



Caracterización in vitro de nanopartículas dirigidas a marcadores de Cancer Stem Cells en líneas celulares de cáncer microcítico de pulmón.

Trabajo Final de Máster
2014-2015

Autora: Ana Sarrias Giménez. Universidad de Sevilla, Facultad de Medicina.
Máster en Investigación Médica: clínica y experimental.

Tutora: Carmen Garnacho Montero. Universidad de Sevilla, Facultad de Medicina, Departamento de Citología e Histología normal y patológica.



FACULTAD DE MEDICINA

Carmen Garnacho Montero, Profesora del departamento de Citología e Histología normal y Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

INFORMA

Que la estudiante del Máster Universitario en Investigación Médica: Clínica y Experimental, **Ana Sarrias Giménez**, ha realizado su trabajo fin de Máster titulado **“Caracterización in vitro de nanopartículas dirigidas a marcadores de Cancer Stem Cell en líneas celulares de cáncer microcítico de pulmón”** bajo su supervisión, en el Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica de la Facultad de Medicina.

Durante el desarrollo de este trabajo, ha mostrado en todo momento un gran interés por el proyecto, así como un elevado grado de responsabilidad, competencia y motivación, además de poseer gran capacidad de integración dentro del grupo de investigación. Por todo ello considera que dicha estudiante reúne los requisitos necesarios para realizar una labor de investigación fructífera y continuada.

Firma el presente informe a los efectos oportunos en Sevilla a 20 de noviembre de 2015

Fdo. Carmen Garnacho Montero

Índice

1. Introducción	6
1.1. Cáncer de pulmón.....	6
1.1.1. Tipos de cáncer de pulmón.....	6
1.1.2. Tratamiento.....	7
1.2. Cancer Stem Cells	8
1.2.1. Origen de las CSCs	8
1.2.2. Características de las CSCs	9
1.2.3. Marcadores	10
1.3. Nanomedicina	11
1.3.1. Nanotransportadores	11
1.3.1.1. Tipos de nanotransportadores.....	11
1.3.1.2. Objetivos y funciones de los nanotransportadores	13
1.3.2. Nanotransportadores dirigidos contra CSCs en el cáncer microcítico de pulmón.....	16
2. Hipótesis y objetivos	18
2.1. Hipótesis	18
2.2. Objetivos	18
3. Material y métodos.....	19
3.1. Materiales.....	19
3.1.1. Líneas celulares.....	19
3.1.2. Anticuerpos	19
3.1.3. Otros materiales.....	19

3.2. Metodología	20
3.2.1. Cultivo celular	20
3.2.2. Western Blot	20
3.2.3. Análisis de Inmunofluorescencia.....	22
3.2.4. Preparación de las NPs	23
3.2.5. Modelo experimental.....	23
3.2.6. Unión e internalización de NPs	24
3.2.7. Análisis de datos.....	25
4.Resultados	26
4.1. Cultivo celular.....	26
4.2. Western Blot.....	26
4.3. Expresión de marcadores en la superficie celular.....	28
4.3.1. Expresión de CXCR4.....	28
4.3.2. Expresión de ABCG2.....	29
4.3.3. Expresión de CD44.....	31
4.4. Unión específica de las NPs a las células pulmonares	32
4.5. Internalización de las NP.....	35
5. Discusión	38
6. Conclusiones.....	43
7. Bibliografía.....	44

Abreviaturas

CSC: células madre del cáncer

NP: nanopartícula

SCLC: cáncer microcítico de pulmón

NSCLC: cáncer no microcítico de pulmón

EGFR: factor de crecimiento epidérmico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ESA: antígeno específico epitelial

ALDH1: aldehído deshidrogenasa 1

EPR: efecto de aumento de la permeabilidad y retención

uPAR: *urokinase plasminogen activator receptor*

BCRP: *breast cancer resistant protein*

PBS: tampón salino fosfato

PFA: paraformaldehído

BSA: albúmina de suero bovino

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Resumen

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo. A pesar de las diferentes terapias comúnmente utilizadas para tratar el cáncer de pulmón, el pronóstico de los pacientes sigue siendo pobre. Diversos trabajos han propuesto que muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón, pueden ser promovidos por las células madre del cáncer (CSC, del inglés *Cancer Stem Cell*). Las CSCs son un subconjunto de células indiferenciadas con la capacidad de iniciar la formación de tumores, proliferar y diferenciarse ampliamente. Se piensa que el crecimiento y / o la recurrencia del cáncer puede estar impulsado por este grupo de células. También están involucradas en las resistencias a la radioterapia y la quimioterapia.

Los sistemas de liberación de fármacos a nanoescala están evolucionando rápidamente y pueden ofrecer un enfoque innovador para superar la resistencia de las CSCs a los fármacos así como reducir la frecuencia de recidivas. Recientemente, las estrategias basadas en nanopartículas han demostrado un aumento de la eficacia terapéutica y la reducción de los efectos secundarios adversos, en comparación con los métodos terapéuticos clásicos. Varios estudios han respaldado a la bomba ABCG2, al receptor CXCR4 y al CD44 como posibles marcadores de CSC en el cáncer microcítico de pulmón.

Los objetivos directos de este trabajo son determinar la presencia de estos marcadores en la superficie de las distintas líneas celulares pulmonares, estudiar la capacidad y especificidad de unión de las nanopartículas a las diferentes dianas y caracterizar la internalización de dichas nanopartículas, con el fin de desarrollar un sistema de direccionamiento de fármacos que eliminaría selectivamente las CSCs.

Palabras clave: cáncer microcítico de pulmón, células madre del cáncer, nanopartículas.

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. Although many therapies are commonly used to treat lung cancer, the prognosis remains poor. Several studies have suggested that many types of cancer, including lung cancer, can be promoted by cancer stem cells (CSC). CSCs are a subset of undifferentiated with the ability to initiate the tumor, proliferation and differentiation. It is thought that growth and / or recurrence of cancer may be driven by this group of cells. They are also involved in drug resistance.

The nanoscale drug delivery systems are evolving rapidly and can offer an innovative approach to overcome drug resistance of the CSC and reduce the frequency of recurrences. Recently, nanoparticles based strategies have demonstrated increased therapeutic efficacy and reduced adverse side effects, compared with those of traditional therapeutic methods. Several studies have supported the ABCG2 pump, the CXCR4 receptor and CD44 as potential markers of CSCs in small cell lung cancer.

The objectives of this study are to determine the presence of these markers on the surface of different lung cell lines, and to study binding specificity of nanoparticles to different targets and characterizing their internalization, in order to develop a drug targeting system which selectively eliminate CSCs.

Key words: small cell lung cancer, cancer stem cells, nanoparticles.

1. Introducción

1.1. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Más de 1,4 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer de pulmón en 2004 y alrededor de 1,3 millones de personas mueren de esta enfermedad cada año (1). En 2012 fallecieron 21.118 personas por cáncer de pulmón en España (2). Se sabe desde hace mucho tiempo que entre el consumo de tabaco y el cáncer de pulmón hay una gran relación (3). Se prevé que en el año 2030, de los aproximadamente 10 millones de muertes causadas por el tabaco, una cuarta parte será atribuible al cáncer de pulmón (4, 5). La cirugía, radioterapia, quimioterapia y las terapias dirigidas son comúnmente utilizadas para tratar el cáncer de pulmón, pero sin embargo, el pronóstico de los pacientes sigue siendo pobre. La tasa de supervivencia a 5 años ha cambiado poco en las últimas décadas, con menos de un 9% en los países en desarrollo y un 15% en los Estados Unidos (4, 6).

1.1.1. Tipos de cáncer de pulmón

La mayoría de los carcinomas de pulmón se dividen en cuatro tipos histológicos principales: carcinoma microcítico o de células pequeñas, carcinoma de células escamosas o epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes.

- **Cáncer microcítico de pulmón (SCLC, del inglés *small cell lung cancer*):** su nombre deriva del pequeño tamaño de sus células. Histológicamente presenta escaso citoplasma, núcleos pequeños hiperromáticos con una trama fina de cromatina, nucléolos indiferenciados y disposición laminar difusa. A nivel morfológico y molecular posee propiedades derivadas del tejido neuroendocrino. Aproximadamente del 15% al 20% de los cánceres de pulmón son de este tipo. Se caracterizan por su alta agresividad, crecimiento rápido y mal pronóstico (3, 7). A pesar de la sensibilidad inicial a la quimioterapia y la radioterapia, la supervivencia global a los 5 años en pacientes con

SCLC es inferior al 5%, debido fundamentalmente a la alta tasa de recurrencia (4).

- **Cáncer no microcítico (NSCLC, del inglés *non small cell lung cancer*):** representan el 80% restante de los cánceres de pulmón. Los tipos más frecuentes son:
 - Carcinoma escamoso o epidermoide: es la variedad de cáncer broncopulmonar más frecuente en España, representando el 40% de los carcinomas no microcíticos. Tiene un crecimiento relativamente lento.
 - Adenocarcinoma: representa el 30% de los carcinomas no microcíticos. Es el menos relacionado con el consumo de tabaco, pero aún así es más frecuente en fumadores. En los últimos años, esta variante histológica ha cobrado especial interés al descubrirse que un subgrupo de pacientes tienen una alteración molecular (mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR) que permite que estos pacientes sean tratados con fármacos frente al EGFR como diana terapéutica.
 - Carcinoma de células grandes: se denomina así por el tamaño de las células que lo componen. Es el tipo menos frecuente de los carcinomas broncopulmonares, representando el 10% de ellos.

