

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Diseño racional y caracterización de nanodispositivos de sílice mesoporosa para liberación controlada en células senescentes

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Jordi Blasco Carrasco

TUTOR: Dr. José Ramón Murguía Ibáñez

COTUTORA: Dña. Irene Galiana Guillem

Curso académico: 2016/2017
VALÈNCIA, septiembre de 2017



Título del TFG

Diseño racional y caracterización de nanodispositivos de sílice mesoporosa para liberación controlada en células senescentes.

Autor

Jordi Blasco Carrasco

Titulación

Grado en Biotecnología

Tutor

Dr. José Ramón Murguía Ibáñez

Cotutora

Dña. Irene Galiana Guillem

Fecha y localidad de lectura

València, septiembre de 2017

ABSTRACT

Cell senescence is a condition characterized by permanent cell cycle arrest and an associated hypersecretory phenotype. It was originally attributed to cellular aging, but today it is known to be caused by other mechanisms such as oxidative damage, DNA damage or by the action of cytotoxic drugs. The process of cellular senescence participates in tissue regeneration during development and also occurs in physiological conditions, but against persistent damage, an accumulation of senescent cells can occur, becoming a problem. In recent years, cell senescence has been associated with different pathologies, and may be beneficial or harmful within the pathological context of each. In this way, the detection, removal or reprogramming of senescent cells has great potential in research and clinical applications.

On the other hand, mesoporous silica nanoparticles (MSNs) have been widely used in biomedicine as a controlled retention and drug delivery system due to factors such as high chemical and thermal stability, biocompatibility, high surface area, low production cost or large volume available for loading drugs. But it is noteworthy among these factors, the ability to functionalize the surface of MSNs with biomolecules, which may act as molecular gates. In this way one can control the location and timing of drug release precharged, either by internal stimuli (pH, enzyme activity, etc.) -dependent homeostasis cell either by external stimuli (temperature, ultrasonic, etc.) which can be applied at will.

In this context, it is widely reported that senescent cells show an increase in β -galactosidase expression, said overexpression being associated with the senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal). Using this characteristic, previously the group has designed and developed a nanodispositive

based on mesoporous silica nanoparticles, charged with a fluorophore and coated with a galacto-oligosaccharide (GOS) that blocks the pores acting as a molecular gate and preventing the exit of the molecule. This system is able to maintain the charge in the interior until the β -galactosidase enzyme associated with senescence is present, as it breaks the glycosidic bonds of the GOS and produces the selective release of the charge in the target cells. However, in the present work a proof of concept is presented in order to demonstrate that the specificity achieved with the synthesized nanodevices is not only due to SA- β -gal, but the existence of GOS-specific receptors on the surface of the senescent cells.

Thus, it is first intended to develop a chemically induced senescence cell model in the SK-Mel-103 melanoma line. Secondly, it is intended to obtain evidence of the presence of a galacto-sugar receptor in senescent cells, as well as to carry out its characterization in case the hypothesis is confirmed. The achievement of these objectives will allow a better understanding of the mechanism that mediates the endocytosis of these functionalized MSNs, which will allow us to progress in the use of this nanotherapy for the treatment of diseases in which cellular senescence processes are involved.

KEYWORDS:

Nanomedicine, mesoporous silica nanoparticles (MSNs), targeted drug delivery, cell senescence, galacto-oligosaccharide, targeting, galacto-sugar receptors.

RESUMEN

La senescencia celular es un estado que se caracteriza por un arresto del ciclo celular permanente y un fenotipo hipersecretor asociado. Originalmente se atribuyó al envejecimiento celular, pero hoy se sabe que puede ser causado por otros. El proceso de senescencia celular participa en la regeneración tisular durante el desarrollo y también se da en condiciones fisiológicas, pero frente a daño persistente se puede producir una acumulación de células senescentes, pasando a ser un problema. En los últimos años, la senescencia celular se ha asociado a diferentes patologías, pudiendo ser beneficiosa o perjudicial dentro del contexto patológico de cada una. De este modo, la detección, eliminación o reprogramación de células senescentes tiene un gran potencial en investigación y aplicaciones clínicas.

Por otra parte, las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) se han utilizado ampliamente en biomedicina como sistema de retención y liberación controlada de fármacos. Esto se debe a factores como su alta estabilidad química y térmica, su biocompatibilidad, su alta superficie específica, el bajo coste de producción o el gran volumen disponible para cargar fármacos. Pero, de entre estos

factores, cabe destacar la capacidad de funcionalizar la superficie de las MSNs con biomoléculas que pueden actuar como puertas moleculares. De esta manera se puede controlar el lugar y el momento de la liberación del fármaco cargado previamente, bien mediante estímulos internos que dependen de la homeostasis de célula (pH, actividad enzimática, etc.), bien mediante estímulos externos, que se pueden aplicar a voluntad (temperatura, ultrasonidos, etc).

En este contexto, está ampliamente descrito que las células senescentes presentan un aumento en la expresión de β -galactosidasa, estando asociada dicha sobreexpresión al fenotipo senescente (*senescence-associated β -galactosidase*, SA- β -gal). Valiéndose de esta característica, previamente el grupo ha diseñado y desarrollado un nanodispositivo basado en nanopartículas mesoporosas de sílice, cargadas con un fluoróforo y recubiertas con un galacto-oligosacárido (GOS) que bloquea los poros actuando como puerta molecular e impidiendo la salida de la molécula. Este sistema es capaz de mantener la carga en su interior hasta el momento en que la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia está presente, ya que rompe los enlaces glicosídicos del GOS y produce la liberación selectiva de la carga en las células diana. Sin embargo, en el presente trabajo se plantea una prueba de concepto para demostrar que la especificidad conseguida con los nanodispositivos sintetizados no se debe únicamente a SA- β -gal, sino que se hipotetiza la existencia de receptores específicos por GOS en la superficie de las células senescentes.

Así pues, en primer lugar se pretende poner a punto un modelo celular de senescencia químicamente inducida en la línea de melanoma SK-Mel-103. En segundo lugar, se pretende obtener evidencia de la presencia de un receptor de galacto-azúcares en células senescentes, así como llevar a cabo su caracterización en caso de confirmarse la hipótesis. La consecución de estos objetivos permitirá conocer mejor el mecanismo que media la endocitosis de estas MSNs funcionalizadas, lo cual permitirá avanzar en el uso de esta nanoterapia para el tratamiento de enfermedades en las cuales estén implicados los procesos de senescencia celular.

PALABRAS CLAVE:

Nanomedicina, nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs), entrega dirigida de fármacos, senescencia celular, galacto-oligosacárido, targeting, receptores de galacto-azúcares.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a Joserra la oportunidad que me brindó de entrar en el “nanomundo”, si en clase parecía interesante, aún lo ha sido más desde dentro. Y, por supuesto, a Ramón, por permitirme formar parte de su grupo. Con vosotros he visto lo grande que es la nanomedicina.

En segundo lugar, y cómo no, a Irene, mi mamá pato, que aunque tuviese toneladas de trabajo encima, siempre ha tenido tiempo para dedicarme. Tu constancia, trabajo duro y exigencia han sido para mí el ejemplo a seguir en este trabajo. Gracias por tus ánimos para continuar, por tus revisiones exhaustivas y por siempre intentar sonreír aunque el día no fuese bueno.

Y detrás de Irene vais todas las chicas del I12, especialmente a Mar, que tanto se ha preocupado por este trabajo, sois fantásticas, con vosotras me he sentido como en casa. Sin vosotras, este TFG hubiese sido mucho más difícil, largo y aburrido.

Gracias a mi familia, que desde que empecé a andar me ha enseñado a esforzarme y a dar lo mejor de mí. En vosotros he visto mi camino a seguir, dar siempre el máximo, aunque parezca imposible dar más. Aquí te incluyo, Rocío. Vosotros sois, y seréis, el pilar sobre el que me sustento.

Por último, gracias a mis amigos, que han estado conmigo en todo momento a lo largo de esta carrera y ese trabajo. Si no fuese por vosotros, tal vez hoy no estuviese a punto de ser biotecnólogo. Que mai ens falte salut!

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 SENESCENCIA CELULAR	1
1.1.1 Mecanismos de inducción de senescencia.....	1
1.1.2 Fenotipo de las células senescentes.....	2
1.1.3 Senescencia en fisiología y patología	3
1.1.4 Senescencia como diana terapéutica.....	4
1.2 NANOBIOTECNOLOGÍA Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	5
1.2.1 Nanodispositivos como sistema controlado de liberación de fármacos.....	5
1.2.2 Nanopartículas Mesoporosas de Sílice.....	6
1.2.3 Concepto de puerta molecular.....	7
1.3 INTERNALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y RECEPTORES DE GOS	8
2 OBJETIVOS	110
3 MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.0.1 Reactivos	11
3.0.2 Equipos	11
3.1 PUESTA A PUNTO DEL MODELO CELULAR DE SENESCENCIA	11
3.1.1 Línea celular. Condiciones de cultivo	11
3.1.2 Inducción de la senescencia con palbociclib	12
3.1.3 Optimización de la densidad de siembra	12
3.1.4 Determinación del tiempo óptimo de tratamiento con palbociclib para la inducción de senescencia	13
3.2 VALORACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DEL SÓLIDO S1-GAL(RHO B) Y EL SÓLIDO S1-GAL(ICG) EN CÉLULAS SENESCENTES Y NO SENESCENTES	14
3.3 ENSAYO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR SÓLIDO S1-GAL CARGADO CON DOXORRUBICINA	15
3.3.1 Optimización de las condiciones para ensayos de muerte celular inducida.....	15
3.3.2 Determinación de la especificidad del sólido S1-GAL(doxo) hacia células senescentes.....	17
3.4 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE SÓLIDO S1-GAL(DOXO)	18
3.4.1 Puesta a punto del ensayo de inhibición.....	18
3.4.2 Estudio del efecto de la concentración de azúcar en los ensayos de inhibición.....	20
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 PUESTA A PUNTO DEL MODELO CELULAR DE SENESCENCIA	23
4.1.1 Optimización de la densidad de sembrado	23

4.1.2	Determinación del tiempo óptimo de tratamiento con palbociclib para la inducción de senescencia	24
4.2	VALORACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DEL SÓLIDO S1-GAL EN CÉLULAS SENESCENTES Y NO SENESCENTES	27
4.3	ENSAYO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR SÓLIDO S1-GAL CARGADO CON DOXORRUBICINA	30
4.4	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE SÓLIDO S1-GAL(DOXO) EN CÉLULAS SENESCENTES	33
5	CONCLUSIONES.....	37
6	BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Señales y rutas implicados en la senescencia celular.....	2
Figura 2. Modelo general del mecanismo senescente.....	4
Figura 3. Estructura de los materiales mesoporosos M41S.....	6
Figura 4. Ejemplo de funcionalización post-sintética de las nanopartículas mesoporosas de sílice	7
Figura 5. Esquema del funcionamiento de una puerta molecular	7
Figura 6. Estructura del galactán.....	8
Figura 7. Estructuras de la familia de las galectinas.....	9
Figura 8. Estructura del palbociclib	12
Figura 9. Esquema general del diseño de placa en el ensayo de optimización de la densidad de sembrado en placas de seis pocillos	12
Tabla 1. Esquema por días del ensayo “Determinación del tiempo óptimo de tratamiento con palbociclib para la inducción de senescencia”.....	13
Figura 10. Esquema general del diseño de placa en los ensayos de “valoración de la internalización del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes”	15
Figura 11. Esquema general del diseño de placa en el ensayo de “optimización de las condiciones para ensayos de muerte celular inducida”.....	16
Figura 12. Esquema general del diseño de placa en el ensayo de “determinación de la especificidad del sólido S1-GAL(doxo) hacia células senescentes”.....	18
Figura 13 . Esquema general del diseño experimental de placa en la puesta a punto de un ensayo de inhibición.....	19
Figura 14. Esquema general del “estudio del efecto de la concentración de azúcar en un ensayo de inhibición”.	21
Figura 15. Esquema de MCM-41 funcionalizada con galactán y cargada con una molécula orgánica (rodamina B, doxorubicina).	22

Figura 16. Fotografías representativas del ensayo “optimización de la densidad de sembrado”	24
Figura 17. Comparación del fenotipo observable al microscopio entre células senescentes (izquierda) y células no senescentes (derecha).....	25
Figura 18. Hidrólisis del X-Gal por la enzima β -galactosidasa y liberación de un compuesto azulado insoluble	26
Figura 19. Fotografías representativas de los tiempos observados para la optimización del tiempo de inducción con palbociclib.	27
Figura 20 .Fotografías representativas del ensayo “valoración de la internalización del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes”	29
Figura 21. Resultados del ensayo de viabilidad usando S1-GAL cargado con doxorubicina en células control ((-) palbociclib) y senescentes ((+) palbociclib).....	32
Figura 22. Viabilidad en células senescentes ((+)palbociclib) tras la adición del sólido S1-GAL cargado con doxorubicina en diferentes condiciones	33
Figura 23. Ensayo de inhibición de la internalización del sólido S1-GAL(doxo) mediante la incubación con galacto-azúcares.....	34
Figura 24. Ensayo de inhibición de la internalización del sólido S1-GAL(doxo) mediante la incubación conjunta con galacto-azúcares.....	35
Figura 25. Ensayo de inhibición de la internalización del sólido S1-GAL(doxo) con altas concentraciones de galacto-azúcares	36

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de Varianza
ASGR1	Receptor de asialoglicoproteínas
CDK4,6	Ciclina dependiente de quinasas 4, 6
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CRD	Dominio receptor de carbohidratos
DDR	Respuesta al daño al ADN
DDS	Sistema de entrega de fármacos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	Suero bovino fetal
GAL	Galactán
GOS	Galacto-oligosacáridos
HDF	Fibroblastos diploides humanos
IDM	Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico
IL-6, 8	Inlerlequina-6, 8
IPF	Fibrosis pulmonar idiopática
LAC	Lactosa
MCM-41	Mobil Crystalline Material 41
MIP	Proteínas inflamatorias de macrófagos
MSN	Nanopartículas Mesoporosas de Sílice
NF-κB	Factor nuclear κB
OIS	Senescencia inducida por oncogén
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified
PFA	Paraformaldehído
Rb	Proteína del retinoblastoma
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa
s	Desviación estándar

S1-GAL	Sólido cargado funcionalizado con el oligosacárido Galactan
S1-GAL (doxo)	Sólido S1-GAL cargado con doxorubicina
S1-GAL (ICG)	Sólido S1-GAL cargado con ICG
S1-GAL (Rhod B)	Sólido S1-GAL cargado con rodamina B
SAHF	Foci de heterocromatina asociado a senescencia
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia
SA-β-gal	Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia
SK-MEL-103	Línea celular utilizada
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
UV	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

1 | INTRODUCCIÓN

1.1 SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular es un estado estable de arresto permanente del ciclo celular, en el cual las células detienen su replicación y presentan un fenotipo alterado. Este término fue acuñado en 1961 por Hayflick y Moorhead, que observaron que a diferencia de las células cancerosas, los fibroblastos diploides humanos (HDF) cultivados *in vitro* perdían la habilidad de replicarse pero se mantenían viables (HAYFLICK & MOORHEAD, 1961). Es por ello que este fenómeno se conoce como senescencia replicativa, consecuencia del acortamiento de los telómeros tras sucesivas replications (J. CAMPISI, 1997; HARLEY ET AL., 1990; HAYFLICK, 1965). Sin embargo, y como se describirá a continuación, además del acortamiento de los telómeros actualmente se conocen más mecanismos que pueden desencadenar el fenotipo senescente, como por ejemplo la senescencia inducida por oncogén (OIS) (SERRANO ET AL., 1997).

La senescencia celular puede aparecer implicada tanto en la fisiología normal del organismo como asociada a patologías, pudiendo actuar como defensa ante la progresión patológica o bien contribuir al desarrollo de la misma. Esta dualidad se conoce como pleiotropía antagonista (CAMPISI, 1997; MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO, 2014), de manera que la senescencia se postula como un arma de doble filo: las terapias pro-senescentes pueden utilizarse para combatir enfermedades, pero deben combinarse con tratamientos posteriores anti-senescencia (CAMPISI & D'ADDA DI FAGAGNA, 2007; MUÑOZ-ESPÍN ET AL., 2013; NARDELLA ET AL., 2011).

1.1.1 Mecanismos de inducción de senescencia

Algunos de los nuevos mecanismos descritos como desencadenantes de senescencia, revisados por CAMPISI & D'ADDA DI FAGAGNA (2007) y MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO (2014), aparecen de manera esquematizada en la Figura 1. Dichos mecanismos incluyen:

- Inducción de senescencia como respuesta al daño al ADN (DDR), por estrés o por especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo en esta categoría el acortamiento de los telómeros.
- Inducción por modificación del estado de la cromatina.
- Inducción por oncogén y señales mitogénicas intensas.
- Inducción por depresión del locus CDKN2A, que codifica para dos supresores de tumores cruciales, p16 y ARF.
- Inducción por la acción paracrina de otras células senescentes (mediada por el fenotipo secretor asociado a senescencia, SASP).

1 | INTRODUCCIÓN

En general, y como se aprecia en la Figura 1, las causas mencionadas concluyen en la activación de genes supresores de tumores e inhibidores del ciclo celular, como son p15, p16, p21, p27, p53 y la proteína del retinoblastoma hipofosforilada (Rb).

