

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



***DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS  
MESOPOROSAS DE SÍLICE PARA EL  
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE  
MAMA***

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: Iris Garrido Cano

TUTOR/A: José Ramón Murguía Ibáñez

***Curso Académico: 2015/2016***

**VALENCIA, julio de 2016**

# ÍNDICE

Abreviaturas .....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
1. Cáncer de mama.....	6
2. Células madre tumorales de cáncer de mama (BCSCs, <i>breast cancer stem cells</i> ) y transición epitelio-mesénquima (EMT, <i>epithelial–mesenchymal transition</i> ).....	8
3. Terapias basadas en microRNAs (miRNAs).....	11
3.1 miR-200c.....	12
4. Nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) .....	14
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS .....	20
1. Síntesis de los materiales mesoporosos .....	21
1.1 Síntesis de MSNpg .....	21
1.2 Carga de MSNpg .....	21
1.3 Funcionalización de MSNpg-doxo y MSNpg .....	21
1.4 Síntesis del material MCM-41.....	22
1.5 Carga de MCM-41.....	23
1.6 Funcionalización de MCM-41 y MCM-41-doxo.....	23
2. Caracterización de los materiales .....	24
2.1 Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno.....	24
2.2 Medida de difracción de rayos X de ángulo pequeño de polvo .....	24
2.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM, <i>transmission electron microscopy</i> ).....	24
3. Ensayo de liberación <i>in vitro</i> .....	25
3.1 Obtención de extracto lisosomal purificado a partir de hígado de conejo .....	25
3.2 Realización del ensayo de liberación <i>in vitro</i> .....	25
4. Ensayo de toxicidad hematológica .....	25
5. Ensayos de viabilidad celular .....	26
5.1 Cultivo celular .....	26
5.2 Realización de los ensayos de viabilidad celular .....	26
6. Estudio de la internalización de los sólidos .....	27
6.1 Estudio de la internalización de los sólidos mediante microscopía confocal .....	27
6.2 Estudio de la internalización de los sólidos mediante citometría de flujo .....	28
6.2.1 Marcaje de los sólidos MSNpg y MCM con FITC .....	28
6.2.2 Realización del ensayo.....	28
7. Ensayos de inhibición de la internalización .....	29
8. Análisis estadístico .....	29

RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
1. Diseño del sistema.....	31
2. Síntesis de nanopartículas y caracterización .....	34
2.1 Caracterización mediante isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno .....	35
2.2 Caracterización mediante medida de difracción de rayos X de polvo .....	38
2.3 Caracterización mediante TEM.....	39
3. Ensayo de liberación <i>in vitro</i> .....	41
4. Ensayo de toxicidad hematológica .....	42
5. Ensayos de viabilidad celular .....	43
6. Estudio de la internalización de los sólidos .....	45
6.1 Estudio de la internalización de los sólidos mediante microscopía confocal.....	45
6.2 Estudio de la internalización de los sólidos mediante citometría de flujo .....	46
7. Ensayos de inhibición de la internalización .....	47
CONCLUSIONES .....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	52

## Abreviaturas

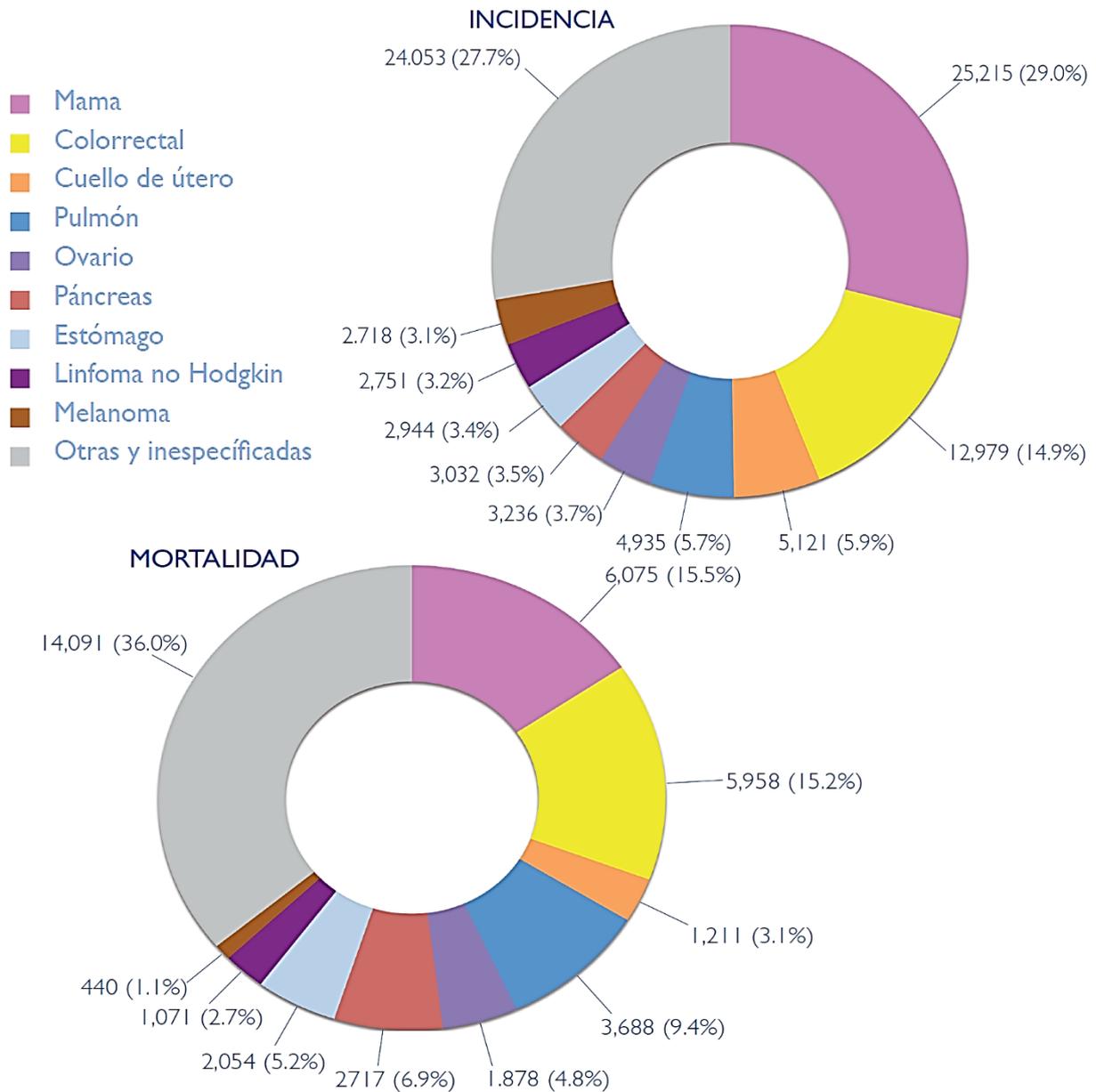
<b>ABC</b>	<i>ATP-binding cassette</i>
<b>ALDH</b>	Aldehído deshidrogenasa
<b>ALDH-1</b>	Aldehído deshidrogenasa-1
<b>APTES</b>	3-aminopropil-trietoxisilano
<b>BCSC</b>	Células madre tumorales de cáncer de mama ( <i>breast cancer stem cells</i> )
<b>BET</b>	Brunauer, Emmett y Teller
<b>BJH</b>	Barret, Joyner y Halenda
<b>CMTN</b>	Cáncer de mama triple negativo
<b>CSC</b>	Células madre tumorales ( <i>cancer stem cells</i> )
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetiltrimetilamonio
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesénquima ( <i>epithelial–mesenchymal transition</i> )
<b>EPR</b>	Retención y permeabilidad aumentada ( <i>enhanced permeability and retention</i> )
<b>FITC</b>	Fluoresceína-5-isotiocianato ( <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
<b>HA</b>	Ácido hialurónico ( <i>hyaluronic acid</i> )
<b>HER2</b>	Receptor de factor de crecimiento epidérmico-2 ( <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
<b>miRNA</b>	MicroRNA
<b>MSN</b>	Nanopartícula mesoporosa de sílice ( <i>mesoporous-silica nanoparticle</i> )
<b>MSN<sub>pg</sub></b>	Nanopartículas mesoporosas de sílice de poro grande
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>PI</b>	yoduro de propidio ( <i>propidium iodide</i> )
<b>siRNA</b>	RNA de silenciamiento
<b>RE</b>	Receptor de estrógenos
<b>RISC</b>	complejo de silenciamiento inducido por RNA
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensajero
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>TEOS</b>	Tetraetilortosilicato
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión ( <i>transmission electron microscopy</i> )
<b>TMB</b>	Trimetilbenceno

# INTRODUCCIÓN

## **1. Cáncer de mama**

Actualmente el cáncer de mama supone un problema considerable para la sociedad. Se estima que 1 de cada 8 mujeres sufrirá esta enfermedad a lo largo de su vida, siendo el carcinoma más frecuentemente diagnosticado en mujeres de 140 países de los 184 países del mundo, así como el que más muertes provoca. En 2012, sólo en España se diagnosticaron más de 25.000 nuevos casos, y supuso la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres, dando lugar a 6.075 muertes (**Figura 1**) (1,2). Además, entre 2008 y 2012 se observó un aumento de la incidencia de más del 20%. Esto se ha producido en la mayoría de los países desarrollados, posiblemente debido al envejecimiento de la población y a la mejora de las técnicas de diagnóstico, que permiten detectarlo cada vez más temprano, aunque la mortalidad es más elevada en los países menos desarrollados debido a la falta de métodos de detección temprana y a las dificultades para acceder a los tratamientos (1,3). En cuanto a la supervivencia, en los últimos 20 años se ha observado una mejora notable puesto que el diagnóstico temprano y los posibles tratamientos han permitido una supervivencia global a los 5 años del diagnóstico de un 82,8% en nuestro país, que es superior a la media europea y equiparable a la de los países con las mejores cifras de supervivencia (1).

Hay varios subtipos de cáncer de mama y distintos tipos de clasificaciones, aunque la clasificación más habitual suele hacerse en base a la expresión o no de tres receptores: el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico-2 (HER2). La mayoría de los tumores expresan al menos alguno de los marcadores indicados, mientras que entre el 10-20% no expresan ninguno de ellos (4,5). Este último subtipo se conoce como cáncer de mama triple negativo (CMTN) (6,7). Los tumores pertenecientes a este subgrupo, además de carecer de los receptores mencionados anteriormente, también se caracterizan por un comportamiento más agresivo en comparación con el resto de subtipos, un peor pronóstico y un riesgo más elevado de metástasis. Este es un proceso complejo que empieza con la migración de células tumorales desde el tumor primario y continúa con la entrada al sistema circulatorio, que permite la llegada a un lugar secundario donde las células se extravasan y colonizan, pudiendo dar lugar así a nuevos tumores derivados del primero (4,6,7).



**Figura 1:** incidencia y mortalidad en mujeres de los tumores más frecuentes (imagen modificada a partir de *Las cifras del cáncer en España, 2014* (2)).

Actualmente se dispone de algunas terapias dirigidas a receptores de membrana expresados por las células tumorales de carcinoma de mama, que ya han permitido un aumento de la tasa de supervivencia de pacientes con tumores RE/RP positivos y con amplificación de HER2, pero que no son aplicables para los pacientes con CMTN debido a la ausencia de dianas moleculares definidas (4,7,8). La única opción para las pacientes de este subtipo es la quimioterapia citotóxica que, aunque permite la respuesta en algunos casos, tiene una elevada toxicidad y una alta tasa de recaída en etapas tempranas. En el caso de las pacientes con CMTN metastático, la supervivencia media es menor de un año y sólo consigue sobrevivir una pequeña parte de ellas

a pesar de recibir quimioterapia. Es por ello que es cada vez más urgente el desarrollo de tratamientos efectivos para el CMTN (4,6–8).

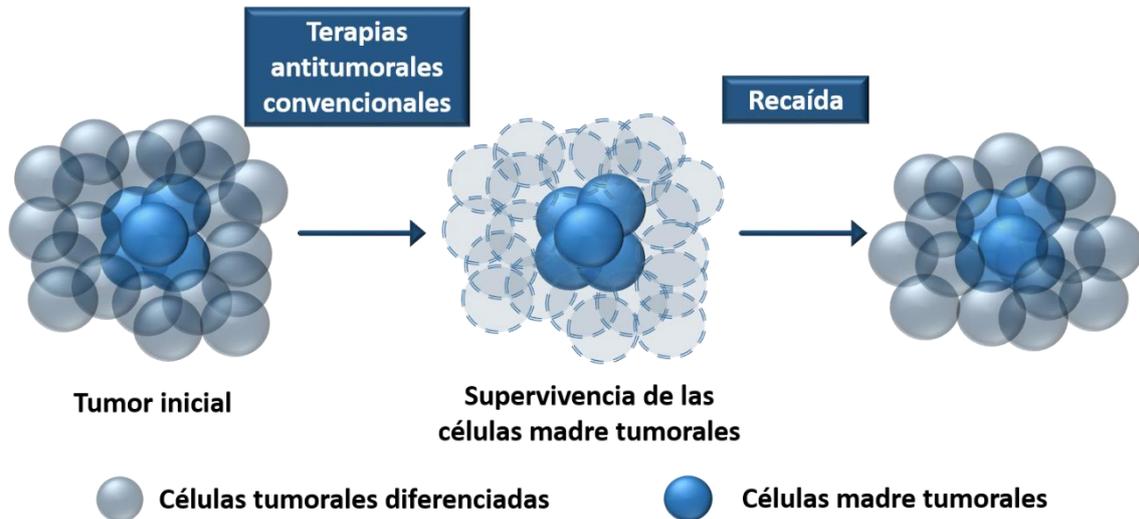
## **2. Células madre tumorales de cáncer de mama (BCSCs, *breast cancer stem cells*) y transición epitelio-mesénquima (EMT, *epithelial–mesenchymal transition*)**

Además de la heterogeneidad intertumoral comentada anteriormente, los tumores sólidos también están compuestos por una población heterogénea de células que tienen comportamientos distintos en cuanto a su capacidad para propagar el tumor, iniciar metástasis y resistir a terapias (9,10). Esta heterogeneidad intratumoral es explicada por dos modelos. El primero es el modelo de la evolución clonal, que postula que durante la evolución tumoral hay subclones de células cancerosas que adquieren al azar diferentes mutaciones o cambios epigenéticos que les confieren distintas características y propiedades, mientras que el segundo modelo, que es el más aceptado, es el modelo jerárquico o de células madre, que propone que las células tumorales se organizan en una jerarquía similar a la de los tejidos normales. En la cima de la jerarquía se encuentran células altamente tumorigénicas llamadas células madre tumorales (CSCs, *cancer stem cells*), que son una población minoritaria con la capacidad de autorenovarse para generar más CSCs, y de producir células diferenciadas con capacidad tumorigénica baja o nula, que comprenden la mayoría de la masa tumoral (10).

Las células madre tumorales de cáncer de mama (BCSCs, *breast cancer stem cells*) fueron aisladas e identificadas por primera vez por su fenotipo  $CD44^+/CD24^{-/bajo} Lin^-$ , y desde entonces se ha utilizado el fenotipo  $CD44^+/CD24^{-/bajo}$  para aislarlas. La molécula de membrana CD44 es una glicoproteína que sirve como receptor específico para el ácido hialurónico (HA, *hyaluronic acid*). Tiene un papel fundamental en adhesión, migración, invasión y angiogénesis, y está implicada en metástasis a tejidos u órganos como hueso, pulmón e hígado, que son los lugares más comunes de metástasis de cáncer de mama debido a su alto contenido en HA y osteopontina, que son ligandos específicos de CD44 que permiten el anclaje de las BCSCs. CD24 es otra glicoproteína de membrana, que expresada en bajos niveles aumenta la habilidad del tumor para crecer y metastatizar. Además, recientemente se ha reconocido otro marcador de BCSCs: la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1). Ésta es la forma dominante de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) en mamíferos. Media la conversión de retinaldehidos a ácido retinoico, y niveles elevados de expresión de esta enzima se correlacionan con resistencia a terapias, un

fenotipo agresivo, y un peor pronóstico clínico no solamente en cáncer de mama sino también en cáncer de esófago (11,12).

Hoy en día, ya hay evidencias que demuestran la hipótesis de que los tratamientos actuales son capaces de eliminar gran parte de las células tumorales, reduciendo así la masa tumoral, pero no son efectivos frente a las BCSCs, que tienen la capacidad de regenerar un nuevo tumor (**Figura 2**)(10,13).