1.1.2. Tratamiento

Las principales decisiones con respecto al tratamiento se toman en base al tipo y subtipo de cáncer de pulmón que presente el paciente, así como del estadio del cáncer. Estos tratamientos incluyen: cirugía, quimioterapia y radioterapia y terapias dirigidas contra dianas específicas de las células neoplásicas, o terapias combinadas con varias de las opciones anteriores o todas.

En el cáncer microcítico, la mayoría de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico, por lo que la cirugía no es el tratamiento adecuado. Aunque el SCLC generalmente reacciona intensamente

al inicio del tratamiento con quimioterapia y radioterapia, un gran número de pacientes presentan recidivas en el primer año tras el diagnóstico. Debido a ello, es necesario un esfuerzo para desarrollar nuevas estrategias de tratamiento que pudieran disminuir la posibilidad de recurrencia del tumor y prolongar la supervivencia de pacientes con SCLC.

1.2. Cancer Stem Cells

El cáncer es una enfermedad heterogénea, con poblaciones celulares que demuestran una amplia gama de fenotipos diferentes. Se ha propuesto que muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón, pueden ser impulsados por una pequeña subpoblación de células llamadas células madre del cáncer (CSC, del inglés *Cancer Stem Cell*), que podrían ser responsables de la mala evolución del cáncer de pulmón (1, 4, 5, 8, 9). La identificación de estas CSCs en el cáncer de pulmón y la definición de los procesos biológicos necesarios para su existencia es de suma importancia en el desarrollo de nuevos enfoques clínicos con el objetivo de mejorar el tratamiento y prevenir la recurrencia de la enfermedad.

1.2.1. Origen de las CSCs

Las CSCs se describieron por primera vez en la leucemia mieloide aguda (8). Lapidot et al. observaron que solo una pequeña fracción de células con fenotipo $CD34^+ CD38^-$ eran capaces de iniciar el tumor en ratones inmunodeficientes. Posteriormente, se demostró que las CSCs existían en otros tipos de tumores, incluyendo cerebro, mama, colon, próstata, páncreas, pulmón, hígado, melanoma y cáncer de ovario (8, 9). La presencia de las CSCs en el cáncer de pulmón fue descrita por primera vez hace más de 25 años. Las muestras clínicas de pacientes con adenocarcinoma y con SCLC contenían pequeñas poblaciones de células (<1,5%) que fueron capaces de formar colonias en un ensayo de clonación en agar blando (10). Cuando se seleccionaron colonias del agar blando y fueron inyectados por vía intracraneal en ratones inmunodeprimidos, estas células fueron capaces de generar tumores con rasgos característicos de la muestra original de pacientes. Este descubrimiento apoyaba la existencia de una población de CSCs en el cáncer de pulmón (1, 4, 5, 10).

Hay diferentes teorías sobre el origen de las CSCs. Una teoría defiende que las CSCs surgen de las células madre o células progenitoras normales. Éstas podrían obtener la capacidad de generar tumores después de adquirir una determinada mutación genética o por efecto de alguna alteración ambiental nociva (Figura 1). Otra teoría alternativa sobre el origen de las CSCs sugiere que surgen a partir de células somáticas normales que podrían adquirir características propias de célula madre y comportamiento maligno debido a diversas alteraciones genéticas (Figura 1). Independientemente del origen, las consecuencias de ambas vías son: inicio de la tumorigénesis, recurrencia del tumor, resistencia a la terapia, y metástasis (1, 4, 5, 8, 9). El fracaso de los tratamientos actuales contra el cáncer podría deberse, al menos parcialmente, a la incapacidad para eliminar las CSCs, que podrían proliferar y generar de nuevo células tumorales.

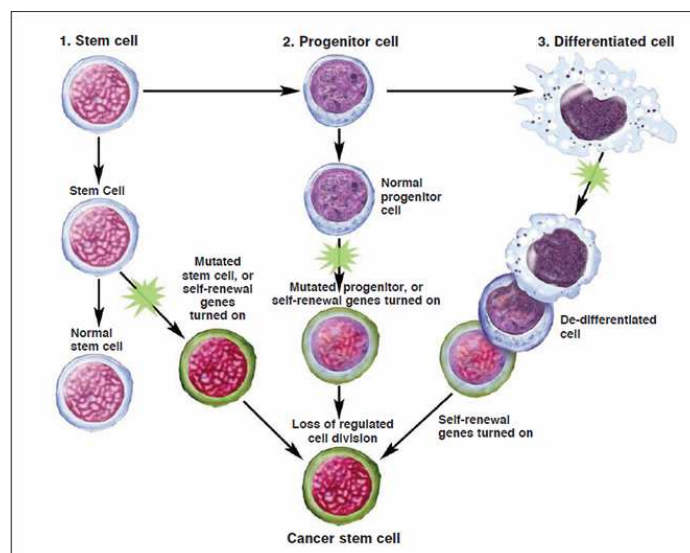


Figura 1: Teorías sobre el origen de las CSCs. Fuente: Are Stem Cells Involved in Cancer?. In *Stem Cell Information*. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2011. Available at http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/pages/2006chapter9.aspx

1.2.2. Características de las CSCs

La teoría de las CSCs divide funcionalmente el cáncer en dos poblaciones distintas: un subconjunto relativamente bien diferenciado con una capacidad proliferativa limitada, que forma la mayor parte del tumor y fenotípicamente caracteriza a la enfermedad; y un segundo subconjunto más pequeño, más indiferenciado, que contiene células madre cancerosas. Se piensa que el

crecimiento y / o la recurrencia del cáncer podría estar impulsado por este grupo de células (9).

Las CSCs poseen capacidad de auto-renovación y diferenciación. Se pueden distinguir de otras células dentro del tumor por la asimetría de su división celular y diversas alteraciones en su expresión génica (3-5, 11). La resistencia a la radioterapia y la quimioterapia es una propiedad adicional de las CSCs que comparten con las células madre normales y que contribuye a su longevidad al permitirles sobrevivir a diferentes tóxicos, incluyendo muchos de los fármacos actualmente utilizados para tratar el cáncer (1, 10-12). Las causas de esta resistencia pueden ser el resultado de varias situaciones, incluyendo los altos niveles de expresión de transportadores ABC, el transporte de adenosina, la resistencia contra la apoptosis, una gran capacidad de reparación del ADN y una tasa lenta de auto-renovación. Diferentes estudios han revelado que las CSCs comúnmente expresan altos niveles de sistemas de eflujo de fármaco, debido a la sobreexpresión de los transportadores ABC. Esto contribuye a la conservación de las CSCs y es la causa más probable de la quimio-resistencia (13, 14). Esta propiedad puede ser utilizada como un marcador para identificar las CSCs (4, 8).

1.2.3. Marcadores

La expresión de marcadores de superficie celular tales como CD44, CD24, CD29, CD90, CD133, antígeno específico epitelial (ESA, del inglés *epithelial-specific antigen*), y aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) se ha utilizado para aislar CSCs de diferentes tumores. Esta expresión de marcadores de superficie es específica de tejido, incluso específica de subtipos de tumor. Por ejemplo, CD44⁺ CD24⁻ y ALDH⁺ caracterizan CSCs de mama; CD133⁺, de colon, cerebro y pulmón; CD34⁺ CD38⁻ para la leucemia; CD44⁺ para la cabeza y el cuello; CD90⁺ para el hígado; y CD44⁺, CD24⁺, ESA⁺ para CSCs de páncreas (1, 5, 9, 15).

Uno de los principales inconvenientes de las terapias actuales es que no hay una eliminación específica de estas células madre cancerosas, debido a la resistencia a múltiples fármacos que presentan. La supervivencia de las CSCs se piensa que está relacionada con la recurrencia del tumor. Por lo tanto, en los

últimos años, la atención se ha centrado en el desarrollo de nuevos agentes y nuevas terapias para el tratamiento del cáncer mediante la eliminación específica de las células madre cancerosas.

1.3. Nanomedicina

La existencia de las CSCs tiene implicaciones importantes en el tratamiento del cáncer, puesto que las CSCs son más resistentes al tratamiento que las demás células, lo que significa que los tratamientos convencionales con quimioterapia y/o radioterapia a menudo no son efectivos. La mayoría de los agentes antitumorales utilizados en la quimioterapia convencional presentan un rápido aclaramiento plasmático, debido a que son moléculas de bajo peso molecular, y corta vida media en sangre, por lo que en muchas ocasiones el efecto no es óptimo. Además, generalmente no presentan especificidad por el tejido o células tumorales, por lo que es necesario el uso de concentraciones elevadas del fármaco, lo que se traduce en un aumento de los efectos secundarios. La nanomedicina ofrece un enfoque innovador para superar estos obstáculos. El potencial de la nanomedicina reside en la capacidad para diseñar diferentes vehículos a escala nanométrica para el transporte de agentes quimioterapéuticos o moléculas activas (16).

1.3.1. Nanotransportadores

1.3.1.1. Tipos de nanotransportadores

Los nanotransportadores (NTs) son los vehículos nanométricos, con una o todas sus dimensiones en la escala inferior a un micrómetro, donde se transportan los fármacos. El desarrollo de NTs depende de varios factores que rigen las interacciones con el cuerpo, incluyendo el tamaño, polaridad, número y la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica. Los NTs empleados en los sistemas de transporte de fármacos tienen generalmente un tamaño de entre 3 y 200 nm y pueden ser de distinto tipo:

- **Liposomas:** NTs de aproximadamente 100 nm de diámetro formados por una bicapa de lípidos. Su depósito acuoso permite la encapsulación de una amplia variedad de agentes hidrófilos, incluidos medicamentos. Por otra parte, la membrana hidrófoba puede encapsular moléculas de

fármacos hidrofóbicos y evitar la fuga de agentes hidrófilos dentro del núcleo (16). Son biocompatibles y fáciles de modificar su estructura (13, 17).