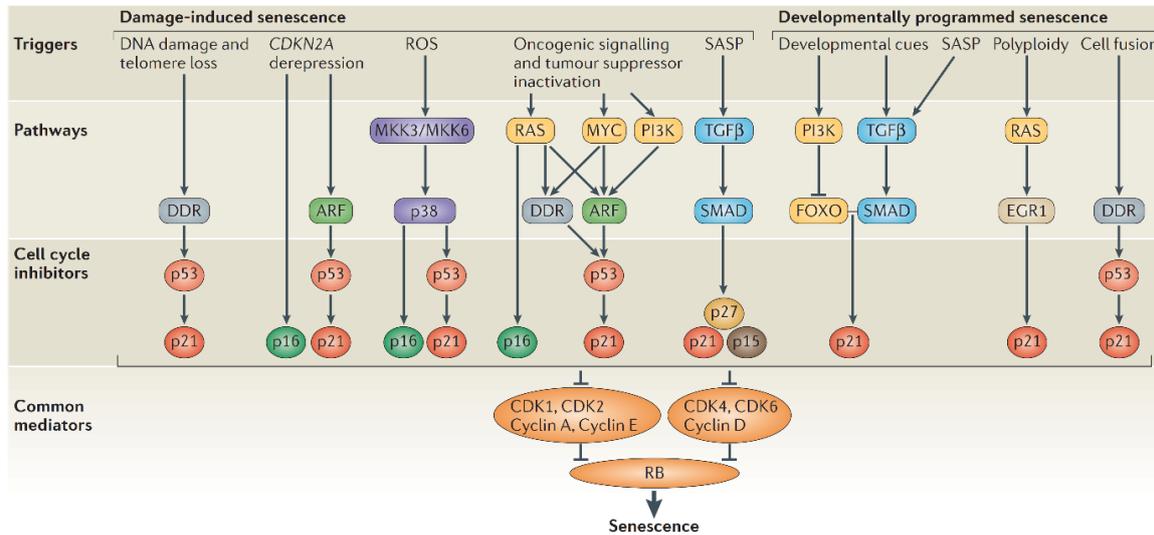


Figura 1. Señales y rutas implicados en la senescencia celular: Diferentes señales asociadas a daño desencadenan el fenotipo senescente activando rutas de señalización que a su vez activan proteínas inhibidoras del ciclo celular y la proteína del retinoblastoma (Rb). ROS: especies reactivas de oxígeno. SASP: fenotipo secretor asociado a senescencia (MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO, 2014).

1.1.2 Fenotipo de las células senescentes

Aunque los mecanismos de inducción de senescencia son muy diversos, las células senescentes presentan una serie de características fenotípicas y biomarcadores comunes. Entre estas características, revisadas por MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO (2014) y PÉREZ-MANCERA ET AL. (2014), se incluyen: la ausencia de marcadores proliferativos (proteína Ki67, no incorporación de 5-bromodeoxiuridina (BrdU)), la expresión de inhibidores del ciclo celular y supresores de tumores (p15, p16, p21, p27, p53 y pRb hipofosforilada entre otros), el aumento de la actividad β -galactosidasa (*senescence-associated β -galactosidase*, SA- β -gal), presencia de marcadores de daño del ADN, *focis* nucleares de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF, por sus siglas en inglés), un fenotipo hipersecretor pro-inflamatorio (SASP) con expresión de moléculas como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor nuclear κ B (NF- κ B), interleuquinas 6 y 8 (IL-6, IL-8) o proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP), entre muchas otras. También presentan alteraciones metabólicas y macroautofagia.

Las células senescentes cultivadas *in vitro* presentan una morfología característica, siendo en general células grandes y planas, con vacuolas y, ocasionalmente, multinucleadas. No obstante, las células senescentes *in vivo* conservan la morfología normal que dictamina la arquitectura tisular (MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO, 2014).

Conocer estas características fenotípicas propias de las células senescentes es imprescindible para su detección y desarrollo de terapias dirigidas. Actualmente la actividad SA- β -gal a pH 6,0 (basada en el elevado contenido lisosomal presente en estas células) posee especial relevancia, pues ha sido y es extensamente empleada para la detección de células en senescencia, con el único inconveniente de que necesita muestras frescas o congeladas (DIMRI ET AL., 1995; MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO, 2014). Es por ello que surgen otras técnicas de detección como la tinción con negro Sudán B (que detecta lipofuscina, agregados de los liposomas), que permite la detección en tejidos incluidos en parafina o fijados en formalina (GEORGAKOPOULOU ET AL., 2012).

1.1.3 Senescencia en fisiología y patología

La senescencia ocupa un papel fundamental en la remodelación tisular durante el desarrollo embrionario, junto con la apoptosis. En este proceso, actúa eliminando estructuras transitorias y regulando la proporción de diferentes tipos celulares, con lo que una disfunción en el mecanismo senescente durante esta etapa puede tener consecuencias en el individuo adulto (MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO, 2014). También se sabe que la senescencia ocurre en tejidos adultos normales, por ejemplo como mecanismo de maduración de megacariocitos (BESANCENOT ET AL., 2010) y sincitiotrofoblastos de la placenta (CHUPRIN ET AL., 2013).

No obstante, la senescencia celular también está presente en diferentes patologías, no solo en condiciones fisiológicas normales. En su revisión, MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO (2014) proponen que el principal propósito de la senescencia es iniciar una serie de procesos que eliminen las células no deseadas, para restringir así la propagación del daño y favorecer la regeneración final del tejido afectado. Los pasos que se sucederían para conseguir este fin son:

1. Arresto proliferativo (senescencia) de las células dañadas.
2. Fenotipo hipersecretor y pro-inflamatorio (SASP) característico de las células senescentes (HOENICKE & ZENDER, 2012), que recluta a las células de sistema inmune.
3. Movilización de células progenitoras que regeneren el tejido dañado.

Así pues, en patologías como la fibrosis hepática, renal, o de la submucosa oral, la senescencia tiene un papel beneficioso, así como en otras enfermedades como la arterosclerosis o la hipertensión pulmonar. También cabe destacar que la senescencia restringe la progresión de algunos tumores premalignos (HOENICKE & ZENDER, 2012). Sin embargo, si bien el proceso descrito (senescencia – eliminación de células senescentes – regeneración tisular) es beneficioso cuando se ejecuta sin percances, la acumulación de células senescentes cuando no son eliminadas puede agravar la disfunción tisular, causar una regeneración inefectiva del tejido y ayudar al desarrollo de distintas

1 | INTRODUCCIÓN

patologías, como queda ilustrado en la Figura 2. Por ejemplo, enfermedades como la sarcopenia, la diabetes tipo 2, la obesidad, las cataratas, el envejecimiento e incluso el cáncer (ya que el fenotipo SASP induce carcinogénesis) están asociadas con la acumulación de células senescentes (PÉREZ-MANCERA ET AL., 2014).

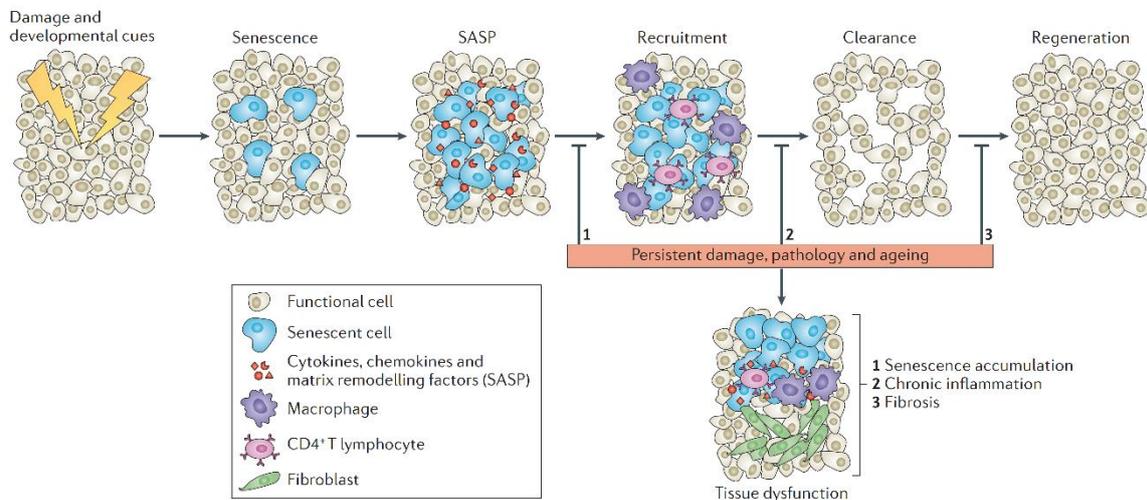


Figura 2. Modelo general del mecanismo senescente: El daño celular provoca la entrada en senescencia de algunas células, que mediante el SASP reclutan al sistema inmune. Este elimina las células dañadas y permite la regeneración del tejido. Cuando el daño es persistente (en ciertas patologías y en el envejecimiento), el mecanismo falla en alguna de sus etapas, con lo cual se acumula el daño y se produce disfunción tisular. SASP: fenotipo secretor asociado a senescencia (MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO, 2014).

1.1.4 Senescencia como diana terapéutica

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, queda patente la necesidad de desarrollar terapias anti-senescentes que sirvan para tratar patologías como el cáncer o el envejecimiento. En este contexto, en ratones progeroides modificados genéticamente se ha demostrado que la eliminación de células senescentes rejuvenece algunos tejidos y previene la aparición de cataratas (BAKER ET AL., 2011), además de alargar la esperanza de vida saludable (BAKER ET AL., 2016). El mayor reto es conseguir una estrategia que consiga dirigir la terapia de manera específica hacia las células senescentes, evitando posibles efectos secundarios en células normales. Si se tiene en cuenta que las células senescentes representan una pequeña parte del tejido dañado (ya que su gran efecto es debido al SASP), eliminarlas de manera selectiva puede reportar grandes beneficios sin alterar o afectar la arquitectura tisular (ZHU ET AL., 2015).

En el grupo en el que se realiza el trabajo se han desarrollado nanodispositivos capaces de liberar fármacos específicamente en células senescentes, evitando los posibles efectos secundarios de los mismos (AGOSTINI ET AL., 2012). Por tanto, la nanotecnología y la nanomedicina pueden ayudar a eliminar células senescentes sin incurrir en efectos no deseados.

1.2 NANOBIOOTECNOLOGÍA Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

La nanotecnología se define comúnmente como el control y reestructuración de la materia en el orden del nanómetro (tamaños inferiores a 100 nm) para así crear nuevos materiales con nuevas propiedades y funciones diferentes a las originales (KOO ET AL., 2005). Este campo de estudio multidisciplinar tiene multitud de aplicaciones, que abarcan desde la física y la ingeniería a la química y la biología. La aplicación de las ciencias biológicas a la nanotecnología es la llamada nanobiotecnología, cuya aplicación médica da lugar a una nueva disciplina: la nanomedicina. (MEDVEDEVA ET AL., 2006).

El propósito de la nanomedicina es conseguir, mediante el uso de nanoestructuras y nanodispositivos, poder tratar, diagnosticar, monitorizar y controlar un sistema biológico (MOGHIMI ET AL., 2005). Actualmente los esfuerzos están centrados en diseñar nanodispositivos que sean capaces de entregar fármacos de manera específica, dirigida y controlada (MOGHIMI ET AL., 2005; WAGNER ET AL., 2006). No obstante, las aplicaciones de la nanomedicina no se limitan a esto, sino que incluyen el uso de nanopartículas magnéticas para imagen biomédica, el desarrollo de biomateriales para implantes biomédicos o la creación de nanodispositivos capaces de actuar como biosensores para obtener un diagnóstico (WAGNER ET AL., 2006).

1.2.1 Nanodispositivos como sistema controlado de liberación de fármacos

En el rango de lo nanométrico, existen multitud de sistemas y estructuras enfocados a la entrega y liberación de fármacos (DDS, *drug delivery system*), entre los que se encuentran micelas poliméricas, nanopartículas derivadas de cápsidas virales, liposomas, dendrímeros y nanopartículas poliméricas, entre otros (MOGHIMI ET AL., 2005).

Comparados con los fármacos en formulación libre, los nanotransportadores ofrecen ventajas como la mejora de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los compuestos encapsulados, un aumento en su solubilidad y biodisponibilidad y una reducción de los efectos secundarios asociados (MEDVEDEVA ET AL., 2006; VALLET-REGÍ ET AL., 2007).

Las nanopartículas mesoporosas de sílice, en concreto, presentan ventajas más allá de las ya expuestas, como su reducido tamaño y la posibilidad de ser funcionalizadas con diferentes biomoléculas.

1 | INTRODUCCIÓN

1.2.2 Nanopartículas Mesoporosas de Sílice

Debido a las propiedades de las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSN), estas se postulan como una posible vía de administración de fármacos. Los materiales mesoporosos de sílice se utilizaron por primera vez en nanomedicina como transportadores de fármacos en 2001 (VALLET-REGI ET AL., 2001), aunque habían sido desarrollados en 1992 por Mobil, una compañía petrolera estadounidense (KRESGE ET AL., 1992). Estos se incluyen dentro de la familia mesoporosa M41S, que comprende tres materiales diferentes cuyas estructuras se muestran en la Figura 3.

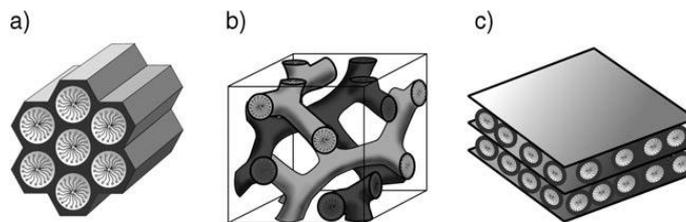


Figura 3. Estructura de los materiales mesoporosos M41S: a) MCM-41 (bidimensional hexagonal con poros); b) MCM-48 (cúbica); y c) MCM-50 (laminar). (HOFFMANN ET AL., 2006)

Las propiedades únicas de las MSN para su aplicación como sistemas de liberación controlada son:

- Tamaño reducido (80 – 100 nm) que permite atravesar barreras biológicas como la hematoencefálica (FIANDRA ET AL., 2015) y mayor penetración celular (DAVIS ET AL., 2008; MEDVEDEVA ET AL., 2006).
- Estabilidad frente a temperatura, pH, estrés mecánico y degradación hidrolítica (CLIMENT, 2012).
- Tamaño de poro regulable (entre 2 y 10 nm de diámetro) y homogéneo, que permite control de la carga y cinética de liberación del fármaco (GIRET ET AL., 2015).
- Elevado volumen de poro ($1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) y superficie específica ($500 - 1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), con el subsiguiente aumento en la cantidad de fármaco que se puede cargar y adsorber (GIRET ET AL., 2015).
- Gran control sobre la estructura y porosidad del sólido final, mediante el cambio en las condiciones de pH, temperatura, concentraciones o surfactante empleadas en la síntesis (CLIMENT, 2012; VALLET-REGÍ ET AL., 2007).
- Superficie interna y externa funcionalizable gracias a los grupos silanol (Si-OH) existentes en su estructura, como se muestra en la Figura 4. Estos grupos permiten funcionalizar la superficie con moléculas y biomoléculas que a su vez permiten controlar el modo de liberación del fármaco (MAS FONT, 2010).

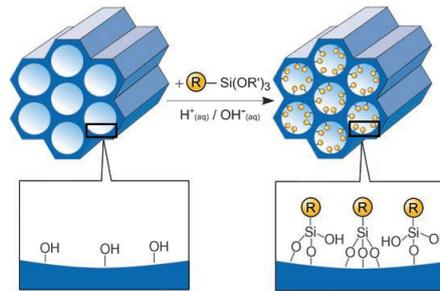


Figura 4. Ejemplo de funcionalización post-sintética de las nanopartículas mesoporosas de sílice: En este caso se aprecia como los grupos silanol de la superficie de la nanopartícula reaccionan con grupos trialcoxisilano. R: grupo funcional orgánico (HOFFMANN ET AL., 2006).

1.2.3 Concepto de puerta molecular

Una puerta molecular es una estructura nanoscópica capaz de controlar el transporte y entrega de materia, que se inicia en respuesta a un estímulo externo.

Las nanopartículas con puerta molecular están formadas por una estructura inorgánica porosa donde se encapsula la carga, y están funcionalizadas con moléculas orgánicas (puertas moleculares) que retienen la carga y la liberan únicamente ante un determinado estímulo externo. Según este modelo, existen dos estados: uno en el que la puerta está cerrada y teóricamente no hay liberación alguna de la carga, y otro estado en el que, tras el estímulo, la puerta queda abierta y se libera el contenido de los poros de la nanopartícula (CLIMENT, 2012; COLL ET AL., 2013). Este mecanismo se ilustra en la Figura 5.

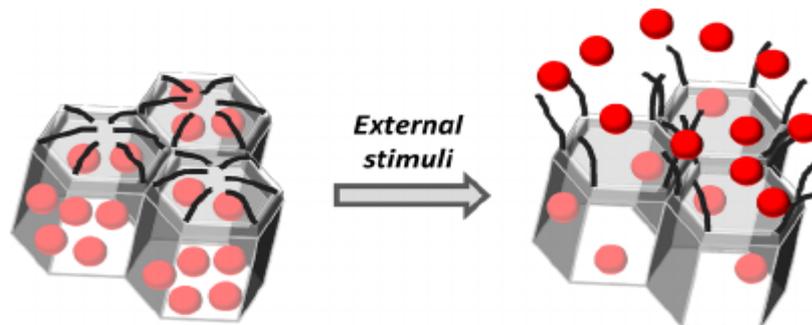


Figura 5. Esquema del funcionamiento de una puerta molecular: El material cargado en los poros permanece en ellos hasta la aparición de un estímulo externo que provoca la apertura de la puerta molecular, liberándose el contenido (COLL ET AL., 2013).

Tanto la naturaleza de las puertas moleculares (ácidos nucleicos, péptidos, polímeros, azúcares, etc.) como el estímulo ante el que responden (pH, temperatura, corte enzimático, luz, potencial de reducción y oxidación, etc.) pueden ser muy diversos. Esto permite el diseño de un material híbrido orgánico-inorgánico que responda específicamente a las condiciones fisiológicas de la patología o situación a tratar (CLIMENT, 2012; COLL ET AL., 2013; SLOWING ET AL., 2008; YANG ET AL., 2012).

