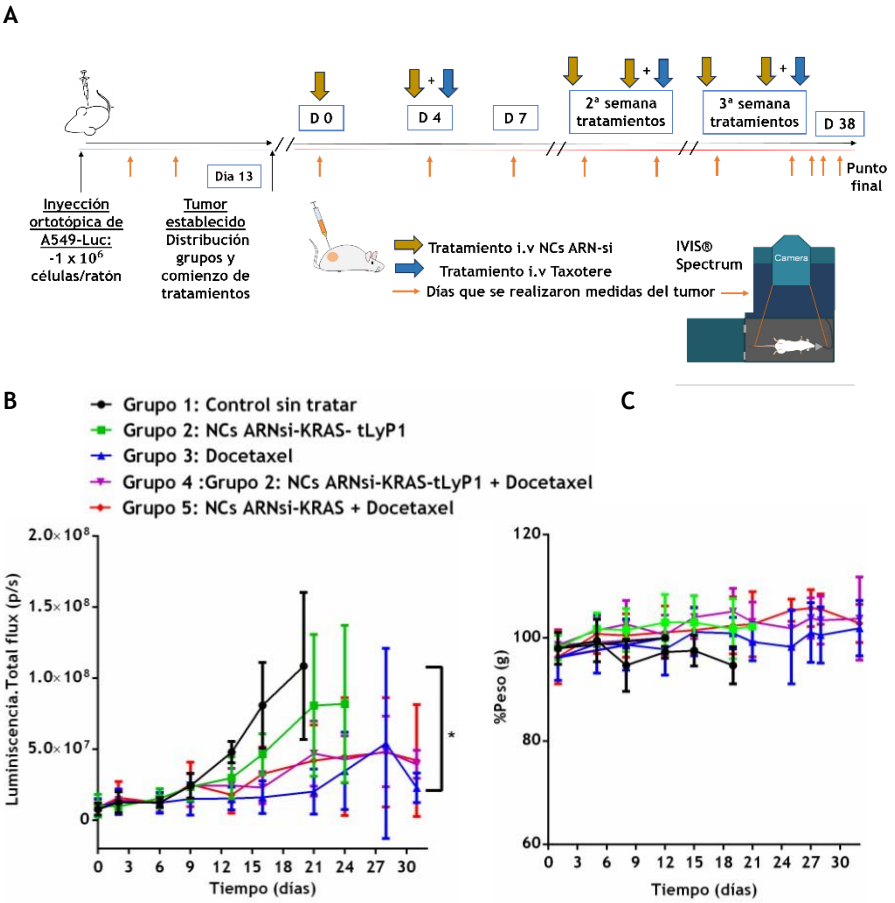


Figura 73. Estudio de eficacia *in vivo* en el modelo tumoral ortotópico de pulmón. A) Representación esquemática del diseño experimental, donde se inyectaron 1 x 10^6 células A549-Luc en el pulmón izquierdo y cuando comenzó a detectarse diseminación de las células tumorales (día 13) se distribuyeron los grupos de tratamiento, considerandolo el día 0 del experimento. Los animales se trataron 2 veces por semana con las LNPs i.v y una vez por semana con Docetaxel i.v durante 3 semanas. Las flechas naranjas indican los días que se realizaron medidas de los tumores. Durante el ensayo de eficacia (que se consideró hasta el día 30 por tamaño muestral de cada grupo) se realizó un ensayo de supervivencia que duró hasta el día 38. **B) Crecimiento del tumor** medido con bioluminiscencia utilizando el sistema de toma de imágenes IVIS; solamente el Docetaxel disminuye el tamaño tumoral. **C) Evolución del porcentaje del peso** durante el transcurso del experimento. No existen síntomas de toxicidad en ningún caso. Los datos representan la media ± SD de 6-7 ratones. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Aunque el estudio de eficacia se consideró hasta el día 30 por tener un tamaño muestral suficiente, se realizó durante todo el ensayo de eficacia un estudio de supervivencia que duró hasta el día 38 (Fig. 74). Los animales del grupo control tuvieron una supervivencia con mediana de 17 días, no muy diferente a la de los del grupo 2 tratados con las LNPs ARNsi-KRAS- tLyP1 (2mg/kg), que tuvieron una supervivencia con mediana de 20 días. Por el contrario, los animales tratados con Docetaxel (5 mg/kg) (G3) o la terapia combinada LNPs ARNsi-KRAS-tLyP1 (2mg/kg) + Docetaxel (5 mg/kg) (G4) y LNPs ARNsi-KRAS (2mg/kg) + Docetaxel (5 mg/kg) (G5) sobrevivieron durante más tiempo, con medianas 37, 34 y 30 días respectivamente. Si comparamos con el grupo control, el tratamiento con las LNPs solas (G2) no incrementó la supervivencia, mientras que el Docetaxel, solo o en combinación con las LNPs (G3, 4 y 5) sí que incrementó la tasa de supervivencia (p=0.0027).

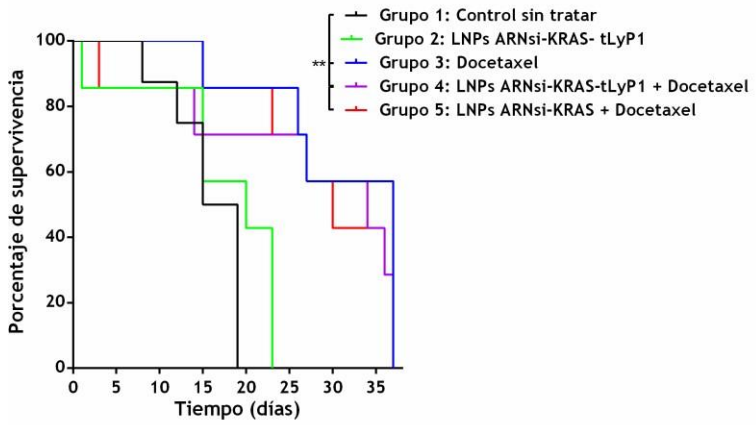


Figura 74. Curva de supervivencia libre de tumor Kaplan-Meier de los diferentes tratamientos debida al tumor después de la primera inyección del tratamiento (día 13 post inyección de las células tumorales). Los animales del grupo control tuvieron una supervivencia con mediana de 17 días, no muy diferente a la de los del G2, que tuvieron una supervivencia con mediana de 20 días. Por el contrario, los animales de los grupos 3, 4 y 5, sobrevivieron durante más tiempo, con medianas 37, 34 y 30 días respectivamente. Si comparamos con el grupo control, el tratamiento con las LNPs solas (G2) no incrementó la supervivencia, mientras que el Docetaxel, solo o en combinación con las LNPs (G3, 4 y 5) sí que incrementó la tasa de supervivencia (p=0.0027). Se realizó un análisis estadístico Long Rank (Mantel Cox).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por lo tanto, en base a estos resultados, podemos concluir que el tratamiento con las LNPs no incrementó la supervivencia de los animales, ni solas, ni en combinación con Docetaxel.

Tras el sacrificio o muerte de los animales se recogieron muestras cuando fue posible del pulmón izquierdo donde se implantó el tumor, que se guardaron a -80 º C hasta su procesamiento. Se realizaron extractos de proteína de los diferentes grupos y se midió la expresión de RAS, realizando un *pool* con diferentes muestras de un mismo grupo de tratamiento.

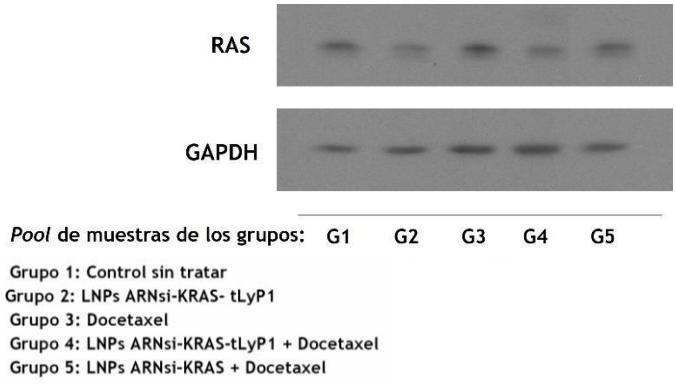


Figura 75. Expresión de RAS en los extractos proteicos obtenidos a partir un *pool* de diferentes tumores de cada grupo. Los grupos de tratamiento 2 y 4 presentan una disminución en la expresión de RAS respecto al control sin tratar (G1).

En base a estos resultados podemos concluir que las LNPs funcionalizadas (G2 y G4) inhibieron RAS, pero parece no ser suficiente para tener efectos biológicos, ya que no fueron capaces de disminuir la carga tumoral ni incrementar la supervivencia.

6.3.2 Evaluación biológica de nanosistemas cargados con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} en un modelo subcutáneo de páncreas

En este estudio se evaluó la eficacia *in vivo* de NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V}, empleando la línea tumoral de páncreas CFPAC-1, que alberga dicha mutación de la oncoproteína[240]. La síntesis de las NCs así como los ensayos previos de su eficacia *in vitro* fueron realizados por el grupo de investigación Nanobiofar, y en este trabajo, evaluamos los nanosistemas *in vivo*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3.2.1 Expresión de NPL-1 en la línea CFPAC-1

Antes de proceder a la evaluación de la eficacia antitumoral de NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} empleando el modelo tumoral pancreático subcutáneo CFPAC-1, se estudió la expresión de neuropilina-1 (NPL-1), dado que en resultados previos, la acumulación de las NCs en las células tumorales mejora gracias al reconocimiento de tLyP1presente en los nanosistemas y su unión al receptor NPL-1 [166].

Para ello, se emplearon las células HUVEC como control positivo de expresión de NPL-1[241], y se midió la expresión del receptor en la línea CFPAC-1 por citometría (Fig. 76), empleando un anticuerpo monoclonal anti-NPL-1 conjugado con PerCP-eFluor™ 710 y su isotipo de ratón IgG1k conjugado con PerCP-eFluor™ 710.

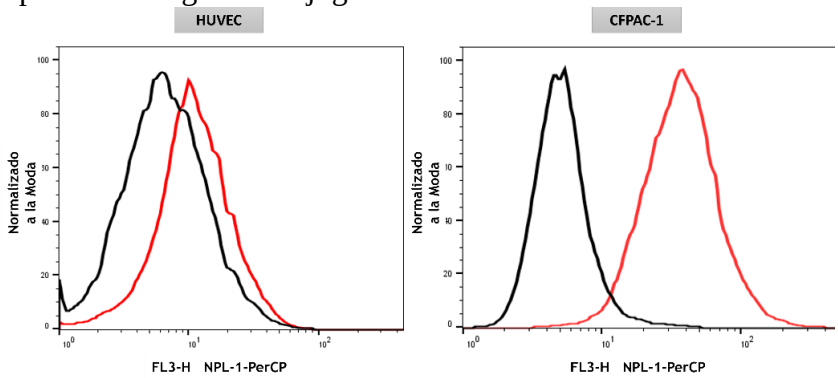


Figura 76. Expresión de NPL-1 en las células HUVEC y en la línea CFPAC-1. Se muestra en negro la tinción con el isotipo y en rojo la tinción con el anticuerpo frente NPL-1. La expresión de NPL-1 en la línea CFPAC-1 es incluso mayor que en el control positivo HUVEC. La imagen es representativa de 3 ensayos independientes realizados por FACS y analizados con el software FlowJo™.

La expresión de NPL-1 en la línea celular CFPAC-1 resultó ser bastante elevada, más que las células HUVEC que se incluyeron en el ensayo como control positivo; tras confirmar la expresión de NPL-1 en la línea tumoral elegida, CFPAC-1, se procedió a los ensayos *in vivo*.

6.3.2.2 Estudio de toxicidad (MTD)

Antes de realizar el estudio de eficacia, se realizó un estudio de toxicidad para evaluar la toxicidad de las NCs a la máxima

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

concentración posible, (3,2 mg/ml). Para ello se inyectaron 2 veces por semana, durante 2 semanas, 100µl de las NCs vía intravenosa y se evaluaron los síntomas clínicos empleando la escala Grimace, monitorizando el peso (Fig. 77) durante todo el tiempo que duró el ensayo y a punto final, recogiendo muestras para realizar análisis bioquímicos (Tabla 10) y hematológicos (Tabla 11), comparando los grupos tratados con los controles. Los resultados del ensayo de toxicidad indicaron la ausencia de toxicidad de las NCs a la máxima concentración posible (3,2 mg/ml), por lo que se trasladó al ensayo de eficacia.

