

Resumen

La presente tesis doctoral titulada “**Nuevas sondas, portadores y pro-fármacos dirigidos a células senescentes *in vivo***” se centra en el diseño, preparación, caracterización y evaluación de sondas basadas en fluoróforos funcionalizados o en nanopartículas, así como en el desarrollo de profármacos, aplicadas al campo de la senescencia celular.

En el primer capítulo se introducen, a nivel general, los diferentes conceptos relacionados con el reconocimiento molecular y la detección de biomarcadores. Seguidamente se introducen conceptos básicos de senescencia celular y envejecimiento, así como el papel que juegan las células senescentes a nivel fisiológico, en enfermedades asociadas al envejecimiento celular y en el cáncer. Por último, se aborda también la creciente necesidad de desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico y terapias centradas en la detección y tratamiento de dichas enfermedades.

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

En el tercer capítulo se describe una nueva sonda molecular para la detección de senescencia *in vivo*. En concreto, se describe el diseño de una sonda de dos fotones basada en un fluoróforo de naftalimida conectada, mediante un éster metílico de L-histidina, con una galactosa acetilada que esta unida a uno de los átomos de nitrógeno aromático de la L-histidina a través de un enlace *N*-glicosídico hidrolizable (**AHGa**). La sonda inicial presenta una baja emisión pero en células senescentes se transforma en un fluoróforo con alto rendimiento cuántico que permite visualizar estas células debido a la hidrólisis del enlace *N*-glicosídico por la enzima β -galactosidasa sobreexpresada en este tipo de células. La sonda es capaz de detectar *in vitro* células de melanoma humano SK-Mel-103 tratadas con quimioterapia inductora de senescencia frente a células control. Adicionalmente, se validó la detección *in vivo* de senescencia en ratones con xenoinjertos tumorales tratados con quimioterapia inductora de senescencia.

Basándonos en los resultados obtenidos en el capítulo tres, en el capítulo cuatro se describe un sistema similar cuyas características confieren al fluoróforo una mayor longitud de onda de excitación (**HeckGal**). La nueva sonda es capaz de detectar células senescentes debido a la sobreexpresión de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia en gran variedad de líneas celulares con diversos métodos de inducción de senescencia. Esta sonda se validó también *in vivo* en un modelo ortotópico de cáncer de mama de ratón tratado con quimioterapia inductora de senescencia, y en un modelo de ratón de fibrosis renal.

Seguidamente, el capítulo cinco, se centra en un nuevo concepto de sondas moleculares no invasivas, que proporcionan una señal fácilmente legible a través de simples medidas de fluorescencia de la orina. Esta idea se llevó a cabo mediante la funcionalización de una sonda con grupos que le confieren características diuréticas (rápida eliminación renal) y el concepto se aplicó al diseño de una sonda para a la detección en orina de la carga senescente en diversos modelos. La sonda (**Cy7Gal**) está basada en la cianina-7 que es hidrolizada por la enzima β -galactosidasa en un fluoróforo altamente emisivo **Cy7**. **Cy7Gal** y **Cy7** contienen restos de ácido sulfónico que aumentan su solubilidad en agua y desencadenan su rápida excreción por el sistema urinario. El grado de senescencia se cuantificó por medición directa de fluorescencia en orina en tres modelos de senescencia en ratones: (i) un modelo ortotópico de cáncer de mama en ratones BALB/cByJ con senescencia inducida por quimioterapia; (ii) ratones BALB / cByJ envejecidos de forma natural; y (iii) ratones con senescencia acelerada (SAMP8, del inglés *Senescence Accelerated Mouse-Prone 8*). Además, las imágenes IVIS *ex vivo* permiten la evaluación de senescencia en diversos órganos. La sonda **Cy7Gal** es el primer ejemplo para la detección y cuantificación no invasiva en orina de la presencia *in vivo* de células senescentes y puede servir como base en el desarrollo de nuevas sondas moleculares para el diagnóstico rápido en orina de diferentes enfermedades, así como para el seguimiento de tratamientos terapéuticos.