**Figura 2:** las terapias antitumorales convencionales tienen la habilidad de eliminar la mayoría de la población tumoral pero no las células madre tumorales, que posteriormente, pueden regenerar el tumor, y/o dar lugar a metástasis.

El estudio de muestras de tumores de pacientes antes y después de recibir quimioterapia neoadyuvante, ha permitido comprobar que las células tumorales capaces de sobrevivir a estas terapias convencionales mostraban una expresión génica con características similares a BCSCs:  $CD44^+/CD24^{-/bajo}$  y altos niveles de expresión de los marcadores mesenquimales N-cadherina, vimentina y fibronectina (14). Esto también se ha visto en células en cultivo, donde se ha comprobado que las CSCs con características mesenquimales son más resistentes a los agentes genotóxicos que las células epiteliales sin estas características (15). Además, se ha visto que el uso de una combinación de quimioterapia convencional y metformina, que es un fármaco utilizado habitualmente para tratar la diabetes que tiene la capacidad de inhibir selectivamente las CSCs, bloquea el crecimiento tumoral y prolonga la remisión en xenotrasplantes en ratones, lo que supone un importante refuerzo para dicha hipótesis (13).

Actualmente, ya se conocen algunos mecanismos moleculares responsables de la resistencia de las BCSCs a la quimioterapia. En primer lugar, parecen estar implicados distintos transportadores de membrana de tipo *ATP-binding cassette* (ABC), que tienen la capacidad de transportar

compuestos y pequeñas moléculas fuera de la célula (11). Asimismo, parece ser que las BCSCs poseen mecanismos de reparación del DNA (11) y tienen una alta tolerancia a la radiación mediada por la vía de señalización Wnt, a la que también contribuye la producción del compuesto antioxidante NADP+ (16) y la actividad de la ALDH, que permite la eliminación de especies reactivas de oxígeno, que son mediadores de la muerte celular inducida por radiación ionizante (10,11). Además, se ha comprobado que la enzima ALDH1 permite metabolizar el agente antineoplásico ciclofosfamida y algunos análogos, posibilitando así su detoxificación (17).

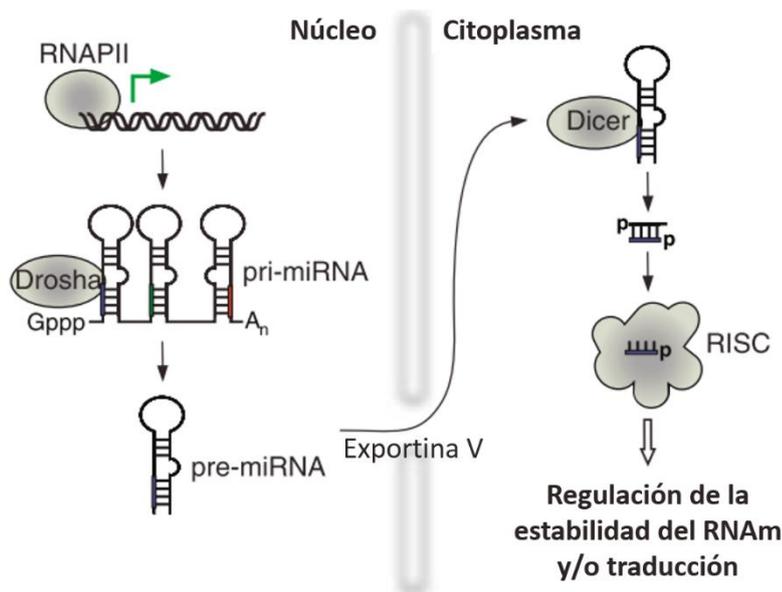
En cuanto al origen de las BCSCs, a pesar de que comparten algunas propiedades con células madre de tejidos normales, está establecido que no se originan necesariamente a partir de estas, sino que pueden formarse a partir de distintos tipos de células mamarias maduras (10). En este proceso de formación de las BCSCs tiene un papel importante la denominada transición epitelio-mesénquima (EMT, *epithelial–mesenchymal transition*), que es un proceso que permite a células epiteliales polarizadas adquirir un fenotipo mesenquimal con capacidad de migrar e invadir. Esto ocurre normalmente durante la etapa de morfogénesis embrionaria, pero también contribuye en los procesos de invasión tumoral, diseminación metastática y resistencia a fármacos (13,18–20). Ya hay estudios que demuestran que células diferenciadas que sufren EMT adquieren propiedades de células madre, como es la expresión de marcadores de BCSCs (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-bajo</sup>/ALDH1<sup>+</sup>), la capacidad de formar mamosferas y una tumorigenicidad incrementada (21,22) .

Una de las características de la EMT es la pérdida de adhesión celular y de polaridad epitelial en las células, que se dan como consecuencia de la pérdida de expresión de E-cadherina y aumento de expresión de N-cadherina, vimentina y fibronectina (23), marcadores cuya expresión es mayor en las BCSCs que en el resto de células tumorales (5,9,18,20), y mayor en CMTN que en otros subtipos (5). Además tiene un impacto importante en varias rutas de señalización ya que la disrupción de la polaridad epitelial permite la activación de las moléculas YAP/TAZ implicadas en la regulación del tamaño de los órganos y la homeostasis tisular (24), y la pérdida de E-cadherinas libera  $\beta$ -cateninas de la membrana plasmática y facilita su translocación nuclear para activar la vía Wnt canónica (25). La activación de ésta última se ha comprobado que aumenta la capacidad de formación de mamosferas *in vitro*, la tumorigenicidad *in vivo*, y la capacidad metastática de células tumorales (10). Ya se han identificado algunos inductores de EMT y metástasis como son los factores de transcripción ZEB1, ZEB2, SNAI2, SLUG y TWIST, que son represores transcripcionales de la E-cadherina (18,19).

Teniendo en consideración todo lo descrito anteriormente, es comprensible que las BCSCs hayan captado la atención de numerosos investigadores debido a su potencial como diana para las terapias de cáncer de mama (11), lo que justifica el diseño experimental de este proyecto, cuyo objetivo es el desarrollo de un tratamiento dirigido a BCSCs.

### 3. Terapias basadas en microRNAs (miRNAs)

Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante de entre 18 y 24 nucleótidos, capaces de regular la expresión de otros genes mediante la interacción con RNAs mensajeros (RNAm) diana. En primer lugar, son transcritos por la RNA polimerasa II en el núcleo, dando lugar a pri-miRNAs que son sucesivamente procesados por la ribonucleasa III Drosha, que libera pre-miRNAs con forma de horquilla. Estos son transportados al citoplasma por la exportina 5, y a continuación, son procesados por la ribonucleasa Dicer. Por último se integran en el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) y guían la degradación y/o represión de la transcripción de los RNAm diana (**Figura 3**) (19,26).



**Figura 3:** Biogénesis y función de los miRNA (imagen modificada a partir de *Kent et al.* (26)).

Desde el descubrimiento del RNA de interferencia en 1998, se ha comprobado que los miRNAs tienen papeles importantes en el desarrollo, diferenciación celular, metabolismo, regulación del ciclo celular y apoptosis, pero también en procesos patogénicos. Su implicación en tumorigénesis se demostró por primera vez en 2002 y desde entonces se ha ido esclareciendo su papel en la iniciación y progresión del cáncer como oncogenes y genes supresores de

tumores, a la vez que se ha observado como la pérdida de miRNAs supresores de tumores y la sobreexpresión de miRNAs oncogénicos ocurre en prácticamente todos los tipos tumorales. Es por ello que cada vez más se investiga el desarrollo de terapias cuyo objetivo sería la reconstitución de miRNAs supresores de tumores o la depleción de miRNAs oncogénicos en células tumorales (19,27).

### **3.1 miR-200c**

Entre los miRNAs que se consideran reguladores clave de CSC y EMT, la familia miR-200 tiene un papel particularmente interesante en el control de la EMT, y en migración e invasión tumoral (13,28). Dicha familia está compuesta por los microRNAs miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 y miR-429, que tienen la capacidad de unirse a sitios de reconocimiento en las regiones 3' no traducidas de los RNAm de los factores de transcripción ZEB1 y ZEB2, considerados activadores maestros de EMT, e inhibir su expresión (10,18,19). ZEB1 y ZEB2, además, son represores transcripcionales de la E-cadherina (23,25), y de la familia miR-200, lo que genera una retroalimentación negativa (13,29). Los miRNAs pertenecientes a esta familia, además de revertir EMT e inducir diferenciación epitelial, actúan como supresores tumorales que bloquean la formación de CSC (13), y también son capaces de inhibir la angiogénesis tumoral ya que se dirigen a las citosinas proangiogénicas IL-8 y XCL1 (30). Por otro lado, también funcionan como reguladores maestros de ciertas características del cáncer (19), y esto parece que puede estar mediado por su efecto inhibitorio sobre la vía de señalización Notch, que es una vía clave en células madre (31).

La expresión de la familia miR-200 está muy suprimida en células con características de BCSCs (9,13), lo que se ha relacionado con el mantenimiento de las características de CSC y un fenotipo de tipo mesenquimal (10), además de con una baja supervivencia en pacientes con tumores de vejiga, gástricos, colorrectales, pancreáticos, ováricos y de pulmón (19). Con el objetivo de determinar las funciones en las que está implicada la familia miR-200, se han hecho estudios de inhibición de estos miRNAs en los que se ha observado que se produce un aumento de ZEB1 y ZEB2, que provoca una disminución de la expresión de E-cadherina y que se dé el proceso de EMT. Además, aumenta el número de CSC en cáncer de mama y pancreático. Por el contrario, en ensayos en los que se han aumentado los niveles de miR-200 en células epiteliales, se ha observado que queda suprimida la acumulación de factores de transcripción de EMT y se mantienen las células en el estado epitelial, además de inhibirse la formación de CSC (9,13).

De entre todos los componentes de la familia miR-200, el miR-200c resulta especialmente interesante como posible diana para el tratamiento del cáncer de mama, por su implicación en EMT (32), en inhibición de la quimioresistencia (33,34) y en migración e invasión tumoral (33–37). Asimismo, miR-200c es capaz de inhibir rasgos de células madre, la clonogenicidad de células tumorales de mama (9), suprimir el crecimiento de células de carcinoma embrionario *in vitro* y la capacidad tumorigénica de BCSCs *in vivo* (9,13), y también de revertir la resistencia a anoikis, un tipo de muerte celular programada consecuenta a la pérdida del anclaje a la matriz extracelular, que es un paso fundamental en la cascada metastásica (18).

Con respecto a la quimioresistencia, la expresión de miR-200c se correlaciona con la resistencia adquirida de células tumorales de mama a doxorrubicina, que es un fármaco citotóxico con acción inhibitoria sobre la topoisomerasa II que se utiliza habitualmente para tratar pacientes con CMTN, de manera que al disminuir su expresión la resistencia a dicho fármaco aumenta. Además, la pérdida de expresión de miR-200c se correlaciona con unos niveles disminuidos de E-cadherina y PTEN, y unos niveles aumentados de ZEB1 y fosfo-AKT en células tumorales de mama con resistencia adquirida a doxorrubicina, mientras que el aumento de miR-200c da como resultado la disminución de ZEB1, aumento de E-cadherina y PTEN, inactivación de la señalización por la vía de AKT, y un aumento de la sensibilidad de células de cáncer de mama a doxorrubicina (23,25,32). Cuando se restaura miR-200c en células tumorales se observa una reducción de la capacidad migratoria e invasiva (18). Esto parece estar mediado por el aumento de E-cadherina. Sin embargo, recientemente se ha visto que incluso en líneas en las que la E-cadherina no se restaura, miR-200c reduce dramáticamente la migración e invasión, lo que implica que también actúa sobre otras dianas capaces de contribuir a la supresión de la motilidad celular (33).

En el contexto del cáncer de mama, un estudio realizado en la línea celular MDA-MB-231 de CMTN ha revelado que la sobreexpresión del miR-200c inhibe la proliferación y produce la inducción de apoptosis (38). Además, ya hay al menos un estudio *in vivo* que demuestra que la introducción de dicho miRNA reduce la habilidad de BCSCs humanas para formar tumores en ratones inmunocomprometidos (9). Por otro lado, su implicación se ha estudiado también en otros tipos de neoplasias, como el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, y el cáncer de células renales, y en ambos casos se ha demostrado su implicación en migración, metástasis y EMT (39,40).

En lo referente a la administración de moléculas miméticas de miRNAs, suele ser problemática ya que se trata de RNAs de doble cadena de unos 22 nucleótidos con un peso molecular de unos

15 kDa, poco estables en los fluidos biológicos y con una corta vida media debido a que son eliminados rápidamente de la circulación por las numerosas nucleasas presentes, y por el rápido aclaramiento renal debido a su bajo peso molecular. Además, los grupos fosfato los hace altamente hidrofílicos y aniónicos, lo que impide la difusión a través de las membranas celulares, y tiene como consecuencia que su entrada al citoplasma celular sea un proceso ineficiente y lento. Asimismo, una vez en los endosomas y lisosomas, los oligonucleótidos son susceptibles de la degradación ácida antes de alcanzar sus dianas. Para superar estos obstáculos podrían realizarse algunas modificaciones químicas como es la adición de los grupos 2'-O-metoxilo, 2'-O-metoxietilo, 2'-F, fosfotioratos, o la conjugación con colesterol, que aumentan su estabilidad y actividad pero debido a su laboriosidad, elevado coste y complejidad, parece que no son del todo aplicables para la clínica (19,27).

#### **4. Nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs)**

La nanomedicina pretende solucionar problemas médicos mediante el uso de dispositivos basados en la nanotecnología. Sus principales objetivos son mejorar las técnicas de diagnóstico, así como las de imagen médica, y los tratamientos actuales. En este último ámbito tiene mucho potencial, ya que mediante el uso de nanodispositivos es posible aumentar la biodisponibilidad de los fármacos y mejorar su eficacia, a la vez que se reduce la concentración necesaria y la frecuencia de administración, consiguiéndose así tratamientos más efectivos y menos agresivos para los pacientes. Asimismo, cabe destacar la posibilidad de reformular fármacos que no han llegado a la fase clínica por su poca solubilidad o efectos secundarios graves (41).

En los últimos años, se han utilizado ya varios tipos de nanomateriales para el transporte de moléculas de interés, como nanopartículas poliméricas, dendrímeros o liposomas. Sin embargo, es difícil conseguir que no haya ni siquiera una mínima liberación de las moléculas cargadas cuando se transportan con estos materiales. En muchos casos, la carga empieza a liberarse cuando estas estructuras se introducen en agua, lo que supone un problema cuando se trata de moléculas con elevada toxicidad, o fármacos basados en ácidos nucleicos o proteínas, que deben protegerse para evitar su degradación. Además, muchos nanomateriales basados en nanopartículas poliméricas, dendrímeros o liposomas se consideran demasiado tóxicos para su aplicación clínica (41).

Debido al rápido incremento del interés en el uso de dispositivos estables de liberación controlada, muchas investigaciones en la última década se han centrado en el desarrollo de este

tipo de sistemas que permitan transportar gran cantidad de moléculas a tejidos o incluso a orgánulos intracelulares sin el problema de la liberación prematura. Entre los distintos materiales con una estructura estable se encuentran los de sílice, que suele ser el material de elección cuando se trata de nanopartículas inorgánicas (41).

El término nanopartícula comprende varias familias de nanobjetos como son los dendrímeros, liposomas, micelas o nanopartículas de metal y sílice. Generalmente suelen clasificarse según su naturaleza orgánica (polímeros o bicapas lipídicas) o inorgánica (formadas por metales o materiales inertes como la hidroxiapatita o la sílice) (42). En comparación con las nanopartículas tradicionales lipídicas o poliméricas, los nanomateriales inorgánicos presentan propiedades únicas como la estabilidad y la facilidad para ser funcionalizados. Más concretamente, las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) han atraído un gran interés para aplicaciones tan variadas como técnicas de imagen médica, diagnóstico, biocatálisis, reparación de tejido óseo, síntesis de materiales de soporte, biosensores o liberación controlada de fármacos (41,43–46).