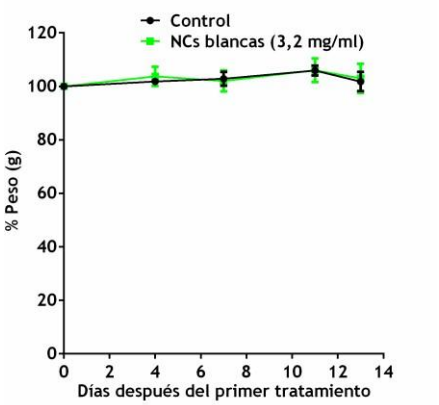


Figura 77. Representación gráfica de la evolución del porcentaje del peso de los ratones. Los pesos de los ratones se monitorizaron durante las dos semanas que duró el estudio de toxicidad, hasta el punto final del experimento. No se observan diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles. Representación gráfica de la media ± SD de 4 ratones por grupo de la evolución del porcentaje del peso de los ratones desde el momento de inicio de los tratamientos, hasta el punto final del experimento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	Control	NCs	Mann-Whitney test (p valor)
ALB (3,8 - 4,3 g/dl)	4,90 ±0,17	4,78 ± 0,10	0,34
ALP (40 - 112 U/L)	93 ± 20,42	89,75 ± 19,70	0,84
ALT (74 ± 52 U/L)	31,67 ± 8,62	24,75 ± 5,32	0,30
AMY (420 -1200)	1278,67 ± 119,56	1176,75 ± 81,00	0,28
TBIL (0,06 - 0,08)	0,37 ± 0,06	0,33 ± 0,10	0,50
BUN (20 - 30 mg/dl)	17,33 ± 2,52	15,25 ± 2,36	0,32
Ca (8,8 - 9,6 mg/dl)	11,39 ± 0,29	11,68 ± 0,62	0,50
TP (6,0 - 7,2 g/dl)	5,93 ± 0,15	5,85 ± 0,39	0,71
GLOB (2,1 - 3,0 g/dl)	1,0 ± 0,10	1,05 ± 0,31	0,77
Glucosa (mg/dl)	179 ± 36,76	162,50 ± 33,28	0,57
Na+145-182 (mmol/dl)	157,67 ± 2,52	153,50 ± 2,38	0,08
K+ 7-11,2 (mmol/dl)	9,43 ± 1,62	9,85 ± 1,56	0,74
FOS (mg/dl)	11,97 ± 2,83	10,70 ± 1,91	0,54
CRE (mg/dl)	0,33 ± 0,12	0,40 ± 0,08	0,44

Tabla 10. Análisis bioquímico. Ratones inmunocompetentes (n=4) fueron inyectados con 100 µl vía intravenosa de las NCs blancas a la máxima concentración posible, (3,2 mg/ml). No se observan signos de toxicidad en el análisis bioquímico. ALB (albúmina); ALP (fosfatasa alcalina); ALT (alanina aminotransferasa); AMY (amilasa); TBIL (bilirrubina total); BUN (Nitrógeno ureico en sangre); Ca (calcio); TP (proteína total); GLOB (globulina); FOS (fósforo); CRE (creatinina).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	Control	NCs	Mann-Whitney test (p valor)
WBC	4,66 ±1,25	6,01 ± 1,61	0,28
RBC	9,87 ± 0,82	9,02 ± 0,89	0,25
HGB (g/L)	144,83 ± 7,28	131,87 ± 10,95	0,13
HCT	46,60 ± 2,63	40,87 ± 3,40	0,06
MCV (fL)	47,38 ± 7,98	45,37 ± 1,22	0,37
MCH (pg)	14,71 ± 0,49	14,62 ± 0,46	0,81
MCHC (g/L)	311,66 ± 17,86	322,25 ± 3,32	0,28
RDW-CV (%)	14,26 ± 1,46	13,70 ± 0,63	0,51
RDW-SD (Fl)	34,75 ± 6,24	31,48 ± 0,82	0,33
PLT	1459,16 ± 99,60	1569,16 ± 214,79	0,46
MPV (fL)	6,00 ± 0,45	6,41 ± 0,46	0,29
PDW	15,45 ± 0,18	15,48 ± 0,16	0,78
PTC	0,87 ± 0,11	0,89 ±0,02	0,79

Tabla 11. **Análisis hematológico.** Ratones inmunocompetentes (n=4) fueron inyectados con 100 µl vía intravenosa de las NCs blancas a la máxima concentración posible, (3,2 mg/ml). No se observan signos de toxicidad en el análisis de hematología. WBC (recuento de glóbulos blanco); RBC (recuento de glóbulos rojos); HGB (hemoglobina); HCT (hematocrito); MCV (tamaño de glóbulos rojos); MCH (cantidad de hemoglobina en un glóbulo rojo promedio); MCHC (concentración de hemoglobina en un glóbulo rojo promedio); RDW (hemograma); PLT (recuento de plaquetas); MPV (volumen plaquetario medio); PDW (ancho de distribución plaquetario); PTC (plaquetocrito).

6.3.2.3 Ensayo piloto del modelo subcutáneo de páncreas. Elección de número de células a inyectar y dosis de Gemcitabina.

Dado que era la primera vez que se realizaba este modelo *in vivo*, quisimos poner a punto las mejores condiciones para el ensayo de eficacia. Para ello, tratamos de establecer el número de células a implantar, para poder tener un tamaño tumoral a un tiempo razonable, así como determinar las dosis de Gemcitabina que se iban a combinar con las NCs, en base lo que estaba publicado[242,243].

Para el desarrollo de este estudio, se inyectaron de forma subcutánea 200 µl de las células CFPAC-1 resuspendidas en PBS (1:1 matrigel) en el flanco derecho de los ratones. Se emplearon dos cantidades de células, un grupo con 1 x 10^6 células inyectadas por ratón, y otro grupo con 3 x 10^6 células, empleando ratones hembra desnudos de la cepa Rj:NMRI-Foxn1 nu/nu (Janvier Labs). Se monitorizó el peso y el estado de los ratones, así como se realizaron medidas de los tumorales 2-3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

veces por semana, calculando el volumen del tumor usando la fórmula $(L \times W^2)/2$, donde L es el largo del tumor, y W es el ancho del tumor. Cuando los tumores alcanzaron los 100 mm^3 se realizaron los subgrupos de tratamiento (control sin tratar y Gemcitabina a diferentes dosis). Se emplearon 6 animales por cada grupo de tratamiento.
Como se observa en la Fig. 78 B, el grupo donde se inyectaron 3×10^6 células tardó 12 días en alcanzar el tamaño medio de tumores que fue cuando comenzó el tratamiento con Gemcitabina (100 mm^3). Se dividieron los ratones en 3 grupos, un grupo control sin tratar, y otros dos grupos que se trataron con 20 mg/kg de Gemcitabina y con 50 mg/kg de Gemcitabina durante 5 semanas, poniendo un tratamiento/semana, como se detalla en la Fig. 78 A. Como se puede ver, ambas dosis de tratamientos disminuyeron casi en su totalidad el tamaño del tumor (Fig. 78 B), por lo que se decidió probar una dosis aún menor de Gemcitabina en el grupo de 1×10^6 células inyectadas, que como alcanzó el tamaño medio de tumores para comenzar el tratamiento con Gemcitabina (100 mm^3) más tarde, a los 26 días (como se observa en la Fig. 79 B), se probó una dosis menor de Gemcitabina, poniendo un tratamiento a la semana de 10 mg/kg durante 5 semanas. En este caso, como se observa en la Fig. 79 B, esta dosis de Gemcitabina inhibió el crecimiento del tumor y lo mantuvo de forma estable. Como indicativo de toxicidad y estado de los ratones se midió el peso en ambos grupos a lo largo de todo el experimento (Fig. 78 C y 79 C) y en ningún caso se observaron diferencias entre los grupos tratados o sin tratar.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

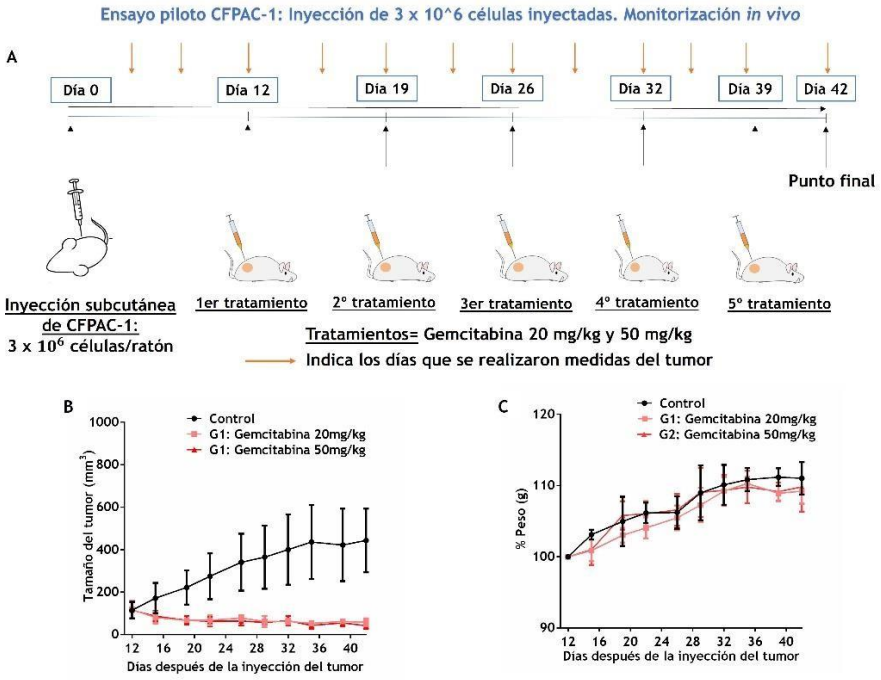


Figura 78. Ensayo piloto *in vivo* de 3 x 10^6 células CFPAC-1 inyectadas. En **A)** se representa esquemáticamente el diseño del experimento, donde se inyectaron 3 x 10^6 células CFPAC-1 de forma subcutánea a día 0, y cuando los tumores alcanzaron 100 mm^3 (día 12) comenzó el tratamiento con Gemcitabina (20 y 50 mg/kg) 1 vez por semana durante 5 semanas. Las flechas naranjas indican los días que se realizaron medidas de los tumores. Se estableció el punto final a día 42 donde se recogieron muestras de los tumores de todos los grupos. **B)** Representación gráfica del crecimiento tumoral medido con un calibre digital y empleando la fórmula (L x W2)/2, donde L es el largo del tumor y W es el ancho del tumor; ambas dosis de Gemcitabina, tanto 20 mg/kg como 50 mg/kg disminuyeron el tamaño del tumor casi en su totalidad. **C)** Representación gráfica de la evolución del porcentaje del peso de los ratones desde el momento de inicio de los tratamientos (día 12) hasta el punto final del experimento, donde no se observó una disminución en el porcentaje del peso de los ratones tratados. Los datos representan la media ± SD de 6 ratones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

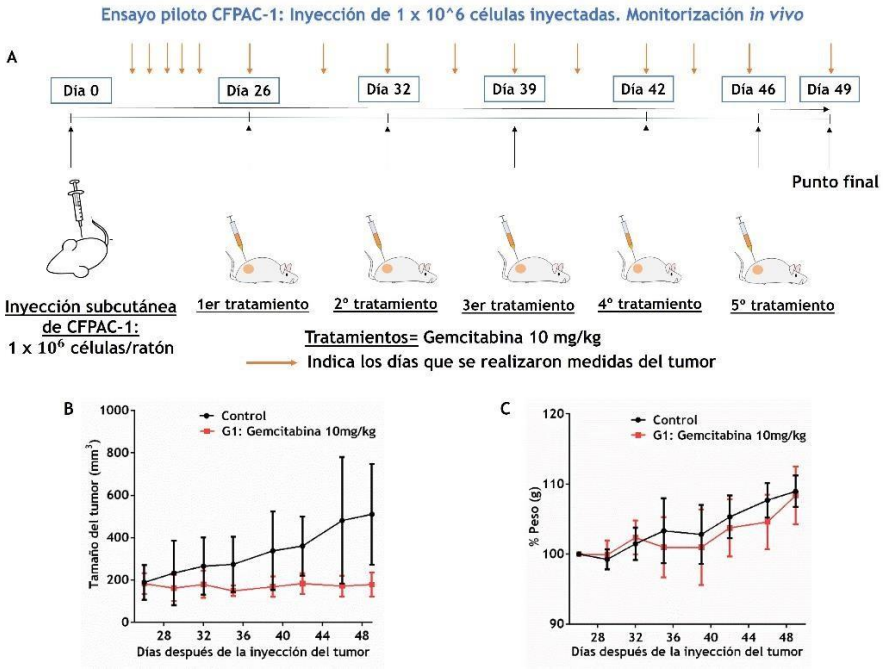


Figura 79. Ensayo piloto *in vivo* de 1 x 10^6 células CFPAC-1 inyectadas. En **A)** se representa esquemáticamente el diseño del experimento, donde se inyectaron de forma subcutánea 1 x 10^6 células CFPAC-1 a Día 0, y cuando los tumores alcanzaron 100 mm^3 (día 26) comenzó el tratamiento con Gemcitabina (10 mg/kg) 1 vez por semana durante 5 semanas. Las flechas naranjas indican los días que se realizaron medidas de los tumores. Se estableció el punto final a día 49 donde se recogieron muestras de los tumores de todos los grupos. **B)** Representación gráfica del crecimiento tumoral medido con un calibre digital y empleando la fórmula (L x W2)/2, donde L es el largo del tumor, y W es el ancho del tumor; la Gemcitabina 10 mg/kg redujo ligeramente el tamaño del tumor y lo mantuvo constante durante las 5 semanas de tratamiento. **C)** Representación gráfica de la evolución del porcentaje del peso de los ratones desde el momento de inicio de los tratamientos (día 26) hasta el punto final del experimento, donde se puede ver que no se observó una disminución en el porcentaje del peso de los ratones tratados. Los datos representan la media ± SD de 6-7 ratones

De esta forma, se decidió que la cantidad de células a inyectar sería 3 x 10^6 células por animal, dado que el tiempo de crecimiento del tumor a una medida de 100 mm^3 donde se establecen los grupos de tratamiento fueron 12 días, frente a los 26 días que tardaron los ratones del grupo que se inyectaron 1 x 10^6. Además, se decidió emplear la dosis de 10 mg/kg que no disminuía de forma tan drástica el crecimiento del tumor,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

si no que mantenía estático el crecimiento y por tanto nos da un margen para poder realizar el estudio de la terapia combinada en el ensayo de eficacia.

