

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INSTITUTO INTERUNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DE
RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y DESARROLLO TECNOLÓGICO



DEVELOPMENT OF SMART DEVICES FOR THE DETECTION OF METABOLITES OF TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE-RELATED ENZYME OVEREXPRESSION

PhD THESIS

Submitted by

Marcia Domínguez Rodríguez

PhD Supervisors:

Prof. Ramón Martínez Máñez

Dr. Juan F. Blandez

Valencia, June 2023

Resumen

La presente tesis doctoral, titulada "Desarrollo de dispositivos inteligentes para la detección de metabolitos de sustancias tóxicas y sobreexpresión enzimática relacionada con enfermedades", se enfoca en el diseño, preparación, caracterización y evaluación de nanopartículas para la detección de metabolitos del benceno en orina y el uso de sondas moleculares fluorogénicas para la detección de enzimas sobreexpresadas mediante medidas en la orina o a través de la misma.

En el primer capítulo se discuten las limitaciones de las técnicas de diagnóstico convencionales y se destaca el valor de la orina como muestra biológica para la detección y seguimiento de biomarcadores relacionados con patologías específicas. También se introducen los conceptos básicos de los materiales mesoporosos de sílice, el reconocimiento molecular y el desarrollo de sondas moleculares, así como el estado del arte en el desarrollo de sondas moleculares fluorogénicas y su aplicación actual en la detección de enzimas, cuya sobreexpresión está ligada a la evolución de diversas patologías. Finalmente, se discute la necesidad creciente de desarrollar nuevas sondas moleculares fácilmente eliminables renalmente como herramientas de diagnóstico no invasivas para el paciente y para el seguimiento de la eficacia del tratamiento de enfermedades.

En el segundo capítulo se exponen los objetivos generales de la presente tesis doctoral, así como los objetivos concretos que son abordados en los diferentes capítulos experimentales.

En el tercer capítulo se describe un nuevo nanodispositivo inteligente (**S4**) para la detección del ácido *trans,trans*-mucónico (*t,t*-MA), que es un metabolito del benceno, en orina. En concreto, se plantea la síntesis y caracterización de un material constituido por nanopartículas de sílice mesoporosas cargadas con sulfrodamina B y funcionalizadas en su superficie externa con un derivado del ácido tereftálico, capaz

Resumen

de coordinarse con el complejo Cu₂bistren (previamente sintetizado y caracterizado), cerrando así los poros y permitiendo la encapsulación del colorante. En presencia del dicarboxilato *t,t*-MA se observó una marcada liberación de sulforodamina B debido a la coordinación preferencial del *t,t*-MA con el complejo Cu₂bistren. La apertura de poros y la liberación de carga se induce rápidamente (10 minutos) y de manera selectiva en muestras de orina real adulterada con *t,t*-MA, utilizando un simple fluorímetro y sin tratamiento previo de la muestra.

El cuarto capítulo presenta el diseño de una nueva sonda fluorogénica (**NB-ALA**) cuya emisión se localiza en el infrarrojo cercano (NIR-I). **NB-ALA** está constituida por el fluoróforo Azul de Nilo unido mediante un enlace amida hidrolizable al aminoácido L-alanina. La formación de este enlace produce la reducción de la emisión de fluorescencia del Azul de Nilo. Esta fluorescencia es recuperada en presencia de la enzima aminopeptidasa-N (APN), la cual hidroliza el enlace entre el Azul de Nilo y el resto peptídico. Las propiedades fotoquímicas del Azul de Nilo, con alto rendimiento cuántico, permite detectar de forma sensible y selectiva la presencia de la enzima APN en muestras de orina. **NB-ALA** se validó de forma eficaz para la detección de APN en muestras de orina humana dopadas, así como en un modelo murino de fibrosis renal inducido por perfusión con ácido fólico, donde el daño renal promueve la presencia en orina de elevados niveles de APN. En este modelo, marcadores de daño renal tradicionales como los niveles séricos de urea y creatinina se recuperan con el tiempo (o más bien se compensan mientras persiste cierto daño renal) siendo la única lectura patológica que puede relacionarse con el daño renal la densidad de la orina. Dichos valores de densidad tomados en función del tiempo se evaluaron frente a los resultados obtenidos con **NB-ALA** para detectar el daño en riñón, mostrándose señal únicamente en la orina procedente de riñones fibróticos.