Las MSNs son materiales sólidos biocompatibles con una estructura porosa con cientos de canales vacíos (mesoporos). Poseen un tamaño de poro homogéneo, que va desde aproximadamente 2 a 10-20 nm, un volumen de poro elevado y una muy alta superficie específica de entre 500 y 1000 m<sup>2</sup>/g. Se caracterizan por poseer propiedades únicas como su gran área superficial, gran tamaño de poro, estabilidad química y térmica, y la posibilidad de regular la morfología y el tamaño de los poros. Estas características hacen que sean materiales potencialmente muy útiles en aquellos procesos que requieran la adsorción o encapsulación de cantidades significativas de moléculas bioactivas. Una de las ventajas más interesantes de este tipo de materiales es que su superficie permite la implementación o funcionalización con moléculas que actúan como “puertas moleculares”, permitiendo una liberación controlada de la especie almacenada, bajo demanda. Las “puertas moleculares” pueden ser definidas como dispositivos nanoscópicos que se implementan en la superficie de los silicatos porosos, y que pueden controlar el transporte de materia desde el interior de los materiales de estudio al exterior (o viceversa) de forma idealmente reversible, gracias a la aplicación de un estímulo externo, capaz de modificar alguna de las propiedades como la carga, el tamaño o la polaridad de la molécula anclada en el exterior (27,41,47,48).

En 2001 se propusieron por primera vez las MSNs como un posible sistema para transportar fármacos y desde entonces se han hecho numerosos esfuerzos para crear dispositivos basados en MSNs que permitan una liberación controlada. Con este fin es posible funcionalizar la superficie de las nanopartículas mediante componentes orgánicos como polímeros hidrófilos,

puertas o ligandos que permiten dirigir las nanopartículas a determinados tejidos o tipos celulares. Este tipo de dispositivos sin liberación prematura de la carga son particularmente útiles cuando esta es tóxica, como ocurre en el caso de los antitumorales, pero también permiten dirigir la liberación a un tejido o tipo celular específico. En los casos en que se realiza el recubrimiento de las nanopartículas con cubiertas orgánicas, además de facilitar el anclaje a ligandos para que haya reconocimiento celular específico también permite mejorar su biocompatibilidad (41,46).

En cuanto a la biocompatibilidad de las MSNs, se han realizado estudios de viabilidad y proliferación con diferentes células de mamíferos en los que se ha comprobado que la internalización de las MSNs no afecta hasta concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$  por  $10^5$  células incluso tras 7 ciclos celulares. Además, las células mantienen la integridad de membrana, la morfología celular, la actividad mitocondrial y las tasas de crecimiento normales. En cuanto a la biocompatibilidad a largo plazo y la biodegradación, hay animales modelo en los que se han realizado implantes de sílice y no se han observado efectos tóxicos derivados en un periodo de 42 días, lo que lleva a pensar que las MSNs tendrían al menos la misma biocompatibilidad que otros materiales de sílice (41).

Cabe comentar que ya se han realizado pruebas *in vivo* con MSNs que han mostrado resultados satisfactorios en cuanto a citotoxicidad, biodegradación, biodistribución y excreción, y recientemente se ha iniciado el reclutamiento de pacientes para un ensayo clínico de nanopartículas de sílice en forma de "cornell dots", siendo este el primer ensayo clínico con este tipo de materiales, lo que supone un gran avance hacia su aceptación clínica (27,47,48).

La síntesis de MSNs se llevó a cabo por primera vez en 1992 y desde entonces se han realizado numerosos estudios. Su síntesis se basa en el uso de precursores de sílice como el tetraetilortosilicato (TEOS), silicato sódico o silicato de tetrametilamonio en presencia de surfactantes catiónicos en condiciones básicas. Los surfactantes forman micelas y, sucesivamente, estructuras supramicelares que actúan como molde y dan lugar a la formación de poros al combinarse con los precursores de sílice. Usualmente, se utiliza el TEOS en combinación con el surfactante catiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) a pH 11. Finalmente, se elimina el surfactante del interior de los poros, lo que puede hacerse mediante tres métodos: tratamiento con nitrato amónico, reflujo en alcohol acidulado con ácido clorhídrico o calcinación. La eliminación del surfactante del interior de los poros permite la obtención de las nanopartículas mesoporosas (47,49).

Las MSNs pueden servir como herramienta para permitir la llegada de moléculas de miRNA al citoplasma, donde tienen que ejercer su acción. De hecho, ya hay trabajos en los que se han administrado RNAs de silenciamiento (siRNAs) mediante MSNs. Estas moléculas tienen propiedades fisicoquímicas muy similares a los miRNAs pero, a diferencia de los miRNAs que son moléculas codificadas en el genoma que no requieren una completa complementariedad por lo que pueden dirigirse a varios RNAm diana, los siRNAs se originan de forma exógena, entran a las células mediante endocitosis o vectores como pueden ser virus, y se dirigen a un RNAm específico (50). Ya hay autores que han diseñado nanodispositivos para su administración, sobretodo adsorbiendo siRNAs en la superficie de las nanopartículas, y también en algunos casos se han cargado en el interior de MSNs de poro grande (MSNpg), demostrando que de este modo se pueden administrar incluso de un modo más eficaz que con agentes de transfección comerciales (27,51,52).

Las MSNpg, a diferencia de las MSNs convencionales como el material MCM-41, que posee un tamaño de poro de aproximadamente 2 nm de diámetro, presentan poros con tamaños que llegan a ser superiores a los 20 nm de diámetro. Estos materiales se preparan mediante expansión de los poros de MSNs convencionales mediante agentes expansores de poro como el trimetilbenceno (TMB), que es el más utilizado. Las MSNpg son especialmente útiles cuando pretenden sintetizarse nanopartículas con moléculas de gran tamaño cargadas en el interior de sus poros (27,52).

Una de las ventajas de transportar miRNAs mediante MSNs es que estas, además de permitir el transporte de moléculas protegiéndolas de la degradación o detección por el sistema inmunitario, también ofrecen la posibilidad de transportar moléculas hidrófobas o con una elevada toxicidad, permitiendo aumentar su efecto terapéutico y reduciendo los efectos adversos (46).

# OBJETIVOS

El objetivo final de este proyecto fue comparar dos nanodispositivos. Uno de ellos basado en MSNpg, y el otro basado en MCM-41 como soporte inorgánico, para la liberación de doxorubicina y moléculas miméticas de miR-200c, que se dirijan de forma específica a las BCSCs.

En este trabajo se realizaron pruebas preliminares con nanodispositivos sin incorporar las moléculas miméticas de miR-200c. Con esto se pretendió comparar las dos estrategias, y descartar una de ellas en caso de que no resultara efectiva, previamente a la síntesis de los nanodispositivos finales, que sí que incorporarían las moléculas miméticas de miR-200c.

Para ello, los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Diseñar, sintetizar y caracterizar dos nanodispositivos utilizando MSNpg y MCM-41 como soporte inorgánico.
2. Comprobar *in vitro* que la liberación de las moléculas cargadas en el interior de los poros se produce de forma controlada
3. Comprobar que los nanodispositivos no producen hemólisis.
4. Validar la eficacia de los materiales en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.
5. Determinar la eficiencia con que se internalizan los nanodispositivos por las células.
6. Comprobar que los nanodispositivos se dirigen específicamente a células que expresan el receptor CD44.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## **1. Síntesis de los materiales mesoporosos**

### **1.1 Síntesis de MSNpg**

La síntesis de las MSNpg se llevó a cabo mediante un método basado en el uso de tetrametilortosilicato (TMOS) como precursor inorgánico, el tensoactivo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como agente director de estructura, y la incorporación del agente expansor 1,3,5-trimetilbenceno (TMB), como fue descrito anteriormente por otros autores (27,52). Para ello, 3,94 g de CTAB (Aldrich) y 2,28 mL de una disolución 1M de NaOH (Aldrich) se disolvieron en 800 g de la mezcla etanol 96% (Scharlab)/agua (0,4:0,6, v:v). Con agitación a 700 rpm se añadió 1,3 mL de TEOS (Aldrich) a la solución. Después de dejar en agitación 8 horas, la mezcla se dejó reposar toda la noche. El precipitado blanco resultante (pre-MSNpg) se separó mediante centrifugación, se lavó dos veces con etanol y tres con agua desionizada, y se dejó secar a 70°C. Posteriormente se suspendió el polvo blanco resultante en etanol mediante sonicación durante 30 minutos y a esta suspensión se le añadieron 20 mL de una mezcla 1:1 (v:v) de agua y TMB (Aldrich). La suspensión se colocó en autoclaves y se mantuvo a 140°C durante 3 días. Transcurrido este tiempo se aisló el sólido mediante centrifugado, y se lavó dos veces con etanol y tres veces con agua. La materia orgánica se eliminó mediante calcinación en una mufla a 550°C durante 5 horas en atmósfera oxidante. De este modo se obtuvo el material MSNpg.

### **1.2 Carga de MSNpg**

En un segundo paso los poros del material MSNpg se cargaron con doxorrubicina, obteniendo así el sólido MSNpg-doxo. Para ello se suspendieron 30 mg de MSNpg en una disolución de 15 mg de doxorrubicina (0,86 mmoles doxorrubicina/g de sólido) en 500 µL de agua desionizada, y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente.

### **1.3 Funcionalización de MSNpg-doxo y MSNpg**

Los materiales MSNpg y MSNpg-doxo se funcionalizaron, en primer lugar, con PEI, y posteriormente con HA, para obtener así los sólidos MSNpg-doxo-PEI-HA, y MSNpg-PEI-HA, respectivamente. En ambos casos, las moléculas orgánicas se adsorbieron por interacción electrostática con la superficie de la nanopartícula.

Para la funcionalización de los sólidos, se suspendieron 30 mg de MSNpg y el sólido MSNpg-doxo (obtenido tras el proceso de carga con doxorubicina) en 825  $\mu\text{L}$  de PBS 42x y se añadieron 15  $\mu\text{L}$  de polietilenimina (PEI) (Aldrich) (relación MSNpg/PEI 2:1 mg/ $\mu\text{L}$ ), dejándose la suspensión en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. En el caso de MSNpg-doxo, en la disolución de funcionalización con PEI se añadieron 2 mg de doxorubicina con el objetivo de evitar la liberación del fármaco cargado en el paso anterior al medio. A continuación, se centrifugó a 9.500 rpm durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se resuspendieron los sólidos (MSNpg-PEI y MSNpg-doxo-PEI) en 825  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, se añadieron 7,5 mg de ácido hialurónico, y se dejaron en agitación durante 3 horas, para centrifugarse posteriormente a 9.500 rpm durante 10 minutos.

Por último, se realizaron varios lavados de MSNpg-doxo-PEI-HA con agua para eliminar la doxorubicina adsorbida en la superficie del material, resuspendiendo el sólido en 10 mL de agua desionizada y centrifugando a 9.500 rpm durante 10 minutos, hasta obtener el sobrenadante incoloro. En el caso de MSNpg-PEI-HA, se realizaron los lavados de forma paralela, puesto que este sólido pretendía utilizarse posteriormente como control negativo del anterior. Los sólidos finales se dejaron secar a vacío a temperatura ambiente hasta que se secaron por completo.

#### **1.4 Síntesis del material MCM-41**

La síntesis de las nanopartículas mesoporosas de tipo MCM-41 se llevó a cabo mediante un procedimiento basado en el uso de tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor inorgánico y el tensoactivo CTAB como agente director de estructura (53–57). Para ello se adicionó 1 g (2,74 mmol) de CTAB (Aldrich) a 480 mL de H<sub>2</sub>O desionizada. Dicha disolución se dejó en agitación a 100 rpm en una placa calefactora a 28°C. A continuación, se añadieron rápidamente, para evitar la carbonatación, 3.5 mL de NaOH (Aldrich) 2 M en H<sub>2</sub>O desionizada y posteriormente se ajustó la temperatura de la disolución a 80°C y se añadieron, gota a gota, 5 mL (2,57x10<sup>-2</sup> mol) de TEOS (Aldrich), dejándose la disolución a incubar durante 2 horas en agitación, hasta observarse la formación de un precipitado blanco. Sucesivamente, el producto sólido obtenido se centrifugó a 9.500 rpm durante 20 minutos y se lavó con agua desionizada hasta neutralizar el pH de la disolución. Una vez alcanzado el pH deseado, el material (pre-MCM-41) se dejó secando en la estufa a 60°C durante 24 horas. Finalmente, se procedió a la calcinación en la mufla del sólido obtenido, para eliminar el CTAB utilizado como molde; para ello, el material se dejó a 550°C durante 5 horas en atmósfera oxidante. Este proceso dio lugar al material MCM-41.

### **1.5 Carga de MCM-41**

Tras la obtención del material MCM-41 se procedió a cargar una fracción de este con doxorubicina, obteniendo así el sólido MCM-41-Doxo. Para ello se suspendieron 200 mg de MCM-41 en una disolución de 40 mg de doxorubicina (0,35 mmoles doxorubicina/g sólido) en 1,5 mL de agua desionizada, se sonicó la suspensión durante 1 minuto, y se dejó secar en estufa a 37°C.

### **1.6 Funcionalización de MCM-41 y MCM-41-doxo**

Los materiales MCM-41 y MCM-41-doxo se funcionalizaron con PEI y ácido hialurónico, para obtener los sólidos MCM-41-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA, respectivamente

Para ello se resuspendieron 200 mg de cada sólido en 5,5 mL de PBS 42x, y se añadieron 100 µL de PEI (Aldrich) (relación sólido/PEI 2:1 mg/µL, y PEI/PBS 42x 1:55 en volumen), y 4 mg de doxorubicina para evitar la difusión del fármaco desde el interior de los poros al medio de funcionalización. Esta suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, se centrifugó a 9.500 rpm durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante. Los sólidos resultantes se resuspendieron en 825 µL de H<sub>2</sub>O desionizada, se añadieron 7,5 mg de ácido hialurónico, y se dejaron en agitación durante 3 horas, para centrifugarse posteriormente a 9.500 rpm durante 10 minutos. Por último, se realizaron varios lavados del sólido MCM-41-doxo-PEI-HA con agua para eliminar la doxorubicina adsorbida en la superficie del material, resuspendiendo el sólido en 10 mL de agua desionizada y centrifugando a 9.500 rpm durante 10 minutos, hasta obtener el sobrenadante incoloro. En el caso de MCM-41-PEI-HA, se realizaron los lavados de forma paralela, puesto que este sólido pretendía utilizarse posteriormente como control negativo del anterior. Los sólidos finales se dejaron secar a vacío a temperatura ambiente hasta que se secaron por completo.

## **2. Caracterización de los materiales**

### **2.1 Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno**

El análisis de la superficie de los materiales se llevó a cabo en el equipo Micromeritics ASAP2010 automate desorption analyser. Para ello las muestras fueron previamente desgasificadas a 120°C a vacío durante 24 horas.

Las áreas superficiales específicas se determinaron utilizando los datos de adsorción en el rango de presiones menores mediante el modelo de Brunauer, Emmett y Teller (BET), que se basa en la capacidad de los sólidos para absorber gases en su superficie y permite obtener la superficie específica. Suponiendo que las partículas son esféricas y que presentan una distribución de tamaño estrecha, se puede obtener un diámetro medio de las nanopartículas denominado diámetro de BET. (49,58).

La distribución de tamaño de poro se calculó siguiendo el método propuesto por Barret, Joyner y Halenda (BJH), que permite el cálculo de su diámetro y volumen (49,59).

### **2.2 Medida de difracción de rayos X de ángulo pequeño de polvo**

Los patrones de difracción de rayos X de polvo de los materiales, determinados por la periodicidad y el orden interno de las MSN, se obtuvieron mediante el difractor Philips D8 Advance utilizando radiación Cu K $\alpha$ .

### **2.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM, *transmission electron microscopy*)**

La morfología y dimensiones de los materiales se estudió mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM, *transmission electron microscopy*) utilizando el microscopio 100 kV Jeol JEM-1010, operando a 100 kV para examinar la muestra a una magnificación óptica de entre 2.500 x y 40.000 x . Para la realización de estas mediciones se sonicó una alícuota de cada sólido en 250  $\mu$ L de 1,2-dicloroetano durante 5 minutos. Posteriormente, se dejó caer una gota de esta suspensión sobre una rejilla de TEM y se dejó secar al aire.

### **3. Ensayo de liberación *in vitro***

El ensayo de liberación *in vitro* se realizó utilizando como estímulos de liberación extracto lisosomal purificado, o agua desionizada a pH 4,5 (blanco).

#### **3.1 Obtención de extracto lisosomal purificado a partir de hígado de conejo**

El extracto lisosomal purificado se obtuvo a partir de hígado de conejo, utilizando el kit Lysosome Isolation Kit (LYSISO1), de Aldrich. Se llevó a cabo el protocolo indicado en el informe técnico de dicho kit.

#### **3.2 Realización del ensayo de liberación *in vitro***

Para la realización de los ensayos de liberación *in vitro* de los sólidos MSNpg-doxo-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA, se utilizó como estímulo extracto lisosomal purificado y agua desionizada a pH 4.5 para el blanco.