Además de decidir la cantidad de células a inyectar y la dosis de Gemcitabina para el ensayo de eficacia, tras las 5 semanas de tratamientos, se sacrificaron los ratones empleando una cámara de CO_2 y se tomaron muestras de los tumores de cada uno de los grupos y subgrupos realizados para realizar extractos proteicos y determinar si se mantiene la expresión de NPL-1 (Fig. 80), como se detalla en elapartado de material y métodos. Aunque ya se había observado por FACS que las células CFPAC-1 expresan alta cantidad de NPL-1 *in vitro*, queríamos asegurarnos de que esta expresión se mantuviera en lostejidos tumorales de los ratones. En los grupos controles y tratados se expresa NPL-1 de una forma heterogénea.

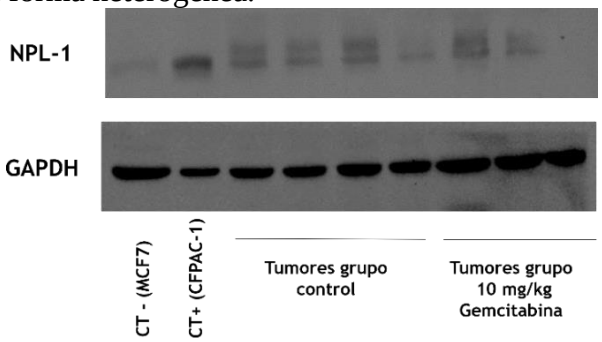


Figura 80. Expresión de NPL-1 en los extractos proteicos obtenidos a partir de los tumores del ensayo piloto. Se empleó como control negativo MCF-7, dado que la referencia de la casa comercial, dentro de las líneas testadas con este anticuerpo, resultó ser la línea con menos expresión. CFPAC-1 se empleó como control positivo. Como se puede observar, en ambos grupos de tumores, tanto los del control que no se trataron como los tratados con Gemcitabina 10 mg/kg, presentan expresión de NPL-1, en diferentes grados.

De esta forma, antes de pasar al ensayo de eficacia, corroboramos que los tumores presentan NPL-1 en los ensayos *in vivo*, y que la Gemcitabina no afecta a su expresión.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.3.2.4 Estudio de eficacia antitumoral de NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} en el modelo subcutáneo de páncreas

Con el fin de comprobar el efecto antitumoral de las NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V}, se realizó este estudio de eficacia antitumoral en un modelo tumoral subcutáneo de páncreas. Para ello, se inyectaron 3 x 10^6 células CFPAC-1 de forma subcutánea en el flanco derecho de ratones hembra desnudos de la cepa Rj:NMRI-Foxn1 nu/nu, en 200 µl de PBS (1:1 matrigel).

Los grupos de estudio se establecieron, una vez los tumores alcanzaron los 100 mm^3, y por tanto se iniciaron los tratamientos, siendo ese punto considerado el día 0 del ensayo. Los grupos realizados fueron, estableciendo 8 animales por grupo: 1) ratones control sin tratamiento, 2) ratones tratados con Gemcitabina 10 mg/kg, 3) ratones tratados con las NCs blancas 10mg/kg (sin anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V}), 4) ratones tratados con las NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} 10mg/kg y 5) ratones tratados con la terapia combinada de Gemcitabina 10 mg/kg + NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} 10 mg/kg.

Las pautas de tratamiento que se pusieron fueron: Gemcitabina 1 vez a la semana (inyección intraperitoneal) y las NCs 2 veces a la semana (inyección intravenosa a través de la cola), como se muestra e la Fig. 81 A. La administración intravenosa de las NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V} impidieron la progresión del tumor, reduciendo de forma significativa el volumen del tumor en el punto final (Fig. 81 B). Este efecto se puede atribuir al bloqueo exitoso *in vivo* del anticuerpo monoclonal frente de la proteína KRAS^{G12V} dentro del tejido tumoral, disminuyendo el volumen del tumor en un 43% y un 33% comparado con los grupos de NCs blancas y el control sin tratar respectivamente. Por otro lado, se observaron efectos inhibitorios del tumor con Gemcitabina como terapia única, como cabía esperar, aunque la terapia combinada no mejoró la inhibición producida solo por la Gemcitabina. Además de la eficacia antitumoral de las NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V}, cabe destacar que apenas hubo diferencias en el cambio corporal en ninguno de los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

grupos (Fig. 81 C), indicando el buen estado de los ratones y ausencia de toxicidad sistemática.

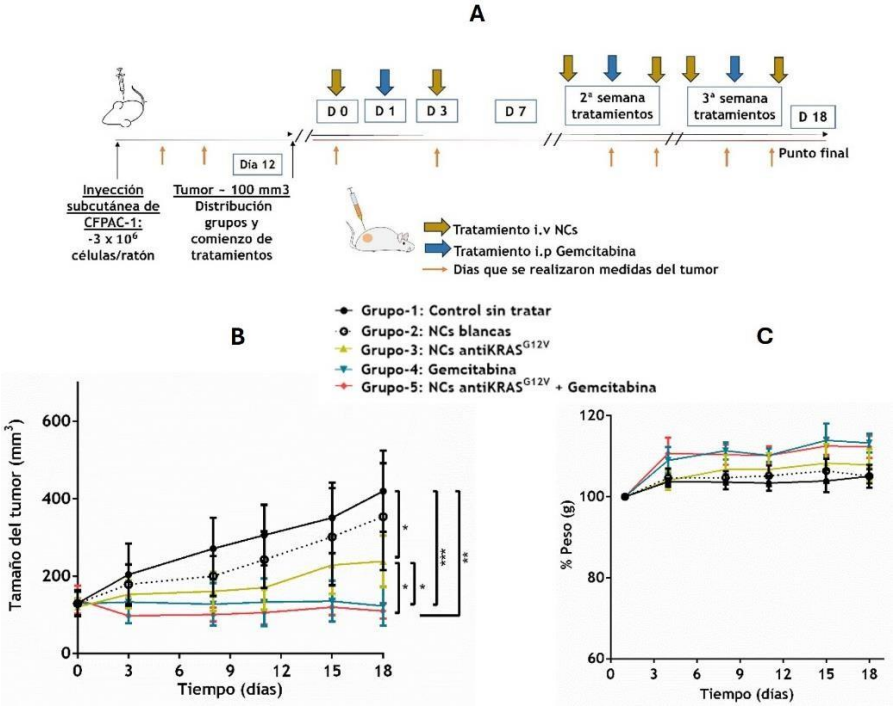


Figura 81. Estudio de eficacia *in vivo* en el modelo tumoral de cáncer de páncreas subcutáneo. A) Representación esquemática del diseño experimental, donde se inyectaron 3 x 10^6 células CFPAC-1 de forma subcutánea y cuando los tumores alcanzaron 100 mm^3 (día 12) se distribuyeron los grupos de tratamiento (considerado día 0 del ensayo), donde se trataron los ratones 2 veces por semana con las NCs i.v y una vez por semana con Gemcitabina i.p durante 3 semanas. Las flechas naranjas indican los días que se realizaron medidas de los tumores. Se estableció el punto final a día 18 donde se recogieron muestras de los tumores de todos los grupos. **B)** Representación gráfica del volumen tumoral medido con un calibre digital y empleando la fórmula (L x W2)/2, donde L es el largo del tumor y W es el ancho del tumor. **C)** Representación gráfica de la evolución del porcentaje del peso de los ratones desde el momento de inicio de los tratamientos, hasta el punto final del experimento, donde no se observó una disminución en el porcentaje del peso de los ratones tratados. Los datos representan la media ± SD de 8 ratones. Se realizó una prueba ANOVA seguida de Post Hoc Tukey; las diferencias fueron consideradas significativas para *p <0,05 y **p<0,01 y muy significativas para ***p < 0,001.

Por último, se recogieron muestras de los tumores en el punto final del experimento. Como muestra la Fig. 82, no existieron diferencias en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el tamaño de los grupos G1 y G2 (control y NCs blancas), mientras que el G3 (NCs cargadas con el anticuerpo monoclonal antiKRAS^{G12V}) presentan una ligera disminución del tamaño y los grupos 4 y 5 (Gemcitabina y terapia combinada) presentaron la mayor disminución del tumor, debida a la acción de la Gemcitabina.

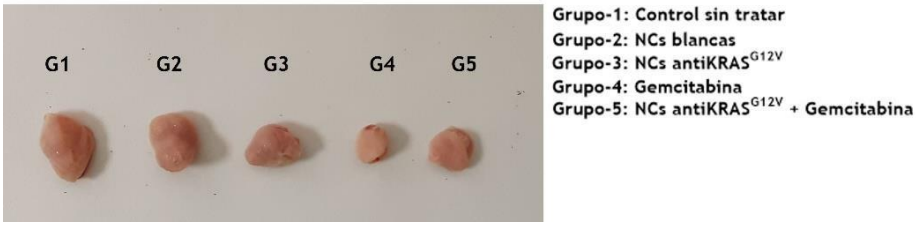


Figura 82. Imagen representativa del tamaño de los tumores obtenidos a punto final del ensayo de eficacia de cada grupo de tratamientos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7 DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han realizado una serie de estudios con los que se pretendía determinar el potencial terapéutico de nuevas terapias innovadoras frente al cáncer, en la búsqueda de terapias cada vez más eficientes y con menos efectos secundarios.

En primer lugar, se realizó una evaluación biológica de los AQCs-Ag5 en diferentes modelos de resistencia a CDDP: células inducidas a EMT[69], células que presentan resistencia al fármaco mediante continua exposición en el tiempo[205] y células senescentes[190].

Dado que los efectos de los AQCs-Ag5[91], así como del CDDP[30], cuya muerte celular depende de la fase del ciclo celular[38,244,213], son diferentes dependiendo de si las células proliferan o están paradas, el hecho de que las células senescentes y las H358 (que están serodeprivadas) estuvieran en estado no proliferativo, podrían presentarse como una limitación del modelo generado, ya que no representa el estado real de las células proliferantes quimiorresistentes. Teniendo esto en cuenta, las líneas que resultaron ser más resistentes al CDDP fueron las H358-EMT seguidas de su línea parental H358, posiblemente debido además a que TP53 está mutado en esta línea[245], y tras estas las A549-senescentes. Mientras que las diferencias en la IC_{50} del CDDP es muy marcada entre las líneas resistentes (R) frente a las sensibles (S) (Tabla 12 A), estas diferencias son mucho menores con los AQCs-Ag5 (Tabla 12 B). Como es bien sabido, TP53 es un factor de transcripción nuclear que se activa en respuesta al daño en el ADN, permitiendo el arresto del ciclo celular y la reparación del mismo; en caso de que este daño sea tan elevado que no se puede reparar, activa el mecanismo necesario para que la célula entre en apoptosis[246]. La única línea que carece de p53 funcional es la línea H358[245], que es la línea que presenta las IC_{50} más elevadas para el tratamiento del CDDP en comparación a las otras dos líneas. Sin embargo, esta diferencia no es tan notable a la acción de los AQCs-Ag5, lo cual podría ser de gran interés en estos casos de resistencia a CDDP.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A

IC_{50} AQCs-Ag5 (μM)	S	R	R/S
A549	1,04	1,74	**1,67**
A2780	0,33	0,61	**1,84**
H358	0,91	1,28	**1,40**

B

IC_{50} CDDP (μM)	S	R	R/S
A549	23,69	101,23	**4,27**
A2780	13,66	41,66	**3,04**
H358	124,38	256,10	**2,05**

Tabla 12. Relación entre las IC_{50} de la línea resistente (R) y sensible (S) al tratamiento con AQCs-Ag5 (A) y CDDP (B). Mientras que las diferencias con los AQCs-Ag5 no son muy marcadas (**A**), encontramos que estas diferencias se magnifican al comparar los cocientes en el tratamiento con el CDDP (**B**), donde se duplica el valor del cociente entre la líneas H358 y A549, poniendo de manifiesto las diferenciasen el mecanismo de acción de los diferentes compuestos y poniendo en valor el hecho de que los AQCs-Ag5 no se vean afectados por la carencia de p53 funcional en el casode las H358[245].

Además, estudiamos la correlación de ciertos parámetros que podrían variar la resistencia al tratamiento con AQCs-Ag5 o al CDDP. Cabría esperar que los mayores niveles de ROS sensibilizaran a la acción de los AQCs-Ag5[91], y si bien esta correlación sucedió con la línea A2780-cis, que con menores niveles de ROS fue menos sensible a la acción de los AQCs-Ag5, esta relación no se guardó en las otras dos líneas (EMT y senescentes) que resultaron más resistentes a la acción de los AQCs-Ag5 a pesar de tener igual o mayores niveles de ROS. Sabemos que BCL-2 está elevado en células senescentes proporcionando resistencia a la apoptosis [218,219] por lo que planteamos que en estos casos sería interesante la terapia combinada con inhibidores de proteínas prosupervivencia, como ABT-737[220] en combinación con los AQCs-Ag5 para incrementar la citotoxicidad.

Por otro lado, el hecho de que dos de las principales vías antioxidantes que tiene la célula, GSH (en las células H358-EMT) y PRDX3 (en las líneas A2780-cis y A549-senescentes) estén incrementados respecto a sus líneas sensibles podría tener una relación directa con la sensibilidad al CDDP así como a los AQCs-Ag5. GSH podría ser uno de los factores clave en la generación de resistencias a CDDP dado que contiene grupos tiol que podrían producir la inactivación citosólica del CDDP mediante la formación de complejos que lo inactivarían[56,57]. De igual forma está descrita la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

quimiorresistencia a CDDP generada en base a altos niveles de PRDX3[97]. Por ello, planteamos que, en estos casos, sería interesante la terapia con AQCs-Ag5, que podrían inhibir el sistema antioxidante Nrf2/GSH sobreexpresado en las células resistentes y así se incrementaría la sensibilidad a la acción del CDDP, como está descrito[96].