1 | INTRODUCCIÓN

Una de las optimizaciones de estos materiales híbridos que se describió en 2012 (AGOSTINI ET AL., 2012) es un nanomaterial que permite la liberación específica de sustancias en células senescentes. En este caso dicho nanodispositivo, al que llamaremos de ahora en adelante S1-GAL, es una nanopartícula mesoporosa de sílice funcionalizada con galactán, un hexa-galacto-oligosacárido de composición definida que consta de dos trisacáridos de galactosa unidos por enlace o-glicosídico (Figura 6) El galactán va a actuar como puerta molecular, ya que será hidrolizado selectivamente por la enzima SA- β -Gal, presente en elevadas concentraciones en células senescentes (gracias a la sobreexpresión del aparato lisosomal – relacionada con el fenotipo SASP - que caracteriza a dichas células) (AGOSTINI ET AL., 2012; MUÑOZ-ESPÍN & SERRANO, 2014).

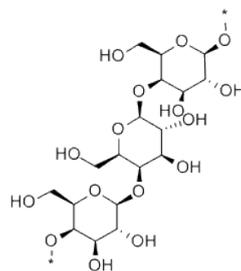


Figura 6. Estructura del galactán (ChemicalBook CAS 39300-87-3)

1.3 INTERNALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y RECEPTORES DE GOS

Las MSN funcionalizadas con galactán liberan su contenido cuando el hexa-galacto-oligosacárido es hidrolizado por la SA- β -Gal, que se encuentra en el lisosoma (AGOSTINI ET AL., 2012; DIMR ET AL., 1995). Para que el sólido S1-GAL llegue al lisosoma es necesario que primero sea internalizado por la célula. La endocitosis es un mecanismo de internalización de macromoléculas que también incluye su transporte a través del andamiaje endo-lisosomal. Una vez una macromolécula es endocitada por la célula, llega a los endosomas tempranos en 5-10 min, y allí es redirigida a su siguiente destino, que puede ser el aparato lisosomal (BAREFORD & SWAAN, 2007).

El mecanismo por el cual el sólido S1-GAL es internalizado por las células senescentes sigue siendo una incógnita a día de hoy. La bibliografía existente apunta a que dicha internalización podría estar mediada por un receptor del tipo lectina, receptores encargados del reconocimiento de azúcares en la superficie celular con alta afinidad por estos (WEIS & DRICKAMER, 1996). De estos receptores, aquellos más relevantes y que presentan gran afinidad por la galactosa (azúcar con el que está funcionalizado el sólido S1-GAL) son el receptor de asialoglicoproteínas (ASGR1, primera lectina de tipo C descubierta (STOCKERT, 1995)) y las galectinas (una familia de receptores solubles presentes en gran cantidad de tipos celulares (CUMMINGS & LIU, 2009)).

ASGR1 en condiciones fisiológicas normales está presente casi exclusivamente en células hepáticas y en macrófagos (FAGERBERG ET AL., 2014), y está relacionado con la eliminación de plaquetas senescentes (HOFFMEISTER & FALET, 2016). La presencia de este receptor en otras condiciones diferentes a la fisiología normal, como en ciertos tipos de cáncer (EZKURDIA ET AL., 2014), sugiere que podría expresarse también en células senescentes. Este receptor induce una endocitosis mediada por clatrin, que interaccionan con ASGR1 ocurriendo a continuación la internalización (BAREFORD & SWAAN, 2007).

Por otra parte, las galectinas son un tipo de receptores solubles que interaccionan entre sí para formar oligómeros (BARONDES ET AL., 1994; CUMMINGS & LIU, 2009). En su forma oligomérica, estos receptores cuentan con al menos dos sitios de reconocimiento de azúcares (CRD) (CUMMINGS & LIU, 2009), como se muestra en la Figura 7. Esto permitiría que interaccionaran con el galactán que recubre el sólido S1-GAL, mientras que el otro extremo quedaría libre para interactuar con un elemento de la membrana celular. Este elemento bien podría ser una asialoglicoproteína, es decir, una proteína glicosilada que ha perdido el ácido siálico (dicho ácido, en condiciones normales, evita que el azúcar terminal quede expuesto y la célula sea eliminada (SORENSEN ET AL., 2009)). Se ha comprobado que las células senescentes sufren un descenso en el grado de sialización, aumentando el número de galactosas expuestas en la superficie celular (ITAKURA ET AL., 2016) que podrían actuar como ligando para las galectinas. La galectina 3, en particular, es internalizada por un proceso llamado endocitosis independiente de clatrin (BAREFORD & SWAAN, 2007).

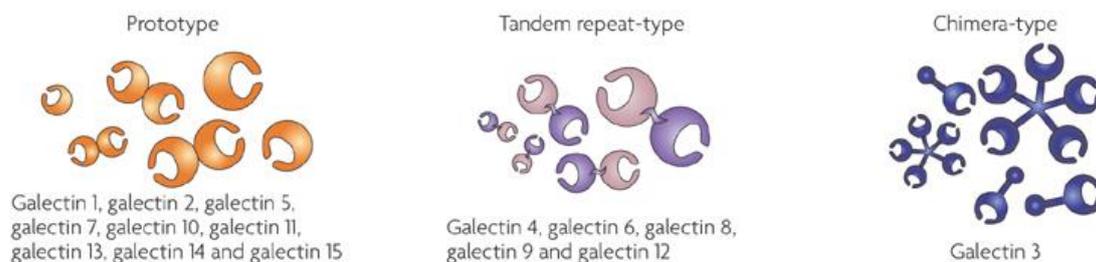


Figura 7. Estructuras de la familia de las galectinas: Las prototipo forman homodímeros. Las de repetición en tándem no oligomerizan, sino que su secuencia ya incluye dos CRD. El tipo quimera (Galectina 3 exclusivamente), al oligomerizar posee varios CRD (RABINOVICH & TOSCANO, 2009).

Conocer el mecanismo por el cual el sólido S1-GAL es internalizado por las células senescentes sería un gran paso en su aplicación en nanomedicina, así como permitiría modificar las características del material para adaptarse al contexto biológico concreto.

2 | OBJETIVOS

Para la realización de este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Poner a punto y optimizar de un modelo de senescencia celular a partir de la línea de melanoma humano SK-MEL-103.
2. Comprobar el funcionamiento de un nanodispositivo mesoporoso (cargado con fluoróforos o citotóxicos y funcionalizado con galacto-oligosacáridos) específico para células senescentes en el modelo celular establecido.
3. Evaluar la existencia de un posible receptor específico de galacto-oligosacáridos como responsable de la especificidad del nanodispositivo hacia células senescentes.

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

3.0.1 Reactivos

El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose (DMEM), el suero fetal bovino (FBS), el Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified (PBS) y el cristal violeta se adquirieron de Sigma-Aldrich. La tripsina-EDTA 0,05 % (1X) se adquirió de Gibco. El paraformaldehído (PFA) se adquirió de Merck, y el ácido acético de Scharlau. El kit de tinción de β -galactosidasa *Senescence β -galactosidase Staining Kit* se adquirió de Cell Signalling, y el fármaco palbociclib se adquirió de Pfizer. La síntesis y caracterización de los sólidos S1-GAL fueron realizadas por miembros del grupo investigación.

3.0.2 Equipos

Los ensayos celulares se realizaron en una cabina de seguridad biológica clase II Telstar Bio-II-A con filtro HEPA y flujo laminar vertical. Para el mantenimiento de las células se utilizó un incubador de CO₂ Forma Steri-Cycle de Thermo Scientific. La evaluación de la morfología y el control rutinario del crecimiento de las líneas celulares se llevó a cabo empleando un microscopio invertido CKX41 de Olympus. El mismo llevaba acoplada una cámara fotográfica Olympus E-620.

Para la observación de compuestos fluorescentes se utilizó el microscopio invertido (LEICA DM6000). Las lecturas de los ensayos de viabilidad se realizaron con el equipo Perkin Elmer Victor 3 1420 Multilabel Plate Counter.

3.1 PUESTA A PUNTO DEL MODELO CELULAR DE SENESCENCIA

3.1.1 Línea celular. Condiciones de cultivo

Para poner a punto el modelo de senescencia se trabajó con una línea de células humanas derivadas de melanoma maligno (SK-MEL-103). Esta línea celular fue proporcionada por el Dr. Manuel Serrano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), y se eligió para este trabajo a raíz de la experiencia previa del grupo en estudios de senescencia con dichas células.

Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10 % FBS en un incubador a 37 °C y una concentración de CO₂ del 5 %. En los subcultivos de mantenimiento de las células se usaron 2 mL de tripsina seguidos de una incubación a 37 °C durante 5 min. Dos veces por semana se realizaron subcultivos 1:8 o 1:10, en función de la densidad celular observada.

Las siembras para los distintos ensayos se realizaron levantando las células con 2 mL de tripsina, seguidos de 5 min de incubación a 37 °C. Para inactivar la tripsina se utilizaron 8 mL de medio DMEM suplementado con FBS, tras lo cual las células se centrifugaron 5 min a 1200 rpm. Tras eliminar

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

el sobrenadante, el precipitado restante se resuspendió en un volumen apropiado para llevar a cabo el recuento celular en cámara de Neubauer.

3.1.2 Inducción de la senescencia con palbociclib

Para la inducción de la senescencia se usó palbociclib, fármaco desarrollado por Pfizer (Figura 8). El palbociclib es un inhibidor selectivo de las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4/6). La inhibición de estas ciclinas hace que la proteína del retinoblastoma (pRb) se encuentre hipofosforilada al final de la fase G1, lo que provoca un arresto del ciclo celular irreversible, induciendo senescencia (DICKSON ET AL., 2016; EZHEVSKY ET AL., 1997).

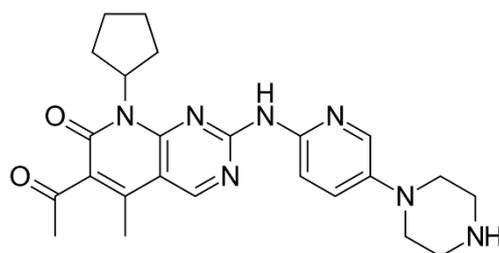


Figura 8. Estructura del palbociclib (PD-0332991, Pfizer)

Las células senescentes se obtuvieron a partir de placas de cultivo en confluencia de células SK-MEL-103. La inducción se realizó añadiendo palbociclib al medio DMEM con 10 % de FBS a una concentración final de 5 μ M tras realizar un subcultivo 1:10.

3.1.3 Optimización de la densidad de siembra

El primer paso para poner a punto el modelo de senescencia fue establecer la densidad de células senescentes a sembrar en los ensayos que permitiesen obtener resultados significativos. Debido a la experiencia previa del grupo con esta línea celular, solo se necesitaba optimizar la densidad

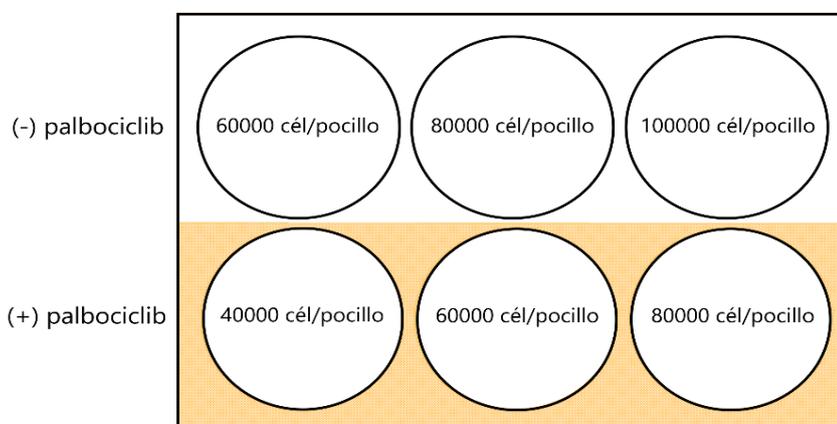


Figura 9. Esquema general del diseño de placa en el ensayo de optimización de la densidad de sembrado en placas de seis pocillos: En la fila superior se sembraron células control, sin ningún tratamiento. En la fila inferior se sembraron las células tratadas con palbociclib 5 μ M durante siete días.

de sembrado para pocillos de 35 mm, como los presentes en placas de seis pocillos. El diseño de estos experimentos de optimización fue el que se muestra en la Figura 9.

Tras sembrar a estas densidades con un volumen de 2 mL de medio DMEM 10 % FBS en cada pocillo, se incubaron las células 24 h. Posteriormente se realizó una tinción de actividad β -galactosidasa (descrita en el apartado 3.1.4) y con los resultados obtenidos se vio el rango óptimo de densidad de siembra para una placa de seis pocillos.

3.1.4 Determinación del tiempo óptimo de tratamiento con palbociclib para la inducción de senescencia

A fin de determinar el menor tiempo de incubación con palbociclib para el cual el grado de inducción de senescencia es máximo, se indujeron siete placas de manera simultánea (día 0). Estas siete placas fueron incubadas a 37 °C y 5 % de CO₂. Los días 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 30 post-inducción se sembraron células de la placa correspondiente en placas de 35 mm, y tras 24 h de incubación se realizó una tinción de actividad β -galactosidasa (Tabla 1). El tiempo de incubación para cada placa fue diferente (3, 5, 7 días...) con el objetivo de observar el grado de inducción de senescencia a diferentes días, a partir de la evaluación cualitativa de los resultados obtenidos en los ensayos de tinción.

Tabla 1. Esquema por días del ensayo "Determinación del tiempo óptimo de tratamiento con palbociclib para la inducción de senescencia".

Día	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	30	31
Placa 1	Siembra	Fijación + tinción												
Placa 2			Siembra	Fijación + tinción										
Placa 3					Siembra	Fijación + tinción								
Placa 4							Siembra	Fijación + tinción						
Placa 5									Siembra	Fijación + tinción				
Placa 6											Siembra	Fijación + tinción		
Placa 7													Siembra	Fijación + tinción

El día 3 la densidad de siembra fue de 40000 células por pocillo, para evitar crecimiento excesivo debido a que el fenotipo de las células todavía no era senescente. El día 5 la densidad de sembrado fue de 50000 células por pocillo, por el mismo motivo. Los días posteriores la densidad de

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

células sembradas fue de 60000 células por pocillo. La incubación posterior a la siembra se produjo en las condiciones habituales.

❖ Tinción de actividad β -galactosidasa:

La evaluación del grado de senescencia alcanzado se llevó a cabo mediante el uso del kit *Senescence β -galactosidase Staining Kit (Cell Signalling)*. Este kit evalúa la actividad de la enzima β -galactosidasa a pH 6. La actividad de esta enzima está aumentada en células senescentes, y su detección a pH 6 se da exclusivamente en este tipo de células. Para ello se proporciona un sustrato, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), que es hidrolizado por la β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble de color intenso.

El protocolo seguido fue el proporcionado por el propio kit. Tras la fijación de las células se añadió la solución de tinción. Las soluciones de tinción y fijación se prepararon siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras añadir la solución de tinción, las células se incubaron en cultivo de noche a 37 °C sin CO₂. La ausencia de CO₂ evita alteraciones en el pH del medio, que podrían interferir con los resultados.

Tras la incubación se retiró la solución de tinción, se lavó dos veces con PBS y las células se observaron al microscopio invertido (Olympus CKX41). Las imágenes de los resultados se tomaron con una cámara Olympus E-620 acoplada al mismo.

3.2 VALORACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DEL SÓLIDO S1-GAL(RHO B) Y EL SÓLIDO S1-GAL(ICG) EN CÉLULAS SENESCENTES Y NO SENESCENTES

A fin de comprobar si efectivamente las nanopartículas funcionalizadas con galactán (sólido S1-GAL) se internalizaban específicamente en células senescentes, se preparó una placa de 24 pocillos como la que se presenta en la Figura 10. Se probaron diferentes concentraciones y modos de adición para estudiar la influencia de estos parámetros en el proceso de internalización.

Se sembraron 30000 células control y 20000 células senescentes en los correspondientes pocillos, en 1 mL de medio DMEM 10 % FBS por pocillo.

Antes de añadir las nanopartículas, estas se resuspendieron en medio DMEM 10 % a una concentración de 1 mg/mL. Para su correcta resuspensión, las nanopartículas primero se sonicaron durante aproximadamente 5 min. Posteriormente se mantienen estas nanopartículas en agitación durante 30 – 60 min previa a su adición. Los modos de adición ensayados fueron dos. En primer lugar (columnas 2 y 3 de la Figura 10), las nanopartículas fueron añadidas directamente al medio, añadiendo alícuotas de 25 y 50 μ L respectivamente de la suspensión inicial para conseguir la

concentración final deseada. En las columnas 4 y 5 el medio se retiró completamente, y se añadió 1 mL de medio DMEM con una concentración de nanopartículas de 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, obtenido de la suspensión inicial. En la columna 1 no se añadió ninguna nanopartícula, a modo de control negativo, que permitiría observar la autofluorescencia.