- Micelas poliméricas: nanoestructuras esféricas, que van de 10 a 100 nm, formadas a partir del autoensamblaje de copolímeros anfifílicos en ambientes acuosos. Como resultado de este auto-ensamblaje, se forma una corona hidrófila y un núcleo hidrófobo, lo que permite la solubilización de fármacos lipófilos. Son biocompatibles y biodegradables (13, 17). Diferentes formulaciones micelares están actualmente en proceso de varias fases de los ensayos clínicos (16).
- Dendrímeros: NTs de aproximadamente 10 nm de tamaño, compuestos de múltiples unidades que se ramifican desde un núcleo central. Estos NTs pueden incorporar diferentes agentes terapéuticos, ya sea a través de la conjugación con los grupos terminales funcionales, o la encapsulación dentro de la cavidad central y sus canales. Se puede controlar su despolimerización y se puede modificar para aumentar o mejorar la biocompatibilidad a través de la unión a diferentes ligandos (13). Los dendrímeros están mostrando un inmenso potencial para el tratamiento del cáncer en estudios preclínicos (16, 17).
- Nanopartículas (NPs) poliméricas: son nanoestructuras esféricas solubles en agua, no tóxicas y biodegradables (13).
- Nanopartículas virales: se trata de una gran variedad de virus y bacteriófagos que han sido desarrollados para la administración de fármacos. Permiten modificaciones en su superficie (cápside) y, mediante esta modificación, conseguir su multifuncionalidad y direccionamiento. Presentan compatibilidad biológica y naturaleza inerte. Además del direccionamiento artificial, un subconjunto de virus, como el parvovirus canino, tienen afinidad natural para los receptores de transferrina presentes en una gran variedad de células tumorales (17).
- Nanotubos de carbono: los nanotubos de carbono son cilindros de carbono compuestos por anillos de benceno. Son completamente insolubles en todos los disolventes, generando algunas preocupaciones por problemas de toxicidad. Sin embargo, se pueden modificar y

funcionalizar de manera que se pueden vincular a una amplia variedad de moléculas activas tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, y agentes terapéuticos solubles en agua (17).

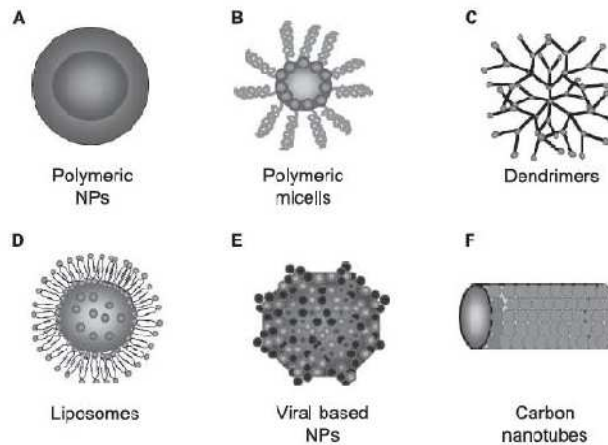


Figura 2: Tipos de NTs (17). A: Nanopartículas poliméricas. B: Micelas. C: Dendrimeros. D: Liposomas. E: Nanopartículas virales. F: Nanotubos de carbono.

1.3.1.2. Objetivos y funciones de los nanotransportadores

Una de las principales ventajas de usar NTs para la administración de fármacos es que prolongan la circulación y mejoran la biodistribución del fármaco incorporado, produciendo una mayor acumulación en los tumores a través de un proceso conocido como efecto de "aumento de la permeabilidad y retención" (EPR, del inglés *Enhanced Permeability and Retention*). Este efecto se basa en el hecho de que la vasculatura patológica, a diferencia de la vasculatura normal, presenta fugas, es decir, es permeable a macromoléculas e incluso a pequeñas partículas, lo que les permite la extravasación y acumulación en el espacio intersticial del tumor (direccionamiento pasivo). Esta acumulación se ve además facilitada por la ausencia casi total de sistema linfático en muchos tumores (13, 16-19).

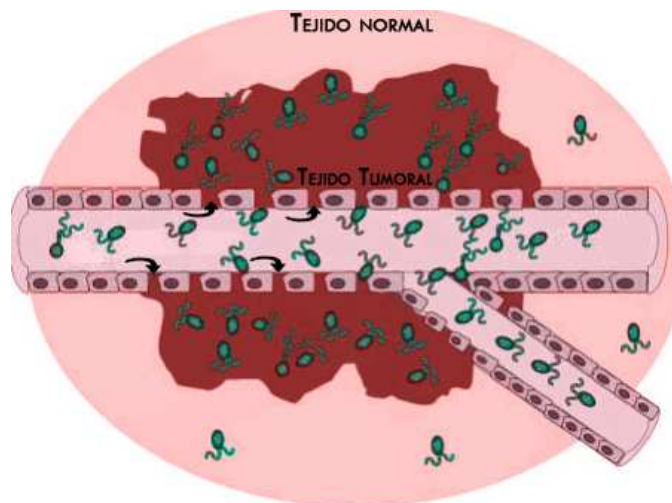


Figura 3: Acumulación de NTs por el efecto de aumento de la permeabilidad y retención en las inmediaciones de un tumor (17). Modificación propia.

Otro contribuidor a la acumulación pasiva es el microambiente que rodea las células tumorales, que es diferente del de las células normales. De rápido crecimiento, las células cancerosas hiperproliferativas muestran una alta tasa metabólica, y el suministro de oxígeno y nutrientes generalmente no es suficiente para su mantenimiento. Por lo tanto, las células tumorales utilizan la glucólisis para obtener energía extra, lo que resulta en un ambiente ácido. Se han diseñado liposomas sensibles al pH que son estables a un pH fisiológico de 7,4, pero se degradan produciéndose la liberación del fármaco cuando el pH es inferior a los valores fisiológicos, como, por ejemplo, en el medio ácido de las células tumorales (17).

Por otra parte, los NTs pueden encapsular agentes quimioterapéuticos, protegiéndolos, consiguiendo así minimizar la degradación e inactivación del agente terapéutico, prevenir los efectos secundarios (mejorando la ratio eficacia/toxicidad) y aumentar la fracción del fármaco que llega al área patológica (16, 17). Recientemente, las estrategias basadas en NTs han demostrado un aumento de la eficacia terapéutica y la reducción de efectos secundarios adversos, en comparación con los de los métodos terapéuticos clásicos (7).

Aunque el efecto EPR aumenta la especificidad de los NTs por el tumor, generalmente no es suficiente por sí solo para desarrollar una terapia óptima basada en este sistema. Para intentar solucionar estas limitaciones, los NTs

pueden dirigirse de forma específica a diferentes marcadores de distintos grupos celulares (direccionamiento activo). La capacidad de los NTs de reconocer específicamente a las células diana puede conseguirse mediante conjugación con ligandos o vectores de direccionamiento que recubren la superficie del NT y reconocen la diana específica en la superficie de la célula (17, 18). En la mayoría de los estudios, el vector de direccionamiento utilizado para aumentar la especificidad de unión del NT a la célula diana es un anticuerpo, aunque también se utilizan ligandos naturales, análogos de los ligandos naturales o péptidos de afinidad.

Otro factor a tener en cuenta es la capacidad de los NTs dirigidos de ser internalizadas por la célula diana, ya que en muchos casos es necesario que el fármaco llegue al interior de la célula para que pueda ejercer su efecto terapéutico. Para ello es necesario utilizar dianas internalizables, normalmente vía endocitosis mediada por receptor (17, 19, 20).

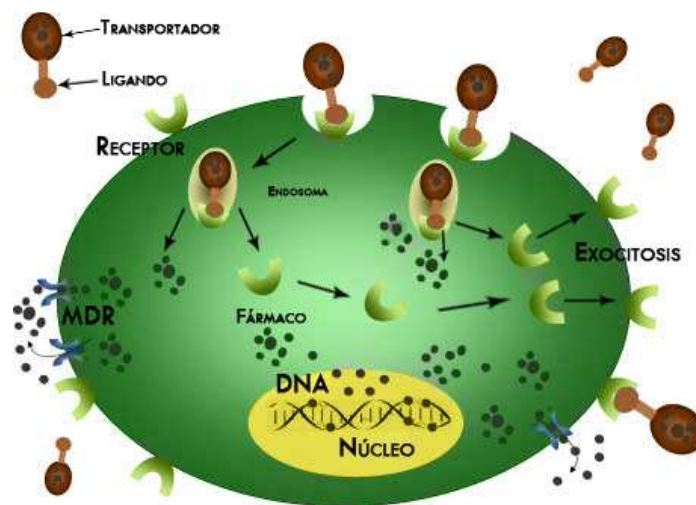


Figura 4: Internalización de NTs por parte de la célula diana (17). La unión del NT al receptor de membrana, desencadena el proceso de internalización de dicho NT. Una vez en el interior celular, el fármaco escapa del compartimento endosomal para poder ejercer su efecto, mientras que el NT será exocitado por la célula. Modificación propia.