La terapia combinada en los modelos de resistencia puso de manifiesto que algunas células resistentes al CDDP se sensibilizaron con la terapia combinada junto a los AQCs-Ag5, lo cual tendría una relevancia importante en la clínica al poder disminuir la dosis de CDDP y por tanto de los efectos secundarios[247]. En otros casos, como el de las células EMT, fue determinante la acción de los AQCs-Ag5 por sí solos, por lo que sería interesante considerar los AQCs-Ag5 como monoterapia para tratar los tumores no proliferativos[247].

Dado el mecanismo de acción del CDDP[244] y su implicación en el daño en el ADN, se estudió las diferencias en los modelos de resistencia, encontrando que en todos los casos probados, todas las líneas sensibles presentaron mayor daño en el ADN con la misma dosis que su correspondiente línea resistente, lo cual podría sugerirnos que el mecanismo de resistencia sería previo a que el CDDP llegara al ADN, como disminuyendo la cantidad de CDDP que entra en la célula, o incrementando su eflujo hacia el exterior, resumidos en la Fig. 83 como “mecanismos antes de la diana” [45,248,34].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

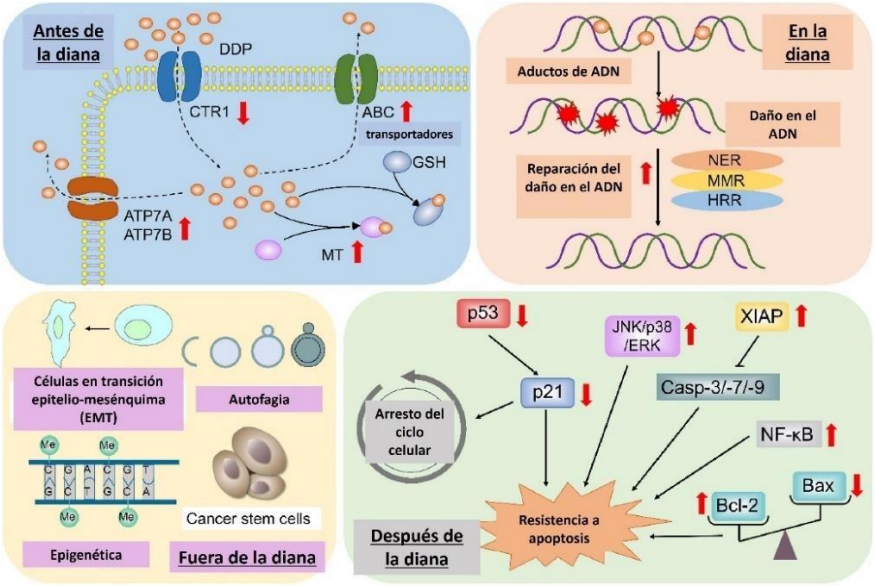


Figura 83. Mecanismos que median la resistencia a CDDP en las células tumorales. CTR 1, transportador de entrada de cobre (proteína de transporte de cobre 1); transportadores ABC, transportadores de unión a ATP; ATP7A/B, transportadores de cobre ATPasa alfa/beta; GSH, glutatión; MT, metalotioneína; NER, reparación por escisión de nucleótidos; MMR, reparación de errores de emparejamiento; HRR, reparación por recombinación homóloga. (Adaptado de Song *et al.*, European Journal of Medicinal Chemistry (2022); con permiso de Elsevier, licencia de uso número 5723020410119).

Se quiso estudiar si los AQCs-Ag5 podrían tener alguna implicación en el daño en el ADN en la terapia combinada, y sorprendió descubrir el comportamiento diferente de las A2780-cis, donde se incrementó el daño respecto al CDDP solo, ya que no está documentado hasta la fecha que los AQCs-Ag5 tengan una relación directa con el daño del DNA, sino con la inhibición de las vías antioxidantes de la célula[91].

Para dar una respuesta a estos hechos se estudió la cantidad de CDDP que accedía a la célula en cada modelo y si los AQCs-Ag5 podrían estar modificando su entrada. Por un lado, confirmamos que menor cantidad de Pt estaba alcanzando su diana en las líneas resistentes, lo que confirmaría nuestra hipótesis de que las líneas resistentes generaron mecanismos "pre-diana" para disminuir su sensibilidad al fármaco e impedir que el CDDP alcanzara el ADN, pero, además, concluimos que los AQCs-Ag5 no modificaban en ningún caso la unión de Pt al ADN,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

por lo que seguíamos sin tener una respuesta al mayor daño producido en la terapia combinada en las células A2780-cis. Estos resultados pusieron también de manifiesto lo que ya conocíamos, diferenciando el mecanismo de acción de los AQCs-Ag5 del de los AQCs-Ag3, que con sólo dos átomos de plata menos, se intercalan en el ADN, produciendo su descompactación e incrementando la accesibilidad a la cromatina, donde su coadministración con CDDP incrementa la cantidad de Pt unido al ADN de las células tumorales sin modificar los niveles de los tejidos sanos [89,90].

Para tratar de explicar el comportamiento de las A2780-cis, nos planteamos si el incremento de los niveles de ROS a causa de la acción de los AQCs-Ag5[91] pudiera estar generando de alguna forma daño en el ADN. Pero descartamos esta idea al hacer una evaluación del estado de oxidación de la PRDX3 en todas las líneas tras ser tratados con los AQCs-Ag5, donde en todos los casos observamos que se producía, en mayor o menor medida, la oxidación de esta vía, incrementando así en los niveles de ROS, por lo que estos hechos no explicarían que el daño se produzca sólo en las A2780-cis.

Este incremento del daño producido en la terapia combinada podría poner como protagonista principal a la GSH, que además de tener un papel primordial en el mantenimiento de la homeostasis redox[194], tiene un papel menos conocido en la formación de los clústeres de Fe-S de la célula, siendo necesarios para la maduración de la maquinaria de las enzimas que procesan y reparan el ADN[249], donde se sabe que actúan como cofactores que desempeñan funciones cruciales en la reparación del ADN[212,250,249]. Dado que la línea A2780 tienen niveles bajos de GSH, y sabiendo que los AQCs-Ag5 no incrementan la cantidad de Pt unido al ADN, planteamos la hipótesis, de que, los AQCs-Ag5 de alguna manera estarían interfiriendo en la reparación de aductos en la línea de CDDP, incrementando así el daño en la línea A2780-cis.

Además, los bajos niveles de GSH en la línea A2780 respecto a las otras líneas, tuvo implicaciones en otras vías, como la alta sensibilidad a la muerte celular por ferroptosis[222], poniendo de manifiesto que probablemente, los bajos niveles de GSH de esta línea, serían una diana interesante para los AQCs-Ag5, sobre todo para la línea resistente al

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CDDP, dado que al oxidar GSH[91] y ser un factor limitante de GPX4 se estaría potenciando la muerte celular por ferroptosis.

Es relevante destacar, que dependiendo de la dosis de AQCs-Ag5 se inducen diferentes formas de muerte celular[91]. Cuando la dosis es baja se induce apoptosis, mientras que las células resistentes a la apoptosis mueren por necrosis cuando se incrementa la dosis y, en último caso, las células resistentes a necrosis mueren por ferroptosis.

En resumen, los AQCs-Ag5 incrementan los niveles mitocondriales de ROS inhibiendo las vías antioxidantes, lo que promueve el inicio de la apoptosis. Aquí hemos caracterizado algunos mecanismos por los que las células pueden ser más resistentes a la acción de los AQCs-Ag5. Los mecanismos estudiados afectan a los eventos de muerte celular posteriores al estrés oxidativo mitocondrial causado por los AQCs-Ag5. En una publicación pendiente de publicar (*The activity of therapeutic molecular cluster Ag5 is dependent on oxygen level and HIF-1 mediated signalling*, de Twigger *et al.*) se han caracterizado los mecanismos mitocondriales que afectan a la actividad de AQCs-Ag5 que, fundamentalmente, es una respiración mitocondrial disminuida -como sucede en hipoxia o durante la glicolisis aerobia-, que impide generar ROS en cantidades suficientes para que la actividad catalítica de AQCs-Ag5 sea relevante. En esta tesis hemos comprobado que aquellas células que son más resistentes a la apoptosis por la sobreexpresión de miembros de la familia de BCL-2 también lo son a la acción de los AQCs-Ag5, algo esperable ya que los AQCs-Ag5 desencadena la vía intrínseca de la apoptosis. Las células que resisten al tratamiento con AQCs-Ag5, que no mueren por apoptosis, son sensibles a la ferroptosis posiblemente debido al incremento en el estrés oxidativo mitocondrial causado. De interés por su posible traslación, es el hecho de que los AQCs-Ag5 potencian la acción de CDDP. Es especialmente relevante que esta potenciación se presente en aquellos modelos que muestran una resistencia mayor a la terapia con CDDP.

En segundo lugar, se evaluó el efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal humanizado SRB1[157], frente a la diana tumoral CCR9[143,151].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una de las principales limitaciones que se presentó en este estudio, fue la baja expresión del receptor *in vitro*, lo cual, aparte de complicar la puesta a punto del experimento, no fue en consonancia con los niveles de expresión del receptor encontrados en muestras de tejidos de tumor pancreático. Poco o nada se conoce sobre el tráfico de CCR9 a la membrana celular, y por qué las células de tumores sólidos no lo expresan en cultivos 2D pero sí en modelos *in vivo* o en los tumores de los pacientes[150], por lo que lo planteamos como una interesante línea de investigación que podría facilitar el estudio de su implicación y mecanismos básicos en modelos previos a los estudios con animales. Es probable que el hecho de que los cultivos celulares se alejen bastante del ambiente tumoral real, donde las interacciones CCL25-CCR9, que aumentan la supervivencia de las células tumorales, incrementan su migración e invasión, y les confieren resistencia a la quimioterapia [151], hagan que ni añadiendo CCL25 a los medios de cultivo consigamos incrementar la expresión del receptor en superficie.

Probablemente por este motivo, la mayoría de aplicaciones con anticuerpos monoclonales anti-CCR9 se basa en modelos *in vitro* e *in vivo* de tumores líquidos como la leucemia, donde el 100% de la población expresa el receptor (como el caso de MOLT4), que han demostrado un gran potencial en la terapia dirigida frente este receptor [154,155, 156,157], pero poco se conoce de la terapia dirigida en tumores sólidos que expresan altamente esta diana, como es el caso del cáncer de páncreas[150].

Si bien consideramos que los resultados de ADCC obtenidos en la línea de PANC-1 se podrían haber replicado en la otra línea de PDAC que se disponía (Mia PACA-2), no fue utilizada por la heterogeneidad de la población en cultivo. Como ya se ha descrito[227], presenta células adherentes redondas y fusiformes, así como células flotantes redondas, y nosotros encontramos que cada población presentaba niveles de expresión diferentes, lo cual complicaría mucho el ensayo a la hora de analizar los datos de ADCC.

En resumen, se ha podido demostrar, que si bien, limitados por los valores de expresión de CCR9 en modelos *in vitro*, el anticuerpo terapéutico SRB1 es capaz de producir ADCC mediada por células NK únicamente en la población CCR9+. Con estos resultados, y dado que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el cáncer de páncreas es uno de los tumores sólidos más letales y con peor pronóstico[251], CCR9 podría presentarse como una potencial diana terapéutica.

Por último, con la finalidad de explorar nuevas estrategias terapéuticas frente al cáncer, se evaluó la eficacia de diferentes nanosistemas frente a mutaciones del oncogén KRAS, que se encuentra alterado en el 90 % de los casos de cáncer de páncreas y el 35% de cáncer de pulmón, siendo dos de los tipos de cáncer con mayores tasas de mutación[168,169].

En primer lugar, se evaluaron *in vitro* LNPs cargadas con diferentes modificaciones químicas de ARNsi-KRAS para determinar la capacidad de silenciamiento del oncogén KRAS, así como su vía de señalización RAS/RAF/MEK[181]. La elección de la línea en la cual se iba a realizar la evaluación fue en consonancia al modelo *in vivo* para el ensayo de eficacia que se tenía pensado utilizar, y dado que se quería emplear un modelo singénico inmunocompetente de ratón, se empleó la línea LLC1 que alberga la mutación G12C [252]. Si bien algunos ARNsi fueron eficaces reduciendo la expresión de KRAS, no siempre fue en paralelo con la reducción total de fosfo-ERK, lo cual podría deberse a que no se estuviera produciendo un silenciamiento completo de la proteína, quedando un porcentaje sin ser alcanzadas por los ARNsi. De cualquier modo, la reducción combinada de KRAS y fosfo-ERK pareció correlacionarse bien con la disminución de la proliferación celular, por lo que fosfo-ERK podría ser un factor determinante para la proliferación celular *in vitro*.

Aunque los mejores candidatos para trasladarlos al modelo *in vivo* por los resultados obtenidos fueron los ARNsi ESC+ y LNA, fue determinante para la elección que finalmente se tuvo que emplear un modelo ortotópico de pulmón inyectando las células A549-luc, en las cuales se había observado que el mejor candidato era el ARN-si LNA.