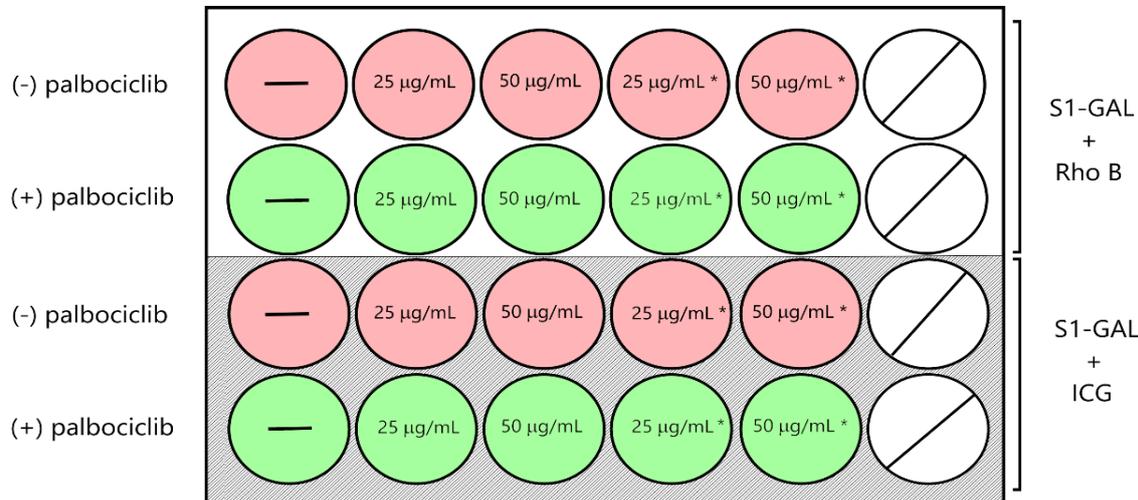


Figura 10. Esquema general del diseño de placa en los ensayos de “valoración de la internalización del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes”: Se añadieron las correspondientes nanopartículas S1-GAL cargadas con rodamina B (Rho B) o verde de indiocianina (ICG) a la concentración indicada en el pocillo, dejándose unos pocillos sin adición de sólido (columna 1) como referencia de autofluorescencia. En las columnas 2 y 3, las nanopartículas se añadieron con alícuotas de la suspensión inicial. En las columnas 4 y 5 se retiró el medio y se añadió medio DMEM nuevo con la concentración deseada de nanopartículas. Las nanopartículas fueron resuspendidas en medio DMEM 10 % FBS, sonicadas 5 min, agitadas durante 30 – 60 min antes de ser añadidas

Se usaron dos tipos de nanopartículas, unas cargadas con rodamina B y otras cargadas con ICG (verde de indiocianina, por sus siglas en inglés). Ambos compuestos son fluoróforos, absorben a 554 y 795 nm, y emiten a 576 y 845 nm, respectivamente, en disolución acuosa (KRISTOFFERSEN ET AL., 2014; OKAWA ET AL., 2013).

Tras 5h de incubación, se lavó con PBS para eliminar los restos de nanopartículas no internalizados y los agregados que pudieran haberse formado. Los pocillos se observaron en un microscopio de fluorescencia invertido (LEICA DM6000).

3.3 ENSAYO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR SÓLIDO S1-GAL CARGADO CON DOXORRUBICINA

3.3.1 Optimización de las condiciones para ensayos de muerte celular inducida

El primer paso para realizar un ensayo basado en la apoptosis inducida por el sólido S1-GAL cargado con doxorubicina fue determinar las mejores condiciones para este tipo de ensayos. Para ello se probaron diferentes concentraciones de nanopartículas, filtrar y no filtrar el medio con las nanopartículas antes de añadirlo y diferentes tiempos de lectura.

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

Siguiendo el esquema especificado en la Figura 11, la placa se dividió en dos mitades. En la mitad superior, las células se incubaron durante 48 h en las condiciones habituales, tras lo cual se realizó una tinción con cristal violeta (explicada más adelante). La mitad inferior, por su parte, fue incubada durante 72 h en las condiciones habituales. Pasado este tiempo también se realizó una tinción con cristal violeta.

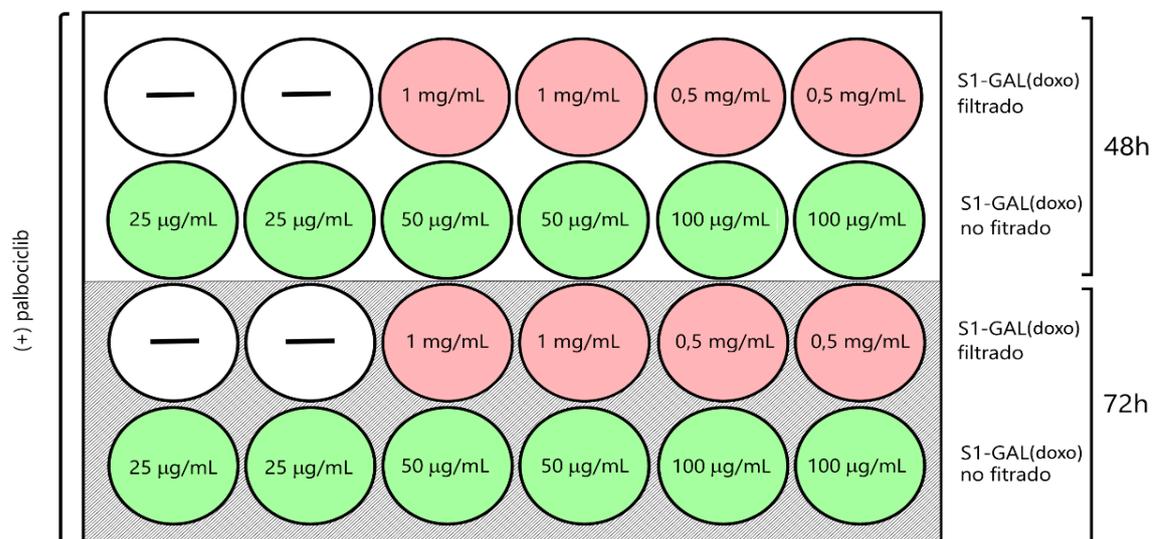


Figura 11. Esquema general del diseño de placa en el ensayo de “optimización de las condiciones para ensayos de muerte celular inducida”: Tras retirar el medio se añadió medio con las nanopartículas a la concentración indicada en los pocillos, dejándose unos pocillos sin adición de sólido como referencia de 100 % de viabilidad. Aquellas concentraciones del orden de mg/mL (en rojo) fueron filtradas previamente a su adición, mientras que aquellas de concentraciones del orden de µg/mL (verde) no fueron filtradas. La viabilidad se midió a las 48 h y a las 72 h para cada condición. En experimentos posteriores, se estudió también una concentración de 2 mg/mL previamente filtrados. Las nanopartículas fueron resuspendidas en medio DMEM 10 % FBS, sonicadas 5 min, agitadas durante 30 – 60 min y filtradas antes de ser añadidas

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos, siguiendo el diseño que se especifica en la Figura 11. La concentración de siembra fue de 20000 células senescentes en cada pocillo. Se incubaron en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS, 1 mL por pocillo, durante 24 h a 37 °C y 5 % CO₂. Pasado el tiempo de incubación se añadió el sólido S1-GAL(doxo), retirando el medio y añadiendo nuevo medio de cultivo con la concentración de nanopartículas deseada.

En cada mitad se repitió el mismo diseño a diferentes tiempos, como se observa en la Figura 11. En los dos primeros pocillos de la fila superior de cada mitad no se añadió el sólido cargado con doxorubicina, de modo que determinaría la viabilidad máxima. En los pocillos restantes de la primera fila (en rojo) se filtró el medio previamente a su adición el medio con filtros estériles con un tamaño de poro de 0,45 µm (Jet Biofil, Nº Catálogo FPV403030). En la segunda fila de cada mitad (en verde) se añadió el medio sin filtrar, retirando primero el medio y añadiendo después el medio con la concentración de nanopartículas deseada. Seguidamente se incubó la placa durante 48 h y 72 h en las condiciones habituales, tras lo cual se procedió a fijar las células.

La fijación se llevó a cabo lavando con dos volúmenes de PBS, seguidos de una incubación durante 10-15 min con una disolución de 0,5 mL de PFA al 4 %. Retirada esta, se lavó con dos volúmenes de PBS y se añadió un volumen de PBS con el que se mantuvieron hasta la tinción con violeta de cristal.

❖ Tinción con cristal violeta

Al retirar el medio y lavar con PBS se eliminan tanto restos de nanopartículas que no han sido internalizadas como aquellas células muertas que por tanto han perdido la adherencia. En este principio se basa el ensayo de viabilidad celular mediante tinción con cristal violeta, un colorante extensamente utilizado en este tipo de ensayos (VEGA-AVILA & PUGSLEY, 2011). Como únicamente las células vivas conservan la adherencia y permanecen pegadas a los pocillos, serán éstas las que resulten teñidas, intercalándose el cristal violeta en su ADN.

Una vez fijadas las células (tal y como se indica en el apartado anterior) se añadieron 0,5 mL de cristal violeta 0,05 % por pocillo y la placa se incubó durante 45 min-1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se retiró el cristal violeta y se lavaron los pocillos con agua del grifo sucesivas veces hasta dejar de ver salida de colorante. Una vez retirado el cristal violeta no incorporado en las células, se secó la placa con ayuda de un secador para eliminar cualquier resto de agua. Finalmente se procedió a desteñir las células para cuantificar el cristal violeta, añadiendo para ello 0,5 mL a cada pocillo de ácido acético al 10 %. La placa se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 min en agitación. Pasado este tiempo se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer Victor 3 1420 Multilabel Plate Counter a 595 nm.

3.3.2 Determinación de la especificidad del sólido S1-GAL(doxo) hacia células senescentes

Una vez determinadas las condiciones óptimas para ensayos de viabilidad con el sólido S1-GAL(doxo), que son filtrando el medio con nanopartículas antes de añadirlo e incubar durante 48 h (como se muestra en el apartado de resultados y discusión), se estudió si el efecto citotóxico de dichas nanopartículas es específico de células senescentes.

Para esto, se comparó el efecto citotóxico de dicho sólido entre células control (no senescentes) y células senescentes.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos, siguiendo el diseño que se especifica en la Figura 12. La concentración de siembra fue de 20000 células/pocillo en el caso de las senescentes y 30000 células/pocillo en el caso de las células control. Se incubaron en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS, 1mL por pocillo, durante 24 h a 37 °C y 5 % CO₂. Pasado el tiempo de incubación se añadió el sólido S1-GAL(doxo), retirando el medio y añadiendo nuevo medio de cultivo con la

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

concentración de nanopartículas deseada. Previamente a su adición el medio fue filtrado con filtros estériles con un tamaño de poro de 0,45 μm (Jet Biofil, N $^{\circ}$ Catálogo FPV403030). A parte de las concentraciones probadas en el ensayo anterior, se añadió una concentración mayor (2 mg/mL) al ensayo, para observar cómo afectaba a la viabilidad una concentración aún mayor. Dicha concentración también fue añadida retirando primero el medio y previamente filtrada.

Tras añadir las nanopartículas, se incubó la placa durante 48 h en las condiciones habituales. Una vez pasado este tiempo se procedió a fijar las células con PFA 4 % y a realizar una tinción de cristal

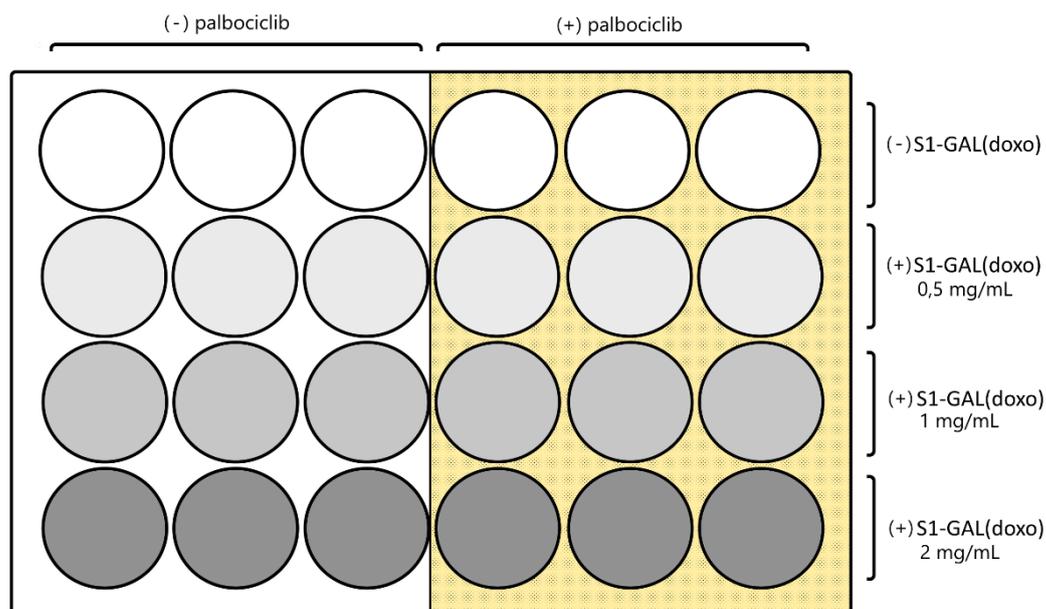


Figura 12. Esquema general del diseño de placa en el ensayo de “determinación de la especificidad del sólido S1-GAL(doxo) hacia células senescentes”: Tras retirar el medio se añadió medio con las nanopartículas a la concentración indicada en los pocillos, dejándose unos pocillos sin adición de sólido como referencia de 100 % de viabilidad. En la mitad izquierda de la placa se sembraron células control no senescentes, y en la derecha células senescentes. Se comprobó si el sólido S1-GAL(doxo) presentaba especificidad hacia células senescentes, produciendo una bajada en la viabilidad respecto al control negativo. Las nanopartículas fueron resuspendidas en medio DMEM 10 % FBS, sonicadas 5min, agitadas durante 30 – 60 min y filtradas antes de ser añadidas. La viabilidad se midió a las 48h.

violeta, siguiendo el método expuesto en el apartado anterior.

3.4 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE SÓLIDO S1-GAL(DOXO)

3.4.1 Puesta a punto del ensayo de inhibición

Tras comprobar la especificidad del sólido S1-GAL cargado con doxorubicina hacia las células senescentes, se propuso estudiar si la incubación con dos azúcares que contuviesen galactosa en su estructura (lactosa –LAC- y galactán –GAL-) influía en la internalización de las nanopartículas en el caso de las células senescentes.

Para ello primero se estudiaron qué condiciones de incubación permitían ver una diferencia más clara entre células incubadas con azúcares y con el sólido S1-GAL(doxo) y células incubadas solo con el sólido con respecto a células senescentes sin tratar.

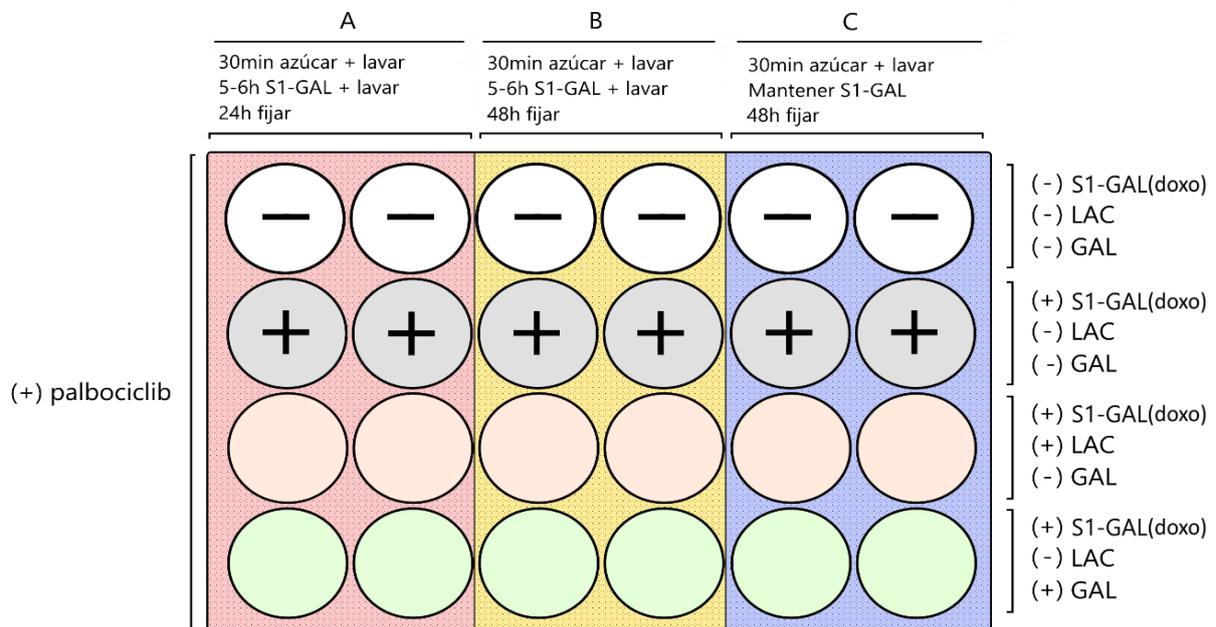


Figura 13. Esquema general del diseño experimental de placa en la puesta a punto de un ensayo de inhibición: Todas las filas tienen sembradas células senescentes. La nanopartícula ensayada está cargada con doxorubicina (S1-GAL(doxo)). La primera fila actúa como control negativo, indicando la viabilidad máxima. La segunda fila está tratada con el sólido S1-GAL cargado con doxorubicina. La tercera fila fue preincubada con lactosa (LAC) y lavada, previo a la adición de nanopartículas. La cuarta fila fue preincubada con galactán (GAL) y lavada, previo a la adición de nanopartículas. Las nanopartículas fueron resuspendidas en medio DMEM 10 % FBS, sonicadas 5min, agitadas durante 30 – 60 min y filtradas. Se retiró el medio y se añadió 1mL de medio con nanopartículas a una concentración de 2mg/mL. La viabilidad se midió a las 24 o 48 h, según la condición.

El sembrado se realizó en una placa de 24 pocillos siguiendo el esquema de la Figura 13, sembrando 20000 células senescentes en 1 mL de medio DMEM con 10 % de FBS por pocillo, y se incubaron durante 24 h en las condiciones habituales.

Las condiciones estudiadas fueron tres, como se muestra en la Figura 13. En todas ellas, de manera previa a la adición de nanopartículas se retiró el medio de cultivo, y se añadió 1 mL de disolución consistente en medio DMEM 10 % FBS con el galacto-azúcar disuelto a una concentración de 70,5 μ M para la lactosa (LAC) y para el galactán (GAL). Se incubaron las células durante 30 minutos con el galacto-azúcar y se retiró el medio. Tras esto, se lavó con PBS y se añadió 1 mL de medio DMEM con las nanopartículas a una concentración de 2 mg/mL. Este medio con las nanopartículas fue preparado como se ha descrito anteriormente (resuspensión, sonicación, agitación) y fue filtrado previamente a su adición.