En primer lugar, se suspendió 1 mg de cada sólido en 2 mL de agua desionizada, y la suspensión resultante se dividió en dos alícuotas. A continuación, se recogieron alícuotas de 150  $\mu$ L a tiempos 30 segundos y 5 minutos. Estas se centrifugaron durante 2 minutos a 9.500 rpm, y se recogieron 120  $\mu$ L del sobrenadante. Posteriormente se procedió a añadir 1 mL de extracto lisosomal en una de las alícuotas, y 1 mL de agua desionizada a pH 4.5 en el restante (blanco). Los tubos se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, tomando 5 alícuotas de 150  $\mu$ L a lo largo de este periodo (2, 5, 15, 30 y 60 minutos). Estas alícuotas se centrifugaron del mismo modo que en el caso anterior, durante 2 minutos a 9.500 rpm y se recogieron 120  $\mu$ L del sobrenadante. La liberación de doxorubicina en función del tiempo se midió con el equipo JASCO Spectrofluorometer FP-8500, mediante su banda de emisión a 557 nm ( $\lambda_{exc} = 480$  nm). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **4. Ensayo de toxicidad hematológica**

La actividad hemolítica del material MSNpg-PEI-HA se evaluó según el protocolo descrito por *Evans et al.* (60). Se recogieron 3 mL de sangre de tres voluntarios en tubos con EDTA para

prevenir la coagulación, se centrifugó la sangre a 500 xg durante 5 minutos y se descartó el plasma. El hematocrito obtenido se lavó tres veces con PBS a pH 7.4 utilizando un volumen equivalente al plasma descartado, centrifugando a 500 xg durante 5 minutos. Tras el último lavado se añadió el mismo volumen de PBS a pH 7.4 que en los lavados y se realizó una dilución 1:50 en PBS a pH 7.4. A continuación, se incubaron 190 µL de estas diluciones con 10 µL de diluciones de las nanopartículas a concentraciones 20, 100 y 800 µg/ml (para que queden finalmente a 1, 5 y 40 µg/ml), 10 µL de Triton X-100 al 20% para los controles positivos, y 10 µL de PBS a pH 7,4 en los controles negativos. Esto se incubó a 37° durante 1 hora y a continuación se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos y se transfirieron 100 µL del sobrenadante a una placa de 96 pocillos en la que se llevó a cabo la medida de la absorbancia a 540 nm (permite medir la liberación de hemoglobina) con el lector de placas. Este ensayo se realizó por triplicado con cada una de las tres muestras, así como con los controles.

## **5. Ensayos de viabilidad celular**

### **5.1 Cultivo celular**

En este estudio se utilizó la línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231. El medio de cultivo utilizado fue Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Thermo Fisher Scientific) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Thermo Fisher Scientific), un 1% de penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL) (Thermo Fisher Scientific), y un 1% L-glutamina (200 mM) (Thermo Fisher Scientific). Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.2 Realización de los ensayos de viabilidad celular**

La citotoxicidad de los sólidos MSNpg-PEI-HA, MSNpg-doxo-PEI-HA, MCM-41-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA se evaluó mediante un estudio de viabilidad utilizando células MDA-MB-231. Para ello se sembraron las células en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de siembra de  $1 \times 10^4$  células por pocillo. Tras incubarlas durante 24 horas en 200 µL de medio completo, se retiró el medio en el que se encontraban las células, y se sustituyó por una suspensión de nanopartículas en el caso de los sólidos MSNpg-doxo-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA en medio de cultivo a una concentración equivalente de doxorrubicina de 0.1, 0.3, 1, 5, 10, 20, 50, 100 y

150  $\mu$ M. Para el cálculo de la cantidad necesaria de nanopartículas en cada caso, se supuso que la totalidad de la doxorrubicina añadida en el paso de carga quedó en el interior de los poros o adsorbida en la superficie de las nanopartículas. Las cantidades de MSNpg-PEI-HA y de MCM-41-PEI-HA fueron las mismas que de MSNpg-doxo-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA, respectivamente. Transcurridas 48 horas se retiró el medio y se añadieron 100  $\mu$ L de una disolución de WST-1 al 7% (Sigma-Aldrich), que es una sal de tetrazolio que se transforma a formazan por las deshidrogenasas mitocondriales, en DMEM-F12 sin rojo fenol (Sigma). Se incubaron las células durante 1 hora, y a continuación se procedió a realizar la lectura de la absorbancia a 490 nm, que permite cuantificar la cantidad de formazan producido, y este es directamente proporcional al número de células vivas. A esta absorbancia se le restó la absorbancia a 690 nm (referencia). Los ensayos se hicieron por triplicado.

## **6. Estudio de la internalización de los sólidos**

Para comprobar la endocitosis de los sólidos MSNpg y MCM-41, se hicieron ensayos en la línea celular MDA-MB-231 y se comprobó la internalización mediante microscopía confocal y citometría de flujo.

### **6.1 Estudio de la internalización de los sólidos mediante microscopía confocal**

Para estudiar la internalización de los sólidos MSNpg-doxo-HA-PEI y MCM-41-doxo-HA-PEI mediante microscopía confocal, se sembraron células MDA-MB-231 en cubreobjetos con 8 cámaras de cultivo celular (Nunc Lab-Tek II chambered coverglass, Thermo Fisher Scientific) a una densidad celular de 45.000 células/cámara en 500  $\mu$ L de medio completo, y se incubaron durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con 100  $\mu$ g/mL de los sólidos MSNpg-doxo-PEI-HA o MCM-41-doxo-PEI-HA, y se incubaron durante 30 minutos y 3 horas, para posteriormente lavarlas con PBS, y fijarlas. Para ello, se añadieron a cada compartimento 100  $\mu$ L de una disolución de paraformaldehído (Sigma-aldrich) al 4% y Hoechst 33342 (Thermofisher) en una relación 1:2000, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se lavó dos veces con PBS. Las muestras se observaron mediante microscopía confocal con el microscopio LSM 710 de Zeiss. Estos ensayos se hicieron por triplicado.

## **6.2 Estudio de la internalización de los sólidos mediante citometría de flujo**

Para realizar los ensayos mediante citometría de flujo se utilizaron nanopartículas marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) anclado covalentemente a su superficie.

### **6.2.1 Marcaje de los sólidos MSNpg y MCM con FITC**

Para el marcaje de los sólidos con un fluoróforo se unió FITC covalentemente a la superficie de las nanopartículas MSNpg y MCM-41.

Con este objetivo, en primer lugar, se preparó el compuesto FITC-APTES mediante una reacción de formación de una urea entre el FITC y el 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES). De esta forma se pudo anclar FITC-APTES en la superficie de las nanopartículas. Para ello se disolvieron 77  $\mu$ moles de FITC en 10 mL de etanol, y se sonicó durante 5 minutos. A esta suspensión se le añadieron 200  $\mu$ L de 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES) y se dejó en agitación durante 24 horas en atmósfera inerte en oscuridad. Transcurrido este periodo se eliminó el disolvente mediante rotavaporación, se añadió 1 mL de acetonitrilo al FITC-APTES resultante, y se sonicó durante 5 minutos.

En el caso de MSNpg se incubaron 30 mg de sólido con 250  $\mu$ L de la disolución de FITC-APTES, mientras que en el caso del sólido MCM-41 se incubaron 30 mg de sólido con 125  $\mu$ L de la suspensión. Cuando se trataba de MSNpg se añadió una cantidad mayor de FITC-APTES debido a que el área superficial de estas nanopartículas es mayor. De este modo se obtuvieron los sólidos MSNpg-FITC y MCM-41-FITC, respectivamente.

### **6.2.2 Realización del ensayo**

Para los ensayos de citometría de flujo, las células MDA-MB-231 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de siembra de 50.000 células/pocillo en 1 mL de medio. Tras ser incubadas durante 24 horas, el medio se reemplazó por suspensiones de MSNpg-FITC y MCM-41-FITC en medio, a una concentración de 100  $\mu$ g/mL durante 30 minutos o 3 horas. Pasado el tiempo de incubación las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron, y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos. A continuación, se resuspendieron en 500  $\mu$ L de una disolución al 0,4% de azul de tripano (HyClone). Se incubaron las células durante 10 minutos y se realizó un lavado con PBS.

El análisis se llevó a cabo en un equipo FACSVerse, de BD biosciences. Se estableció la intensidad límite de detección por encima del valor más alto observado en células control a las que no se les había añadido azul de tripano ni DAPI. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

### **7. Ensayos de inhibición de la internalización**

Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de siembra de 10.000 células por pocillo en 200  $\mu$ L de medio completo. 24 horas después se reemplazó el medio por una disolución de HA en medio completo a una concentración de 5 mg/mL, y se incubaron las células durante 30 minutos. Posteriormente se reemplazó este medio por una suspensión de MSNpg-doxo-PEI-HA o MCM-41-doxo-PEI-HA a una concentración equivalente de doxorubicina de 50  $\mu$ M. Tras 48 horas, se procedió a medir la viabilidad (véase el punto 5.2 *Realización de los ensayos de viabilidad celular*, del apartado *Material y métodos*). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **8. Análisis estadístico**

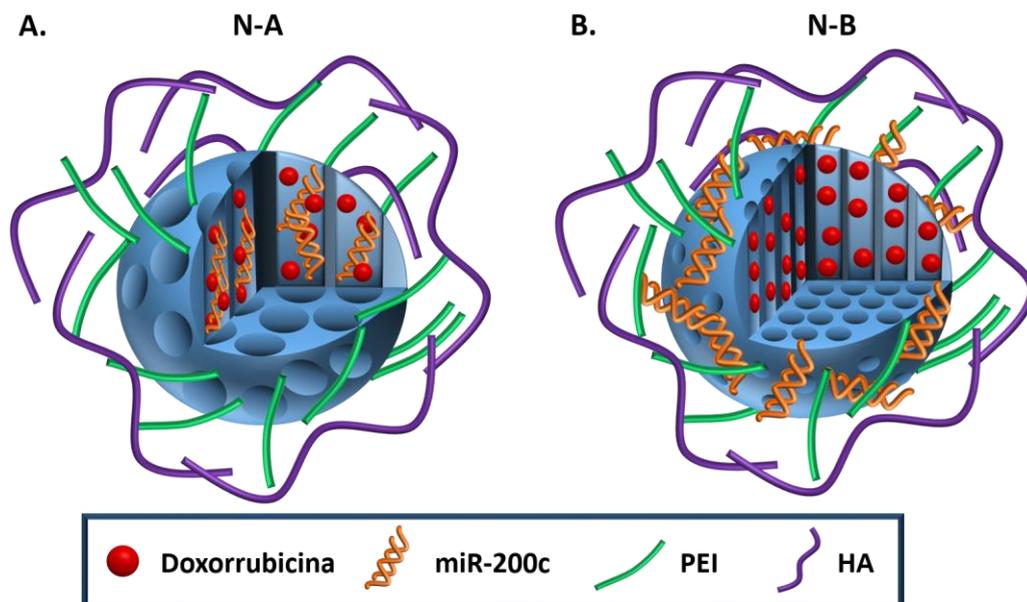
Los análisis de datos se llevaron a cabo con el software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). Se realizó el test t-student, considerándose resultados estadísticamente significativos cuando el valor de *P* era menor a 0,05.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. Diseño del sistema

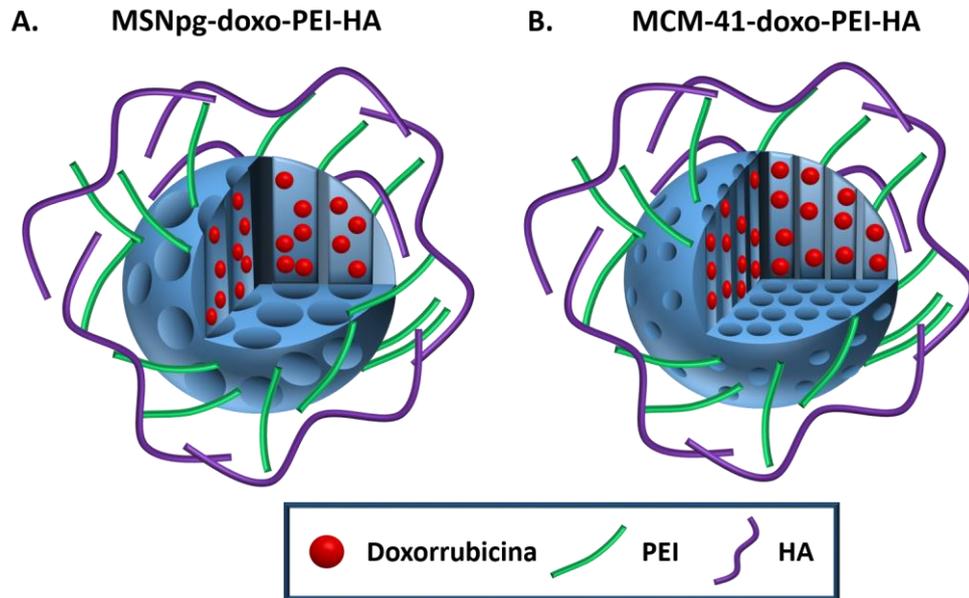
Como se ha comentado anteriormente, el objetivo final del trabajo fue comparar dos estrategias terapéuticas para determinar cuál de ellas resultaría más efectiva para el tratamiento del cáncer de mama. Los nanodispositivos objeto de este estudio son los que se detallan a continuación:

- A. N-A: Nanopartículas basadas en MSNpg como soporte inorgánico, cargadas con doxorubicina y miR-200c, y funcionalizadas con PEI y HA (**Figura 4A**).
- B. N-B: Nanopartículas basadas en MCM-41 como soporte inorgánico, cargadas con doxorubicina, funcionalizadas con PEI sobre el que quedarían adsorbidas las moléculas de miR-200c, y recubiertas con HA (**Figura 4B**).



**Figura 4:** Representación esquemática de los nanodispositivos objeto de estudio. **A:** N-A: MSN de poro grande, cargadas con doxorubicina y miR-200c, y funcionalizadas con polietilenimina (PEI) y ácido hialurónico (HA). **B:** N-B: MCM-41 cargadas con doxorubicina, funcionalizadas con PEI con miR-200c adsorbido sobre la PEI, y recubiertas con HA.

Sin embargo, debido a la poca estabilidad química de las moléculas miméticas de miR-200c, y como estudio preliminar, se decidió preparar dos materiales cargados exclusivamente con doxorubicina y que se diferencian en el tamaño de los poros de la matriz inorgánica. Estos dispositivos son MSNpg-doxo-PEI-HA (**Figura 5A**) y MCM-41-doxo-PEI-HA (**Figura 5B**).