El cambio del modelo in vivo se tuvo que replantear debido a la agresividad de las células LLC1, que no dieron margen para poder tener suficiente tiempo como para tener una ventana terapéutica en la que observar beneficios con el tratamiento, por lo que se descartó como un buen modelo para este estudio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente se testó la eficacia de las LNPs vehiculizadas elegidas solas y en combinación con Docetaxel, utilizado de forma común para el tratamiento del cáncer de pulmón[253], dado que se sabe que, para reducir KRAS, podría no ser suficiente el tratamiento único para provocar una respuesta terapéutica adecuada[183]. En todo caso, solamente la terapia con Docetaxel fue eficaz disminuyendo el tamaño del tumor, así como incrementando la supervivencia respecto al grupo control y en ningún caso las LNPs tuvieron un efecto biológico.

Estos resultados podrían deberse a varios motivos; en primer lugar, debido a la imposibilidad de poner a punto el modelo *in vivo* con las células LLC1 donde se habían evaluado los ARNsi, hizo que se tuviera que cambiar de línea celular a la A549-luc, en la cual en otros grupos se había observado mayor actividad de los ARNsi LNA. En nuestras manos, en los ensayos *in vitro* el ARNsi que mostró mayor potencial fue ESC+, por lo que cabe la posibilidad de que de haber probado su eficacia *in vivo* hubieran mostrado mayor efecto biológico. En segundo lugar, aunque las LNPs estuvieran funcionalizadas, no se estudió el grado de expresión de NPL-1 en las células A549-luc, por lo que no sabemos si la vehiculización hacia el tejido tumoral mejoró gracias al reconocimiento del receptor, que debería estar sobreexpresado[166]. Otra de las hipótesis por la cual no funcionó la terapia combinada es que al administrarse en conjunto por la misma vía para disminuir el número de inyecciones a los animales, pudieran interaccionar, interfiriendo en su mecanismo de acción[254]. La última hipótesis que planteamos para explicar estos resultados es que, simplemente las LNPs llegaran a su diana, disminuyendo los niveles de KRAS, pero no lo suficiente como para tener unos efectos biológicos *in vivo*, quedando un porcentaje de oncoproteínas activas suficientes para seguir promoviendo el crecimiento del tumor.

En resumen, aunque se sabe que LNPs son el tipo de nanosistemas de "*delivery*" más eficientes para transportar ARNsi a su diana[177,178], su aplicación clínica aún se limita al tratamiento de enfermedades hepáticas y a la administración de vacunas debido a la importante acumulación del ARNsi en el hígado y en el lugar de la inyección tras la administración parenteral[177,178,179,180]. Más investigación es necesaria para que sean eficientes frente a tumores sólidos y tejidos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

extrahepáticos, planteándose como un desafío importante donde aún queda mucho por investigar[255]. Por todos los años de investigación que tienen detrás y el auge producido a raíz del interés tras su éxito en la vacuna de la COVID-19[256], es posible que en pocos años se puedan considerar como una potente herramienta terapéutica frente al cáncer.

Por último, se evaluó la eficacia de NCs portadoras de anticuerpos monoclonales antiKRAS^{G12V}.

En primer lugar, para decidir el modelo *in vivo* más adecuado, se consideraron diferentes líneas celulares, valorando que por un lado que fueran portadoras de la mutación, y que estuviera descrito la expresión de NPL-1 de la línea, ya que las NCs estaban funcionalizadas. Por este motivo se decidió emplear un modelo subcutáneo de páncreas con la línea CFPAC, ya que, además albergar esa mutación[186] estaba descrita su expresión de NPL-1[166].

En un primer ensayo, se quiso comprobar de todas formas la expresión de NPL-1 en la línea, para evitar que fuera un motivo de duda en caso de que no tuvieran efecto biológico en el ensayo de eficacia, resultando ser muy positivas. Otra consideración que tuvimos en cuenta antes del ensayo de eficacia fue el número de células a inyectar[257,258,243] así como como la dosis de Gemcitabina[259,260,261] en base a lo publicado en otros trabajos. Consideramos en base a los resultados que la mayor dosis de células probadas permitiría realizar los ensayos con un tiempo más prudente de duración, y que la dosis de Gemcitabina debería ser la más baja dado que las otras no nos permitirían tener una ventana terapéutica suficiente para ver el efecto de la terapia combinada.

Finalmente se estudió la eficacia de las NCs portadoras de los anticuerpos monoclonales antiKRAS^{G12V} solas y en combinación con Gemcitabina, utilizada de forma común para el tratamiento del cáncer de páncreas[262], dado que se sabe que para reducir KRAS, podría no ser suficiente el tratamiento único para provocar una respuesta terapéutica adecuada[186]. En este caso, las NCs por sí solas tuvieron eficacia disminuyendo el tamaño tumoral, pero no mejoró la inhibición producida solo por la Gemcitabina. En este caso no podemos atribuir estos resultados a la combinación de los tratamientos, ya que se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

administraron por diferentes vías, pero de alguna forma nuevamente pudieron interactuar impidiendo la potenciación de la acción conjunta. Cabe destacar el efecto que tuvieron por sí solas las NCs, que al estar vehiculizadas, probablemente se incrementó su llegada a las células tumorales permitiendo mayor liberación del tratamiento, lo cual puede ser atribuido al bloqueo de KRAS en las mismas.

En resumen, estos resultados muestran una potente actividad antitumoral de las NCs portadoras de anticuerpos monoclonales anti$KRAS^{G12V}$, presentándose como una importante herramienta frente al cáncer de páncreas, dado que esta mutación sigue una potencial diana terapéutica difícil de abordar[189].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8 CONCLUSIONES

1. Los AQCs-Ag5 son una herramienta terapéutica de potencial aplicación en los casos de resistencia a la quimioterapia con CDDP.

2. El receptor CCR9 es una diana terapéutica útil en el cáncer de páncreas y el uso de anticuerpos monoclonales contra esta proteína representa una prometedora aproximación terapéutica.

3. El uso de nanosistemas se presenta como una estrategia viable para dirigir tratamientos frente a dianas intracelulares en cáncer.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9 BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Definition of cancer. https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1.
2. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol*. 2016;7(1). doi:10.5306/wjco.v7.i1.54
3. Paul D. The systemic hallmarks of cancer. *J Cancer Metastasis Treat*. 2020;6. doi:10.20517/2394-4722.2020.63
4. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell*. 2000;100(7).
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
6. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1). doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
7. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Vinals F, Capella G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Curr Pharm Des*. 2009;16(1). doi:10.2174/138161210789941847
8. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017;8(23). doi:10.18632/oncotarget.16723
9. Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)*. 2011;3(3). doi:10.3390/cancers3033279
10. Moses MA, Brem H, Langer R. Advancing the field of drug delivery: Taking aim at cancer. *Cancer Cell*. 2003;4(5). doi:10.1016/S1535-6108(03)00276-9
11. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9). doi:10.3390/ijms21093233
12. Lei Z, Tian Q, Teng Q, et al. Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. *MedComm*. 2023;4(3). doi:10.1002/mco2.265
13. Turajlic S, Furney SJ, Stamp G, et al. Whole-genome sequencing reveals complex mechanisms of intrinsic resistance to BRAF

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inhibition. *Ann Oncol*. 2014;25(5). doi:10.1093/annonc/mdu049
14. Ma Y, Wang L, Neitzel LR, et al. The MAPK pathway regulates intrinsic resistance to BET inhibitors in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(8). doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0453
15. Kalbasi A, Ribas A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(1). doi:10.1038/s41577-019-0218-4
16. Saleh R, Elkord E. Acquired resistance to cancer immunotherapy: Role of tumor-mediated immunosuppression. *Semin Cancer Biol*. 2020;65. doi:10.1016/j.semcancer.2019.07.017
17. Meador CB, Hata AN. Acquired resistance to targeted therapies in NSCLC: Updates and evolving insights. *Pharmacol Ther*. 2020;210. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107522
18. Wicki A, Mandalà M, Massi D, et al. Acquired resistance to clinical cancer therapy: A twist in physiological signaling. *Physiol Rev*. 2016;96(3). doi:10.1152/physrev.00024.2015
19. Hu X, Zhang Z. Understanding the Genetic Mechanisms of Cancer Drug Resistance Using Genomic Approaches. *Trends Genet*. 2016;32(2). doi:10.1016/j.tig.2015.11.003
20. Kara A, Özgür A, Nalbantoğlu S, Karadağ A. DNA repair pathways and their roles in drug resistance for lung adenocarcinoma. *Mol Biol Rep*. 2021;48(4).doi:10.1007/s11033-021-06314-z
21. Damia G, Broggini M. Platinum resistance in ovarian cancer: Role of DNA repair. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1). doi:10.3390/cancers11010119
22. Marine JC, Dawson SJ, Dawson MA. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(12). doi:10.1038/s41568-020-00302-4
23. Allain EP, Rouleau M, Lévesque E, Guillemette C. Emerging roles for UDP-glucuronosyltransferases in drug resistance and cancer progression. *Br J Cancer*. 2020;122(9). doi:10.1038/s41416-019-0722-0
24. Buß I, Hamacher A, Sarin N, Kassack MU, Kalayda G V. Relevance of copper transporter 1 and organic cation transporters

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1-3 for oxaliplatin uptake and drug resistance in colorectal cancer cells. *Metallomics*. 2018;10(3). doi:10.1039/c7mt00334j

25. Giddings EL, Champagne DP, Wu MH, et al. Mitochondrial ATP fuels ABC transporter-mediated drug efflux in cancer chemoresistance. *Nat Commun*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-23071-6
26. Wang JQ, Yang Y, Cai CY, et al. Multidrug resistance proteins (MRPs): Structure, function and the overcoming of cancer multidrug resistance. *Drug Resist Updat*. 2021;54. doi:10.1016/j.drup.2021.100743
27. Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer. *Drug Resist Updat*. 2016;24. doi:10.1016/j.drup.2015.11.004
28. Wu P, Gao W, Su M, et al. Adaptive Mechanisms of Tumor Therapy Resistance Driven by Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9. doi:10.3389/fcell.2021.641469
29. Gandin V, Hoeschele JD, Margiotta N. Special Issue "Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action 3.0." *Int J Mol Sci*. 2023;24(9). doi:10.3390/ijms24097917
30. Alassadi S, Pisani MJ, Wheate NJ. A chemical perspective on the clinical use of platinum-based anticancer drugs. *Dalt Trans*. 2022;51(29). doi:10.1039/d2dt01875f
31. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008;7(1). doi:10.2174/187152007779314044
32. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22). doi:10.1073/pnas.162491399
33. Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J Cancer Sci Ther*. 2019;11(4).
34. Chen SH, Chang JY. New insights into mechanisms of cisplatin resistance: From tumor cell to microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17). doi:10.3390/ijms20174136

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

35. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: Apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol*. 1996;270(4 PART 2). doi:10.1152/ajprenal.1996.270.4.f700
36. Nam TG. Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicol Res*. 2011;27(1). doi:10.5487/TR.2011.27.1.001
37. Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med*. 1998;131(6). doi:10.1016/S0022-2143(98)90060-9
38. Shaloam R D. Preclinical Assessment of Low Doses of Cisplatin in the Management of Acute Promyelocytic Leukemia. *Int J Cancer Res Mol Mech (ISSN 2381-3318)*. 2015;1(3). doi:10.16966/2381-3318.113
39. Shen L, Wen N, Xia M, et al. Calcium efflux from the endoplasmic reticulum regulates cisplatin-induced apoptosis in human cervical cancer hela cells. *Oncol Lett*. 2016;11(4). doi:10.3892/ol.2016.4278
40. Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, et al. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. *Oncol Rep*. 2013;29(4). doi:10.3892/or.2013.2279
41. Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2004;286(2 55-2). doi:10.1152/ajprenal.00192.2003
42. Berry JM. Modification of cisplatin toxicity with diethyldithiocarbamate. *J Clin Oncol*. 1990;8(9). doi:10.1200/jco.1990.8.9.1585
43. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(12). doi:10.1093/ndt/12.12.2478
44. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012;31(15). doi:10.1038/onc.2011.384

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

45. Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X, Zhu X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10. doi:10.2147/DDDT.S106412
46. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res*. 2016;106. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.001
47. Lugones Y, Loren P, Salazar LA. Cisplatin Resistance: Genetic and Epigenetic Factors Involved. *Biomolecules*. 2022;12(10). doi:10.3390/biom12101365
48. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, et al. Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future. *Cell Death Dis*. 2014;5. doi:10.1038/cddis.2013.428
49. Katano K, Kondo A, Safaei R, et al. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellularpharmacology of copper. *Cancer Res*. 2002;62(22).
50. Safaei R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett*. 2006;234(1). doi:10.1016/j.canlet.2005.07.046
51. Kuo MT, Fu S, Savaraj N, Chen HHW. Role of the human high-affinity copper transporter in copper homeostasis regulation and cisplatin sensitivity in cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 2012;72(18). doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0888
52. Müller J, Lips KS, Metzner L, Neubert RHH, Koepsell H, Brandsch M. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharmacol*. 2005;70(12). doi:10.1016/j.bcp.2005.09.011
53. Molnár J, Engi H, Hohmann J, et al. Reversal of multidrug resitance by natural substances from plants. *Curr Top MedChem*. 2010;10(17).
54. Kaarteenaho-Wiik R, Lehtonen S, Kinnula VL, et al. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol*. 2002;196(3). doi:10.1002/path.1042
55. Korita P V., Wakai T, Shirai Y, et al. Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2010;23(4). doi:10.3892/or_00000721