Respecto a la adición e incubación del galacto-azúcar, las condiciones fueron iguales para las tres condiciones ensayadas. La diferencia entre éstas radica en los tiempos posteriores. En la primera

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

condición (A), se incubaron las células con el sólido S1-GAL(doxo) durante 5-6h, tras lo cual se retiró el medio, se lavó con PBS y se añadió medio DMEM 10 % FBS con el que se incubó durante 24 h, momento en el cual se fijaría con PFA 4 % y se realizó la tinción con cristal violeta. La segunda condición (B) se diferencia de la primera (A) en el tiempo de incubación previo a la fijación, que fue de 48 h. En la tercera condición (C) se incubaron las células con las nanopartículas durante 48 h, no siendo retiradas en ningún momento hasta la fijación con PFA 4 % y la tinción con cristal violeta.

Las disoluciones de los galacto-azúcares se prepararon pesando el azúcar en viales, esterilizándolo mediante radiación UV, añadiendo medio DMEM 10 % FBS hasta la concentración deseada y se mantuvieron en agitación hasta su completa disolución en el medio.

3.4.2 Estudio del efecto de la concentración de azúcar en los ensayos de inhibición

Tras observar que apenas había un cambio en la viabilidad de las células incubadas conjuntamente con un azúcar y el sólido S1-GAL cargado con doxorubicina (tal y como se expone en el apartado de resultados), se repitió el ensayo con concentraciones mayores de azúcar. Atendiendo a los resultados del apartado anterior, se probaron tres condiciones diferentes en cuanto a modos y tiempos de incubación, según lo especificado en la Figura 14.

El sembrado se realizó en dos placas de 24 pocillos siguiendo el esquema de la Figura 14, sembrando 20000 células senescentes en 1mL de medio DMEM 10 % FBS por pocillo, y se incubaron durante 24h en las condiciones habituales. En una de las placas el galacto-azúcar fue el galactán en todo momento, mientras que en la otra fue la lactosa. En ningún momento se usaron de manera conjunta. Para descartar un posible efecto osmótico causado por la alta concentración de azúcar, se añadió la concentración máxima de azúcar a algunos controles.

Las disoluciones de los galacto-azúcares se prepararon como se ha descrito en el apartado anterior (pesar, esterilizar mediante UV, disolver en medio DMEM 10 % FBS y agitar) y la suspensión de sólido S1-GAL(doxo) fue preparada como se ha descrito anteriormente (resuspensión en medio DMEM 10 % FBS, sonicación, agitación) y fue filtrada previamente a su adición.

Tras la incubación inicial y exceptuando la última fila (tal como se muestra en la Figura 14), se retiró el medio de todos los pocillos y se añadió 1mL de medio DMEM 10 % FBS con la concentración de azúcar correspondiente siguiendo el esquema de la Figura 14. Se incubaron las células con el azúcar durante 1h en las condiciones habituales y seguidamente se retiró el medio con el galacto-azúcar y se lavó con PBS.

Dependiendo de la condición ensayada, el siguiente paso fue diferente. En la primera condición ensayada (A) se repitió lo hecho en el ensayo anterior: se incubaron las células solamente

con el sólido S1-GAL(doxo) durante 1h, tras lo cual se retiró el medio y se añadió 1 mL de medio DMEM 10 % FBS nuevo. En la segunda condición ensayada (B) la incubación con las nanopartículas se hizo de manera conjunta con el galacto-azúcar (a la misma concentración que en la primera incubación) durante 1h, tras lo cual se lavó y se añadió 1mL de medio DMEM 10 % FBS nuevo. En la tercera condición ensayada (C) se procedió como en la primera (A), con la diferencia de que el tiempo de incubación con el sólido fue de 5min, tras lo cual se lavó y se añadió 1mL de medio DMEM 10 % FBS.

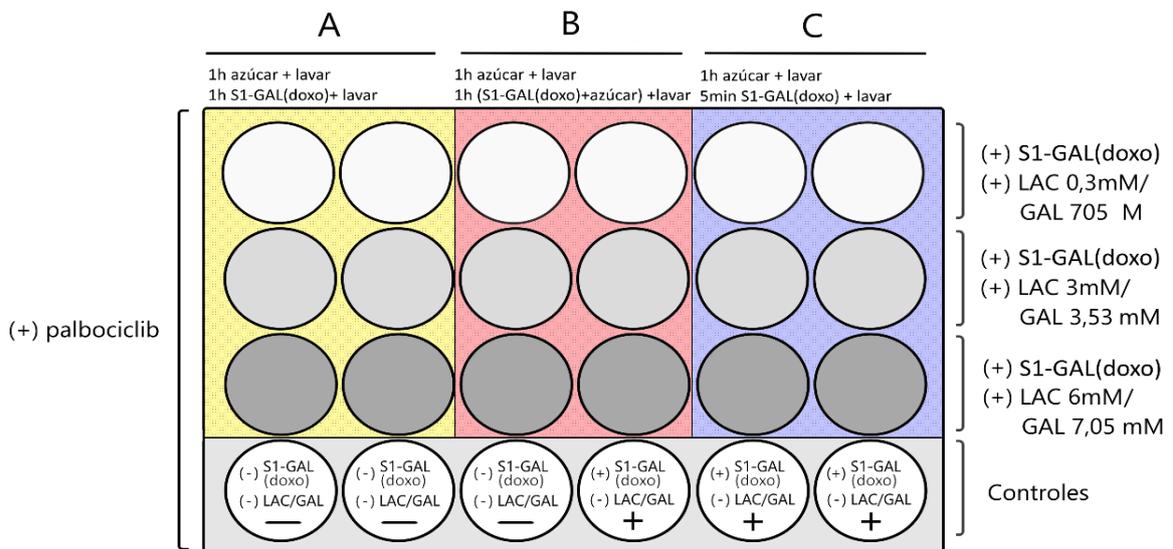


Figura 14. Esquema general del “estudio del efecto de la concentración de azúcar en un ensayo de inhibición”: Para cada réplica, se hizo una placa con cada azúcar, de tal manera que las concentraciones eran de galactán (GAL) o lactosa (LAC), nunca mezcladas. Se probaron tres condiciones diferentes (A, B, C) en función del modo y tiempo de incubación. En las tres primeras filas se probaron diferentes concentraciones del respectivo azúcar. En la última fila se incluyeron controles positivos (añadiendo S1-GAL(doxo) sin azúcar) y negativos (sin añadir ninguno de los dos). Antes de añadir las nanopartículas y el azúcar, se retiró el medio y se añadió medio nuevo con azúcar o nanopartículas. Los azúcares fueron esterilizados, disueltos en medio DMEM 10 % FBS y agitados hasta su total disolución. Las nanopartículas fueron resuspendidas en medio DMEM 10 % FBS, sonicadas 5min, agitadas durante 30 – 60 min y filtradas antes de ser añadidas a una concentración de 2 mg/mL. La viabilidad se midió a las 24 h.

Se incubó la placa durante 24 h y después se fijaron las células con PFA 4 %. Finalmente se realizó una tinción de cristal violeta siguiendo el método expuesto anteriormente.

Una vez observados los resultados (expuestos en el apartado de resultados y discusión) se decidió volver a probar la condición B con una concentración de azúcar mucho mayor, tanto para el galactán (28,2 mM) como para la lactosa (25 mM).

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los ensayos, se incluyó al menos una réplica de cada condición, y dichos ensayos se repitieron al menos dos veces. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar (s). Se usó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre condiciones, con un nivel de confianza del 95 % LSD ($p < 0,05$). Los datos fueron analizados mediante el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI v.16.1.17 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo tiene como propósito establecer un modelo celular de senescencia válido que permita trabajar con él para diseñar y optimizar nanoterapias enfocadas al diagnóstico y tratamiento de diferentes patologías relacionadas con procesos de senescencia.

Dicho modelo se ha obtenido a partir de la línea celular SK-MEL-103, proporcionada por el Dr. Manuel Serrano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Para el establecimiento del modelo celular se indujo la senescencia añadiendo palbociclib en el medio, un inhibidor selectivo de quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4/6). Para optimizar los ensayos, se comprobó el tiempo óptimo para la inducción de senescencia tras la adición del fármaco.

Las nanopartículas específicas para células senescentes con las que se ha trabajado son un diseño propio de nuestro grupo denominado S1-GAL. El sólido S1-GAL es una nanopartícula mesoporosa de sílice. Al ser un material híbrido consta de una parte inorgánica (la estructura mesoporosa MCM-41) funcionalizada con una puerta molecular orgánica: el hexo-galacto-oligosacárido galactán. Dicha puerta molecular bloquea los poros, manteniendo la carga dentro del material hasta que aparezca un determinado estímulo externo, siendo así la responsable de otorgar a las nanopartículas la especificidad que las caracteriza.

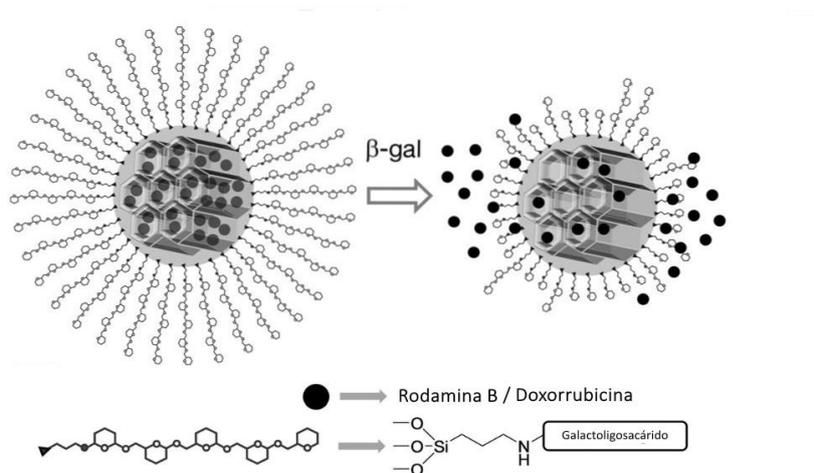


Figura 15. Esquema de MCM-41 funcionalizada con galactán y cargada con una molécula orgánica (rodamina B, doxorrubicina): La acción de la SA- β -gal en células senescentes hidroliza el hexa-galacto-oligosacárido, liberando así selectivamente la carga encapsulada en estas células. Adaptada de HOFFMANN ET AL., 2006.

Este estímulo externo es en nuestro caso la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal, *senescence-associated β -galactosidase*), ya que esta enzima se presenta en niveles muy altos en células senescentes con respecto a las células no senescentes. Esta enzima es la encargada de hidrolizar el galactán, reduciéndolo a monómeros y liberando así la carga que contiene el sólido en el interior de sus poros, como se muestra en la Figura 15. Dicha carga puede ser una molécula que actúe

como marcador, como la rodamina B; o un fármaco citotóxico como la doxorrubicina, que produciría la apoptosis una vez liberado. Ambos tipos de moléculas han sido probados en este trabajo.

La especificidad del sólido S1-GAL hacia células senescentes ya había sido comprobada anteriormente por el grupo (AGOSTINI ET AL., 2012). En este trabajo, los primeros ensayos que se llevarían a cabo se basarían en comprobar dicha especificidad en el modelo concreto de senescencia celular que establecimos con la línea de melanoma SK-MEL-103. Si se probaba el correcto funcionamiento selectivo de las nanopartículas en nuestro modelo celular, con los siguientes ensayos se pretendería estudiar si la especificidad del sólido S1-GAL es debida solamente a la SA- β -gal o si por el contrario se debiera a la presencia de receptores de azúcares específicos para galacto-oligosacáridos en la superficie de las células senescentes. Dichos receptores actuarían mediando en la endocitosis, de tal manera que la nanopartícula llegase al aparato lisosomal. La prueba de concepto iniciada en trabajos anteriores del grupo (Bou, 2015) consistió en bloquear los posibles receptores incubando las células junto con un azúcar que contuviese en su estructura al menos una galactosa, de manera que la presencia del azúcar redujese la internalización de las nanopartículas cargadas con fluoróforo. Basándonos en estos estudios preliminares, en este trabajo se puso a punto el uso de nanopartículas cargadas con el citotóxico doxorrubicina para poder llevar a cabo dichos estudios de bloqueo por competición con el azúcar, basándonos en la viabilidad celular como parámetro de control. Así pues, un bloqueo de los receptores al incubar previamente las células con el azúcar se debería traducir en un incremento de la viabilidad celular, respecto a la correspondiente viabilidad de las células tratadas con las nanopartículas sin una incubación previa con un galacto-azúcar.

4.1 PUESTA A PUNTO DEL MODELO CELULAR DE SENESCENCIA

4.1.1 Optimización de la densidad de sembrado

El objetivo de este ensayo fue obtener una densidad óptima de sembrado que permitiese realizar los diferentes ensayos posteriores. La importancia de la densidad celular radica en que una densidad insuficiente impide el crecimiento de las células, mientras que una densidad excesiva causa la parada del crecimiento celular conocida como inhibición por contacto.

Así pues, el primer paso para establecer el modelo de senescencia con las células SK-MEL-103 fue optimizar la densidad de sembrado en las placas multipocillo que se utilizarían para realizar los diferentes ensayos. Aunque por la experiencia del grupo previa a este trabajo ya se había optimizado la densidad de sembrado en placas de 24 pocillos, aún quedaba establecer la cantidad óptima de células a sembrar en placas de 6 pocillos, en las que se llevarían a cabo los ensayos de tinción de actividad β -galactosidasa para caracterizar el fenotipo senescente de las células tratadas con

palbociclib. Para ello se probó a sembrar diferentes concentraciones de células por pocillo, tanto células control como células senescentes.

Tal y como se puede observar en la Figura 16, a partir de los resultados obtenidos la densidad de sembrado que se consideró óptima para placas de 6 pocillos fue de entre 40.000 - 60.000 células/pocillo para células senescentes y entre 80.000 - 100.000 células/pocillo para las células control. Las células senescentes ((+) palbociclib) aparecen en las imágenes marcadas en azul como resultado de la tinción de actividad β -galactosidasa, ensayo cuyos resultados se comentan en el próximo apartado.

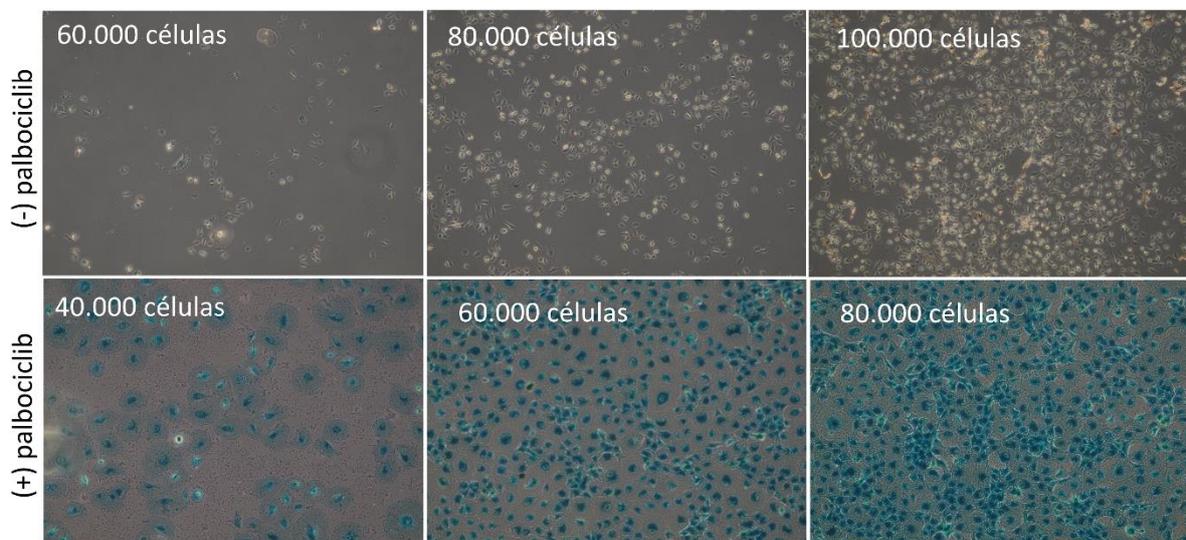


Figura 16. Fotografías representativas del ensayo "optimización de la densidad de sembrado": En la fila superior se muestran células control (no senescentes). En la inferior se muestran células tratadas con palbociclib, con fenotipo senescente inducido. En la esquina superior de cada fotografía se muestra la densidad de sembrado en el pocillo.

En el caso de los ensayos de internalización y viabilidad, se trabajó con placas de 24 pocillos. La densidad de sembrado en estos experimentos fue de 20000 células/pocillo en el caso de las senescentes, y de 30000 células/pocillo en el caso de las células control.

4.1.2 Determinación del tiempo óptimo de tratamiento con palbociclib para la inducción de senescencia

El objetivo de querer determinar el tiempo óptimo de inducción de senescencia con palbociclib era alcanzar un compromiso entre el grado de inducción y el tiempo requerido para obtenerlo. Es decir, buscábamos conseguir el mayor grado de senescencia celular en el menor tiempo posible, de manera que se pudiesen obtener cultivos de células senescentes en un plazo relativamente corto de tiempo.

Como se ha dicho previamente, en este trabajo se utilizó palbociclib para inducir senescencia en las células SK-MEL-103, un fármaco que provoca un arresto celular al inhibir CDK4 y CDK6. Puesto que

4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el grupo ya contaba con experiencia previa con ésta línea celular, se trabajó a una concentración ya establecida de palbociclib 5 μM para inducir el fenotipo senescente. Así pues, con este ensayo se pretendió determinar el tiempo óptimo de tratamiento con palbociclib 5 μM para conseguir obtener un buen grado de senescencia celular en el cultivo.