Para el desarrollo de sistemas de direccionamiento activo de fármacos que pudieran eliminar específicamente las CSCs, generalmente se utilizan marcadores que se encuentran sobreexpresados en esta subpoblación celular, aunque también pueden estar expresados en menor medida en otros tipos celulares. Esta diferencia entre las CSCs y las restantes células del tumor

puede ser explotada para la entrega selectiva de fármacos dirigidos utilizando NTs.

1.3.2. Nanotransportadores dirigidos contra CSCs en el cáncer microcítico de pulmón

Para desarrollar un sistema de NTs dirigidos contra las CSCs del cáncer microcítico de pulmón es necesario, en primer lugar, identificar marcadores específicos de esta subpoblación celular. En la literatura encontramos numerosos ejemplos de marcadores asociados a CSC de pulmón, entre ellos:

- **CD133 o prominina-1.** Glicoproteína transmembrana considerada como el marcador más frecuente de CSCs, habiéndose detectado en múltiples órganos. En cáncer de pulmón, tanto en SCLC como en NSCLC, se ha detectado en una escasa subpoblación de células indiferenciadas. Se cree que el fenotipo CD133⁺ se relaciona más con la resistencia a quimioterapia que como factor pronóstico aislado del tumor y juega un papel funcional en la regulación del ciclo celular y la proliferación, pero no la iniciación del tumor (21).
- **CD44.** Glicoproteína transmembrana implicada en procesos de adhesión celular, migración e interacción célula-matriz. También actúa como co-receptor del EGFR y de otros receptores de la familia ErbB y activa de forma indirecta la proliferación celular. Se cree que CD44 puede ser un marcador de la iniciación del tumor y que alguna de sus variantes como CD44v6, podría verse implicada en la capacidad de migración e invasión del tumor. En líneas celulares de cáncer de pulmón, las células CD44⁺ presentaron propiedades típicas de CSC (5, 21). La expresión de este marcador es mayor en NSCLC comparado con SCLC (22).
- **CD87.** También denominado uPAR, (receptor de uPA; *Urokinase plasminogen activator receptor*), constituye, junto con su ligando, el principal regulador de degradación de la matriz extracelular, por lo que está involucrado en la invasión tumoral. En cáncer de pulmón, los datos sugieren que las células uPAR⁺ constituyen una subpoblación de CSCs muy importante desde el punto de vista funcional, ya que estas células son resistentes a la quimioterapia (23).

- **CD90.** Es una glicoproteína de superficie que se sobreexpresa en distintas formas de cáncer de pulmón. Además, se ha comprobado que en la variedad microcítica se coexpresa con CD44 en una subpoblación de células que podrían representar las CSCs (24).
- **CXCR4.** También denominado CD184, CXCR4 es un receptor transmembrana, acoplado a proteína G, que reconoce el factor derivado de las células estromales (SDF-1). Este receptor media la migración, activación de integrina y adhesión de las células tumorales del cáncer de pulmón a las células estromales, por lo que está relacionado con la capacidad de metástasis. Se expresa en la mayoría de las muestras de cáncer de pulmón NSCLC, estando asociada su sobreexpresión con peor pronóstico de supervivencia. Se ha evidenciado mejoría con anticuerpos anti-CXCR4 en otros tumores (mieloma múltiple, cáncer de próstata, colon) (25).
- **ABCC1.** Es el gen que codifica para la proteína “*multidrug resistance-associated protein 1*”, un miembro de la superfamilia de transportadores del tipo ABC.
- **ABCG2.** También conocido como la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP, del inglés *Breast Cancer Resistant Protein*) es un transportador de membrana dependiente de ATP, que puede bombear multitud de sustancias, tanto endógenas como exógenas, al exterior de la célula, lo que le convierte en un posible marcador de resistencia al tratamiento con quimioterapia. Se ha encontrado elevado en diversas muestras de NSCLC. Estos hallazgos sugieren que puede servir como una diana idónea para el tratamiento de los carcinomas de pulmón microcíticos (26).

En concreto, en este trabajo hemos estudiado los marcadores CD44, CXCR4 y ABCG2.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

El cáncer microcítico de pulmón es la variante más agresiva y con peor pronóstico y, a pesar de los avances en el tratamiento, la mayoría de los pacientes acaban recidivando. Este mal pronóstico y la gran capacidad de metástasis puede deberse a la existencia de una población de CSCs.

Las nanomedicina nos da la oportunidad de dirigir, específicamente contra estas CSCs, nanotransportadores cargados con fármacos. Estos nanotransportadores protegen al fármaco de su degradación y mejoran su distribución órgano-específica, disminuyendo así la dosis terapéutica necesaria y los posibles efectos secundarios. Enfocar este nuevo tipo de terapia hacia las CSCs podría resultar en un gran avance en el tratamiento del cáncer de pulmón, mejorando su pronóstico y aumentando la tasa de supervivencia.

2.2. Objetivos

Este trabajo pretende caracterizar la unión específica e internalización de nanopartículas dirigidas a diversos marcadores de CSCs en un modelo *in vitro* de células pulmonares, con el objetivo final de determinar si dichos sistemas de direccionamiento podrían ser utilizados como vehículos eficaces de fármacos antitumorales contra dichas CSCs, en el cáncer microcítico de pulmón.

Objetivos parciales:

1. Determinar la presencia de diversos marcadores de CSCs, como son el CXCR4, ABCG2 y CD44, en la superficie de las distintas líneas celulares pulmonares.
2. Estudiar la capacidad y especificidad de la unión de las NPs a las diferentes dianas.
3. Evaluar y cuantificar la internalización de dichas NPs.

3. Material y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Líneas celulares

Para este trabajo hemos utilizado las siguientes líneas celulares:

- H69V: células neoplásicas de carcinoma microcítico de pulmón humano.
- Beas-2B: células epiteliales bronquiales humanas normales.
- HeLa: células neoplásicas de carcinoma cérvico-uterino humano, utilizadas como control positivo.
- NCI-H510A: células neoplásicas de carcinoma microcítico de pulmón humano derivadas de una metástasis adrenal.

3.1.2. Anticuerpos

- Anticuerpos primarios:
 - Anti-CXCR4: anticuerpo policlonal de cabra contra el receptor CXCR4 humano.
 - Anti-ABCG2: anticuerpo monoclonal de ratón contra la bomba ABCG2 humana.
 - Anti-CD44: anticuerpo monoclonal de ratón contra la glicoproteína transmembrana CD44 humana.

3.1.3. Otros materiales

- Placas de cultivo de 8 pocillos para inmunofluorescencia.
- Anticuerpos secundarios.
- Tampón salino fosfato (PBS): solución de lavado para células.
- Medios de cultivo para las células.
- Paraformaldehído (PFA) al 2% diluido en PBS.
- Albúmina de suero bovino (BSA): solución de bloqueo de anticuerpos.
- DAPI (1:10000): marcador fluorescente de núcleos celulares.
- Mowiol: medio de montaje.

- Nanopartículas esféricas de látex fluorescente (FITC) de 100 nm de diámetro.

3.2. Metodología

3.2.1. Cultivo celular

Las líneas celulares fueron mantenidas en frascos de cultivo de 75 cm² (T75) en un incubador húmedo a 37°C y 5% de CO₂, en diferentes medios de cultivo según la línea celular. Las células H69V se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM y penicilina y estreptomycin al 1%. Las HeLa se cultivaron en medio de cultivo DMEM con los mismos suplementos. Por el contrario, las células Beas-2B se cultivaron en medio BEGM completo (Lonza/Clonetics Corporation) sin suero para evitar la diferenciación escamosa. El medio BEGM consiste en una base de medio BEBM con los suplementos y factores de crecimiento: BPE, hidrocortisona, EGF, epinefrina, insulina, triyodotironina, transferrina, ácido retinoico y gentamicina/anfotericina B. Para permitir la adherencia de las células Beas-2B se usaron frascos T75 cuyas superficies de crecimiento se habían recubierto previamente con una solución de seroalbúmina bovina (0,01 mg/ml), fibronectina (0,01 mg/ml) y colágeno I bovino (0,03 mg/ml).

3.2.2. Western Blot

Extracción de proteínas

Se utilizaron proteínas extraídas previamente de las tres líneas celulares estudiadas. La concentración de proteína total se determinó con el kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), siguiéndose las instrucciones del fabricante.

Electroforesis SDS-PAGE

Se prepararon geles de separación al 12%, adecuado para el tamaño de las bandas, que estaba entre 40 y 80 KDa.

Procedimiento:

1. Preparar 30 μ l mezclando la muestra proteica con el tampón de carga. La cantidad de proteínas cargadas fue de 24 μ g por carril.
2. Desnaturalización de las proteínas a 95°C durante 5 minutos.
3. Mantener en hielo para evitar la renaturalización de las proteínas.
4. Cargar las muestras de proteína junto al marcador de peso molecular.
5. Correr el gel, inicialmente a una corriente de 85V aumentando paulatinamente hasta alcanzar los 120V para asegurar que todas las proteínas alcancen el frente del gel de separación.

Transferencia a membrana

Procedimiento:

1. Cortar la membrana de PVDF a tamaño adecuado. Cortar la esquina superior derecha como criterio. Activar la membrana introduciéndola en metanol.
2. Preparar el "sándwich" con:
 - 5 papeles Whatman humedecidos en buffer de transferencia 1X.
 - Membrana humedecida en buffer de transferencia 1X.
 - Gel.
 - 5 papeles Whatman humedecidos en buffer de transferencia 1X.
3. Conectar cada cable a su polo adecuado y fijar el amperaje: 150 mA/gel, 8 w.
4. Comprobar la calidad de la transferencia tras teñir con Rojo Ponceau.