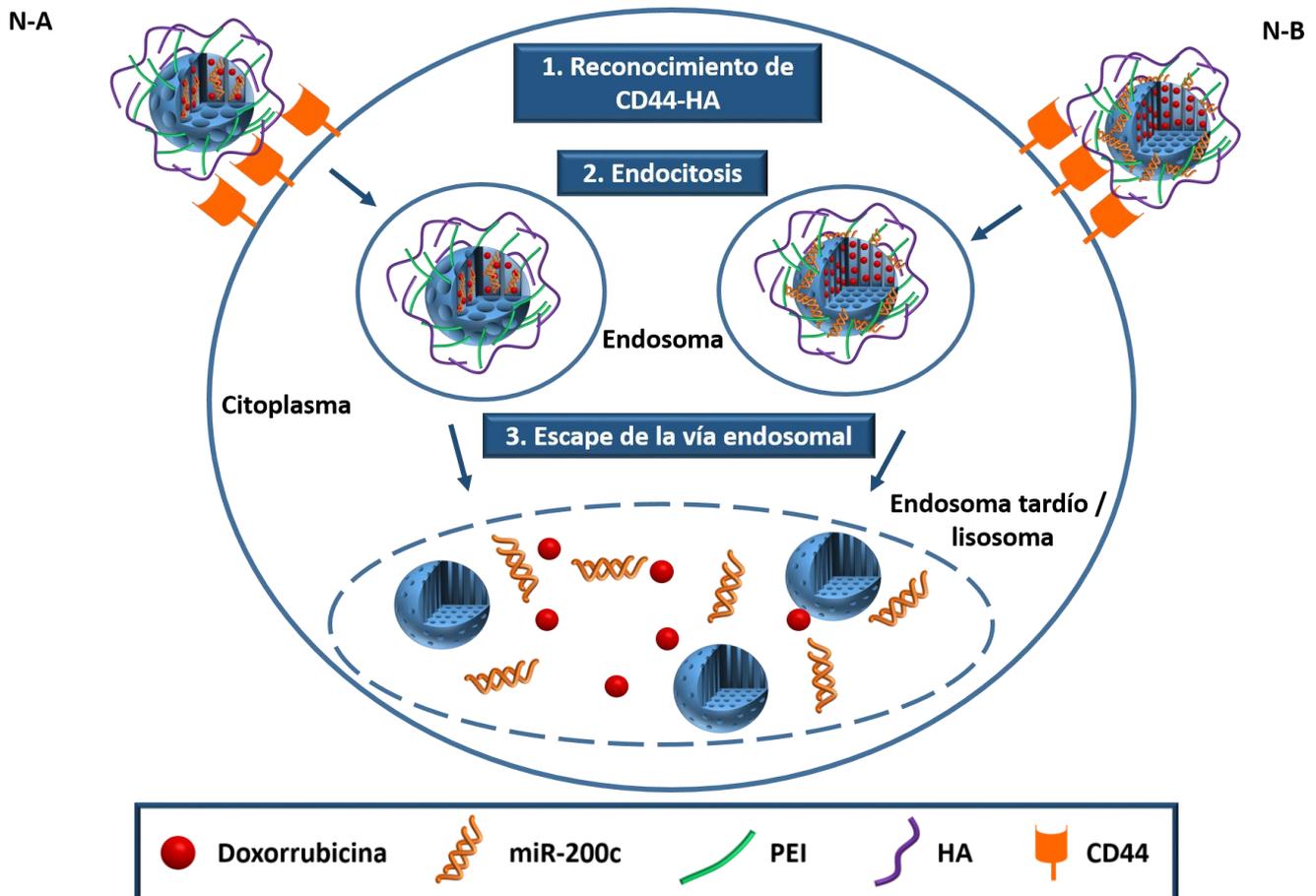
**Figura 5:** Representación esquemática de los nanodispositivos a comparar en este trabajo. **A:** MSNpg-doxo-PEI-HA: MSN de poro grande (MSNpg), cargadas con doxorubicina y funcionalizadas con polietilenoimina (PEI) y ácido hialurónico (HA). **B:** MCM-41-doxo-PEI-HA: MCM-41 cargadas con doxorubicina y funcionalizadas con PEI y HA.

Para dirigir los nanodispositivos de forma selectiva a las BCSCs, se utilizó HA recubriendo las nanopartículas. Este, como se ha visto, es un ligando del receptor CD44, que está sobreexpresado en las BCSCs. Se trata de un glicosaminoglicano biodegradable, biocompatible y no inmunogénico, componente principal de la matriz extracelular y esencial para el crecimiento celular, estabilidad estructural de los órganos, y organización tisular.

Pero además de recubrir las MSNs con HA, también es necesario funcionalizar su superficie con otras moléculas que permitan el denominado *escape de la vía endosomal*. Esto se debe a que en general, las MSNs se internalizan en las células vía endocitosis. Este es un proceso complejo mediante el que las células utilizan parte de su membrana celular para crear una vesícula dentro de la que quedan las partículas (endosomas), que se fusionarán posteriormente con los lisosomas. Los lisosomas son orgánulos celulares con pH ácido que contienen numerosas enzimas digestivas, y la fusión endosoma-lisosoma podría provocar la degradación de los nanodispositivos y de las moléculas cargadas en su interior. Por tanto, un paso fundamental para que la terapia sea efectiva es facilitar el escape endosomal para asegurar que el contenido de las MSNs sea liberado en el citoplasma celular. Hay muchas terapias antitumorales como la doxorubicina que son capaces de atravesar las membranas por lo que no es del todo necesario que se lleve a cabo el escape de la vía endosomal y solo requieren que se prevenga la liberación prematura para evitar efectos no deseados como consecuencia de su efecto sobre células sanas.

Pero en el caso de moléculas hidrofóbicas o que no tienen la capacidad de atravesar la membrana, como es el caso de los miRNAs, sí son necesarias (46).

Para lograr el *escape de la vía endosomal*, se optó por funcionalizar las nanopartículas con PEI. Esta es una molécula con numerosos grupos protonables que tiene efecto de tampón de pH (llamado esponja de protones), que entraría a los endosomas adsorbida en los nanodispositivos, donde provocaría un hinchamiento osmótico y ruptura de la membrana endosomal sin necesidad de ningún estímulo externo. No se conoce exactamente el mecanismo de acción de este tipo de moléculas pero parece ser que durante el trayecto hacia los endosomas tardíos o lisosomas, los endosomas se acidifican desde pH fisiológico hasta 5,5, lo que provoca un aumento drástico del nivel de protonación de la PEI. La acumulación de cargas positivas dentro del endosoma tardío o lisosoma está acoplada a una entrada pasiva de aniones cloruro a través de canales de iones para mantener la electroneutralidad. Este gran aumento de la concentración de iones resulta en una entrada de moléculas de agua que causan el hinchamiento del orgánulo y la ruptura de su membrana, y por tanto la liberación al citoplasma de las nanopartículas y de su contenido (45,46,61) (**Figura 6**).



**Figura 6:** Representación esquemática del mecanismo de acción de los nanodispositivos. En primer lugar, el ácido hialurónico (HA) adsorbido en la superficie de las nanopartículas N-A y N-B sería reconocido por el receptor de membrana CD44, lo que iniciaría el proceso de endocitosis, tras el cual las nanopartículas quedarían en el interior de los endosomas. A continuación, comenzaría el proceso de acidificación de los endosomas, que tendría como consecuencia la protonación de la polietilenimina (PEI), y como consecuencia el hinchamiento osmótico del endosoma, que daría lugar a la ruptura de su membrana y a la liberación de las nanopartículas y su contenido al citoplasma.

## 2. Síntesis de nanopartículas y caracterización

Para preparar los materiales de poro grande (MSNpg), como se ha comentado anteriormente, se expandieron los poros del material inicial (pre-MSNpg) utilizando TMB como agente expansor en agua y etanol (27,52). A partir del MSNpg obtenido se utilizó una fracción para cargarlo con doxorubicina y funcionalizarlo con PEI y HA (MSNpg-doxo-PEI-HA), y otra para funcionalizarla con PEI y HA (MSNpg-PEI-HA).

En cuanto al sólido MCM-41, se preparó como está descrito en el apartado *material y métodos*, y tal y como se hizo en el caso anterior, también se utilizó una fracción para cargarlo con

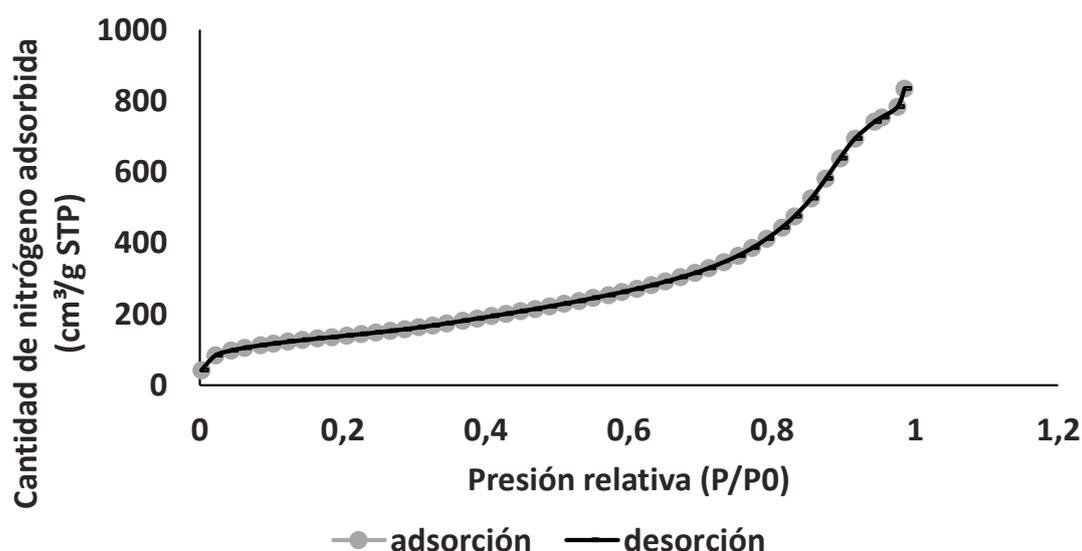
doxorrubicina y funcionalizarlo con con PEI y HA (MCM-41-doxo-PEI-HA), y otra para funcionalizarla con PEI y HA (MCM-41-PEI-HA).

Tanto en el caso de MSNpg como de MCM-41, la carga de doxorrubicina en el interior de los poros se realizó en PBS 42x para mantener constante el pH de la disolución durante todo el proceso de síntesis del sólido final. Esto es un requisito imprescindible para que el fármaco no se degrade debido a la subida del pH que tendría lugar en el paso de funcionalización con PEI.

### 2.1 Caracterización mediante isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno

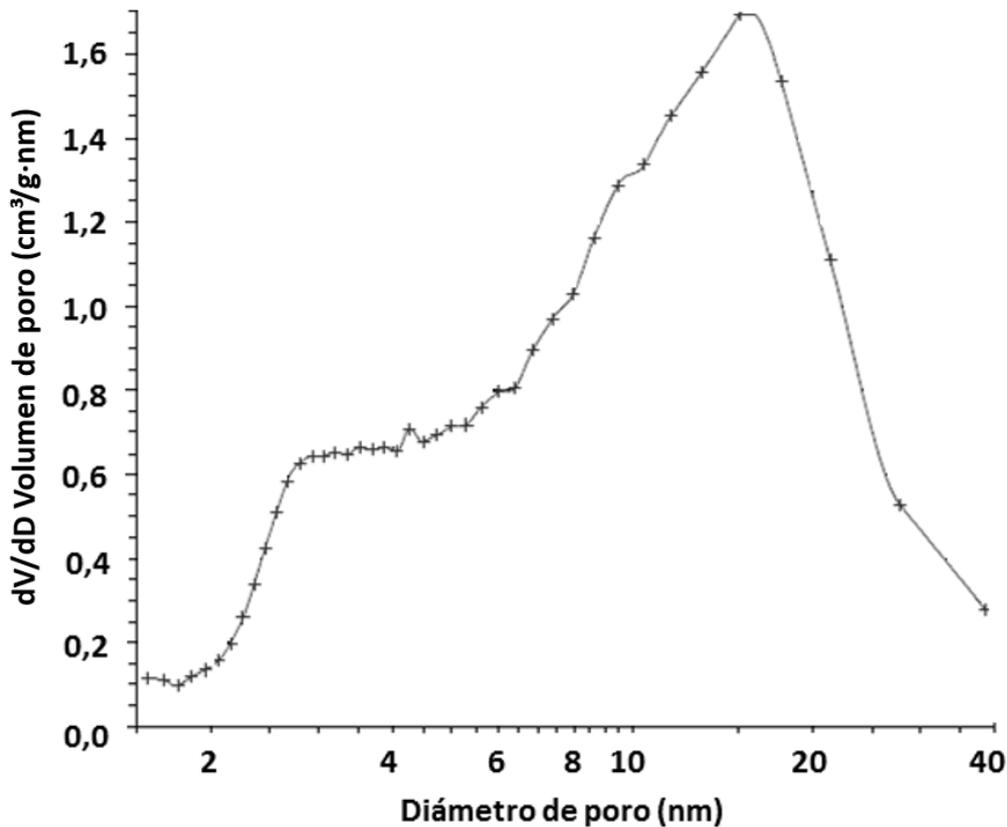
Con el objetivo de obtener información acerca del área superficial y tamaño y volumen de los poros de los materiales MSNpg y MCM-41, se llevaron a cabo isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno.

Las isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno del material MSNpg se muestran en la **Figura 7**. Es posible observar un aumento gradual de la adsorción de nitrógeno, observándose un salto más pronunciado a partir de  $P/P_0 > 0,7$ . Este perfil se corresponde con el llenado de poros de un tamaño bastante heterogéneo.



**Figura 7:** Isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno del material MSNpg.

Mediante la aplicación del modelo BET se calculó un área específica de  $504 \text{ m}^2/\text{g}$ . Además, aplicando el modelo BJH en las medidas de adsorción se calculó un diámetro medio de poro de  $7,59 \text{ nm}$ , y un volumen de poro de  $1,18 \text{ cm}^3/\text{gr}$ . En la **Figura 8** se ha representado la distribución de tamaño de poro obtenida para este material, en la que se observa una distribución muy ancha desde alrededor de  $3 \text{ nm}$  hasta  $20 \text{ nm}$ . Se puede apreciar un pico centrado a aproximadamente  $3\text{-}4 \text{ nm}$ , y un pico mucho más intenso centrado a  $15 \text{ nm}$ . Esta distribución confirma lo observado en la isoterma de adsorción.



**Figura 8:** Distribución del tamaño de poro del material MSNpg.

En la **Figura 9** se muestran las isotermas de adsorción del material MCM-41. Se observa la curva típica de este tipo de sólidos mesoporosos, distinguiéndose un salto de adsorción entre los valores  $P/P_0$   $0,2$  y  $0,4$ . Esto se corresponde con una isoterma de tipo IV, que se debe a la condensación del nitrógeno en el interior de los mesoporos. La ausencia de histéresis entre los valores de  $P/P_0$  de  $0,2$  y  $0,4$  sugiere la presencia de mesoporos cilíndricos uniformes.

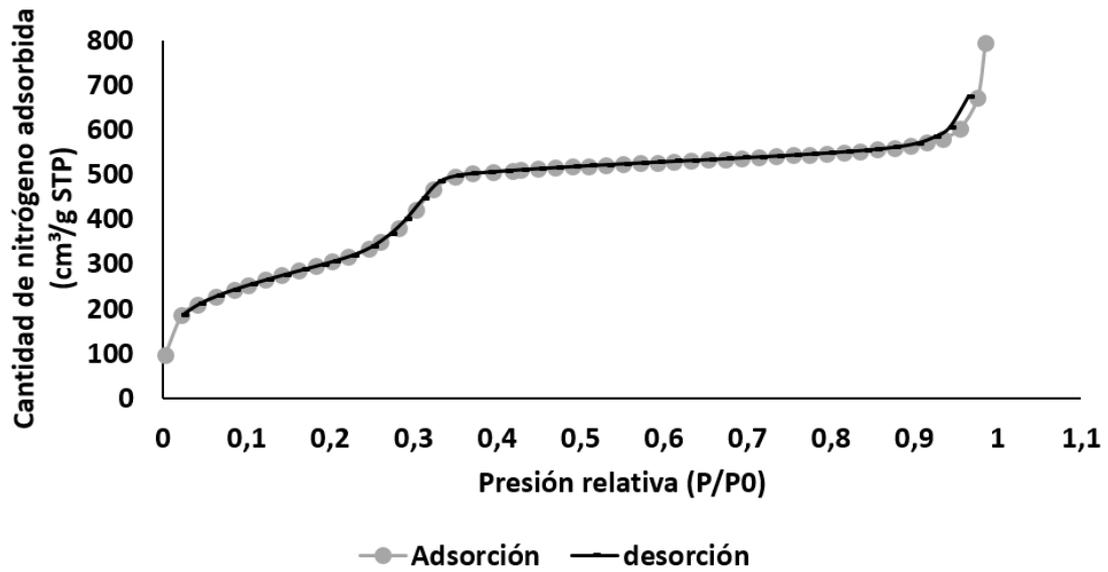


Figura 9: Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno del material MCM-41.

Aplicando el modelo BET se calculó un área específica de 1122 m<sup>2</sup>/g. Además, aplicando el modelo BJH en las medidas de adsorción ( $P/P_0 < 0,6$ ) se calculó un diámetro medio de poro de 2,53 nm, y un volumen de poro de 0,92 cm<sup>3</sup>/gr. En la **Figura 10** se ha representado la distribución de tamaño de poro obtenida para este material, en la que se observa una distribución estrecha centrada alrededor de 2,5 nm.