Siguiendo el esquema de la Tabla 1 y el procedimiento descrito en el apartado 3.1.4, se realizaron varias inducciones simultáneas tratando varias placas de células con palbociclib en día 0, y a diferentes tiempos se fue determinando de manera cualitativa el grado de senescencia logrado en el cultivo. Este grado de senescencia se puede determinar, según la línea celular y el tiempo de tratamiento, observando el fenotipo de las células al microscopio. En el caso de nuestras células, la inducción de senescencia da lugar a un fenotipo muy marcado: las células se vuelven grandes y aplastadas, muy desarrollado con múltiples vesículas, así como también pueden ser multinucleadas en algunos casos. Estos cambios morfológicos se pueden observar en la Figura 17:

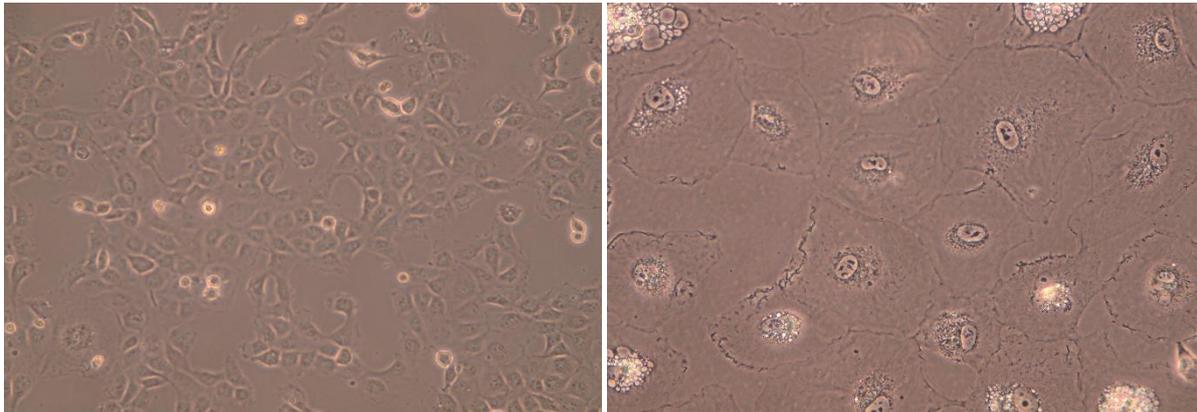


Figura 17. Comparación del fenotipo observable al microscopio entre células senescentes (izquierda) y células no senescentes (derecha).

Sin embargo, dejando de lado la observación de las células, el ensayo más extendido que se lleva a cabo para determinar el grado de senescencia en un cultivo es la tinción de la actividad β -galactosidasa: un ensayo colorimétrico basado en el uso del sustrato X-Gal descrito desde 1995 (DIMRI ET AL., 1995; ITAHANA ET AL., 2013). Este ensayo, como ya se ha comentado en el apartado 3.1.4, aprovecha la actividad aumentada de la enzima β -galactosidasa que se da en células senescentes, siendo conocida como *senescence-associated β -galactosidase activity*.

Como ya se ha dicho, las células senescentes no proliferan al estar paradas irreversiblemente en la fase G1 del ciclo celular; sin embargo, la ausencia de síntesis de ADN no se puede utilizar como marcador de senescencia *in vivo*, ya que hay otras células (como las quiescentes o las terminalmente diferenciadas) que comparten esta característica. Por tanto, es la actividad de la SA- β -gal la que normalmente se utiliza para identificar células senescentes, si bien es necesario confirmar el estado senescente con la detección de otros marcadores (como por ejemplo la ausencia de Ki67). La actividad

β -galactosidasa aumentada responde al incremento de la masa lisosomal de las células senescentes, que permite que la enzima pueda actuar a un pH subóptimo de 6, cuando su pH óptimo es de 4-4,5 (KURZ ET AL., 2000). Como se muestra en la Figura 18, dicha enzima hidroliza el sustrato permeable X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), dando como productos galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol. Este último se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble de color intenso que da lugar a un precipitado fácilmente observable.

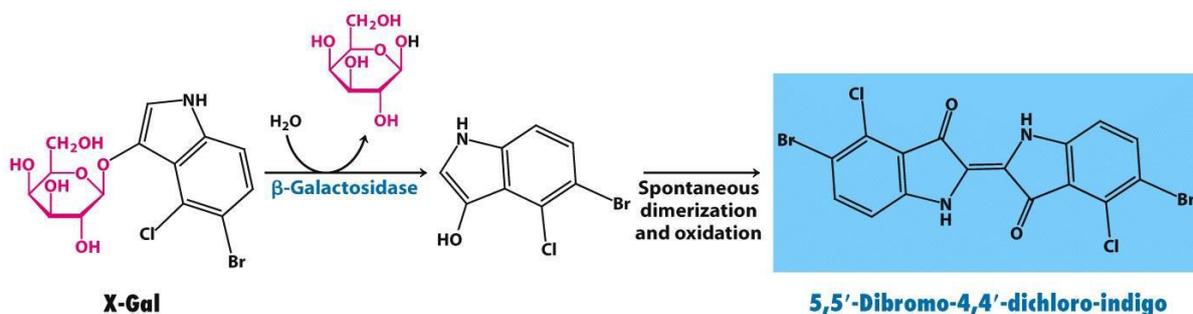


Figura 18. Hidrólisis del X-Gal por la enzima β -galactosidasa y liberación de un compuesto azulado insoluble (BERG ET AL., 2012).

En la Figura 19 se observa que tres días después de añadir el palbociclib la inducción de senescencia es prácticamente nula, y va aumentando al avanzar el tiempo de tratamiento. En el día 7 se observa una tinción de azul intenso, que corresponde con el fenotipo senescente deseado. A partir del día 7, más tiempo de tratamiento con palbociclib no produce un aumento apreciable en el grado de inducción de senescencia (intensidad de la tinción). En el día 30 se aprecia que el grado de tinción no solo no aumenta sino que disminuye, así como empieza a haber muerte celular. Se observó gran cantidad de células apoptóticas en el día 30, con lo que la viabilidad disminuye tras una exposición prolongada al palbociclib, perdiéndose el cultivo senescente.

Asimismo, a día 7 ya se podían observar los cambios fenotípicos que se han descrito al inicio del apartado, como el paso de la morfología redondeada a una morfología plana y con un gran citoplasma. También se aprecia el aumento de la masa lisosomal y células multinucleadas.

A partir de los resultados obtenidos, se concluyó que el tiempo óptimo para la inducción del fenotipo senescente era de 7 días, ya que la tinción de dichas células presenta un color azul intenso, que no es significativamente inferior al de tiempos mayores de tratamiento con palbociclib. Además, este tiempo (una semana de tratamiento) permite disponer de células senescentes listas para los ensayos en un tiempo relativamente corto, que se adapta al ritmo de trabajo del laboratorio.

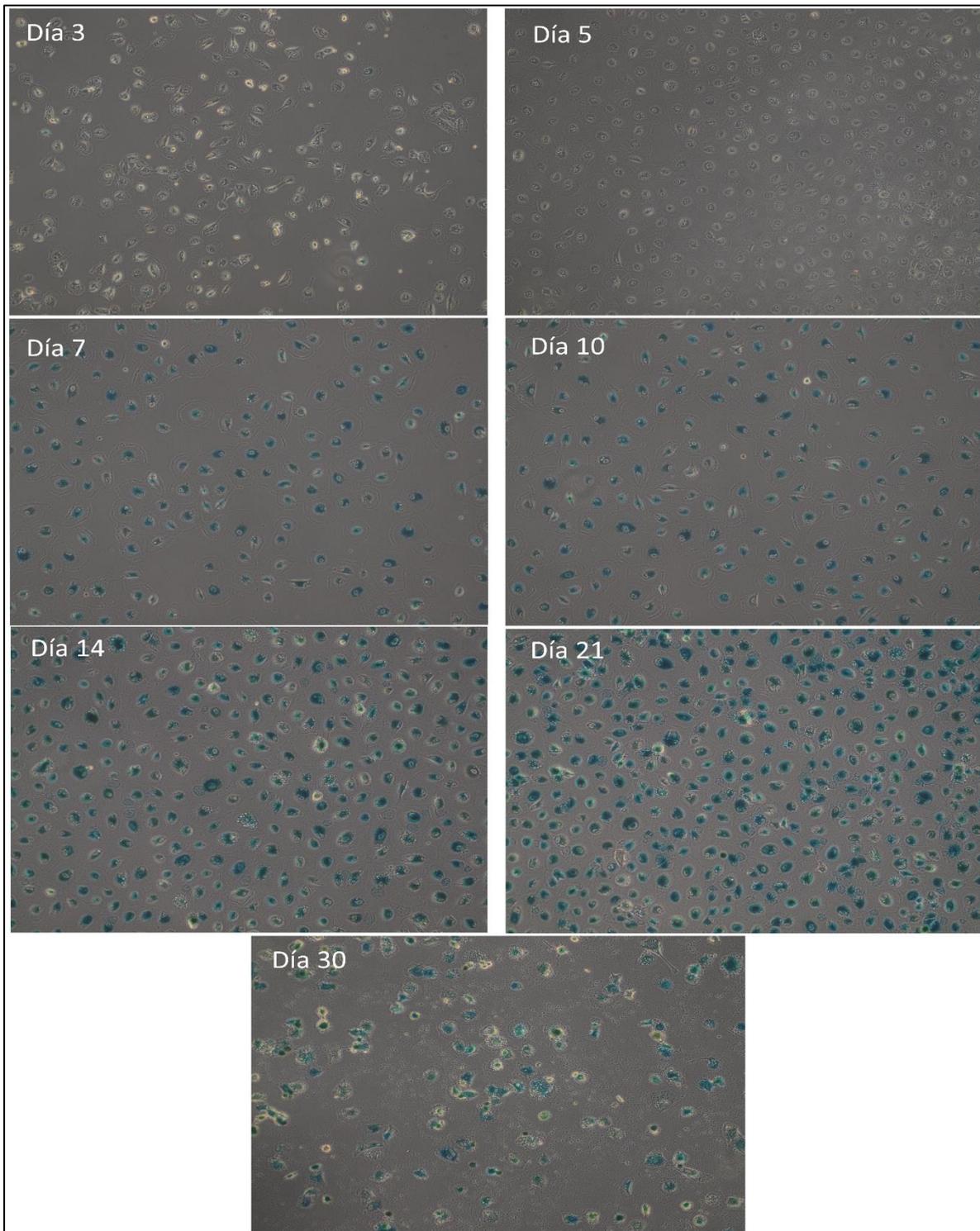


Figura 19. Fotografías representativas de los tiempos observados para la optimización del tiempo de inducción con palbociclib.

4.2 VALORACIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DEL SÓLIDO S1-GAL EN CÉLULAS SENESCENTES Y NO SENESCENTES

Tras conseguir inducir el fenotipo senescente de manera exitosa en la línea celular SK-MEL-103, se evaluó el nivel de internalización y apertura del sólido S1-GAL en células senescentes y células

control (no senescentes). De esta manera, se pretendía confirmar si el nanodispositivo funcionaba de la manera específica esperada y las células SK-MEL-103 con fenotipo senescente inducido por palbociclib respondían de manera correcta a la internalización y liberación selectiva de la carga encapsulada.

Para ello, en estos ensayos se utilizaron sólidos S1-GAL cargados con dos fluoróforos diferentes: rodamina B (sólido S1-GAL(Rhod B)) y verde de indiocianina (sólido S1-GAL(ICG)). En ambos casos, como queda indicado en la Figura 10, se añadieron pocillos sin nanopartículas para evaluar el nivel de autofluorescencia de las células, y se probaron dos concentraciones diferentes de sólidos. También se estudiaron dos maneras diferentes de administración de las nanopartículas: adición de las mismas mediante una alícuota de la suspensión previamente preparada, de manera que la concentración final de sólido en el pocillo fuese la deseada; o adición de las nanopartículas mediante renovación de medio, de manera que el medio del pocillo se sustituyese por un nuevo volumen que incorporase ya la suspensión de sólido a la concentración determinada. Esta doble metodología de adición de las nanopartículas a las células podía ser determinante del resultado observado, ya que es importante conseguir que las nanopartículas lleguen a las células de la forma más homogénea y con menos agregados posible.

Se esperaba que en células control no senescentes la fluorescencia fuese nula o muy baja, debido a la baja tasa de internalización-liberación de nanopartículas que habían demostrado en estudios anteriores (AGOSTINI ET AL., 2012). Por otra parte se esperaba observar una fluorescencia intensa en las células senescentes, localizada sobre todo en el espacio perinuclear, donde se sitúa el aparato lisosomal y por ende, la SA- β -gal. Dicha enzima, hasta donde alcanza el conocimiento actual, es la responsable de la apertura selectiva de los sólidos S1-GAL, al ser solamente en las células senescentes donde se encuentra sobreexpresada.

En la Figura 20 se muestran imágenes representativas de diversas condiciones tomadas al microscopio de fluorescencia. En estas se observa que los resultados obtenidos coinciden con los esperados. Por una parte, las células a las que no se les añadieron nanopartículas no presentan autofluorescencia en las condiciones y parámetros de láser utilizados para la toma de imágenes, con lo que la fluorescencia observada en las células incubadas con nanopartículas es debida al fluoróforo cargado en las mismas. Para ambos fluoróforos, una mayor concentración de sólido cargado implica una mayor intensidad de la fluorescencia, con lo que se puede establecer una relación directamente proporcional entre ambas. Debido a la baja intensidad de fluorescencia que presenta el ICG a las concentraciones estudiadas, sólo se muestran las imágenes correspondientes a la mejor condición de las ensayadas.

4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

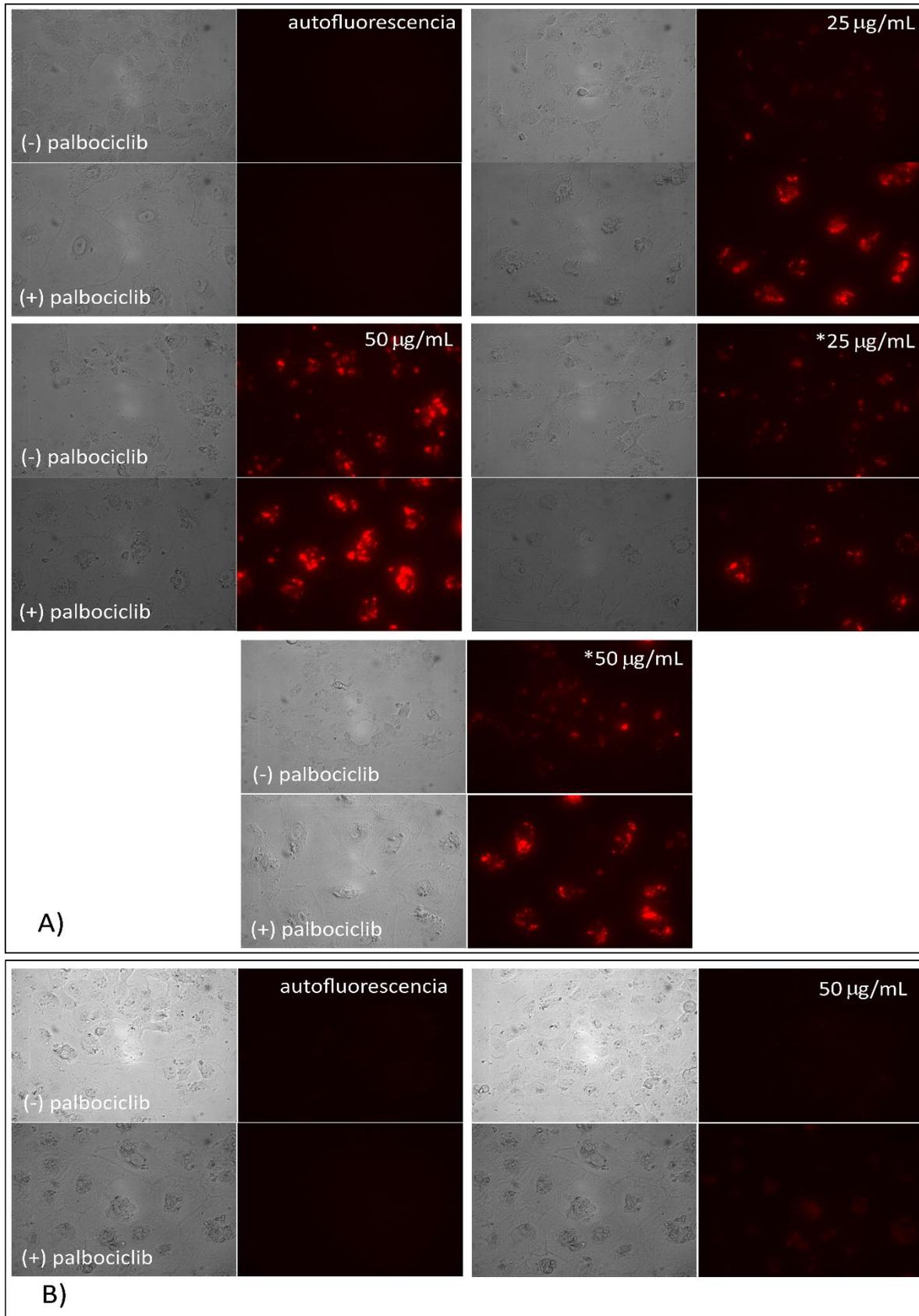


Figura 20. Fotografías representativas del ensayo “valoración de la internalización del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes”: A) Se muestran los resultados del ensayo utilizando S1-GAL(Rhod B). B) Se muestran algunos resultados del ensayo utilizando S1-GAL(IGC). *: se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio nuevo con la concentración de nanopartículas deseadas. La ausencia de asterisco indica que el modo de adición fue mediante la adición de una alícuota al medio que permitiese obtener la concentración final deseada, sin renovar el medio.