Basándonos en la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico y seguimiento de enfermedades más eficaces y menos tóxicos, en el capítulo cinco se describe una

nueva sonda (**NB-SO₃-Leu**) para la detección de elevados niveles de leucina aminopeptidasa (LAP) como biomarcador de cáncer. Para ello, se modificó la estructura del fluoróforo comercial Azul de Nilo con la introducción de un grupo sulfónico, generando una estructura zwitteriónica que favorece la solubilidad en agua de la sonda y promueve su eliminación renal, disminuyendo los posibles efectos tóxicos por acumulación de la sonda, o el fluoróforo libre, en diferentes órganos del sistema reticuloendotelial. Los resultados mostraron una alta selectividad y sensibilidad del **NB-SO₃-Leu** en la detección de LAP, incluso en la presencia de potenciales interferentes. Un ejemplo especialmente importante del uso de LAP como biomarcador es su aplicación para la detección del melanoma, en el que la detección precoz es esencial para la resección. Por ello, la sonda se validó *in vitro* en la detección de LAP en células de cáncer de melanoma SK-Mel-103, caracterizado por la sobreexpresión de esta enzima. Los estudios finales con inhibidores enzimáticos demostraron la selectividad de la sonda en el mecanismo propuesto.

Partiendo de la idea anterior, en el sexto capítulo se describe una sonda molecular similar (**NB-SO₃-Ala**) para la detección de niveles elevados de alanina aminopeptidasa (APN) como biomarcador de cáncer. Para ello inicialmente se modificó el esqueleto del fluoróforo comercial Azul de Nilo con restos de ácido sulfónico para aumentar su solubilidad. Una vez obtenido el fluoróforo modificado, este se conjugó a un residuo de alanina, que actúa como unidad reactiva de APN produciendo, además, la desactivación de la fluorescencia del fluoróforo modificado. En presencia de APN esta fluorescencia se recupera permitiendo la monitorización de los niveles de la enzima. Por otra parte, la nueva sonda es capaz de detectar la sobreexpresión de la enzima APN en diferentes líneas celulares de cáncer, observándose mayor expresión en células de cáncer de pulmón humano A549.

Resumen

simples medidas de fluorescencia de la orina. Con tal fin, se partió de un fluoróforo de hemicianina-7 (Cy7), cuya estructura está modificada con ácidos sulfónicos, generando una estructura zwitteriónica que favorece su eliminación a través de la orina. Este fluoróforo se empleó en el diseño de una sonda para la detección, a través de la orina, de la enzima monoamina oxidasa (MAO), cuyos elevados niveles se asocian a enfermedades relacionadas con el envejecimiento. La sonda (**Cy7-MAO**), constituida por el fluoróforo Cy-7 modificado con grupos sulfónicos unido a un grupo propilamino, es hidrolizada en presencia de dicha enzima, recuperando la fluorescencia inicial del fluoróforo. Esta sonda, tiene la gran ventaja de que tras su administración se hidroliza en presencia de la enzima MAO, dando lugar a la liberación de un fluoróforo Cy7 altamente emisivo que puede cuantificarse en la orina de forma directa. **Cy7-MAO** se validó con éxito *in vitro* utilizando células humanas HepG2 de hígado, con altos niveles endógenos de MAO. Por otra parte, la sonda **Cy7-MAO** se empleó para la detección de la enzima MAO *in vivo* en ratones jóvenes y viejos. Estos estudios indicaron que la expresión de MAO en ratones ancianos sanos aumenta significativamente en comparación con los animales jóvenes, lo que sugiere que la sobreexpresión de MAO puede utilizarse como biomarcador del envejecimiento.

Por último, en el capítulo ocho, se presentan las conclusiones principales de los diferentes capítulos experimentales, así como las conclusiones generales extraídas de esta tesis doctoral. El desarrollo de nanomateriales y sondas moleculares para detectar selectivamente sustancias tóxicas y enzimas que han sido empleadas como biomarcadores de enfermedades constituye un campo novedoso y con gran potencial para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico. Se espera que los resultados obtenidos en esta tesis puedan servir como base para el desarrollo de nuevas sondas moleculares para el diagnóstico y tratamiento temprano de diferentes enfermedades, así como para el seguimiento de tratamientos en pacientes.