Marcaje con anticuerpos

1. Bloqueo de la membrana con solución de bloqueo: 3% leche en polvo descremada en PBS-T durante una hora en agitación suave a temperatura ambiente.
2. Añadir el anticuerpo primario correspondiente, anti-ABCG2 (1:100), anti-CXCR4 (1:1000) o anti-CD44 (1:1000), en solución de bloqueo (PBS-T al 3% de leche en polvo descremada) e incubar toda la noche a 4°C en agitación. Como control de carga se utilizaron el GAPDH y la vinculina.

3. Lavar la membrana tres veces con PBS-T, durante 10 minutos en agitación.
4. Añadir el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) en solución de bloqueo e incubar durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
5. Lavar tres veces durante 10 minutos con PBS-T. Mantener siempre la membrana en solución de lavado, para que permanezca húmeda.
6. Revelar utilizando el kit de revelado Clarity Western ECL de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. Análisis de Inmunofluorescencia

1. Las líneas celulares fueron sembradas en placas de 8 pocillos al 60-80% de confluencia, y se incubaron durante un día a 37°C.
2. Seguidamente, las células fueron lavadas dos veces con 500 µL de PBS por pocillo.
3. Se fijaron las células con 250 µL de PFA al 2% frío, durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Se lavaron las células tres veces con 500 µL de PBS.
5. Posteriormente se incubaron las células con los anticuerpos primarios contra CXCR4 (1:100), ABCG2 (1:100) o CD44 (1:400) en una solución de bloqueo (PBS + 1% BSA), durante una hora a temperatura ambiente.
6. Se lavaron las células tres veces con 500 µL de PBS.
7. Las células se incubaron entonces con los anticuerpos secundarios conjugado con FITC (1:250) en la solución de bloqueo PBS + 1% BSA, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
8. Las células se lavaron tres veces con 500 µL de PBS.
9. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (1:5000) durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
10. Tras un último lavado con PBS, las preparaciones fueron montadas utilizando Mowiol como medio de montaje.

Las imágenes de fluorescencia se realizaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX50 y una cámara digital Hamamatsu ORCA-03G. Para analizar los niveles de fluorescencia, las imágenes fueron procesadas con el software Image Pro-Plus 7.0.

3.2.4. Preparación de las NPs

En este trabajo se ha utilizado un prototipo de NP esférica de látex fluorescente (FITC) de 100 nm de diámetro (Polysciences, Inc, USA). Estas NPs esféricas son muy homogéneas en tamaño y forma, y fácilmente trazadas mediante microscopia de fluorescencia, por lo que, a pesar de no ser biodegradables, por lo que no podrían utilizarse en humanos, son un modelo muy apropiado para el diseño de sistemas dirigidos. Las NPs se prepararon mediante adsorción del vector de direccionamiento (anticuerpo anti-CXCR4, anti-ABCG2 o anti-CD44) a la superficie de la partícula de látex, siguiendo el protocolo expuesto a continuación:

1. Las NPs se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad en una solución con 7,5 μ L de NPs + 25 μ g de anticuerpo y PBS hasta alcanzar un volumen final de 35 μ L.
2. Se lavaron las NPs con 500 μ L de PBS, centrifugando a 12000 g durante 3 min.
3. Se resuspendió el pellet en 500 μ L de solución de bloqueo (PBS + 1% BSA).
4. La solución se sonicó con 35 pulsos a potencia media, para disgregar los posibles agregados de NPs.

Como controles negativos se utilizaron NPs desnudas, sin anticuerpo, o recubiertas con un anticuerpo inespecífico (control de isotipo).

3.2.5. Modelo experimental

Para diferenciar las NPs internalizadas de las NPs unidas a la superficie celular hemos utilizado un método de doble marcaje fluorescente (19, 27). Este método consiste en incubar las células con las NPs fluorescentes (FITC) conteniendo el vector de direccionamiento a 4°C o a 37°C. La incubación a 4°C permite que una NP pueda unirse a la célula a través del vector de direccionamiento sin ser internalizada por ella, dado que la célula se encuentra en un estado metabólicamente inactivo, por lo que no se produce endocitosis. Por el contrario, con la incubación a 37°C, las células están metabólicamente activas y podrían internalizar las NPs por endocitosis. Seguidamente se fijan las células sin permeabilizar y se realiza una tinción de las NPs empleando un

anticuerpo secundario conjugado con Texas Red que reconoce la fracción constante del vector de direccionamiento (anti-CXCR4, anti-ABCG2 o anti-CD44). La fijación sin permeabilizar las membranas evita que las NPs que están en el interior celular se marquen con el anticuerpo secundario en rojo. Por lo tanto, este método nos permite diferenciar entre NPs internalizadas por la célula (verdes) y NPs adheridas a la superficie de la célula (doble marcaje, amarillas).

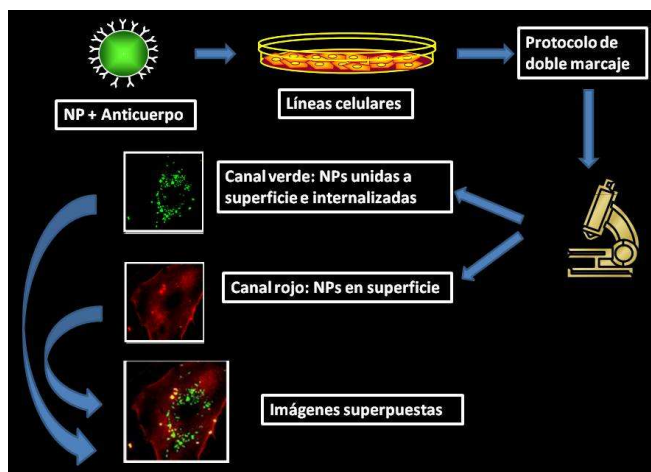


Figura 5: Esquema del método de doble marcaje por inmunofluorescencia y de los resultados obtenidos tras estudiar las muestras al microscopio.

3.2.6. Unión e internalización de NPs

Para evaluar la eficacia de unión y la internalización de las NPs dirigidas a las distintas dianas de las células pulmonares se utilizó el método de doble marcaje, siguiendo el protocolo:

1. Las diferentes líneas celulares se sembraron en placas de inmunofluorescencia y se incubaron a 37°C durante un día.
2. Se lavaron las células dos veces con 500 µL de medio de cultivo frío (4°C, para ensayo de unión) o caliente (37°C, para ensayo de internalización).
3. Se incubaron las células a 4°C (unión) durante 30 minutos, o a 37°C (internalización) durante una 1 hora o 3 horas en 200 µL de medio completo con 1% BSA conteniendo NPs en proporción 1:10.
4. Se lavaron las células tres veces con 500 µL de su respectivo medio de cultivo para eliminar las NPs no unidas a las células.
5. Las células se fijaron con 250 µL de PFA 2% frío durante 10 minutos.

6. Tras tres lavados con PBS, se incubaron las células, a temperatura ambiente y en oscuridad, con el correspondiente anticuerpo secundario fluorescente conjugado con Texas Red (1:250) en solución de bloqueo de PBS 1% BSA durante 30 minutos.
7. Se lavaron las células tres veces con 500 μ L de PBS.
8. Se tiñeron los núcleos con DAPI (1:50000) durante 5 minutos.
9. Las células fueron lavadas con PBS y montadas con Mowiol.

Las imágenes fueron tomadas con el microscopio de fluorescencia y procesadas con el software de análisis de imagen digital Image Pro-plus 7.0.

3.2.7. Análisis de datos

Los parámetros como el porcentaje de internalización, el número de NPs totales, y el número de NPs por célula fueron calculados usando el programa de procesamiento de imágenes Image Pro-Plus 7, con el que se realizó el análisis de las imágenes superpuestas, para determinar el área correspondiente al total de NPs (fluorescencia verde) y a las NPs adheridas a la superficie celular (fluorescencia amarilla procedente de la combinación de los canales verde y rojo). Además se calcularon los parámetros siguientes:

- NPs en la superficie celular: ratio área amarilla/área total verde.
- El porcentaje de internalización: $(1 - \text{ratio de NPs en la superficie celular}) * 100$.
- El número de NPs totales por célula se calculó de siguiente forma: $\text{área total verde} / \text{área de una NP esférica de 100 nm de diámetro}$ ($7,854 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$).
- El número de NPs por célula: $\text{número de NPs totales} / \text{número de células}$ (recuento de núcleos teñidos con el DAPI).

4. Resultados

4.1. Cultivo celular

El cultivo celular se realizó con éxito con las líneas celulares HeLa, H69V y Beas-2B (tras preparación del frasco con la solución de soporte descrita en “Material y métodos”). Las tres líneas fueron utilizadas para los experimentos de inmunofluorescencia y Western Blot, mientras que para el estudio de unión e internalización de NPs dirigidas se utilizaron únicamente las líneas pulmonares, tanto no tumorales (Beas-2B) como tumorales (H69V).

4.2. Western Blot

Con el fin de demostrar la expresión de CXCR4, ABCG2 y CD44 en las líneas celulares pulmonares Beas-2B y H69V, se realizaron los ensayos de Western Blot. La línea celular HeLa fue utilizada como control positivo de la expresión de los diferentes marcadores. Como control de carga se utilizaron el GAPDH y la vinculina.