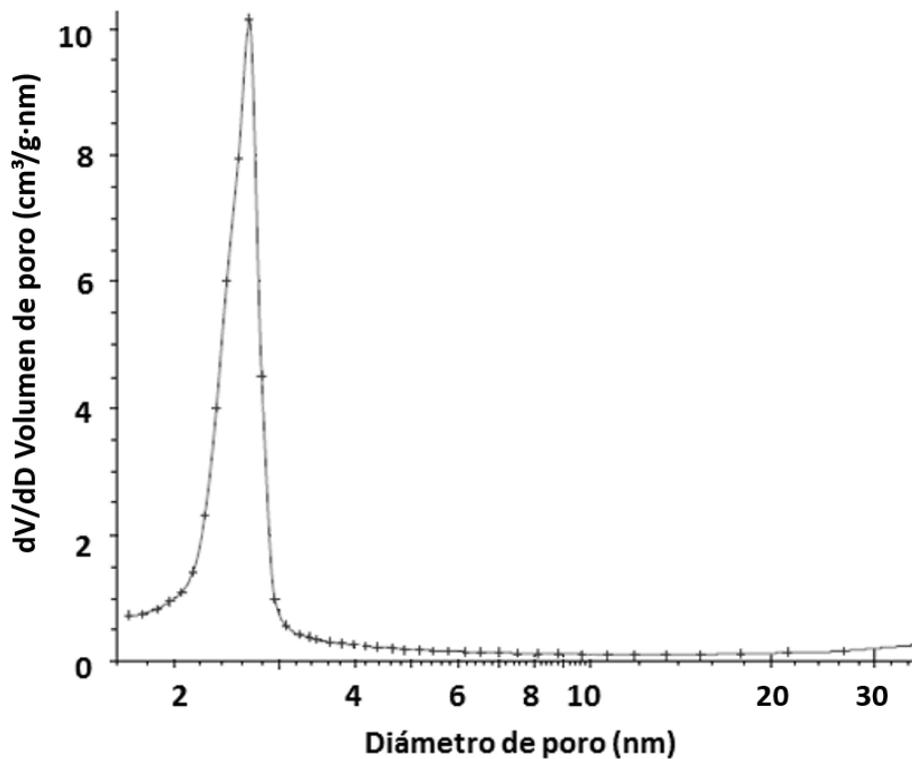
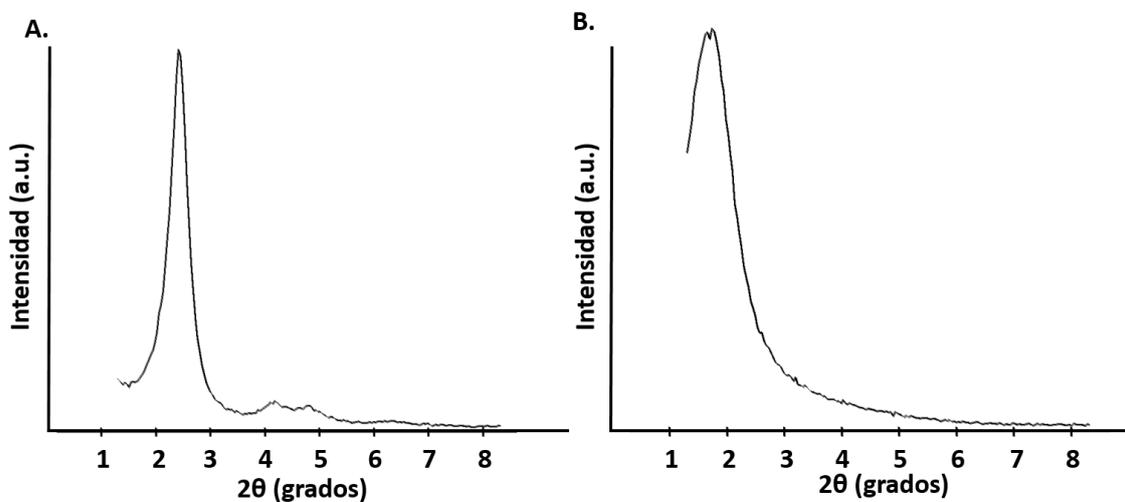


Figura 10: Distribución del tamaño de poro del material MCM-41.

## 2.2 Caracterización mediante medida de difracción de rayos X de polvo

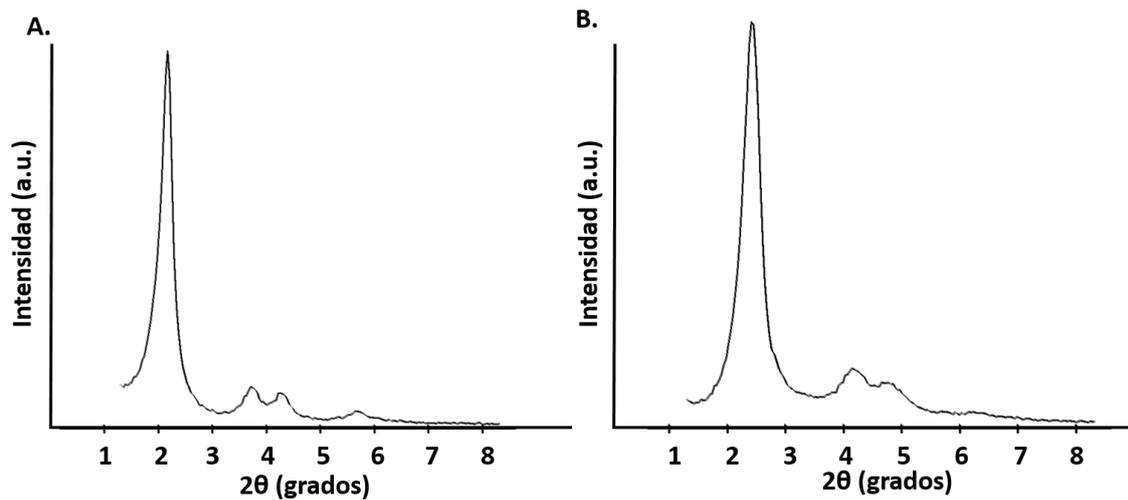
Otra técnica utilizada para caracterizar los nanodispositivos fue la difracción de rayos X de polvo. Mediante este procedimiento fue posible estudiar los cambios en la estructura de los materiales que tuvieron lugar durante los procesos de expansión de poro y calcinación. Esto se realizó con los materiales pre-MSNpg, MSNpg, pre-MCM-41 y MCM-41.

En el caso del material pre-MSNpg (antes de la expansión de los poros y calcinación), se observan los cuatro picos típicos de los materiales mesoporosos con ordenación hexagonal, indexados a los picos de Bragg (1 0 0), (1 1 0), (2 0 0) y (2 1 0) (**Figura 11A**). En el sólido MSNpg, no se observan los picos (1 1 0), (2 0 0) y (2 1 0), debido a que la expansión del poro conlleva una reorganización de la mesoestructura interna del material y un aumento del grado de desorden (**Figura 11B**). En cuanto al pico (1 0 0), se mantiene, aunque se observa un desplazamiento hacia ángulos más bajos, lo que indica que se ha producido un aumento del tamaño de los poros.



**Figura 11:** Patrones de difracción de rayos X de polvo de los materiales pre-MSNpg (A) y MSNpg (B).

En cuanto a los patrones de difracción de rayos X de los materiales pre-MCM-41 y MCM-41 (**Figura 12**), antes de la calcinación (pre-MCM-41), como ocurría en pre-MSNpg, se observan los cuatro picos de Bragg (1 0 0), (1 1 0), (2 0 0) y (2 1 0) característicos de los materiales mesoporosos ordenados de tipo MCM-41 (**Figura 12A**). Tras la calcinación (MCM-41), se siguen observando los cuatro picos, lo que indica que se mantiene la estructura mesoporosa hexagonal, pero se puede ver un leve desplazamiento del pico (1 0 0) hacia ángulos más altos, como consecuencia de la disminución del tamaño de celda, habitual en el paso de calcinación, debido a la condensación adicional de grupos silanol y al refuerzo de la estructura de las nanopartículas (**Figura 12B**).



**Figura 12:** Patrones de difracción de rayos X de polvo del material MCM-41 antes (A) y después (B) de la calcinación.

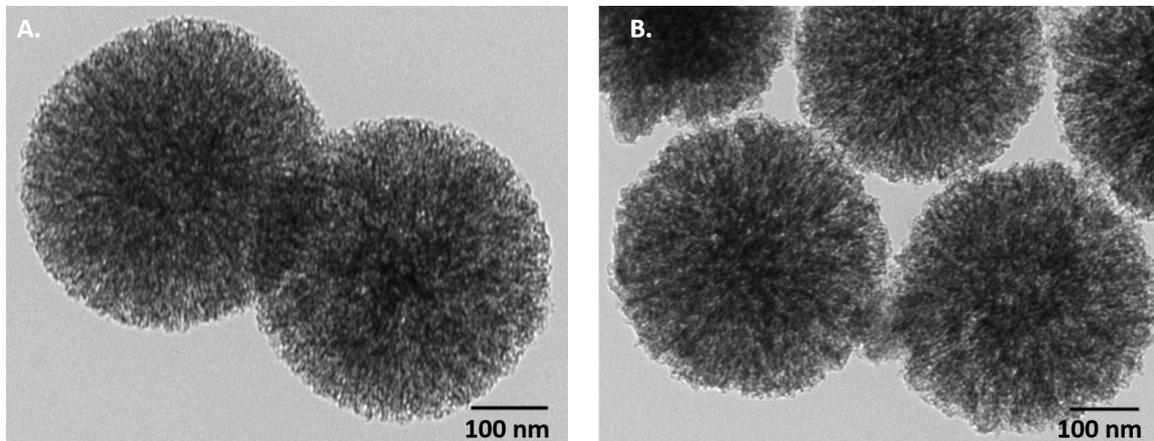
A partir de los datos obtenidos mediante difracción de rayos X de polvo, y aplicando la ley de Bragg, es posible calcular la distancia interplanar ( $d$ ) del material estudiado. Tomando los datos en el plano (1 0 0) y teniendo en cuenta que los materiales de este trabajo son de simetría hexagonal, es posible calcular el parámetro de celda unitaria ( $a_0$ ), que es equivalente a la distancia centro a centro entre poros adyacentes, mediante la ecuación  $a_0 = 2d_{100}/\sqrt{3}$ .

Si se compara el parámetro de celda unitaria de los materiales pre-MSNpg y MSNpg, se observa que el valor aumenta desde 42 hasta 59 Å. Esto representa un aumento de la celda unidad de 17 Å, confirmando la expansión del poro. Por el contrario, cuando se realiza el mismo cálculo para los materiales de tipo MCM-41, se observa que el parámetro de celda pasa de 47 Å antes de calcinar, a 42 Å tras el proceso de calcinado, lo que concuerda con la típica contracción de celda que tiene lugar durante este proceso, tal y como se ha explicado anteriormente.

### **2.3 Caracterización mediante TEM**

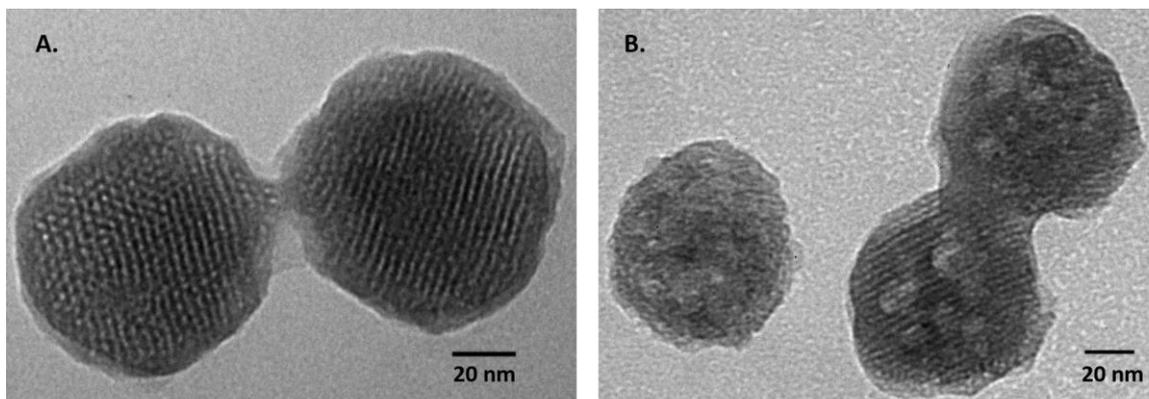
Mediante estudios de TEM se confirmaron los resultados obtenidos con el resto de métodos de caracterización.

La visualización de los sólidos MSNpg y MSNpg-doxo-PEI-HA reveló que estos sólidos poseen una morfología esférica, con una mesoestructura desordenada como consecuencia del proceso de expansión de los poros. En cuanto al tamaño de las nanopartículas, se observó que se encontraban entre 350 y 450 nm (**Figura 13**). Es posible observar en las imágenes adquiridas como la carga con doxorubicina y la funcionalización con PEI y HA no causaron alteraciones morfológicas.



**Figura 13:** Imágenes de los materiales MSNpg (A) y MSNpg-doxo-PEI-HA (B), obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión.

En cuanto a los sólidos MCM-41 y MCM-41-doxo-PEI-HA, su visualización mediante TEM reveló que estos poseen una morfología esférica, como ocurría en los anteriores, aunque en este caso fue posible visualizar la distribución ordenada de los poros, que pueden verse con claridad en las imágenes obtenidas como líneas blancas y negras alternadas (**Figura 14A**). Como puede observarse en la **Figura 14B**, la carga y funcionalización del material en este caso tampoco tuvo ningún efecto en la estructura y morfología de las nanopartículas, aunque la estructura porosa se observa con menor claridad debido a la presencia de moléculas en el interior y alrededor de las nanopartículas.

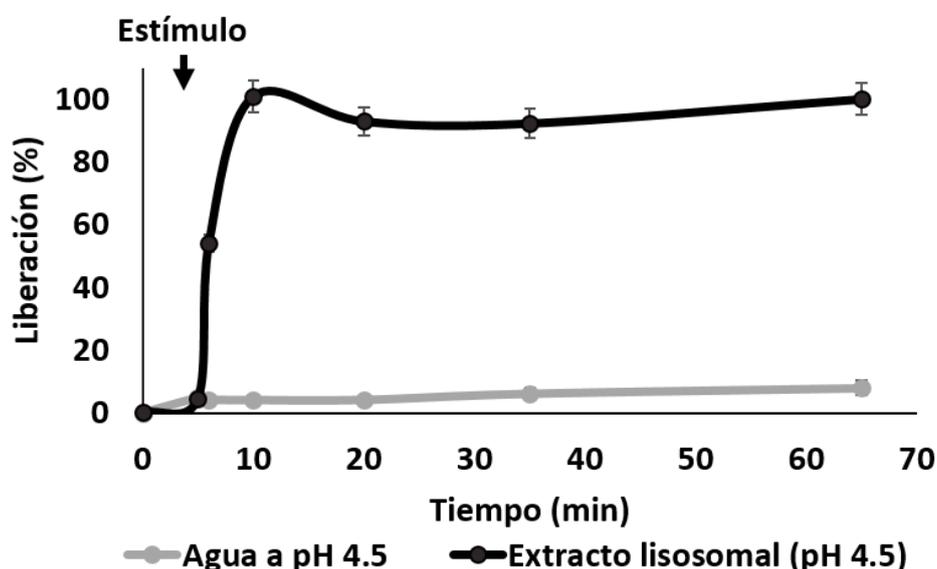


**Figura 14:** Imágenes de los materiales MCM-41 (A) y MCM-41-doxo-PEI-HA (B), obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión.

### 3. Ensayo de liberación *in vitro*

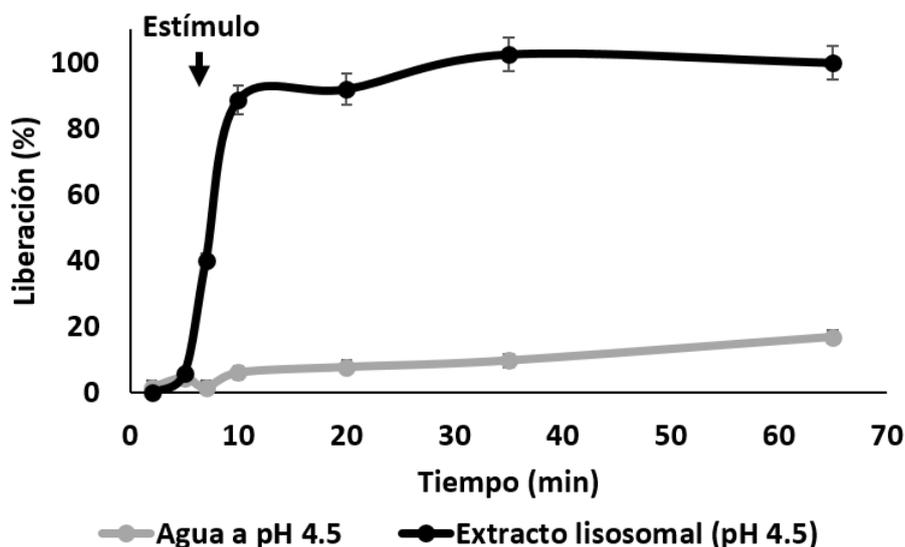
La PEI, tal y como se ha descrito anteriormente, permite la liberación del contenido de las nanopartículas a pH ácido, pero puesto que ambos dispositivos tienen una capa de HA externa, era de esperar que esta molécula impidiera la salida del contenido de las nanopartículas en ausencia de enzimas capaces de degradarla. Es por ello que se estudió el perfil de liberación de los materiales. Para ello se suspendieron los materiales MSNpg-doxo-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA en agua desionizada y a continuación se introdujo agua a pH 4,5 o extracto lisosomal.