Como se puede observar en las imágenes, existe una diferencia en la internalización de las nanopartículas y liberación del fluoróforo entre células senescentes y células controles no senescentes, con lo cual podemos decir que efectivamente el sólido S1-GAL actúa de manera específica y selectiva sobre células senescentes. Los puntos más intensos que se observan en células control corresponden a agregados de nanopartículas que no se han disgregado al sonicar y agitar previamente la suspensión del material, quedándose por lo tanto acumulados en la superficie de las células sin llegar a ser internalizados por las mismas. Tras observar varios campos de los pocillos de cada condición se pudo concluir que, a pesar de observarse estos agregados de nanopartículas no internalizadas tanto en células control como en células senescentes, las muestras de células senescentes aparecían por lo general mucho más “limpias” (ausencia de agregados y nanopartículas en el exterior celular) que las de células control. Esto se puede corresponder con una mayor internalización de las nanopartículas en células senescentes, en las cuales además se vio que la fluorescencia del fluoróforo liberado colocalizaba en su gran mayoría con el espacio perinuclear (donde se acumulan las vesículas y actividad β -galactosidasa – recuérdese los resultados de tinción de dicha actividad enzimática).

Debido a estos resultados, en los subsiguientes ensayos, se decidió sustituir en todos los casos el medio, añadir las nanopartículas renovando el medio, de manera que el medio del pocillo se sustituye por un nuevo volumen de medio que incorporase ya la suspensión de sólido a la concentración deseada.

4.3 ENSAYO DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR SÓLIDO S1-GAL CARGADO CON DOXORRUBICINA

Tras validar el modelo de senescencia y haber confirmado que el sólido S1-GAL cargado con moléculas fluorescentes funcionaba tal y como se esperaba, se procedió a poner a prueba la hipótesis planteada en el trabajo de Regina Bou (Bou, 2015). Dicha hipótesis plantea la posible presencia de un receptor de galacto-ligosacáridos que medie la entrada del nanodispositivo en la célula, es decir, que participe en su endocitosis. Dicho receptor debería poder ser bloqueado con un azúcar que contuviese galactosa en su estructura si se incubaba de manera conjunta con el nanodispositivo. A modo de prueba de concepto, en este trabajo previo se intentó bloquear el supuesto receptor con el disacárido lactosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc), que posee una glucosa y una galactosa en su estructura. Los resultados que se obtuvieron mostraban una bajada en la internalización del sólido cargado con rodamina B que, aunque prometedora, era inconcluyente (Bou, 2015).

Antes de tomar el relevo de esta hipótesis, fue necesario poner a punto un ensayo que permitiese evaluar las diferencias en la internalización de las nanopartículas entre células control y células senescentes. Tras observar los agregados de nanopartículas en el ensayo anterior, que se

4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

basaba en microscopía de fluorescencia para determinar las diferencias en intensidad de señal entre unas células y otras (además de realizar otros ensayos no incluidos en este trabajo), se concluyó que las nanopartículas se agregaban con facilidad, aumentando mucho la señal inespecífica e imposibilitando una cuantificación real y objetiva de los resultados. Esto imposibilitaba poder realizar un ensayo de bloqueo de receptor con azúcar y poder obtener resultados fiables. Es por ello que se decidió cambiar el tipo de ensayo con el que evaluar las diferencias entre células control y senescentes, y aprovechando la disponibilidad de sólido S1-GAL cargado con un citotóxico (doxorubicina) se eligió la viabilidad celular como parámetro de control.

La viabilidad se midió mediante la tinción con cristal violeta a las 48 horas, método expuesto en el punto 3.3. Como se dijo entonces, dicho método relaciona directamente la absorbancia con la viabilidad celular.

Así pues, en el ensayo de viabilidad se dispuso de nanopartículas cargadas con doxorubicina (S1-GAL(doxo)). La doxorubicina es un citotóxico que se intercala en el ADN y se une a enzimas asociadas al ADN, entre otros, activando mecanismos de apoptosis (TACAR ET AL., 2013). Por tanto, las células que internalizasen y liberasen el contenido del sólido S1-GAL(doxo) sufrirían apoptosis, y según nuestra hipótesis, la inhibición del hipotético receptor debería suponer una viabilidad mayor de las células senescentes.

Para esto era necesario comprobar que el sólido S1-GAL cargado con doxorubicina era específico para células senescentes, y que no producía una bajada de viabilidad en células no senescentes. A fin de comprobar dicha especificidad se realizó un ensayo como el que se muestra en la Figura 12, probando diferentes concentraciones del sólido en células control y en células senescentes. En base a los resultados previos obtenidos por microscopía de fluorescencia en los ensayos de internalización con el sólido de rodamina, debido a la mencionada agregación de nanopartículas se decidió filtrarlas antes de incubarlas con las células. Hasta ahora, en los ensayos previos se había trabajado con suspensiones de nanopartículas simplemente sonicadas y dejadas agitar durante 30-60 minutos antes de adicionarlas a las células. Sin embargo, al filtrar se consigue eliminar los agregados más grandes de nanopartículas así como una mayor homogeneidad de la suspensión de sólido con la que se va a tratar el cultivo. El resultado de este ensayo de puesta a punto de viabilidad celular con el sólido S1-GAL en células control y células senescentes aparece reflejado en la Figura 21.

Los resultados de este ensayo se representan como porcentaje respecto a la viabilidad máxima obtenida (correspondiente a la condición células incubadas sin S1-GAL(doxo)), pues los valores absolutos de viabilidad varían según el día del ensayo.

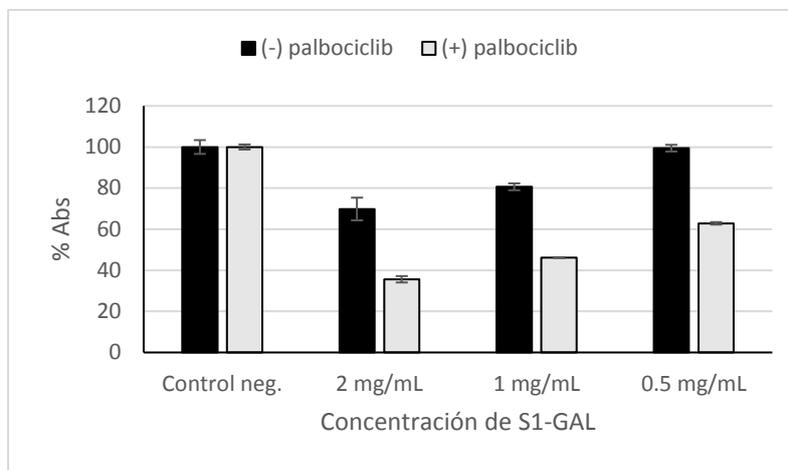


Figura 21. Resultados del ensayo de viabilidad usando S1-GAL cargado con doxorubicina en células control (-) palbociclib y senescentes (+) palbociclib): Los resultados aparecen referenciados respecto a la viabilidad máxima, como media \pm s. Se observa una diferencia significativa entre la viabilidad en células control y senescentes. ($p < 0,05$).

En la Figura 21 se observa que tanto en células senescentes como en células control la viabilidad disminuye con el aumento de la concentración de S1-GAL(doxo). No obstante, esta bajada en la viabilidad es mucho más notoria en células senescentes. El descenso de viabilidad en células control puede ser explicada por una liberación basal no específica de la carga encapsulada en las nanopartículas, al ser posible que la doxorubicina difunda en pequeñas cantidades aunque la puerta molecular permanezca cerrada por ausencia del estímulo específico (AGOSTINI ET AL., 2012). Esta idea queda reforzada por la comparación entre células senescentes y control a la menor concentración de sólido testada (0,5 mg/mL): aquí la viabilidad de las células control se mantiene en el 100 %, mientras que las células senescentes sufren un descenso de viabilidad hasta el 60 %. Por tanto, se puede concluir que el sólido S1-GAL cargado con doxorubicina es internalizado y libera su carga de manera específica en células senescentes.

La otra parte de este ensayo consistió en comprobar, ya únicamente en células senescentes, qué modos de adición de nanopartículas, concentraciones, y tiempos de incubación permitían obtener los resultados más fiables. Para ello se siguió el esquema de la Figura 11. Los resultados de esta parte se muestran en la Figura 22.

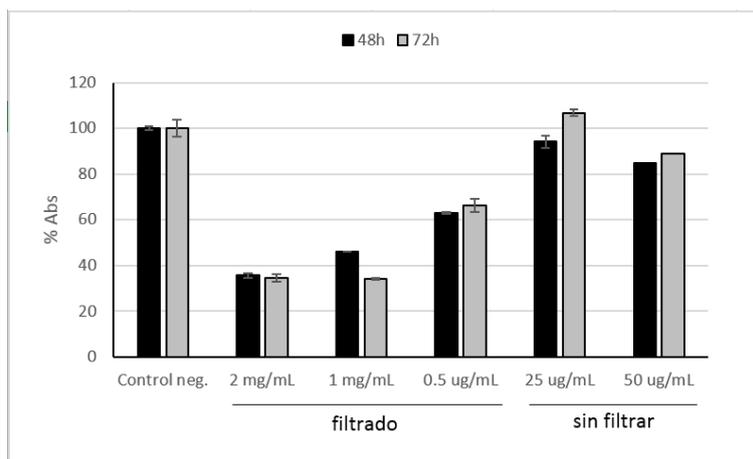


Figura 22. Viabilidad en células senescentes ((+)palbociclib) tras la adición del sólido S1-GAL cargado con doxorubicina en diferentes condiciones: Los resultados aparecen referenciados respecto a la absorbancia máxima, como media \pm s. La diferencia entre la viabilidad añadiendo el sólido filtrado y sin filtrar es significativa ($p < 0,05$). La diferencia entre los dos tiempos de incubación no es significativa ($p > 0,01$).

Como se esperaba, mayores concentraciones de nanopartícula provocan una mayor disminución de la viabilidad de las células senescentes. Asimismo, filtrar las nanopartículas de manera previa a su adición y utilizar concentraciones mayores induce mayor nivel de apoptosis. En cuanto al tiempo, se ha comprobado que un aumento en el tiempo de incubación de las células con las nanopartículas no se traduce en una bajada de viabilidad significativa. Este resultado se corresponde con la revisión de Bareford & Swaan, donde se afirma que la endocitosis es un proceso que ocurre en 5 o 10 minutos (BAREFORD & SWAAN, 2007). Por tanto, aumentar el tiempo de incubación no supone ninguna diferencia en cuanto al resultado final.

Tras analizar los resultados obtenidos, se determinó que la concentración óptima de nanopartículas con la que tratar el cultivo senescente era de 2 mg/mL tras un filtrado previo a su adición, siendo no significativo alargar el ensayo durante tres días y pudiendo por tanto leer los resultados de viabilidad tras 48 horas de incubación.

4.4 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE SÓLIDO S1-GAL(DOXO) EN CÉLULAS SENESCENTES

Una vez determinada la concentración de nanopartículas a utilizar así como las condiciones de tratamiento, y tras observarse que un aumento en el tiempo de incubación no producía cambios en la viabilidad, se procedió a estudiar el efecto inhibitorio de azúcares con galactosa en su estructura sobre los posibles receptores de galacto-oligosacáridos. Para ello se emplearon dos azúcares, lactosa y galactán, y se trabajó únicamente con células senescentes.

La incubación de las células con el azúcar (lactosa o galactán, nunca en combinación) y con las nanopartículas S1-GAL(doxo) se realizó como se muestra en la Figura 13. Se probaron diferentes tiempos de lectura de la viabilidad celular (24 y 48 h), y en uno de los casos (Figura 23C) las nanopartículas no se retiraron en ningún momento hasta la fijación de las células para llevar a cabo la lectura de resultados. Los resultados de dicho ensayo se muestran en la Figura 23.

En la Figura 23 se observa que la incubación con un galacto-azúcar no provoca ningún cambio significativo en la viabilidad de las células senescentes respecto al control positivo (células incubadas solamente con S1-GAL(doxo)). Como era de esperar, sí que se observa que una incubación de 48 h antes de leer los resultados provoca una mayor disminución de la viabilidad, lo cual se puede deber a que la acción citotóxica de la doxorrubicina no es inmediata, pese a que como exponen Tacar et al. (TACAR ET AL., 2013) el fármaco es internalizado de manera casi inmediata por la célula.

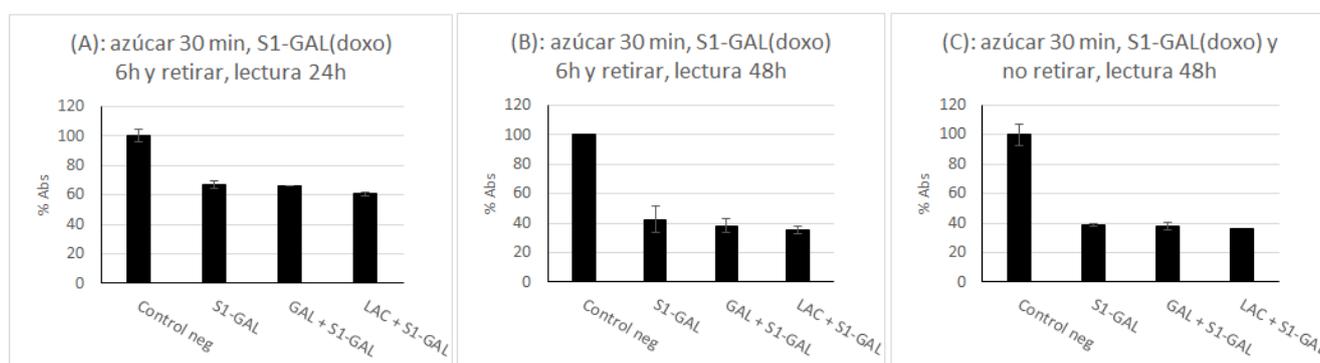


Figura 23. Ensayo de inhibición de la internalización del sólido S1-GAL(doxo) mediante la incubación con galacto-azúcares: Los resultados aparecen referenciados respecto a la absorbancia máxima, como media \pm s. La diferencia entre la viabilidad incubando con y sin azúcares no es significativa ($p > 0,01$).

Por otra parte, se observa que incubar con el sólido S1-GAL(doxo) 6h (Figura 23A-Figura 23B) o 48h (Figura 23C) no produce ninguna diferencia significativa en la viabilidad celular ($p > 0,01$), lo que respalda los resultados anteriores: es decir, que la internalización se produce en los primeros minutos tras la adición de las nanopartículas. Para confirmar esto, en el siguiente ensayo se añadió una condición donde la incubación de las células con el sólido fuese de tan solo 5 minutos.

No obstante, se probaron otras condiciones para corroborar que el galacto-azúcar no tenía ningún efecto sobre la internalización de las nanopartículas y subsiguiente liberación de la carga encapsulada. Para ello, se siguió el esquema de la Figura 14. Por si el efecto inhibitorio del galacto-azúcar fuese transitorio, se decidió incluir una condición donde el sólido y el azúcar se incubasen de manera conjunta durante 30 min.

4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la Figura 24 muestran, por una parte, que aunque la diferencia entre la incubación con el sólido durante 5 min y durante 30 min sea significativa ($p < 0,05$), a simple vista se aprecia que incubar las nanopartículas durante 5 min produce una bajada en la viabilidad muy similar a una incubación a tiempos más largos. De esta manera, queda demostrado que la internalización del sólido ocurre inmediatamente tras su adición, no habiendo un tiempo de latencia observable. Esto refuerza la idea de la existencia de un receptor, presente en muchos tipos de endocitosis (BAREFORD & SWAAN, 2007) mediadas por algún tipo de receptor, como es el caso de la galectina 3 (RABINOVICH & TOSCANO, 2009) o ASGR1 (BAREFORD & SWAAN, 2007), ambos receptores de galacto-azúcares.

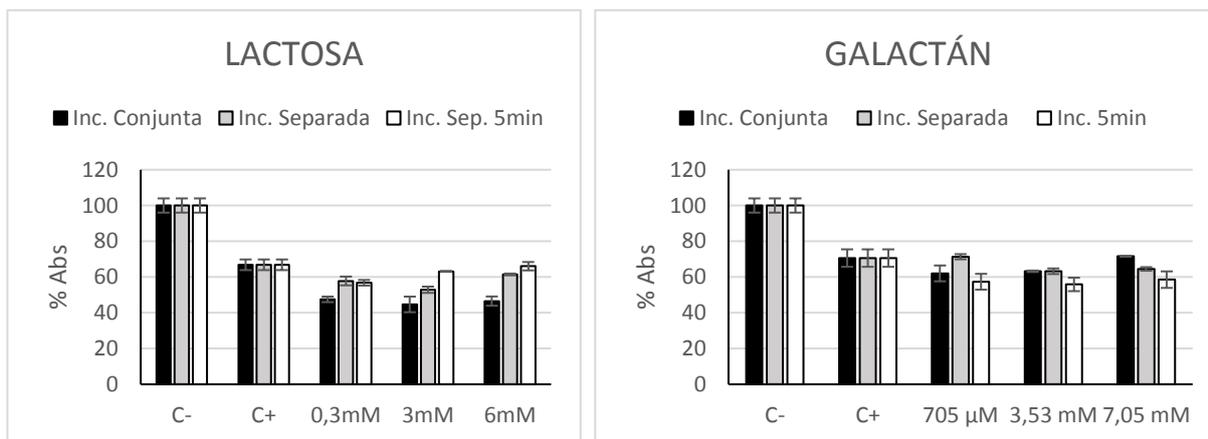


Figura 24. Ensayo de inhibición de la internalización del sólido S1-GAL(doxo) mediante la incubación conjunta con galacto-azúcares: En las tres condiciones se preincubaron las células con el correspondiente galacto-azúcar a la concentración indicada. Tras este paso, las barras negras indican que se realizó una incubación de 1 h de galacto-azúcar y S1-GAL(doxo) conjunta; las barras grises indican que el sólido S1-GAL(doxo) se incubó en ausencia de galacto-azúcar durante 1 h; y las barras blancas indican que el sólido S1-GAL(doxo) se incubó en ausencia de galacto-azúcar durante 5 min. Los resultados aparecen referenciados respecto a la absorbancia máxima, como media \pm s. La diferencia entre la viabilidad incubando nanopartículas con azúcares de manera conjunta y separada es significativa para la lactosa ($p < 0,05$) y no para el galactán ($p > 0,01$). La diferencia entre la viabilidad incubando las nanopartículas separadamente durante 5 y 30 min es significativa para ambos azúcares ($p < 0,05$). C-: Control negativo, sin S1-GAL(doxo); C+: Control positivo, S1-GAL(doxo) sin galacto-azúcares.