En la Figura 6A se observa la banda correspondiente a CXCR4 (39 kDa) en las tres líneas celulares estudiadas, además de la banda correspondiente al control de carga, vinculina (124 kDa). La figura 6B representa la densitometría, realizada basándonos en la ratio CXCR4/Vinculina. Se observa un nivel de expresión más elevado en las células HeLa, utilizadas como control positivo, si lo comparamos con los otros dos tipos celulares ($0,74 \pm 0,29$). Las células Beas-2B y las H69V presentaron niveles similares ($0,58 \pm 0,30$ y $0,64 \pm 0,27$ respectivamente), siendo los niveles en las células H69V algo más elevados que en las Beas-2B.

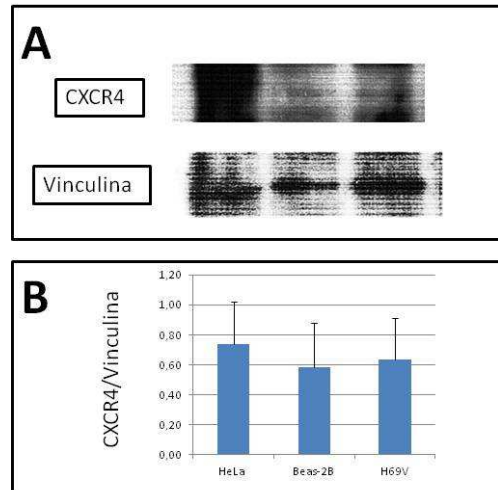


Figura 6: Western Blot de CXCR4. A) Bandas proteicas correspondientes a CXCR4 y al control de carga vinculina en las líneas celulares HeLa, Beas-2B y H69V. B) Densitometría calculada a partir de la ratio CXCR4/vinculina (n=3).

La Figura 7A muestra la banda correspondiente a ABCG2 (72 kDa), junto con la banda correspondiente al control de carga GAPDH. La densitometría realizada (B) muestra un mayor nivel de expresión de ABCG2 en las células HeLa, utilizadas como control positivo ($0,81 \pm 0,72$). El nivel de expresión entre Beas-2B y H69V fue muy similar ($0,34 \pm 0,32$ y $0,28 \pm 0,27$ respectivamente), siendo el nivel de expresión en H69V algo inferior al de las células Beas-2B.

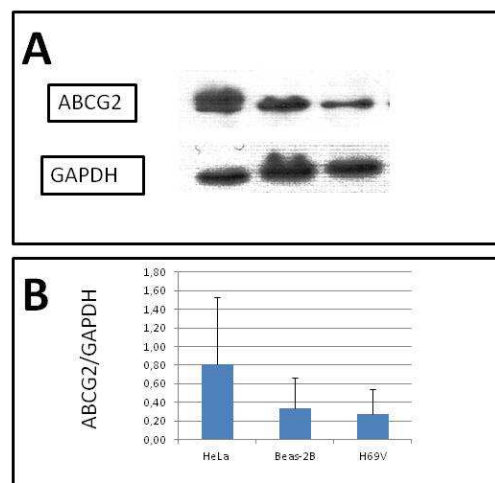


Figura 7: Western Blot de ABCG2. A) Bandas proteicas correspondientes a ABCG2 y al control de carga GAPDH en las líneas celulares HeLa, Beas-2B y H69V. B) Densitometría calculada a partir de la ratio ABCG2/GAPDH (n=3).

En la figura 8A se observa la banda proteica correspondiente a CD44 (80 kDa) junto con el control de carga GAPDH (35.8 kDa). La figura 8B representa

la correspondiente densitometría. Se observa una mayor expresión de CD44 en las células tumorales H69V ($0,79\pm0,39$), seguidas de las células HeLa ($0,43\pm0,13$). Por el contrario, la expresión en las células no tumorales Beas-2B fue inferior, aunque con una amplia variabilidad ($0,31\pm0,47$).

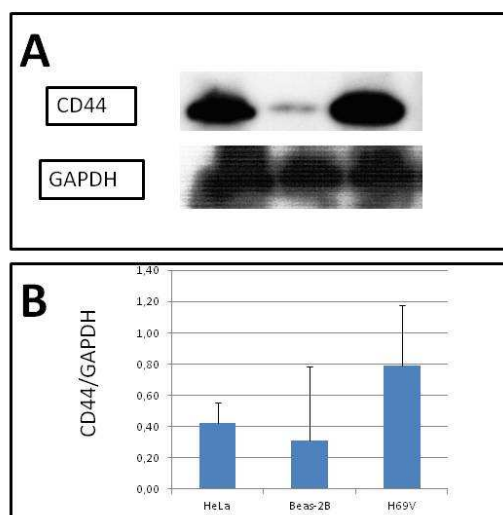


Figura 8: Western Blot de CD44. A) Bandas proteicas correspondientes a CD44 y al control de carga GAPDH, y densitometría calculada a partir de la ratio CD44/GAPDH (n=3).

4.3. Expresión de marcadores en la superficie celular

Para analizar la expresión de CXCR4, ABCG2 y CD44 en la superficie de las distintas líneas celulares, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en células no permeabilizadas.

4.3.1. Expresión de CXCR4

Como control positivo para este marcador se utilizó la línea celular HeLa. La figura 9 muestra la expresión de dicho marcador (A). La figura 9 también muestra el control negativo (B), donde se utilizó únicamente el anticuerpo secundario conjugado con FITC, en ausencia de anticuerpo primario. En dicho control negativo no se observó una fluorescencia relevante, lo que indica que no existen uniones inespecíficas del anticuerpo secundario a las células.

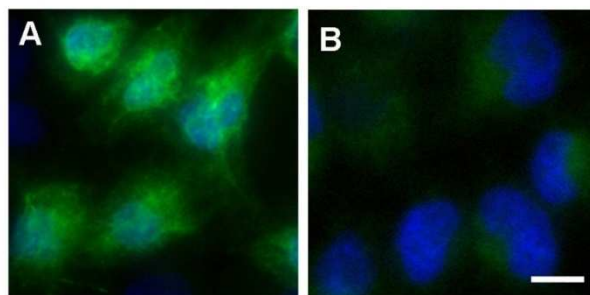


Figura 9: Marcaje de CXCR4 en las células HeLa. Después de incubar las células con el anticuerpo anti-CXCR4, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con FITC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.

En la figura 10 se muestra la expresión de CXCR4 en las células Beas-2B y H69V. Podemos observar una pequeña diferencia en la densidad del marcaje entre ambas líneas. Aunque no se trata de un método cuantitativo, las imágenes muestran una densidad mayor de CXCR4 en las células H69V (figura 10B) que en las células Beas-2B (figura 10A). Como se observa, no se aprecia fluorescencia en ninguno de los controles negativos (C y D), por lo que no existen uniones inespecíficas.

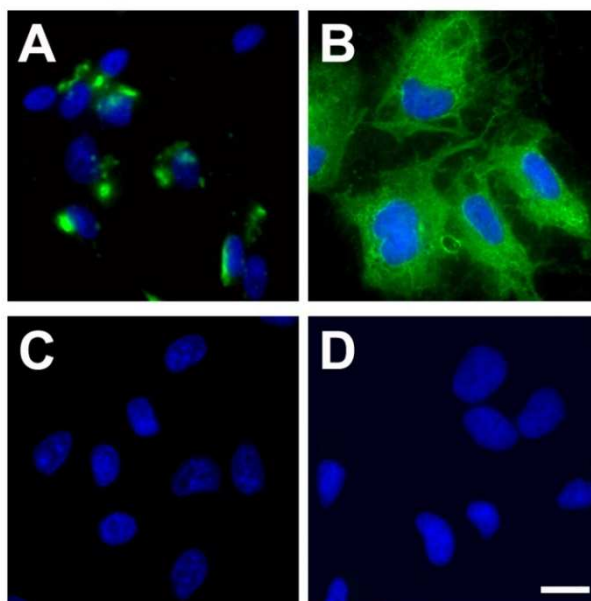


Figura 10: Imágenes representativas del marcaje en superficie de CXCR4 en células Beas-2B y H69V. Las células Beas-2B (A y C) y H69V (B y D) se incubaron con el anticuerpo anti-CXCR4 (A y B). Posteriormente, todas las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario, marcado con Cy2. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.

4.3.2. Expresión de ABCG2

Como control positivo frente al anticuerpo ABCG2 utilizamos la línea celular HeLa. Como se observa en la figura 11, esta línea celular expresó dicho

marcador (A). También se muestra el control negativo (B), donde se utilizó el anticuerpo secundario conjugado con FITC en ausencia de anticuerpo primario. Como se puede comprobar, no se observa fluorescencia, lo que indica que no existen uniones inespecíficas.

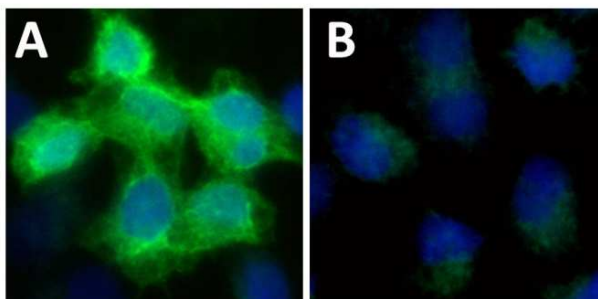


Figura 11: Marcaje de ABCG2 en las células HeLa. Después de incubar las células con el anticuerpo anti-ABCG2, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con FITC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.