56. Silva MM, Rocha CRR, Kinker GS, Pelegrini AL, Menck CFM. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-54065-6
57. Kuo MT, Chen HHW. Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs*. 2010;2010. doi:10.1155/2010/430939
58. Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, et al. ERCC1-XPF Endonuclease Facilitates DNA Double-Strand Break Repair.*Mol Cell Biol*. 2008;28(16). doi:10.1128/mcb.00293-08
59. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5). doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-2238
60. Saldivar JS, Wu X, Follen M, Gershenson D. Nucleotide excision repair pathway review I: Implications in ovarian cancer and platinum sensitivity. In: *Gynecologic Oncology*. Vol 107. ; 2007. doi:10.1016/j.ygyno.2007.07.043
61. Usanova S, Piée-Staffa A, Sied U, et al. Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Mol Cancer*. 2010;9. doi:10.1186/1476-4598-9-248
62. Chang IY, Kim MH, Kim HB, et al. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;327(1). doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.008
63. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9). doi:10.1038/nrc1431
64. Farmer H, McCabe H, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434(7035). doi:10.1038/nature03445
65. Albertella MR, Green CM, Lehmann AR, O'Connor MJ. A role for polymerase η in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. *Cancer Res*. 2005;65(21). doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1095

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

66. Bassett E, Vaisman A, Tropea KA, et al. Frameshifts and deletions during in vitro translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases β and η. *DNA Repair (Amst)*. 2002;1(12). doi:10.1016/S1568-7864(02)00150-7
67. Ren JH, He WS, Nong L, et al. Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010;25(1). doi:10.1089/cbr.2009.0701
68. Ingruber J, Dudas J, Sprung S, Lungu B, Mungenast F. Interplay between Partial EMT and Cisplatin Resistance as the Drivers for Recurrence in HNSCC. *Biomedicines*. 2022;10(10). doi:10.3390/biomedicines10102482
69. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Hushmandi K, et al. Association of the epithelial–mesenchymal transition (EMT) with cisplatin resistance. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11). doi:10.3390/ijms21114002
70. Martinez-Rivera M, Siddik ZH. Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(8). doi:10.1016/j.bcp.2011.12.026
71. Ding Z, Yang X, Pater A, Tang SC. Resistance to apoptosis is correlated with the reduced caspase-3 activation and enhanced expression of antiapoptotic proteins in human cervical multidrug-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270(2). doi:10.1006/bbrc.2000.2432
72. Duiker EW, Meijer A, Van Der Bilt ARM, et al. Drug-induced caspase 8 upregulation sensitises cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells to rhTRAIL-induced apoptosis. *Br J Cancer*. 2011;104(8). doi:10.1038/bjc.2011.84
73. Kuwahara D, Tsutsumi K, Oyake D, Ohta T, Nishikawa H, Koizuka I. Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Auris Nasus Larynx*. 2003;30(SUPPL.). doi:10.1016/s0385-8146(02)00129-3
74. Debela DT, Muzazu SGY, Heraro KD, et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Open Med. 2021;9. doi:10.1177/20503121211034366
75. Yin W, Wang J, Jiang L, James Kang Y. Cancer and stem cells. *Exp Biol Med*. 2021;246(16). doi:10.1177/15353702211005390
76. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(17). doi:10.1007/s00018-019-03125-1
77. Dixon KJ, Wu J, Walcheck B. Engineering anti-tumor monoclonal antibodies and fc receptors to enhance ADCC by human NK cells. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2). doi:10.3390/cancers13020312
78. Tanner JE. Designing antibodies for oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2005;24(4). doi:10.1007/s10555-005-6197-x
79. Singh S, Melnik R. Thermal ablation of biological tissues in disease treatment: A review of computational models and future directions. *Electromagn Biol Med*. 2020;39(2). doi:10.1080/15368378.2020.1741383
80. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5). doi:10.1038/nrc1071
81. Pucci C, Martinelli C, Ciofani G. Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*. 2019;13. doi:10.3332/ecancer.2019.961
82. Chikara S, Nagaprashantha LD, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Singhal SS. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Lett*. 2018;413. doi:10.1016/j.canlet.2017.11.002
83. Jena P, Sun Q. Super Atomic Clusters: Design Rules and Potential for Building Blocks of Materials. *Chem Rev*. 2018;118(11). doi:10.1021/acs.chemrev.7b00524
84. Chakraborty I, Pradeep T. Atomically Precise Clusters of Noble Metals: Emerging Link between Atoms and Nanoparticles. *Chem Rev*. 2017;117(12). doi:10.1021/acs.chemrev.6b00769
85. Lin CAJ, Yang TY, Lee CH, et al. Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications. *ACS Nano*. 2009;3(2).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

doi:10.1021/nn800632j
86. Vajda S, Pellin MJ, Greeley JP, et al. Subnanometre platinum clusters as highly active and selective catalysts for the oxidative dehydrogenation of propane. *Nat Mater*. 2009;8(3). doi:10.1038/nmat2384
87. Boronat M. Theoretical tools for studying gold nanoparticles as catalysts for oxidation and hydrogenation reactions. In: *Catalysis*. ; 2013. doi:10.1039/9781849737203-00050
88. Gregory Schaaff T, Knight G, Shafigullin MN, Borkman RF, Whetten RL. Isolation and selected properties of a 10.4 kda gold:glutathione cluster compound. *J Phys Chem B*. 1998;102(52). doi:10.1021/jp9830528
89. Porto V, Borrajo E, Buceta D, et al. Silver Atomic Quantum Clusters of Three Atoms for Cancer Therapy: Targeting Chromatin Compaction to Increase the Therapeutic Index of Chemotherapy. *Adv Mater*. 2018;30(33). doi:10.1002/adma.201801317
90. Buceta D, Busto N, Barone G, et al. Ag2 and Ag3 Clusters: Synthesis, Characterization, and Interaction with DNA. *Angew Chemie - Int Ed*. 2015;54(26). doi:10.1002/anie.201502917
91. Porto V, Buceta D, Domínguez B, et al. Silver Clusters of Five Atoms as Highly Selective Antitumoral Agents Through Irreversible Oxidation of Thiols. *Adv Funct Mater*. 2022;32(29). doi:10.1002/adfm.202113028
92. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(12). doi:10.1038/nrd4002
93. Guerra F, Arbini AA, Moro L. Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2017;1858(8). doi:10.1016/j.bbabio.2017.01.012
94. Wolf DA. Is Reliance on Mitochondrial Respiration a "Chink in the Armor" of Therapy-Resistant Cancer? *Cancer Cell*. 2014;26(6). doi:10.1016/j.ccell.2014.10.001
95. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*. 2009;284(20). doi:10.1074/jbc.R900010200

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

96. Hannon Barroeta P, O'Sullivan MJ, Zisterer DM. The role of the Nrf2/GSH antioxidant system in cisplatin resistance in malignant rhabdoid tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149(11). doi:10.1007/s00432-023-04734-x
97. Yan H, Cai X, Fu S, Zhang X, Zhang J. PRDX3 promotes resistance to cisplatin in gastric cancer cells. *J Cancer Res Ther*. 2022;18(7). doi:10.4103/jcrt.jcrt_970_22
98. Reczek CR, Chandel NS. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annu Rev Cancer Biol*. 2017;1. doi:10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808
99. Tirichen H, Yaigoub H, Xu W, Wu C, Li R, Li Y. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. *Front Physiol*. 2021;12. doi:10.3389/fphys.2021.627837
100. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochem*. 2005;70(2). doi:10.1007/s10541-005-0102-7
101. Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants Redox Signal*. 2012;16(11). doi:10.1089/ars.2011.4123
102. Zhang H, Forman HJ. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(7). doi:10.1016/j.semcdb.2012.03.017
103. Preston TJ, Muller WJ, Singh G. Scavenging of Extracellular H2O2 by Catalase Inhibits the Proliferation of HER-2/Neu-transformed Rat-1 Fibroblasts through the Induction of a Stress Response. *J Biol Chem*. 2001;276(12). doi:10.1074/jbc.M004617200
104. Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules - From biology to health and disease. *Antioxidants Redox Signal*. 2007;9(1). doi:10.1089/ars.2007.9.25
105. Ahsan MK, Lekli I, Ray D, Yodoi J, Das DK. Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: An implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxidants Redox Signal*. 2009;11(11). doi:10.1089/ars.2009.2683
106. Padayachee L, Rohwer JM, Pillay CS. The thioredoxin redox

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

potential and redox charge are surrogate measures for flux in the thioredoxin system: Thioredoxin redox charge and flux. *Arch Biochem Biophys*. 2020;680. doi:10.1016/j.abb.2019.108231
107. Aoyama K, Nakaki T. Inhibition of GTRAP3-18 may increase neuroprotective glutathione (GSH) synthesis. *Int J Mol Sci*. 2012;13(9). doi:10.3390/ijms130912017
108. Netto LES, Antunes F. The Roles of peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and in signal transduction. *Mol Cells*. 2016;39(1). doi:10.14348/molcells.2016.2349
109. Rhee SG. Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells*. 2016;39(1). doi:10.14348/molcells.2016.2368
110. Kleih M, Böpple K, Dong M, et al. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. *Cell Death Dis*. 2019;10(11). doi:10.1038/s41419-019-2081-4
111. Oiseth SJ, Aziz MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat*. 2017;3(10). doi:10.20517/2394-4722.2017.41
112. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL. PROPERTIES AND OVERVIEW OF IMMUNE RESPONSES. In: *Cellular and Molecular Immunology*. ; 2010. doi:10.1016/b978-1-4160-3123-9.50006-1
113. Loeb LA. Human cancers express mutator phenotypes: Origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6). doi:10.1038/nrc3063
114. Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science (80-)*. 1999;286(5446). doi:10.1126/science.286.5446.1897
115. Stoler DL, Chen N, Basik M, et al. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(26). doi:10.1073/pnas.96.26.15121
116. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2). doi:10.1038/nri3789
117. Hamdan F, Cerullo V. Cancer immunotherapies: A hope for the uncurable? *Front Mol Med*. 2023;3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

doi:10.3389/fmmed.2023.1140977
118. Liu C, Yang M, Zhang D, Chen M, Zhu D. Clinical cancer immunotherapy: Current progress and prospects. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.961805
119. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1). doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
120. Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, et al. gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2011;364(22). doi:10.1056/nejmoa1012863
121. Vansteenkiste J, Zielinski M, Linder A, et al. Final results of a multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the efficacy of MAGE-A3 immunotherapeutic as adjuvant therapy in stage IB/II non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*. 2007;25(18_suppl). doi:10.1200/jco.2007.25.18_suppl.7554
122. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378). doi:10.1038/nature10673
123. Copier J, Dalgleish A. Whole-cell vaccines: A failure or a success waiting to happen? *Curr Opin Mol Ther*. 2010;12(1).
124. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(9). doi:10.1038/nrd4663
125. Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8). doi:10.1038/nrc3770
126. Chiocca EA, Rabkin SD. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(4). doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0015
127. Ledford H. Cancer-fighting viruses win approval. *Nature*. 2015;526(7575). doi:10.1038/526622a
128. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. *Adv Immunol*. 2006;90. doi:10.1016/S0065-2776(06)90002-9
129. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

immunity by CTLA-4 blockade. *Science (80-)*. 1996;271(5256). doi:10.1126/science.271.5256.1734
130. Grosso JF, Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: An overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun*. 2013;13(1).
131. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2011;364(26). doi:10.1056/nejmoa1104621
132. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3). doi:10.1038/85330
133. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26). doi:10.1056/nejmoa1200690
134. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*. 1990;171(5). doi:10.1084/jem.171.5.1393
135. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*. 2010;207(10). doi:10.1084/jem.20100643
136. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: Toward combination strategies with curative potential. *Cell*. 2015;161(2). doi:10.1016/j.cell.2015.03.030
137. Albelda SM. CAR T cell therapy for patients with solid tumours: key lessons to learn and unlearn. *Nat Rev Clin Oncol*. 2024;21(1). doi:10.1038/s41571-023-00832-4
138. Cappell KM, Kochenderfer JN. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(6). doi:10.1038/s41571-023-00754-1
139. Teige I, Mårtensson L, Frendéus BL. Targeting the antibody checkpoints to enhance cancer immunotherapy-focus on FcγRIIb. *Front Immunol*. 2019;10(MAR). doi:10.3389/fimmu.2019.00481
140. Charmsaz S, Scott AM, Boyd AW. Targeted therapies in hematological malignancies using therapeutic monoclonal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

antibodies against Eph family receptors. *Exp Hematol*. 2017;54. doi:10.1016/j.exphem.2017.07.003

141. Strohl WR. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20(6). doi:10.1016/j.copbio.2009.10.011
142. Lo Nigro C, Macagno M, Sangiolo D, Bertolaccini L, Aglietta M, Merlano MC. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med*. 2019;7(5). doi:10.21037/atm.2019.01.42
143. Xu B, Deng C, Wu X, et al. CCR9 and CCL25: A review of their roles in tumor promotion. *J Cell Physiol*. 2020;235(12). doi:10.1002/jcp.29782
144. Koda Y, Nakamoto N, Chu PS, et al. CCR9 axis inhibition enhances hepatic migration of plasmacytoid DCs and protects against liver injury. *JCI Insight*. 2022;7(17). doi:10.1172/jci.insight.159910
145. Singh R, Stockard CR, Grizzle WE, Lillard JW, Singh S. Expression and histopathological correlation of CCR9 and CCL25 in ovarian cancer. *Int J Oncol*. 2011;39(2). doi:10.3892/ijo.2011.1059
146. Johnson-Holiday C, Singh R, Johnson E, et al. CCL25 mediates migration, invasion and matrix metalloproteinase expression by breast cancer cells in a CCR9-dependent fashion. *Int J Oncol*. 2011;38(5). doi:10.3892/ijo.2011.953
147. Singh S, Singh UP, Stiles JK, Grizzle WE, Lillard JW. Expression and functional role of CCR9 in prostate cancer cell migration and invasion. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24). doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0266
148. Gupta P, Sharma PK, Mir H, et al. CCR9/CCL25 expression in non-small cell lung cancer correlates with aggressive disease and mediates key steps of metastasis. *Oncotarget*. 2014;5(20). doi:10.18632/oncotarget.2526
149. Mishan MA, Heirani-Tabasi A, Mokhberian N, et al. Analysis of chemokine receptor gene expression in esophageal cancer cells compared with breast cancer with insights into metastasis. *Iran*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