Por último, en lo que a detección de senescencia celular se refiere, se presenta en el capítulo seis la detección óptica *in vivo* de senescencia celular mediante el uso de nanopartículas de sílice mesoporosas (**S3**) cargadas con el fluoróforo Nile Blue (**NB**) y funcionalizadas en su superficie externa con un galactohexasacárido. El **NB** está aprobado por la FDA para su uso en humanos y presenta emisión en el infrarrojo cercano (NIR). La emisión a 672 nm de **NB** se encuentra prácticamente desactivada dentro de los poros de las nanopartículas **S3**, debido a la planaridad de la molécula y su capacidad para dar interacciones de apilamiento- π . Las nanopartículas **S3** están funcionalizadas con un galactohexasacárido que les confiere una selectividad específica hacia células senescentes. En presencia de estas células y de β -galactosidasa, el galactosacárido es hidrolizado, produciéndose la liberación de **NB** que vuelve a emitir fluorescencia. La eficacia de la sonda para detectar ópticamente senescencia celular se validó *in vivo* en células senescentes SK-Mel-103 y 4T1, y en ratones BALB/cByJ con tumores ortotópicos de cáncer de mama tratados con quimioterapia *in vivo*.

Una vez alcanzados los objetivos planificados en lo referente al diagnóstico, en el capítulo siete se abordó la mejora de uno de los senolíticos más potentes y ampliamente conocido en el campo de la senescencia celular que existe a día de hoy en el mercado: el Navitoclax, también conocido como ABT-263. Muchas potenciales terapias senolíticas a humanos se ven

obstaculizadas por la especificidad subóptima de los fármacos senolíticos para las células senescentes y las altas toxicidades que reducen sus ventanas terapéuticas. El senolítico Navitoclax es un inhibidor selectivo de las proteínas antiapoptóticas BCL-2, BCL-XL y BCL-W, y su principal efecto secundario en humanos es que induce la muerte apoptótica de las plaquetas (trombocitopenia) al depender éstas de BCL-XL para su supervivencia. El efecto senolítico de este compuesto proviene de la sobreexpresión de proteínas de la familia BCL-2 en células senescentes. Teniendo en cuenta lo anterior, se diseñó y preparó un pro-fármaco a través de la funcionalización de Navitoclax con un residuo galactosídico (**Nav-gal**), con el fin de que éste no fuese capaz de inhibir las proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2 cuando está unido al azúcar, evitando así la muerte de células no senescentes. Al entrar en el lisosoma de células senescentes, el enlace glicosídico se hidroliza por acción de la enzima β -galactosidasa (SA β Gal), obteniendo Navitoclax libre que mata a la célula. La pro-droga **Nav-gal** se validó en células senescentes de cáncer de pulmón humanas (A549) y de ratón (L1475 (luc)); líneas celulares de cáncer de melanoma humano (SK-Mel-103) y glándula mamaria de ratón (4T1); células de carcinoma colorrectal (HCT116); fibroblastos de pulmón de ratón (células MLg) y fibroblastos de pulmón humano (ER: células Mek IMR90) observando un IC₅₀ similar a el Navitoclax en células senescentes pero protegiendo a las células no senescentes. Además los estudios *in vivo* tras el tratamiento con un inductor quimioterapéutico de senescencia y **Nav-gal** produjeron la reducción de células senescentes en un modelo ortotópico de cáncer de pulmón y la disminución del tamaño tumoral en ratones xenoinjertados con células de cáncer de pulmón humanas. Además se reduce significativamente la trombocitopenia a las dosis de tratamiento, consiguiéndose así una mejora en el perfil terapéutico del fármaco.

Por último, en el capítulo ocho, se presentan las conclusiones principales extraídas de los estudios con los diferentes sistemas desarrollados así como las conclusiones generales extraídas de esta tesis doctoral. El desarrollo de sondas, nanomateriales y profármacos para detectar y eliminar selectivamente células senescentes *in vivo* se presenta como una nueva estrategia con gran potencial en el campo de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Se espera que los resultados obtenidos en esta tesis puedan servir como base para el desarrollo de nuevas sondas moleculares y senolíticos para el diagnóstico y tratamiento temprano de diferentes enfermedades, así como para el seguimiento en pacientes de tratamientos senoterapéuticos.