En la **Figura 15** se observa el perfil de liberación de MSNpg-doxo-PEI-HA. Se puede observar que cuando se introduce agua a pH 4,5 no se produce una liberación significativa de la doxorubicina encapsulada en los poros (inferior al 10% después de 60 minutos). Por el contrario, en presencia de extracto lisosomal (que mimetiza el ambiente con el que se encontrarán las nanopartículas tras ser endocitadas por las células), se observa una liberación de doxorubicina rápida (casi el 100% a los 10 minutos). Esta liberación es debida a la hidrólisis enzimática del ácido hialurónico y la posterior protonación de la PEI.



**Figura 15:** Cinética de liberación de doxorubicina de una suspensión de nanopartículas MSNpg-doxo-PEI-HA tras la adición de un estímulo de agua a pH 4,5 o extracto lisosomal.

En el caso de los nanodispositivos MCM-41-doxo-PEI-HA (**Figura 16**), los resultados son muy similares a los obtenidos con el sólido anterior, observándose que cuando únicamente está presente el estímulo de pH la liberación de doxorubicina es insignificante (menor del 10% a los 60 minutos), mientras que cuando se expone al extracto lisosomal se produce la liberación de la doxorubicina cargada en el interior de los poros en un corto periodo de tiempo.



**Figura 16:** Cinética de liberación de doxorubicina de una suspensión de nanopartículas MCM-41-doxo-PEI-HA tras la adición de un estímulo de agua a pH 4,5 o extracto lisosomal.

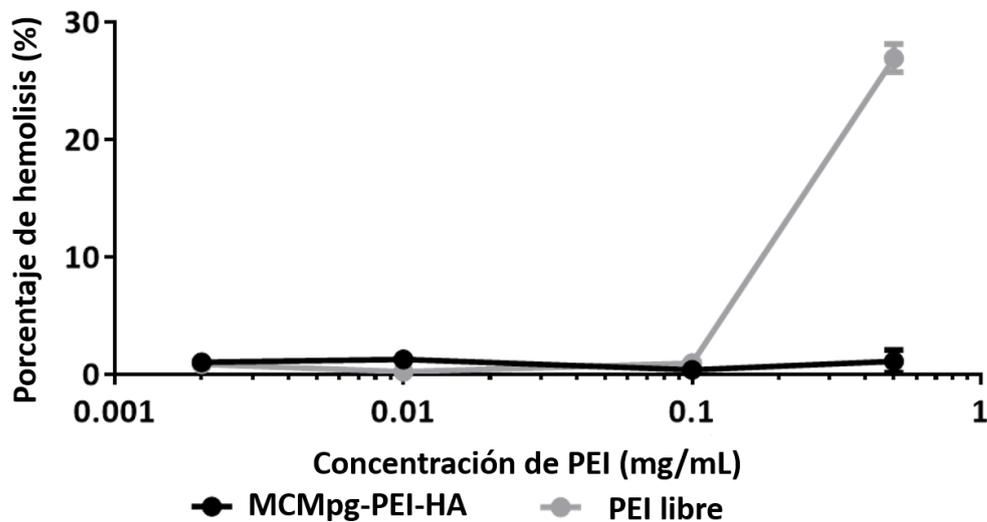
Estos resultados son consistentes con que las nanopartículas no van a liberar su contenido hasta haber sido endocitadas por las células, y encontrarse en el lisosoma de estas.

#### 4. Ensayo de toxicidad hematológica

A pesar de que los estudios de liberación *in vitro* demostraron que las nanopartículas no liberan su contenido hasta ser endocitadas por las células, se quiso comprobar que los nanodispositivos no resultan dañinos para las membranas celulares. Esto se debe a que las nanopartículas contienen PEI, que podría causar citotoxicidad debido a que es un polímero altamente ramificado y a su carga positiva.

Para evaluar la capacidad de los sólidos para causar daño a membranas celulares, se realizó un ensayo de hemotoxicidad. En este se utilizó sangre humana, a partir de la que se aislaron eritrocitos que fueron incubados con nanopartículas o con PEI libre a diferentes concentraciones durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación fue posible determinar el porcentaje de eritrocitos que se habían lisado, mediante la cuantificación de hemoglobina. Para establecer el 100% de hemólisis se utilizó Tritón X-100, y como control negativo se utilizó PBS. Los ensayos se llevaron a cabo con el material MSNpg-PEI-HA, puesto que tiene una mayor área superficial y por tanto una mayor capacidad de adsorción de PEI, que es la molécula que tiene la capacidad de producir daño a las membranas.

En la **Figura 17** se muestra el porcentaje de eritrocitos lisados en cada caso, que es indicador del daño producido a las membranas. Cuando se trataba de PEI libre, puede observarse como se produce un aumento del porcentaje de hemólisis a partir de 0,1 mg/mL, llegando a provocar aproximadamente el 30% de hemólisis con 0,3 mg/mL. En el caso de las nanopartículas, la cantidad de estas que se incubaron en cada caso fue calculada de modo que la cantidad de PEI total fuera equivalente a la de PEI libre. Se puede observar en la **Figura 17** como ninguna de las concentraciones utilizadas produjo efectos hemolíticos (no superó el 3% de hemólisis), lo que permite considerar que a estas concentraciones no causan daño en la membrana de los eritrocitos. Esto podría ser debido a la presencia de la capa de HA que se encuentra en el exterior de los nanodispositivos, que podría impedir el contacto de la PEI con las membranas celulares.

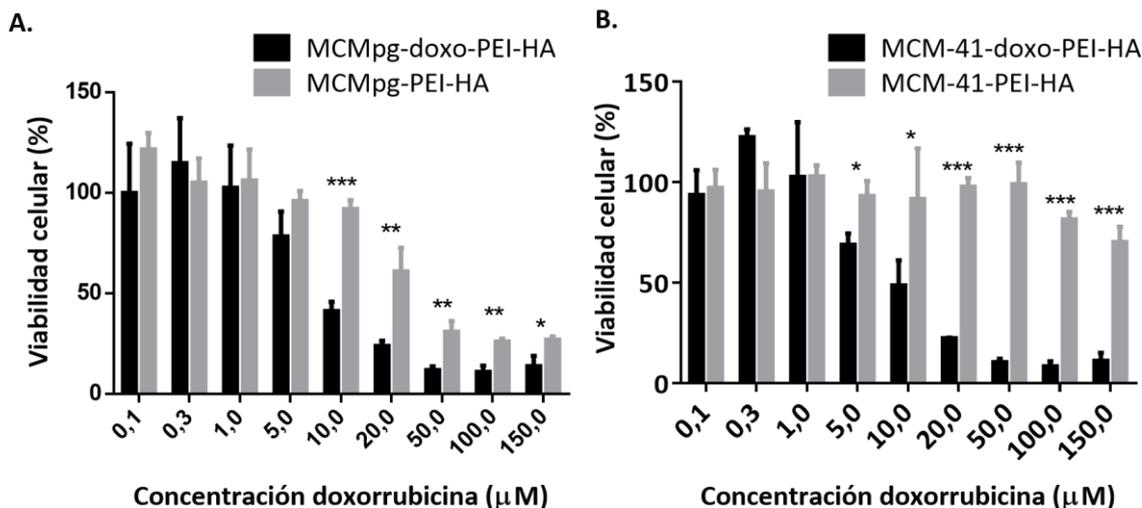


**Figura 17:** Actividad hemolítica de PEI y MSNpg-PEI-HA. Porcentaje de eritrocitos humanos incubados con PEI o MSNpg-PEI-HA, que han perdido la integridad de membrana tras 1 hora de incubación.

## 5. Ensayos de viabilidad celular

Se llevaron a cabo distintos estudios de viabilidad para comprobar la citotoxicidad de los nanodispositivos obtenidos. Estos se realizaron en la línea celular MDA-MB-231 de CMTN. Para calcular la cantidad necesaria de nanopartículas en cada caso, se tuvo en cuenta que las nanopartículas adsorbieron la totalidad de la doxorubicina añadida en el proceso de carga. Se utilizaron como control células no tratadas.

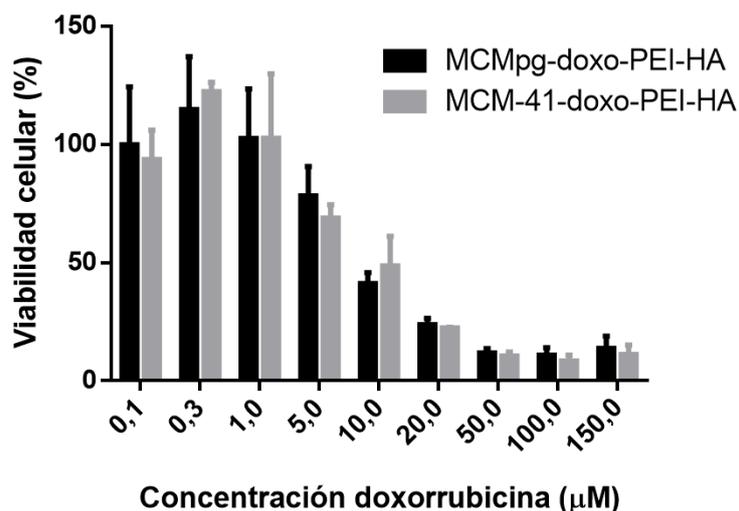
Por un lado, quiso compararse la eficacia de los sólidos cargados con doxorrubicina en comparación con los equivalentes sin citotóxico (**Figura 18**). El objeto de este estudio fue comprobar si el efecto citotóxico observado se debía a la liberación del fármaco en el interior de las células o a la presencia de los nanodispositivos.



**Figura 18:** Resultados del ensayo de viabilidad realizado en la línea celular MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con los sólidos MSNpg-doxo-PEI-HA y MSNpg-PEI-HA (A), o MCM-41-doxo-PEI-HA y MCM-41-PEI-HA (B) durante 48 horas (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

Como puede observarse en la **Figura 18**, en ambos casos los nanodispositivos cargados con doxorrubicina disminuyen la viabilidad celular. Cuando se comparó la citotoxicidad del material MCMpg-doxo-PEI-HA con su equivalente no cargado con doxorrubicina, se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se utilizaron concentraciones equivalentes de doxorrubicina mayores de 10 µM. Cabe comentar que, en este caso, se observó que la nanopartícula no cargada con el citotóxico produjo una disminución de la viabilidad celular. Cuando se realizaron los ensayos para comparar el sólido MCM-41-doxo-PEI-HA con el mismo sin cargar, se observaron diferencias estadísticamente significativas a partir de una concentración equivalente de doxorrubicina de 5 µM.

Por otra parte, con los resultados obtenidos también fue posible comparar la eficacia de los nanodispositivos MSNpg-doxo-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA (**Figura 19**). En este caso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 19:** Resultados del ensayo de viabilidad realizado en la línea celular MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con los sólidos MSNpg-doxo-PEI-HA o MCM-41-doxo-PEI-HA durante 48 horas.

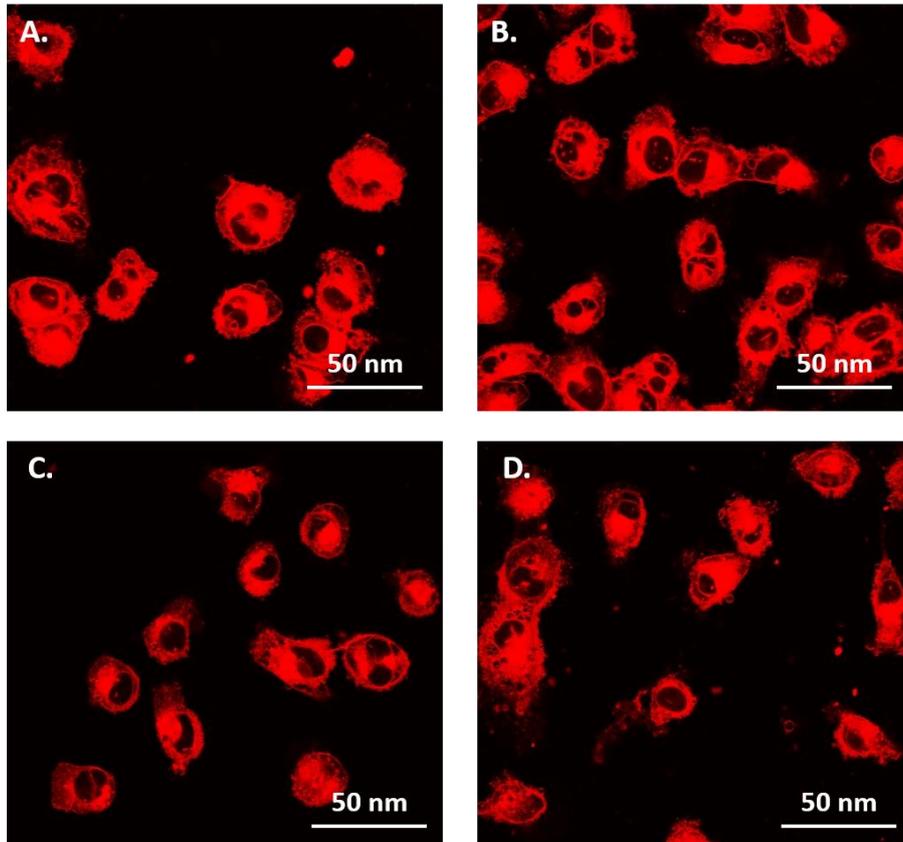
## 6. Estudio de la internalización de los sólidos

La internalización de las nanopartículas se estudió mediante microscopía confocal y citometría de flujo.

### 6.1 Estudio de la internalización de los sólidos mediante microscopía confocal

Para la realización de este ensayo se trataron células MDA-MB-231 con las nanopartículas MSNpg-doxo-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA durante 30 minutos y 3 horas, y a continuación se fijaron y observaron las células mediante microscopía confocal con el fin de observar si se producía la internalización de estas nanopartículas.

En la **Figura 20** se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal tras tratar las células con una concentración de 100 µg/mL de nanopartículas. Tal y como muestran las fotografías, no existen diferencias apreciables en cuanto a la internalización de los dos tipos de nanopartículas. En ambos casos puede verse como las células son capaces de internalizar las nanopartículas, y se observa la señal de fluorescencia de la doxorrubicina (rojo) en el citoplasma celular. Este fármaco ejerce su acción en el núcleo celular, en el que no se observa fluorescencia emitida por la doxorrubicina, lo que podría ser debido a que las imágenes están tomadas transcurrido un corto periodo de tiempo tras el tratamiento, que podría ser insuficiente para la llegada del fármaco al núcleo.



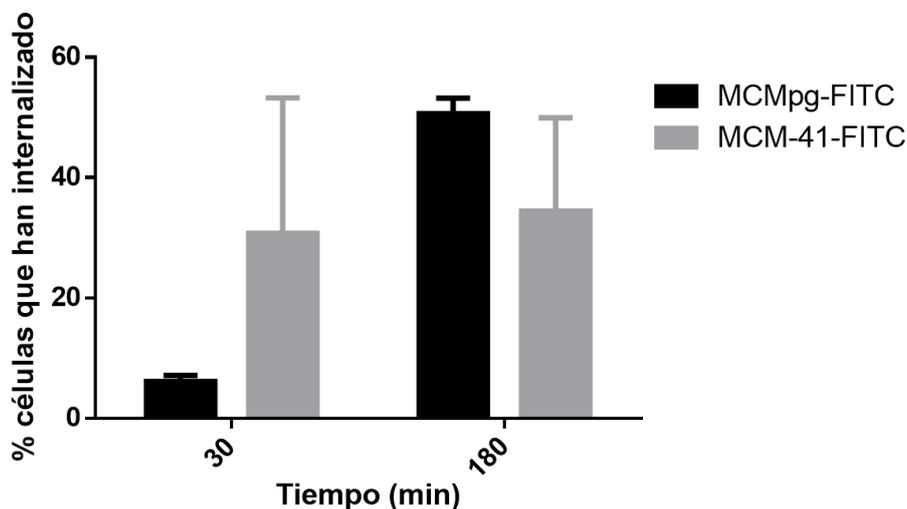
**Figura 20:** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal: células MDA-MB-231 tratadas con los sólidos MSNpg-doxo-PEI-HA durante 30 minutos (A) y 3 horas (B), y con el sólido MCM-41-doxo-PEI-HA durante 30 minutos (C) y 3 horas (D) con una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se observa en rojo la fluorescencia emitida por la doxorubicina.