J Public Health. 2015;44(10).
150. Heinrich EL, Arrington AK, Ko ME, et al. Paracrine activation of chemokine receptor CCR9 enhances the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Cancer Microenviron*. 2013;6(3). doi:10.1007/s12307-013-0130-6
151. Zhong Y, Jiang L, Lin H, et al. Expression of CC chemokine receptor 9 predicts poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Diagn Pathol*. 2015;10(1). doi:10.1186/s13000-015-0341-x
152. Wang C, Liu Z, Xu Z, et al. The role of chemokine receptor 9/chemokine ligand 25 signaling: From immune cells to cancer cells (Review). *Oncol Lett*. 2018;16(2). doi:10.3892/ol.2018.8896
153. Tu Z, Xiao R, Xiong J, et al. CCR9 in cancer: Oncogenic role and therapeutic targeting. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1). doi:10.1186/s13045-016-0236-7
154. Hu Y, Zhang L, Wu R, et al. Specific killing of CCR9 high-expressing acute T lymphocytic leukemia cells by CCL25 fused with PE38 toxin. *Leuk Res*. 2011;35(9). doi:10.1016/j.leukres.2011.01.015
155. Chamorro S, Vela M, Franco-Villanueva A, et al. Antitumor effects of a monoclonal antibody to human CCR9 in leukemia cell xenografts. *MAbs*. 2014;6(4). doi:10.4161/mabs.29063
156. Somovilla-Crespo B, Monzón MTM, Vela M, et al. 92R Monoclonal antibody inhibits human CCR9+ leukemia cells growth in NSG mice xenografts. *Front Immunol*. 2018;9(JAN). doi:10.3389/fimmu.2018.00077
157. Santamaria S, Delgado M, Botas M, et al. Therapeutic potential of an anti-CCR9 mAb evidenced in xenografts of human CCR9+ tumors. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.825635
158. Patra JK, Das G, Fraceto LF, et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology*. 2018;16(1). doi:10.1186/s12951-018-0392-8
159. Jahangirian H, Lemraski EG, Webster TJ, Rafiee-Moghaddam

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

R, Abdollahi Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: Green nanomedicine. *Int J Nanomedicine*. 2017;12. doi:10.2147/IJN.S127683

160. Lam PL, Wong WY, Bian Z, Chui CH, Gambari R. Recent advances in green nanoparticulate systems for drug delivery: Efficient delivery and safety concern. *Nanomedicine*. 2017;12(4). doi:10.2217/nnm-2016-0305
161. De Mendoza AEH, Campanero MA, Mollinedo F, Blanco-Prieto MJ. Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy. *J Biomed Nanotechnol*. 2009;5(4). doi:10.1166/jbn.2009.1042
162. Lasa-Saracibar B, Estella-Hermoso De Mendoza A, Guada M, Dios-Vieitez C, Blanco-Prieto MJ. Lipid nanoparticles for cancer therapy: State of the art and future prospects. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(10). doi:10.1517/17425247.2012.717928
163. Germain M, Caputo F, Metcalfe S, et al. Delivering the power of nanomedicine to patients today. *J Control Release*. 2020;326. doi:10.1016/j.jconrel.2020.07.007
164. 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). doi:10.3390/jpm11080771
165. Pearce AK, O'Reilly RK. Insights into Active Targeting of Nanoparticles in Drug Delivery: Advances in Clinical Studies and Design Considerations for Cancer Nanomedicine. *Bioconjug Chem*. 2019;30(9). doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00456
166. He LH, He YL, Zuo WH, et al. Neuropilin1 silencing impairs the proliferation and migration of cells in pancreatic cancer. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(9). doi:10.1002/jcla.23394
167. Shi L, Zhang J, Zhao M, et al. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale*. 2021;13(24). doi:10.1039/d1nr02065j
168. Andrade F, German-Cortés J, Montero S, et al. The Nanotechnology-Based Approaches against Kirsten Rat Sarcoma-Mutated Cancers. *Pharmaceutics*. 2023;15(6). doi:10.3390/pharmaceutics15061686
169. Hajdúch M, Jančík S, Drábek J, Radzioch D. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

doi:10.1155/2010/150960
170. Muñoz-Maldonado C, Zimmer Y, Medová M. A comparative analysis of individual ras mutations in cancer biology. *Front Oncol*. 2019;9(OCT). doi:10.3389/fonc.2019.01088
171. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: Split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(7). doi:10.1038/nrm2438
172. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012;72(10). doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2612
173. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1). doi:10.1038/s41392-021-00780-4
174. Pantsar T. The current understanding of KRAS protein structure and dynamics. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18. doi:10.1016/j.csbj.2019.12.004
175. Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Gharagozlou E, et al. Microrna a new gate in cancer and human disease: A review. *J Biol Sci*. 2017;17(6). doi:10.3923/jbs.2017.247.254
176. Lorenzer C, Dirin M, Winkler AM, Baumann V, Winkler J. Going beyond the liver: Progress and challenges of targeted delivery of siRNA therapeutics. *J Control Release*. 2015;203. doi:10.1016/j.jconrel.2015.02.003
177. Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;154-155. doi:10.1016/j.addr.2020.06.002
178. Akinc A, Maier MA, Manoharan M, et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol*. 2019;14(12). doi:10.1038/s41565-019-0591-y
179. Zhang R, El-Mayta R, Murdoch TJ, et al. Helper lipid structure influences protein adsorption and delivery of lipid nanoparticles to spleen and liver. *Biomater Sci*. 2021;9(4). doi:10.1039/d0bm01609h
180. Kauffman KJ, Dorkin JR, Yang JH, et al. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lett. 2015;15(11). doi:10.1021/acs.nanolett.5b02497

181. Cheng Q, Wei T, Farbiak L, Johnson LT, Dilliard SA, Siegwart DJ. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR–Cas gene editing. *Nat Nanotechnol*. 2020;15(4). doi:10.1038/s41565-020-0669-6
182. Kranz LM, Diken M, Haas H, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature*. 2016;534(7607). doi:10.1038/nature18300
183. Teijeiro-Valiño C, Novoa-Carballal R, Borrajo E, et al. A multifunctional drug nanocarrier for efficient anticancer therapy. *J Control Release*. 2019;294. doi:10.1016/j.jconrel.2018.12.002
184. Tam YYC, Chen S, Zaifman J, et al. Small molecule ligands for enhanced intracellular delivery of lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2013;9(5). doi:10.1016/j.nano.2012.11.006
185. Dilliard SA, Cheng Q, Siegwart DJ. On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(52). doi:10.1073/pnas.2109256118
186. Anthiya S, Öztürk SC, Yanik H, et al. Targeted siRNA lipid nanoparticles for the treatment of KRAS-mutant tumors. *J Control Release*. 2023;357. doi:10.1016/j.jconrel.2023.03.016
187. Chen P, Yang W, Hong T, et al. Nanocarriers escaping from hyperacidified endo/lysosomes in cancer cells allow tumor-targeted intracellular delivery of antibodies to therapeutically inhibit c-MYC. *Biomaterials*. 2022;288. doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121748
188. Molina-Crespo A, Cadete A, Sarrio D, et al. Intracellular delivery of an antibody targeting gasdermin-b reduces her2 breast cancer aggressiveness. *Clin Cancer Res*. 2019;25(15). doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2381
189. The Cancer Genome Atlas Research Network, Raphael BJ. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma The Cancer Genome Atlas Research Network *. *Cancer Cell*. 2017;32(2)(2).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

190. Gordon RR, Nelson PS. Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resist Updat*. 2012;15(1-2). doi:10.1016/j.drup.2012.01.002
191. Aoshiba K, Tsuji T, Nagai A. Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells. *Eur Respir J*. 2003;22(3). doi:10.1183/09031936.03.00011903
192. Morelli AP, Tortelli TC, Mancini MCS, et al. STAT3 contributes to cisplatin resistance, modulating EMT markers, and the mTOR signaling in lung adenocarcinoma. *Neoplasia (United States)*. 2021;23(10). doi:10.1016/j.neo.2021.08.003
193. Nakasuka F, Tabata S, Sakamoto T, et al. TGF-β-dependent reprogramming of amino acid metabolism induces epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancers. *Commun Biol*. 2021;4(1). doi:10.1038/s42003-021-02323-7
194. Kalinina E V., Gavriliuk LA. Glutathione Synthesis in Cancer Cells. *Biochem*. 2020;85(8). doi:10.1134/S0006297920080052
195. Konopleva M, Contractor R, Tsao T, et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2006;10(5). doi:10.1016/j.ccr.2006.10.006
196. Cheff DM, Huang C, Scholzen KC, et al. The ferroptosis inducing compounds RSL3 and ML162 are not direct inhibitors of GPX4 but of TXNRD1. *Redox Biol*. 2023;62. doi:10.1016/j.redox.2023.102703
197. Kalkavan H, Chen MJ, Crawford JC, et al. Sublethal cytochrome c release generates drug-tolerant persister cells. *Cell*. 2022;185(18). doi:10.1016/j.cell.2022.07.025
198. Comenge J, Sotelo C, Romero F, et al. Detoxifying Antitumoral Drugs via Nanoconjugation: The Case of Gold Nanoparticles and Cisplatin. *PLoS One*. 2012;7(10). doi:10.1371/journal.pone.0047562
199. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5). doi:10.1038/nprot.2006.339
200. Booty LM, Gawel JM, Cvetko F, et al. Selective Disruption of Mitochondrial Thiol Redox State in Cells and In Vivo. *Cell*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Chem Biol. 2019;26(3). doi:10.1016/j.chembiol.2018.12.002

201. Tanaka T, Halicka D, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Cytometric analysis of DNA damage: phosphorylation of histone H2AX as a marker of DNA double-strand breaks (DSBs). *Methods Mol Biol*. 2009;523. doi:10.1007/978-1-59745-190-1_11
202. Muslimovic A, Ismail IH, Gao Y, Hammarsten O. An optimized method for measurement of gamma-H2AX in blood mononuclear and cultured cells. *Nat Protoc*. 2008;3(7). doi:10.1038/nprot.2008.93
203. Singh V, Johansson P, Ekedahl E, Lin YL, Hammarsten O, Westerlund F. Quantification of single-strand DNA lesions caused by the topoisomerase II poison etoposide using single DNA molecule imaging. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;594. doi:10.1016/j.bbrc.2022.01.041
204. Pinto S, Pahl J, Schottelius A, Carter PJ, Koch J. Reimagining antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer: the potential of natural killer cell engagers. *Trends Immunol*. 2022;43(11). doi:10.1016/j.it.2022.09.007
205. Bahar E, Kim JY, Kim HS, Yoon H. Establishment of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines characterized by enriched metastatic properties with increased twist expression. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20). doi:10.3390/ijms21207613
206. Sai X, Qin C, Wu Y, Zhao Y, Bian T. Downregulation of PTEN mediates bleomycin-induced premature senescence in lung cancer cells by suppressing autophagy. *J Int Med Res*. 2020;48(5). doi:10.1177/0300060520923522
207. Wang B, Kohli J, Demaria M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in Cancer*. 2020;6(10). doi:10.1016/j.trecan.2020.05.004
208. Correia-Melo C, Marques FD, Anderson R, et al. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J*. 2016;35(7). doi:10.15252/embj.201592862
209. Lee SY, Ju MK, Jeun HM, et al. Reactive oxygen species induce epithelial-mesenchymal transition, glycolytic switch, and mitochondrial repression through the Dlx-2/Snail signaling pathways in MCF-7 cells. *Mol Med Rep*. 2019;20(3).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

doi:10.3892/mmr.2019.10466
210. Jiang J, Wang K, Chen Y, Chen H, Nice EC, Huang C. Redox regulation in tumor cell epithelial–mesenchymal transition: Molecular basis and therapeutic strategy. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2. doi:10.1038/sigtrans.2017.36
211. Handy DE, Lubos E, Yang Y, et al. Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *J Biol Chem*. 2009;284(18). doi:10.1074/jbc.M900392200
212. Daniel T, Faruq HM, Magdalena JL, Manuela G, Horst LC. Role of GSH and Iron-Sulfur Glutaredoxins in Iron Metabolism—Review. *Molecules*. 2020;25(17). doi:10.3390/molecules25173860
213. Eastman A. The Mechanism of Action of Cisplatin: From Adducts to Apoptosis. In: *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. ; 2006. doi:10.1002/9783906390420.ch4
214. Bolzán AD, Bianchi MS. DNA and chromosome damage induced by bleomycin in mammalian cells: An update. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2018;775. doi:10.1016/j.mrrev.2018.02.003
215. Adibi R, Moein S, Gheisari Y. Cisplatin-resistant ovarian cancer cells reveal a polyploid phenotype with remarkable activation of nuclear processes. *Adv Biomed Res*. 2023;12(1). doi:10.4103/abr.abr_348_21
216. Parasassi T, Brunelli R, Costa G, et al. Thiol redox transitions in cell signaling: A lesson from N-acetylcysteine. *ScientificWorldJournal*. 2010;10. doi:10.1100/tsw.2010.104
217. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3). doi:10.1038/s41580-018-0089-8
218. Sasaki M, Kumazaki T, Takano H, Nishiyama M, Mitsui Y. Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(15). doi:10.1016/S0047-6374(01)00281-0
219. Basu A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Pharmacol Ther. 2022;230. doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107943

220. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun*. 2016;7. doi:10.1038/ncomms11190
221. Yu Y, Yan Y, Niu F, et al. Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases. *Cell Death Discov*. 2021;7(1). doi:10.1038/s41420-021-00579-w
222. Yang WS, Sriramaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014;156(1-2). doi:10.1016/j.cell.2013.12.010
223. Weaver K, Skouta R. The Selenoprotein Glutathione Peroxidase 4: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. *Biomedicines*. 2022;10(4). doi:10.3390/biomedicines10040891
224. Zou Y, Li H, Graham ET, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. *Nat Chem Biol*. 2020;16(3). doi:10.1038/s41589-020-0472-6
225. Yan H fa, Zou T, Tuo Q zhang, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1). doi:10.1038/s41392-020-00428-9
226. Ushio J, Kanno A, Ikeda E, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Diagnostics*. 2021;11(3). doi:10.3390/diagnostics11030562
227. Sasaki N, Gomi F, Hasegawa F, et al. Characterization of the metastatic potential of the floating cell component of MIA PaCa-2, a human pancreatic cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;522(4). doi:10.1016/j.bbrc.2019.11.120
228. Taborda NA, Hernández JC, Montoya CJ, Rugeles MT. Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunología*. 2014;33(1). doi:10.1016/j.inmuno.2013.11.002
229. Punekar SR, Velcheti V, Neel BG, Wong KK. The current state of the art and future trends in RAS-targeted cancer therapies. *Nat*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rev Clin Oncol. 2022;19(10). doi:10.1038/s41571-022-00671-9
230. Bhattacharya S, Socinski MA, Burns TF. KRAS mutant lung cancer: progress thus far on an elusive therapeutic target . *Clin Transl Med*. 2015;4(1). doi:10.1186/s40169-015-0075-0
231. Adderley H, Blackhall FH, Lindsay CR. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: Converging small molecules and immune checkpoint inhibition. *EBioMedicine*. 2019;41. doi:10.1016/j.ebiom.2019.02.049
232. Karimi N, Moghaddam SJ. KRAS-Mutant Lung Cancer: Targeting Molecular and Immunologic Pathways, Therapeutic Advantages and Restrictions. *Cells*. 2023;12(5). doi:10.3390/cells12050749
233. Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer. *Semin Oncol*. 2021;48(1). doi:10.1053/j.seminoncol.2021.02.003
234. Waters AM, Der CJ. KRAS: The critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(9). doi:10.1101/cshperspect.a031435
235. Acunzo M, Romano G, Nigita G, et al. Selective targeting of point-mutated KRAS through artificial microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(21). doi:10.1073/pnas.1620562114
236. Hu H, Cheng R, Wang Y, et al. Oncogenic KRAS signaling drives evasion of innate immune surveillance in lung adenocarcinoma by activating CD47. *J Clin Invest*. 2023;133(2). doi:10.1172/JCI153470
237. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26(22). doi:10.1038/sj.onc.1210422
238. Justilien V, Fields AP. Utility and applications of orthotopic models of human non-small cell lung cancer (NSCLC) for the evaluation of novel and emerging cancer therapeutics. *Curr Protoc Pharmacol*. 2013;1(SUPPL.62). doi:10.1002/0471141755.ph1427s62
239. Semba T, Sato R, Kasuga A, et al. Lung adenocarcinoma mouse models based on orthotopic transplantation of syngeneic tumor-initiating cells expressing EpCAM, SCA-1, and Ly6d. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12). doi:10.3390/cancers12123805

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

240. Sinha R, Luna A, Schultz N, Sander C. A pan-cancer survey of cell line tumor similarity by feature-weighted molecular profiles. *Cell Reports Methods*. 2021;1(2). doi:10.1016/j.crmeth.2021.100039
241. Wang L, Zeng H, Wang P, Soker S, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J Biol Chem*. 2003;278(49). doi:10.1074/jbc.M310047200
242. Qu CF, Song YJ, Rizvi SMA, et al. In vivo and in vitro inhibition of pancreatic cancer growth by targeted alpha therapy using 213Bi-CHX.A″-C595. *Cancer Biol Ther*. 2005;4(8). doi:10.4161/cbt.4.8.1892
243. Hayes TK, Neel NF, Hu C, et al. Long-Term ERK Inhibition in KRAS-Mutant Pancreatic Cancer Is Associated with MYC Degradation and Senescence-like Growth Suppression. *Cancer Cell*. 2016;29(1). doi:10.1016/j.ccell.2015.11.011
244. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
245. Tung MC, Lin PL, Wang YC, et al. Mutant p53 confers chemoresistance in non-small cell lung cancer by upregulating Nrf2. *Oncotarget*. 2015;6(39). doi:10.18632/oncotarget.6150
246. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers (Basel)*. 2011;3(1). doi:10.3390/cancers3010994
247. Achkar IW, Abdulrahman N, Al-Sulaiti H, Joseph JM, Uddin S, Mraiche F. Cisplatin based therapy: The role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *J Transl Med*. 2018;16(1). doi:10.1186/s12967-018-1471-1
248. Song M, Cui M, Liu K. Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer. *Eur J Med Chem*. 2022;232. doi:10.1016/j.ejmech.2022.114205
249. Fuss JO, Tsai CL, Ishida JP, Tainer JA. Emerging critical roles of Fe-S clusters in DNA replication and repair. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2015;1853(6). doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.018

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

250. Zhang M, Liu Z, Le Y, Gu Z, Zhao H. Iron-Sulfur Clusters: A Key Factor of Regulated Cell Death in Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022. doi:10.1155/2022/7449941
251. Li Q, Feng Z, Miao R, Liu X, Liu C, Liu Z. Prognosis and survival analysis of patients with pancreatic cancer: retrospective experience of a single institution. *World J Surg Oncol*. 2022;20(1). doi:10.1186/s12957-021-02478-x
252. Limagne E, Nuttin L, Thibaudin M, et al. MEK inhibition overcomes chemoimmunotherapy resistance by inducing CXCL10 in cancer cells. *Cancer Cell*. 2022;40(2). doi:10.1016/j.ccell.2021.12.009
253. Pircher A, Wasle IK, Mian M, et al. Docetaxel in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) - An observational study focusing on symptom improvement. *Anticancer Res*. 2013;33(9).
254. Tang C, Prueksaritanont T. Use of in vivo animal models to assess pharmacokinetic drug-drug interactions. *Pharm Res*. 2010;27(9). doi:10.1007/s11095-010-0157-z
255. Shemi A, Khvalevsky EZ, Gabai RM, Domb A, Barenholz Y. Multistep, effective drug distribution within solid tumors. *Oncotarget*. 2015;6(37). doi:10.18632/oncotarget.5051
256. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm*. 2021;601. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120586
257. Rosewell Shaw A, Porter CE, Yip T, et al. Oncolytic adeno-immunotherapy modulates the immune system enabling CAR T-cells to cure pancreatic tumors. *Commun Biol*. 2021;4(1). doi:10.1038/s42003-021-01914-8
258. Tang D, Zhang J, Yuan Z, et al. Pancreatic satellite cells derived galectin-1 increase the progression and less survival of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*. 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0090476
259. Lee JJ, Huang J, England CG, McNally LR, Frieboes HB. Predictive Modeling of In Vivo Response to Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(9). doi:10.1371/journal.pcbi.1003231
260. Li Z, Zou X, Zhu H, Chen M, Zhao Y. Inhibitory effect of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

baicalein combined with gemcitabine in human pancreatic cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2018;15(4). doi:10.3892/ol.2018.8043

261. N'Guessan KF, Davis HW, Chu Z, et al. Enhanced Efficacy of Combination of Gemcitabine and Phosphatidylserine-Targeted Nanovesicles against Pancreatic Cancer. *Mol Ther*. 2020;28(8). doi:10.1016/j.ymthe.2020.05.013
262. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med*. 2013;369(18). doi:10.1056/nejmoa1304369
263. Linge A, Weinhold K, Bläsche R, Kasper M, Barth K. Downregulation of caveolin-1 affects bleomycin-induced growth arrest and cellular senescence in A549 cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(10). doi:10.1016/j.biocel.2007.05.01

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10 ANEXOS

Creación y origen de las figuras y tablas de este trabajo:
El origen y creación de las figuras de esta tesis doctoral se detalla a continuación:

1) Figuras de creación propia empleando Biorender.com: figuras 1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 24, 52, 57, 65 y 68.
2) Figuras de creación propia empleando PowerPoint: figuras 7, 9, 17, 18, 19, 25, 49, 50, 51,56, 60, 69, 72, 73 (a), 75, 78 (a), 79 (a), 80, 81 (a), 82, tabla 3 y tabla 4.
3) Figuras de creación propia empleando el software *GraphPad Prism:* figuras 20, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 53, 54, 55, 58, 59, 64, 67, 70, 71, 73 (b, c), 74, 77, 78 (b, c), 79 (b, c) y 81 (b, c).
4) Figuras de creación propia empleando el software *FlowJo*: figuras 31, 40, 41, 42, 61, 62, 63, 66 y 76.
5) Figuras de otras fuentes que no sean de elaboración propia: figuras 5, 8 y 83. Las figuras presentan la licencia de uso correspondiente en el pie de figura.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA | CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15012/2023/007
Data de inicio do expediente: 28.3.2023
Persoa solicitante: Anxo Vidal Figueroa
Procedemento: resolución de autorización
Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

ANTECEDENTES

A persoa solicitante, como representante do Centro de Biomedicina Experimental CEBEGA, presentou con data 28.3.2023 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro Electrónico da Xunta de Galicia 2023/10011168), cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Avaliación de terapias innovadoras contra o cancro
Nome do centro usuario: Centro de Biomedicina Experimental CEBEGA
Persoa responsable do proxecto: Anxo Vidal Figueroa
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Centro de Biomedicina Experimental da USC (CEBEGA) (ES1507800292901)
Clasificación do proxecto: Tipo I ☐ Tipo II ☐ Tipo III ☒

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL
XEFATURA TERRITORIAL
SERVIZO DE GANDARÍA
Edificio Administrativo Monelos
R/ Vicente Ferrer, 2, 4º andar
15071 A Coruña
T: 981 184 565
servizo.ganderia.a.coruna@xunta.gal
medioruralxunta.gal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, o Comité de Bioética de Experimentación Animal da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1 Autorizar o proxecto solicitado.

2 O proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva aos tres anos dende a súa aprobación.

3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo, esta autorización deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

A Coruña, 4 de abril de 2023
O xefe territorial
Jose Manuel Santos Maneiro

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité de Ética de la Investigación de Galicia
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro S/N
15781 Santiago de Compostela
A Coruña

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Lorenzo Armenteros del Olmo, Secretario Suplente del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20/03/2019 el estudio:

Título: Desarrollo de farmacos biologicos contra CCR9 en tumores sólidos mediante la modulación del sistema inmune del paciente
Versión modificación:
Promotor/a:SunRock Biopharma
Investigador/a: Anxo Vidal Figueroa
Código de Registro: 2019/054

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registro y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

Documento firmado digitalmente por:
Lorenzo Armenteros Del Olmo (01284/2008 19:12)
https://sede.xunta.gal/csv/sve?SACR-HMC4-8DAH-CP4Q-TRAM-2155-4139-7848-F3

Xacobeo 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Castilla-La Mancha

Certificado de reconocimiento de la capacitación de personal que maneja animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo

D/Dª, ÁNGELA TURRERO BRAOJOS con N.I.F. 03939255E, ha obtenido el reconocimiento de la capacitación, en base a la disposición transitoria primera de la Orden ECC/566/2015, para las siguientes funciones y especies:/ It has been recognized by the training, based on the first transitory provision of the Order ECC/566/2015, for following functions and species

FUNCIONES/ RESPONSABILITIES	ESPECIES/SPECIES
a) CUIDADO DE LOS ANIMALES b) EUTANASIA DE ANIMALES c) REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS	ROEDORES

Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER **CAP0700216**

La presente autorización es válida hasta el / This autorisation is valid until

28/02/2027

ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE

Nombre y dirección del organismo que expide el certificado/Name and address of the issuing body of the certificate

Dirección General de Agricultura y Ganadería.
Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural
Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.
C/ Pintor Matías Moreno, 4 – 45071 TOLEDO

Teléfono/ Telephone	Fax / Fax	Correo electrónico / E-mail
925 267861	925 266897	dgag@jccm.es

Fecha / Date	Lugar / Place	Sello / Stamp
28/02/2019	Toledo Nombre y firma / Name and signature	

LA DIRECTORA GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Firmado por Mª Cruz Ponce Isla
Verificable en la Sede Electrónica https://www.jccm.es/ Código Seguro de Verificación: 0666665A66334IAF666666

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, por lo que se sigue investigando en nuevas estrategias terapéuticas que puedan ayudar a mejorar la respuesta al tratamiento y sus efectos secundarios.
En este trabajo se ha realizado una evaluación biológica de tres terapias innovadoras: clústeres atómicos cuánticos de cinco átomos de plata, anticuerpos monoclonales terapéuticos y nanosistemas para la entrega de agentes terapéuticos.
En conjunto los resultados obtenidos en el transcurso de esta tesis muestran que las terapias innovadoras estudiadas suponen una estrategia prometedora frente al cáncer.