En la figura 12 se muestra la expresión de ABCG2 en las células Beas-2B y H69V. Ambas líneas celulares expresaron dicho receptor, pero con diferencias en la densidad entre ambas líneas. A pesar de no tratarse de un método cuantitativo, las imágenes muestran una densidad mayor en las células H69V (B) que en las células Beas-2B (A). Asimismo, en la figura 12 también se observan los controles negativos, donde no se aprecia fluorescencia, por lo que no existen uniones inespecíficas del anticuerpo secundario a las células.

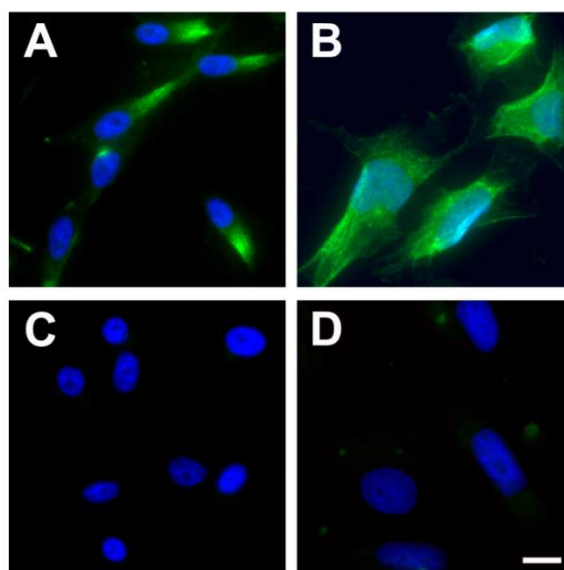


Figura 12: Imágenes representativas del marcaje en superficie de ABCG2 en células Beas-2B y H69V. Las células Beas-2B (A y C) y H69V (B y D) fueron incubadas con el anticuerpo anti-ABCG2 (A y B). Posteriormente, todas las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario, marcado con FITC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.

4.3.3. Expresión de CD44

Como control positivo para este marcador se utilizó la línea celular HeLa. En la figura 13 se puede ver la expresión en superficie de dicho marcador (A). En la figura también se puede observar el control negativo (B), donde se utilizó únicamente el anticuerpo secundario conjugado con FITC, en ausencia de anticuerpo primario. En el control negativo no se observó ningún tipo de fluorescencia, por lo que se puede deducir que no existen uniones inespecíficas entre el anticuerpo secundario y las células.

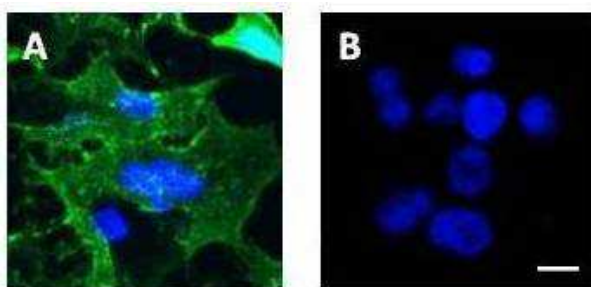


Figura 13: Marcaje de CD44 en las células HeLa. Después de incubar las células con el anticuerpo anti-CD44, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con FITC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.

En la figura 14 se muestra la expresión de CD44 en las células Beas-2B. Se puede observar que solo algunas células presentaban marcaje en su superficie, mientras otras no lo presentaban (A). También podemos observar su control negativo (B), donde, como antes, solo se utilizó el anticuerpo secundario conjugado con FITC en ausencia de anticuerpo primario.

Por el contrario, todas las células H69V presentaron un marcaje positivo (14C). Como en los casos anteriores, podemos ver que en el control negativo (14D), con el anticuerpo secundario conjugado con FITC en ausencia de anticuerpo primario, no se aprecia fluorescencia.

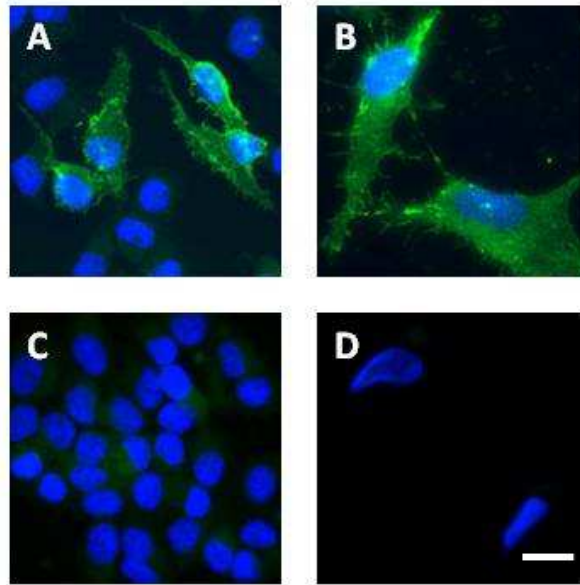


Figura 14: Marcaje de CD44 en las células pulmonares. Las células Beas-2B (A y B) y H69V (C y D) se fijaron con PFA al 2%, sin permeabilizar las membranas celulares. Después de ser incubadas con el anticuerpo anti-CD44 (A y C), todas las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario, marcado con FITC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.

4.4. Unión específica de las NPs a las células pulmonares

Para comprobar la capacidad de unión específica de las NPs, las células se incubaron a 4°C con una preparación conteniendo las NPs con y sin vector de direccionamiento (anti-CXCR4, anti-ABCG2, anti-CD44 o anti- IgG inespecífico) (Figuras 15 y 16). La incubación a 4°C permite la unión específica de las NPs dirigidas, pero la célula está metabólicamente inactiva, por lo que en ningún caso se produce la endocitosis de dichas NPs.

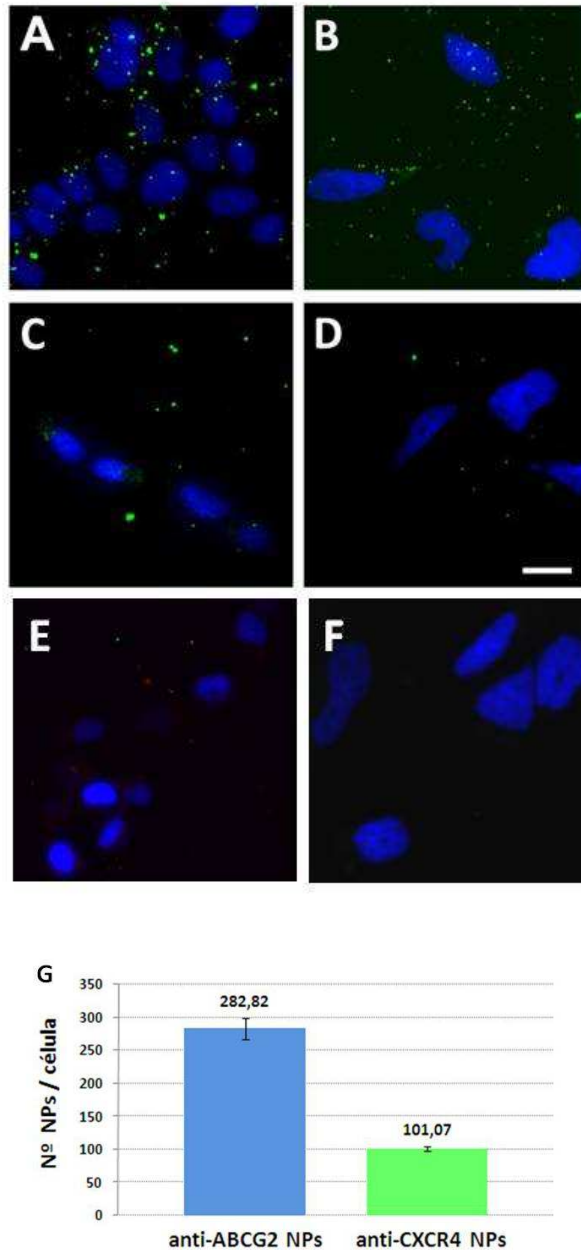


Figura 15: Unión de NPs dirigidas contra ABCG2, CXCR4 y CD44 en células Beas-2B y H69V. Imágenes representativas de la unión de las NPs contra ABCG2 en células Beas-2B (A) y H69V (B), CXCR4 en células Beas-2B (C) y H69V (D), y de las NPs contra CD44 en células Beas-2B (E) y H69V (F), tras incubación durante 30 min a 4°C. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m. F) Cuantificación de las NPs anti-ABCG2 y anti-CXCR4 unidas a las células Beas-2B. $n \geq 10$ imágenes.

Los experimentos a 4°C mostraron unión de las NPs dirigidas mediante anticuerpos contra ABCG2 en las células Beas-2B (figura 15A) y H69V (figura 15B). Aunque en menor grado, también se comprobó la unión de las NPs direccionadas con anticuerpos frente a CXCR4 a las células Beas-2B (figura 15C) y H69V (figura 15D). Con estos dos tipos de NPs, solo se pudo realizar la cuantificación del número de NPs en el caso de la línea celular Beas-2B. En el

caso de las células H69V no se pudo realizar por no poseer suficientes campos celulares para su evaluación. En el caso de las NPs dirigidas con anticuerpos frente a CD44, tanto en el caso de las Beas-2B (figura 15E) como en el de las células H69V (figura 15F) no se encontraron partículas unidas a las células. Por ello, tampoco se realizó la cuantificación de estas líneas celulares incubadas con este tipo de NP.