En el caso del galactán, las diferencias obtenidas entre la incubación separada y conjunta no fue significativa ($p > 0,01$). En cambio, en la lactosa, la diferencia entre ambas condiciones sí fue significativa ($p < 0,05$), aunque ello supuso una bajada en la viabilidad. Es decir, la presencia de lactosa durante la incubación favorece la internalización del sólido S1-GAL(doxo). La explicación a este fenómeno puede residir en la modulación alostérica que presentan muchos receptores, especialmente aquellos que oligomerizan (CHANGEUX & CHRISTOPOULOS, 2016), como es el caso de las galectinas (Figura 7) que, en general, forman oligómeros, agregándose para formar receptores con múltiples sitios de reconocimiento. Podría ser que la lactosa funcionase como un agonista de estos receptores oligoméricos, facilitando la unión del receptor a las asialoglicoproteínas del glicocáliz senescente y al galactán de las nanopartículas, de este modo, promovería la internalización del sólido, disminuyendo la viabilidad. Siguiendo con esta hipótesis, si fuese cierta, un gran aumento en la concentración del

azúcar debería dejar de tener efecto alostérico y provocar inhibición de la internalización al unirse a los CRD de los receptores, impidiendo que se una el galactán unido al nanodispositivo.

Para ello se ensayaron dos concentraciones muy elevadas de ambos azúcares, con la intención de determinar si se producía un aumento estadísticamente significativo en la viabilidad. Los resultados de dicho ensayo se muestran en la Figura 25.

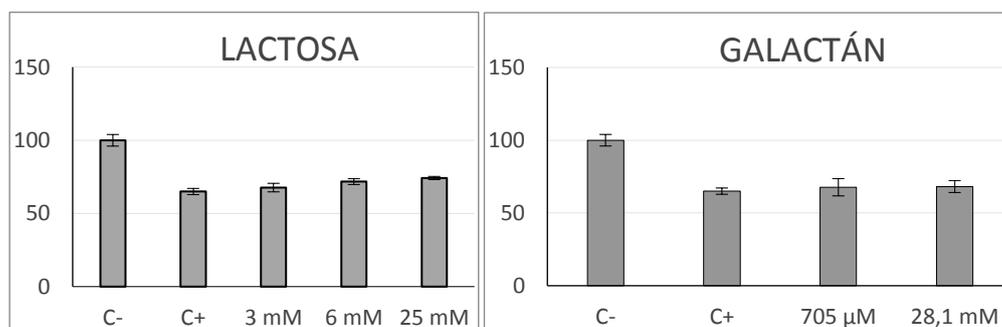


Figura 25. Ensayo de inhibición de la internalización del sólido S1-GAL(doxo) con altas concentraciones de galacto-azúcares: Los resultados aparecen referenciados respecto a la absorbancia máxima, como media \pm s. Las células fueron incubadas con el galacto-azúcar correspondiente a la concentración indicada durante 1 h, después se retiró el medio y se añadió medio nuevo con la suspensión de nanopartículas y el galacto-azúcar, de tal manera que se incubaron conjuntamente durante 1 h, tras lo cual se retiró el medio. A las 24 h se realizó la lectura. La diferencia entre la viabilidad incubando nanopartículas con bajas y altas concentraciones de azúcares no es significativa en ninguno de los dos casos ($p > 0,01$). C-: Control negativo, sin S1-GAL(doxo); C+: Control positivo, S1-GAL(doxo) sin galacto-azúcares.

La diferencia entre las condiciones ensayadas no resulta significativo, lo que sumado a los resultados anteriores, parece indicar que no existe tal receptor específico de galacto-oligosacáridos. Esto indica que quizá la modulación de los niveles de internalización del sólido S1-GAL en células senescentes sea debida a otro factor o a una suma de factores desconocidos. Por otra parte, en los resultados presentados por Regina Bou (Bou, 2015) se utilizaron fibroblastos pulmonares humanos. La diferencia existente entre dichos resultados y los expuestos en este trabajo, bien podrían deberse a diferencias en la expresión de receptores de galacto-oligosacáridos propias de las distintas líneas celulares empleadas.

Por último, para poder confirmar la existencia o no de receptores específicos de galacto-oligosacáridos sobreexpresados en células senescentes se recomendaría utilizar técnicas inmunológicas (como el *Western Blot*) o a diferentes métodos de amplificación de ácidos nucleicos (como la RT-qPCR) que permitan dirimir esta cuestión.

Una vez resuelta la incógnita de la existencia de estos receptores, de estar presentes su implicación en la endocitosis de nanopartículas funcionalizadas con GOS podría ser estudiada, bien mediante el bloqueo inmunológico de estos, bien mediante la incubación con ligandos con una afinidad por el receptor superior a la del galactán. Este conocimiento permitiría modificar y mejorar las propiedades de estos nanodispositivos para adaptarlos mejor al contexto biológico concreto.

5 | CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Mediante los procedimientos descritos y usando el fármaco palbociclib, se ha obtenido un modelo celular de senescencia a partir de la línea celular SK-MEL-103.
2. El sólido S1-GAL, un soporte inorgánico (MCM-41) funcionalizado con galactán y cargado con rodamina B o doxorrubicina, es internalizado y liberado de manera específica en las células senescentes obtenidas a partir de la línea celular SK-MEL-103.
3. No se ha podido demostrar la expresión/sobreexpresión de receptores específicos de galacto-oligosacáridos responsables de la endocitosis del sólido S1-GAL.

Este trabajo pone de manifiesto que pese a su efectividad y especificidad, el mecanismo por el cual el sólido S1-GAL es internalizado sigue siendo una incógnita, pese a que algunas evidencias apunten a los receptores específicos de GOS.

Para poder avanzar en el uso de estos nanodispositivos y conseguir una aplicación biomédica eficaz, determinar cómo son endocitados sería un objetivo clave en una nueva línea de investigación.

6 | BIBLIOGRAFÍA

- AGOSTINI, A., MONDRAGÓN, L., BERNARDOS, A., MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R., DOLORES MARCOS, M., SANCENÓN, F., ... MURGUÍA, J. R. (2012). Targeted cargo delivery in senescent cells using capped mesoporous silica nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(42), 10556–10560. <https://doi.org/10.1002/anie.201204663>
- BAKER, D. J., CHILDS, B. G., DURIK, M., WIJERS, M. E., SIEBEN, C. J., ZHONG, J., ... VAN DEURSEN, J. M. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184–189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- BAKER, D. J., WIJSHAKE, T., TCHKONIA, T., LEBRASSEUR, N. K., CHILDS, B. G., VAN DE SLUIS, B., ... VAN DEURSEN, J. M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232–6. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
- BAREFORD, L. M., & SWAAN, P. W. (2007). Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(8), 748–58. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.008>
- BARONDES, S. H., COOPER, D. N. W., GITT, M. A., & LEFFLER, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.012>
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., & STRYER, L. (2012). *Biochemistry* (7th ed.). New York: W.H. Freeman.
- BESANCENOT, R., CHALIGNÉ, R., TONETTI, C., PASQUIER, F., MARTY, C., LÉCLUSE, Y., ... GIRAUDIER, S. (2010). A senescence-like cell-cycle arrest occurs during megakaryocytic maturation: Implications for physiological and pathological megakaryocytic proliferation. *PLoS Biology*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000476>
- BOU PUERTO, R. (2015). *Diseño racional y caracterización de nanodispositivos de sílice mesoporosa para liberación controlada en células senescentes*. Universitat Politècnica de València. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54380/BOU - Diseño racional y caracterización de nanodispositivos de sílice mesoporosa para liberaciónpdf?sequence=5](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54380/BOU-Diseño_racional_y_caracterización_de_nanodispositivos_de_sílice_mesoporosa_para_liberación_....pdf?sequence=5)
- CAMPISI, J. (1997). Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence. *Journal of the American Geriatrics Society*, 45(4), 482–8. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1997.tb05175.x>
- CAMPISI, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer Part A*. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(96\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(96)00058-5)
- CAMPISI, J., & D'ADDA DI FAGAGNA, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- CHANGEUX, J.-P., & CHRISTOPOULOS, A. (2016). Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. *Cell*, 166(5), 1084–1102. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.015>
- CHUPRIN, A., GAL, H., BIRON-SHENTAL, T., BIRAN, A., AMIEL, A., ROZENBLATT, S., & KRIZHANOVSKY, V. (2013). Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes and Development*, 27(21), 2356–2366. <https://doi.org/10.1101/gad.227512.113>
- CLIMENT TEROL, E. (2012, November 23). *Design of new hybrid materials: Study of its application in new detection formats and in controlled release applications*. Riunet. Editorial Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain). <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/17939>
- COLL, C., BERNARDOS, A., MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R., & SANCENÓN, F. (2013). Gated silica mesoporous supports for controlled release and signaling applications. *Accounts of Chemical Research*, 46(2), 339–349. <https://doi.org/10.1021/ar3001469>
- CUMMINGS, R. D., & LIU, F. (2009). Galectins. In *Essentials of Glycobiology* (pp. 1–12). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301264>
- DAVIS, M. E., CHEN, Z. (GEORGIA), & SHIN, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 771–782. <https://doi.org/10.1038/nrd2614>
- DICKSON, M. A., SCHWARTZ, G. K., KEOHAN, M. L., D'ANGELO, S. P., GOUNDER, M. M., CHI, P., ... TAP, W. D. (2016). Progression-Free Survival Among Patients With Well-Differentiated or Dedifferentiated Liposarcoma Treated With CDK4 Inhibitor Palbociclib. *JAMA Oncology*, 2(7), 937. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0264>
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., ... AL., ET. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7568133>
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., ... PEREIRA-SMITH, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>

6 | BIBLIOGRAFÍA

- EZHEVSKY, S. A., NAGAHARA, H., VOCERO-AKBANI, A. M., GIUS, D. R., WEI, M. C., & DOWDY, S. F. (1997). Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(20), 10699–704. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9380698>
- EZKURDIA, I., JUAN, D., RODRIGUEZ, J. M., FRANKISH, A., DIEKHANS, M., HARROW, J., ... TRESS, M. L. (2014). Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. *Human Molecular Genetics*, *23*(22), 5866–5878. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu309>
- FAGERBERG, L., HALLSTRÖM, B. M., OKSVOLD, P., KAMPF, C., DJUREINOVIC, D., ODEBERG, J., ... UHLÉN, M. (2014). Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(2), 397–406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- FIANDRA, L., COLOMBO, M., MAZZUCHELLI, S., TRUFFI, M., SANTINI, B., ALLEVI, R., ... CORSI, F. (2015). Nanoformulation of antiretroviral drugs enhances their penetration across the blood brain barrier in mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *11*(6), 1387–1397. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.03.009>
- GEORGAKOPOULOU, E., TSIMARATOU, K., EVANGELOU, K., FERNANDEZ, M.-P., ZOUMPOURLIS, V., TROUGAKOS, I., ... GORGOLIS, V. (2012). Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging*, *5*(1), 37–50. <https://doi.org/10.18632/aging.100527>
- GIRET, S., WONG CHI MAN, M., & CARCEL, C. (2015). Mesoporous-Silica-Functionalized Nanoparticles for Drug Delivery. *Chemistry - A European Journal*, *21*(40), 13850–13865. <https://doi.org/10.1002/chem.201500578>
- HARLEY, C. B., FUTCHER, A. B., & GREIDER, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, *345*(6274), 458–460. <https://doi.org/10.1038/345458a0>
- HAYFLICK, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, *37*(3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- HAYFLICK, L., & MOORHEAD, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, *25*(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- HOENICKE, L., & ZENDER, L. (2012). Immune surveillance of senescent cells-biological significance in cancer-and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs124>
- HOFFMANN, F., CORNELIUS, M., MORELL, J., & FRÖBA, M. (2006). Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials. *Angewandte Chemie International Edition*, *45*(20), 3216–3251. <https://doi.org/10.1002/anie.200503075>
- HOFFMEISTER, K. M., & FALET, H. (2016). Platelet clearance by the hepatic Ashwell–Morrell receptor: mechanisms and biological significance. *Thrombosis Research*, *141 Suppl 2*(Suppl 2), S68–72. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(16\)30370-X](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(16)30370-X)
- ITAHANA, K., ITAHANA, Y., & DIMRI, G. P. (2013). Colorimetric detection of senescence-associated ?? galactosidase. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *965*, 143–156. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_8
- ITAKURA, Y., SASAKI, N., KAMI, D., GOJO, S., UMEZAWA, A., & TOYODA, M. (2016). N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell & Bioscience*, *6*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0079-5>
- KOO, O. M., RUBINSTEIN, I., & ONYUKSEL, H. (2005). Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.06.004>
- KRESGE, C. T., LEONOWICZ, M. E., ROTH, W. J., VARTULI, J. C., & BECK, J. S. (1992). Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, *359*(6397), 710–712. <https://doi.org/10.1038/359710a0>
- KRISTOFFERSEN, A. S., ERGA, S. R., HAMRE, B., & FRETTE, ?YVIND. (2014). Testing Fluorescence Lifetime Standards using Two-Photon Excitation and Time-Domain Instrumentation: Rhodamine B, Coumarin 6 and Lucifer Yellow. *Journal of Fluorescence*, *24*(4), 1015–1024. <https://doi.org/10.1007/s10895-014-1368-1>
- KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y., & ERUSALIMSKY, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 3613–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11017877>
- MAS FONT, N. (2010). *Design and synthesis of a new molecular gate system with enzymatic aperture for controlled release of chemical species*. Universitat Politècnica de València. Retrieved from <https://riunet.upv.es/handle/10251/60382?tl=a>
- MEDVEDEVA, N. V., IPATOVA, O. M., IVANOV, I. D., DROZHZHIN, A. I., & ARCHAKOV, A. I. (2006). [Nanobiotechnology and nanomedicine]. *Biomeditsinskaia Khimiia*, *52*(6), 529–546. <https://doi.org/10.1134/S1990750807020023>

- MOGHIMI, S. M., HUNTER, A. C., & MURRAY, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*, *19*(3), 311–330. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2747rev>
- MUÑOZ-ESPÍN, D., CAÑAMERO, M., MARAVER, A., GÓMEZ-LÓPEZ, G., CONTRERAS, J., MURILLO-CUESTA, S., ... SERRANO, M. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell*, *155*(5), 1104–1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>
- MUÑOZ-ESPÍN, D., & SERRANO, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(7), 482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- NARDELLA, C., CLOHESSY, J. G., ALIMONTI, A., & PANDOLFI, P. P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, *11*(7), 503–511. <https://doi.org/10.1038/nrc3057>
- OKAWA, S., YANO, A., UCHIDA, K., MITSUI, Y., YOSHIDA, M., TAKEKOSHI, M., ... YAMADA, Y. (2013). Phantom and mouse experiments of time-domain fluorescence tomography using total light approach. *Biomedical Optics Express*, *4*(4), 635. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.000635>
- PÉREZ-MANCERA, P. A., YOUNG, A. R. J., & NARITA, M. (2014). Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *14*(8), 547–558. <https://doi.org/10.1038/nrc3773>
- RABINOVICH, G. A., & TOSCANO, M. A. (2009). Turning “sweet” on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *9*(5), 338–352. <https://doi.org/10.1038/nri2536>
- SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D., & LOWE, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell*, *88*(5), 593–602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- SLOWING, I. I., VIVERO-ESCOTO, J. L., WU, C.-W., & LIN, V. S.-Y. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *60*(11), 1278–1288. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.012>
- SORENSEN, A. L., RUMJANTSEVA, V., NAYEB-HASHEMI, S., CLAUSEN, H., HARTWIG, J. H., WANDALL, H. H., & HOFFMEISTER, K. M. (2009). Role of sialic acid for platelet life span: exposure of α -galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood*, *114*(8), 1645–1654. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199414>
- STOCKERT, R. J. (1995). The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiological Reviews*, *75*(3). Retrieved from <http://physrev.physiology.org/content/75/3/591.short>
- TACAR, O., SRIMORNSAK, P., & DASS, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*(2), 157–170. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
- VALLET-REGÍ, M., BALAS, F., & ARCOS, D. (2007). Mesoporous materials for drug delivery. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *46*, 7548–7558. <https://doi.org/10.1002/anie.200604488>
- VALLET-REGÍ, M., RÁMILA, A., DEL REAL, R. P., & PÉREZ-PARIENTE, J. (2001). A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chemistry of Materials*, *13*(2), 308–311. <https://doi.org/10.1021/cm0011559>
- VEGA-AVILA, E., & PUGSLEY, M. K. (2011). An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, *54*(January), 10–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22423572>
- WAGNER, V., DULLAART, A., BOCK, A.-K., & ZWECK, A. (2006). The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology*, *24*(10), 1211–1217. <https://doi.org/10.1038/nbt1006-1211>
- WEIS, W. I., & DRICKAMER, K. (1996). Structural Basis of Lectin–Carbohydrate Recognition. *Annual Review of Biochemistry*, *65*(1), 441–473. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002301>
- YANG, P., GAI, S., & LIN, J. (2012). Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Chemical Society Reviews*, *41*(9), 3679. <https://doi.org/10.1039/c2cs15308d>
- ZHU, Y., TCHKONIA, T., PIRTSKHALAVA, T., GOWER, A. C., DING, H., GIORGADZE, N., ... KIRKLAND, J. L. (2015). The Achilles’ heel of senescent cells: From transcriptome to senolytic drugs. *Ageing Cell*. <https://doi.org/10.1111/acer.12344>