## **6.2 Estudio de la internalización de los sólidos mediante citometría de flujo**

Puesto que el estudio de internalización de los sólidos mediante microscopía confocal no permitió ver diferencias en cuanto a la velocidad de internalización de los dos tipos de sólidos, se decidió llevar a cabo un estudio mediante citometría de flujo, ya que esta técnica permite determinar con una mayor exactitud el número de células que han endocitado las nanopartículas a diferentes tiempos. Para ello se utilizaron nanopartículas marcadas con FITC unido covalentemente a su superficie. Empleando este fluoróforo es posible llevar a cabo un protocolo que permite discernir entre las nanopartículas endocitadas y aquellas que se encuentran en el exterior de las células, incluso si están adheridas a su superficie.

Para la realización de estos ensayos se incubaron las nanopartículas MSNpg-FITC o MCM-41-FITC con células MDA-MB-231 durante 30 minutos o 3 horas, y a continuación se lavaron las células y se incubaron con azul de tripano, que tiene la capacidad de extinguir la fluorescencia verde emitida por las nanopartículas que se encuentran en el exterior de las células.

En la **Figura 21** se muestran los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. Se observa como a los 30 minutos de añadir las nanopartículas, el porcentaje de células que han internalizado MSNpg-FITC es menor que el de células que internalizan MCM-41-FITC, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Tras 3 horas de incubación se comprobó que la cantidad de MSNpg-FITC había aumentado respecto del tiempo anterior, mientras que no hubo grandes cambios en el número de células que habían endocitado el material MCM-41-FITC. En este caso, tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas.



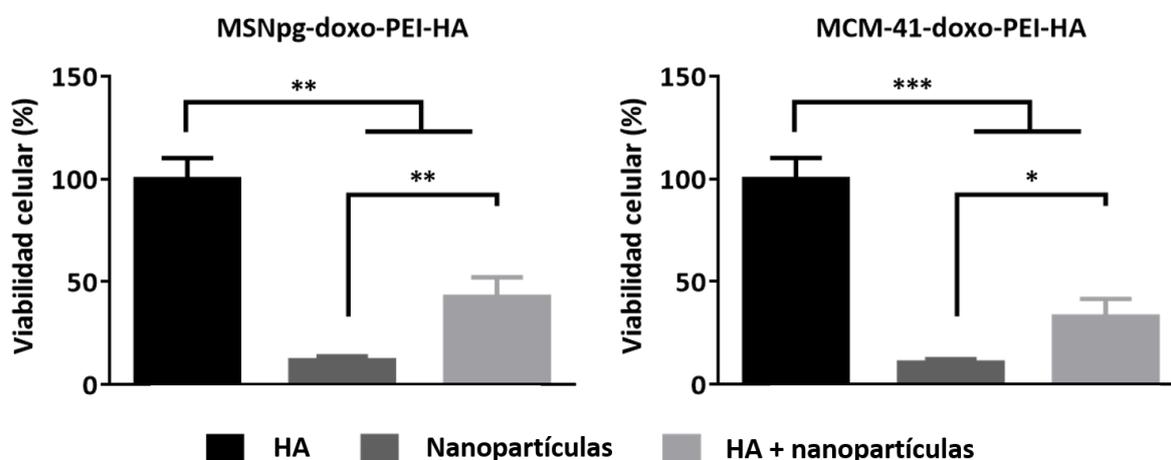
**Figura 21:** Internalización de los sólidos MSNpg-FITC y MCM-41-FITC, medida mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos eran predecibles ya que las nanopartículas con MCM-41 como soporte inorgánico, como se ha visto, tienen un tamaño menor y por tanto pueden ser endocitadas más fácilmente por las células que las de tipo MSNpg.

## **7. Ensayos de inhibición de la internalización**

Se realizaron ensayos de inhibición de la internalización para comprobar que las nanopartículas se dirigen específicamente a células que expresan el receptor CD44. Con este fin se incubaron las células objeto de estudio con una disolución de HA libre. Este tiene la capacidad de unirse específicamente a los receptores CD44 e inhibir la interacción entre el receptor y el ácido hialurónico adsorbido en la superficie de las nanopartículas.

Como puede observarse en la **Figura 22**, en ambos casos la preincubación con HA libre previa al tratamiento con las nanopartículas provoca una disminución estadísticamente significativa del efecto citotóxico. Se utilizaron como control las mismas células tratadas con ácido hialurónico para comprobar que este no tenía ningún efecto sobre la viabilidad celular.



**Figura 22:** Comparación del efecto citotóxico de los sólidos MSNpg-doxo-PEI-HA (A) o MCM-41-doxo-PEI-HA (B), con o sin preincubar las células con HA (5 mg/mL) durante 30 minutos (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

El hecho de inhibir los receptores CD44 provocó una disminución estadísticamente significativa del efecto citotóxico de las nanopartículas, por lo que es posible afirmar que las nanopartículas se dirigen a este receptor de membrana, y esto desencadenaría el proceso de endocitosis mediada por CD44.

\* \* \*

Como se ha comentado anteriormente, en este trabajo se han realizado estudios para evaluar y comparar la eficacia de nanopartículas equivalentes a N-A y N-B no cargadas con moléculas miméticas de miR-200c.

Los materiales MSNpg-doxo-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA se han diseñado, sintetizado y caracterizado mediante las técnicas estándar. Además, se ha comprobado que ambos sistemas liberan el contenido de forma selectiva cuando se exponen a estímulos que simulan el ambiente lisosomal y que resultan citotóxicos para células tumorales de cáncer de mama, efecto que se ha demostrado que está mediado por su selectividad para dirigirse a células que expresan el receptor CD44 (sobrexpresado por BCSCs). También se ha observado que las nanopartículas de

tipo MSN<sub>pg</sub>, a pesar de su mayor tamaño pueden ser internalizadas con una alta eficacia por las células, aunque a una menor velocidad que las MCM-41.

Estos ensayos no han permitido establecer grandes diferencias entre los dos tipos de nanodispositivos, que permitan descartar alguno de ellos. Es por ello que se espera continuar con este proyecto, sintetizando los nanodispositivos N-A y N-B y comparando tanto su eficacia para administrar las moléculas miméticas de miR-200c, como su efecto sobre las BCSCs.

# CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son:

1. Se han diseñado, sintetizado y caracterizado los nanodispositivos MSNpg-doxo-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA.
2. Se han realizado estudios de liberación *in vitro* que han permitido comprobar que los nanodispositivos únicamente liberan el fármaco cargado en el interior de sus poros en presencia de estímulos que simulan el ambiente lisosomal.
3. Se han realizado estudios de toxicidad hematológica utilizando sangre humana, mediante los que se ha demostrado que las nanopartículas no producen daño a las membranas celulares, a pesar de que contienen PEI, que se considera tóxica.
4. Se han realizado estudios de viabilidad para comprobar el efecto citotóxico de los sólidos sobre células de línea celular de CMTN MDA-MB-231, mediante los que se ha comprobado que MSNpg-doxo-PEI-HA y MCM-41-doxo-PEI-HA tienen un efecto citotóxico. A partir de estos estudios no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas entre la eficacia de ambos dispositivos.
5. Se han realizado estudios de internalización de los materiales para determinar la eficacia con la que son endocitados por las células, en los que se ha comprobado que, aunque la MSNpg es endocitada más lentamente por las células, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos nanodispositivos.
6. Se han realizado estudios de inhibición competitiva de la internalización en los que se ha demostrado que los dos tipos de nanopartículas se dirigen preferentemente a las células que expresan el receptor CD44.

# BIBLIOGRAFÍA

1. AECC. Situación del cáncer de mama en España. 2014. Asoc española contra el cáncer. 2014.
2. Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2014. Soc Española Oncol Médica. 2014;1-20.
3. Latest world cancer statistics. Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012 : Marked increase in breast cancers must be addressed. International Agency for Research on Cancer World Health organization. 2013.
4. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer*. 2015;121(1):8-16.
5. Jang MH, Kim HJ, Kim EJ, Chung YR, Park SY. Expression of epithelial-mesenchymal transition – related markers in triple-negative breast cancer : ZEB1 as a potential biomarker for. *Hum Pathol.*; 2015;46(9):1267-74.
6. Chen Y, Yeh M, Yu M, Wei Y, Chen W, Chen J. Lapatinib–induced NF-kappaB activation sensitizes triple-negative breast cancer cells to proteasome inhibitors. *BCR*. 2013
7. Chen J, Russo J. ER $\alpha$ -Negative and Triple Negative Breast Cancer: Molecular Features and Potential Therapeutic Approaches. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796(2):162-75.
8. Loi S, Pommey S, Haibe-kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;3-8.
9. Shimono Y, Ugalde MZ, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, et al. Down-regulation of miRNA-200c Links Breast Cancer Stem Cells with Normal Stem Cells. *Cell*. 2009;138(3):592-603.
10. Guo W. Concise Review : Breast cancer stem cells : Regulatory networks, stem cell niches, and disease relevance. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3:942-8.
11. Bozorgi A, Khazaei M, Khazaei MR. Breast Cancer New Findings on Breast Cancer Stem Cells : A Review. *J Breast Cancer*. 2015;18(4):303-12.
12. Ajani JA, Song S, Hochster HS, Steinberg IB. Cancer stem cells: The promise and the potential. *Semin Oncol*. 2015;42(S1):S3-17.
13. Iliopoulos D, Lindahl-allen M, Polytarchou C, Heather A, Tschlis PN, Struhl K. Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to Polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Mol Cell*. 2011;39(5):761-72.
14. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13820-5.
15. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. 2009;138(4):645-59.
16. Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med*. 2013;56:89-101.
17. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):4234-41.
18. Howe EN, Cochrane DR, Richer JK. Targets of miR-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance. *Breast Cancer Res*. 2011;13(2):R45.

19. Dai X, Tan C. Combination of microRNA therapeutics with small-molecule anticancer drugs: Mechanism of action and co-delivery nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;81:184-97.
20. Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev.* 2013;27(20):2192-206.
21. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani S a. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2011;13(1):202.
22. Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS One.* 2008;3(8):e2888.
23. Kopp F, Oak PS, Wagner E, Roidl A. miR-200c sensitizes breast cancer cells to doxorubicin treatment by decreasing TrkB and Bmi1 expression. *PLoS One.* 2012;7(11):e50469.
24. Yu F-X, Guan K-L. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev.* 2013;27(4):355-71.
25. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008;68(10):3645-54.
26. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle : microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene.* 2006;6:188-96.
27. Na HK, Kim MH, Park K, Ryoo SR, Lee KE, Jeon H, et al. Efficient functional delivery of siRNA using mesoporous silica nanoparticles with ultralarge pores. *Small.* 2012;8(11):1752-61.
28. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* 2010;11(9):670-7.
29. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009;11(12):1487-95.
30. Pecot C V., Rupaimoole R, Yang D, Akbani R, Ivan C, Lu C, et al. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nat Commun.* 2013;4:2427.
31. Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S, Burk U, Niedermann G, Firat E, et al. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J.* 2011;30(4):770-82.
32. Chen Y, Sun Y, Chen L, Xu X, Zhang X, Wang B, et al. MiRNA-200c increases the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin through the suppression of E-cadherin-mediated PTEN/Akt signaling. *Mol Med Rep.* 2013;7(5):1579-84.
33. Cochrane DR, Howe EN, Spoelstra NS, Richer JK. Loss of miR-200c: A Marker of Aggressiveness and Chemoresistance in Female Reproductive Cancers. *J Oncol.* 2010;2010:821717.
34. Cochrane DR, Spoelstra NS, Howe EN, Nordeen SK, Richer JK. MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(5):1055-66.
35. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem.* 2008;283(22):14910-4.
36. Park S-M, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 2008;22(7):894-907.

37. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 2008;9(6):582-9.
38. Ren Y, Han X, Yu K, Sun S, Zhen L, Li Z, et al. MicroRNA-200c downregulates XIAP expression to suppress proliferation and promote apoptosis of triple-negative breast cancer cells. *Mol Med Rep.* 2014;10(1):315-21.
39. Lo W-L, Yu C-C, Chiou G-Y, Chen Y-W, Huang P-I, Chien C-S, et al. MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *J Pathol.* 2011;223(4):482-95.
40. Wang X, Chen X, Wang R, Xiao P, Xu Z, Chen L, et al. microRNA-200c modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in human renal cell carcinoma metastasis. *Oncol Rep.* 2013;30(2):643-50.
41. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C-W, Lin VSY. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11):1278-88.
42. Mai WX, Meng H. Mesoporous silica nanoparticles: A multifunctional nano therapeutic system. *Integr Biol.* 2013;5(1):19-28.
43. Mamaeva V, Sahlgren C, Lindén M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances. *Adv Drug Deliv Rev.*; 2013;65(5):689-702.
44. Yu M, Jambhrunkar S, Thorn P, Chen J, Gu W, Yu C. Hyaluronic acid modified mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells. *Nanoscale.* 2013;5(1):178-83.
45. Meng H, Xue M, Xia T, Ji Z, Tarn DY, Zink JJ, et al. Use of size and a copolymer design feature to improve the biodistribution and the enhanced permeability and retention effect of doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles in a murine xenograft tumor model. *ACS Nano.* 2011;5(5):4131-44.
46. Argyo C, Weiss V, Bräuchle C, Bein T. Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles as a Universal Platform for Drug Delivery Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles as a Universal Platform for Drug Delivery. *Chem. Mater.* 2013;26(1):435-451
47. Wang Y, Zhao Q, Han N, Bai L, Li J, Liu J, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2015;11(2):313-27.
48. Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Schaer D, Ow H, Burns A, et al. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2768-80.
49. Llinàs MC, Sánchez-garcía D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad.* 2014;LXXI(565):20-31.
50. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids.* Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy; 2015;4:e252.
51. Morry J, Ngamcherdtrakul W, Gu S, Goodyear SM, Castro DJ, Reda MM, et al. Dermal delivery of HSP47 siRNA with NOX4-modulating mesoporous silica-based nanoparticles for treating fibrosis. *Biomaterials.* 2015;66:41-52.
52. Kim M, Na H, Kim Y, Ryoo S, Cho HS, Lee KE, et al. Facile Synthesis of Monodispersed Mesoporous Silica Nanoparticles with Ultralarge Pores and Their Application in Gene Delivery. 2011;(5):3568-76.

53. Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 1992;359(6397):710-2.
54. El Haskouri J, Zárata DO de, Guillem C, Latorre J, Caldés M, Beltrán A, et al. Silica-based powders and monoliths with bimodal pore systems. *Chem Commun*. 2002;5(4):330-1.
55. Comes M, Rodríguez-López G, Marcos MD, Martínez-Máñez R, Sancenón F, Soto J, et al. Host solids containing nanoscale anion-binding pockets and their use in selective sensing displacement assays. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005;44(19):2918-22.
56. Comes M, Marcos MD, Martínez-Máñez R, Sancenón F, Soto J, Villaescusa LA, et al. Chromogenic Discrimination of Primary Aliphatic Amines in Water with Functionalized Mesoporous Silica. *Adv Mater*. 2004;16(20):1783-6.
57. Vallet-Regi M, Rámila A, del Real RP, Pérez-Pariente J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chem Mater*. 2001;13(2):308-11.
58. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J Am Chem Soc*. 1938;60:309-19.
59. Barrett EP, Joyner LG, Halenda PP. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J Am Chem Soc*. 1951;73:373-80.
60. Evans BC, Nelson CE, Yu SS, Beavers KR, Kim AJ, Li H, et al. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J Vis Exp*. 2013;(73):e50166.
61. Kapilov-Buchman Y, Lellouche E, Michaeli S, Lellouche J-P. Unique Surface Modification of Silica Nanoparticles with Polyethylenimine (PEI) for siRNA Delivery Using Cerium Cation Coordination Chemistry. *Bioconjug Chem*. 2015;26(5):880-9.