La Figura 15G muestra la cuantificación de las NPs dirigidas unidas a las células Beas-2B, observándose la unión de una media de $282,82 \pm 16,02$ NPs dirigidas contra ABCG2 por célula, frente a un promedio de $101,7 \pm 2,98$ NPs por célula en el caso de las direccionadas hacia el receptor CXCR4.

En la figura 16 se observa que no hubo unión significativa de las NPs controles conteniendo un anticuerpo inespecífico (isotipo IgG de ratón) a las células Beas-2B ni a las H69V. Del mismo modo, tampoco se evidenció unión significativa a las células por parte de las NPs de látex *per se* (sin vector de direccionamiento) ni en la línea celular Beas-2B ni en H69V.

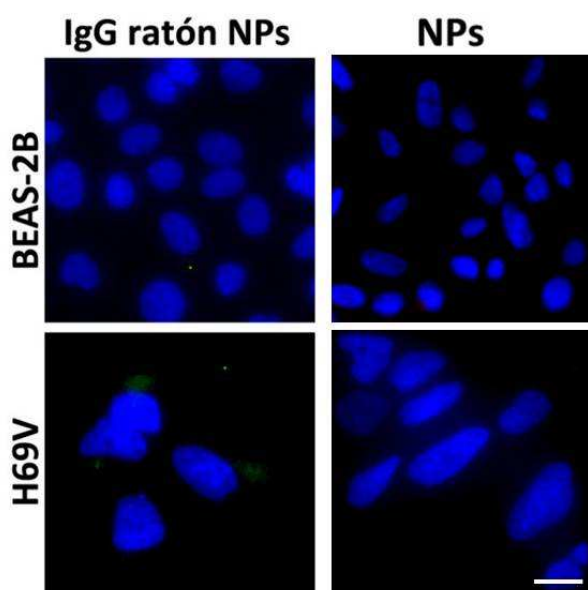
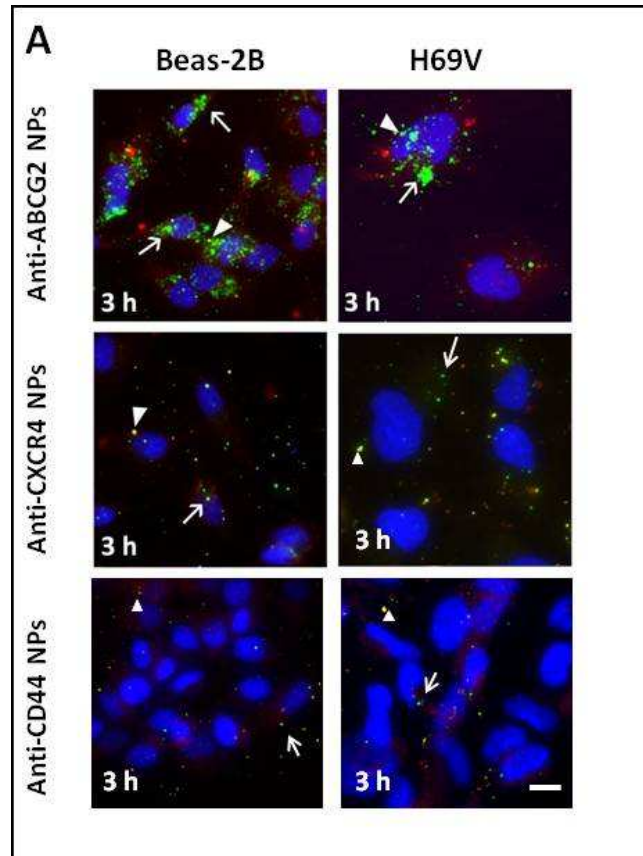


Figura 16: Imágenes representativas de la unión de NPs control en células Beas-2B y H69V. Imágenes representativas de la unión de las NPs con isotipo IgG de ratón y de la unión de NPs *per se* en las líneas celulares Beas-2B y H69V, tras incubación durante 30 min a 4°C. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.

4.5. Internalización de las NP

Para estudiar la posible internalización de las NPs se incubaron las células a 37°C durante tres horas (figura 17). A esta temperatura la célula está metabólicamente activa, por lo que se permite la endocitosis de las NPs.



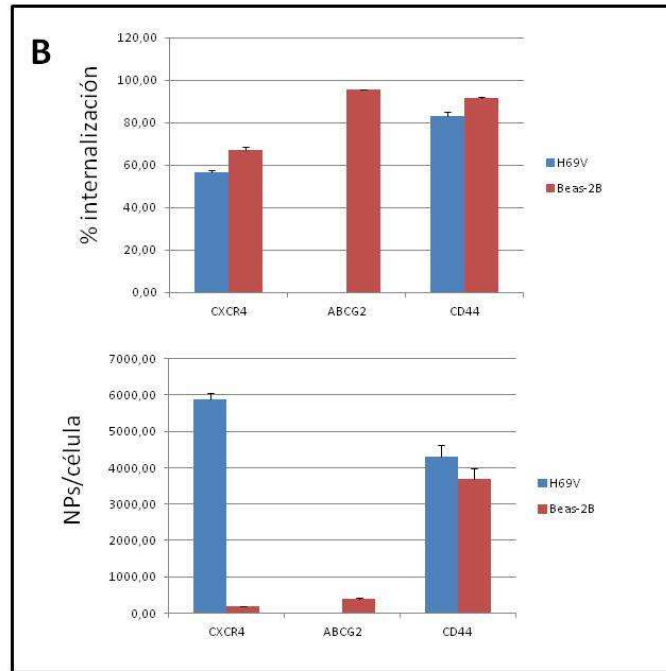


Figura 17: Internalización de NPs anti-CXCR4, anti-ABCG2 y anti-CD44. A) Imágenes representativas de la líneas celulares Beas-2B y H69V tras 3h de incubación con las NPs anti-CXCR4, anti-ABCG2 y anti-CD44 y posterior tinción con un anticuerpo secundario marcado con Texas Red. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μ m. B) Porcentaje de internalización en las células H69V y Beas-2B y número de NPs totales por célula. $n \geq 10$ imágenes.

En la figura 17A se muestran imágenes representativas de la internalización de las NPs anti-CXCR4, anti-ABCG2 y anti-CD44 en las líneas celulares Beas-2B y H69V. Las NPs internalizadas aparecen en verde (flechas) y aquellas NPs unidas a la membrana celular en amarillo (doble marcaje, puntas de flecha).

La figura 13B representa el porcentaje de internalización y el ratio NPs/célula de las NPs anti-CXCR4, anti-ABCG2 y anti-CD44 en las células Beas-2B y H69V, y en la tabla 1 podemos ver los valores. Como muestra la figura, después de tres horas de incubación, los porcentajes de internalización se mantienen similares entre las dos líneas celulares, siendo un poco más elevados en la línea celular Beas-2B. Por el contrario, en cuanto al ratio NPs/célula, se observa más elevado en la línea celular H69V.

CXCR4			
H69V		Beas-2B	
% internalización	NPs/cel	% internalización	NPs/cel
56,50±1,26	5870,28±190,72	67,2±1,38	179,41±8,19

ABCG2			
H69V		Beas-2B	
% internalización	NPs/cel	% internalización	NPs/cel
		95,5±0,34	406,67±21,01

CD44			
H69V		Beas-2B	
% internalización	NPs/cel	% internalización	NPs/cel
83,35±1,92	4300,99±323,52	91,45±0,81	3688,99±284,79

Tabla 1: Valores del porcentaje de internalización y el ratio NPs/célula en las células H69V y Beas-2B. n≥10 imágenes.

No fue posible cuantificar la internalización ni las NPs/célula en las células H69V con las NPs anti-ABCG2 al carecer de suficientes campos, por lo que se necesitará continuar con el estudio de ese marcador.

5. Discusión

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar los marcadores CD44, ABCG2 y CXCR4 de CSCs del cáncer microcítico de pulmón como posibles dianas para el desarrollo de un sistema de NPs con la función de mejorar su tratamiento.

El cultivo de las células, tanto controles (HeLa), como las células de pulmón tumorales (H69V) y no tumorales (Beas-2B), se realizó según la información de la casa comercial (ECACC.) El uso del soporte en el caso de las Beas-2B funcionó a la perfección durante el cultivo celular. Sin embargo, en los experimentos con NPs observamos, tras varias repeticiones, que las NPs se adherían también a este soporte, por lo que para dichos experimentos se sembraron las células Beas-2B en las placas de inmunofluorescencia sin el soporte. Debido a que las células se siembran a una alta confluencia y el experimento se realiza con el mismo medio de cultivo BEGM, consideramos que no hay posibilidad de que las células Beas-2B sufran una diferenciación escamosa.

Aunque no se han incluido en nuestros resultados, también se analizaron mediante western blot los diferentes marcadores CXCR4, ABCG2 y CD44 en otra línea tumoral de pulmón, NCI-H510A. Esta línea celular NCI-H510A presenta una celularidad mixta, con una población de células adherentes y otra de células en suspensión. Su cultivo se realiza habitualmente sin ningún tipo de solución de soporte para el frasco, pero en estas condiciones la fracción de células adheridas es insuficiente. En nuestro caso, a pesar de aumentar el porcentaje de células adheridas al frasco mediante el uso de soluciones de soporte como el utilizado para las células Beas-2B o con gelatina al 1%, el cultivo de las células NCI-H510A resultó subóptimo. Por esta razón, no se pudo utilizar esta línea celular en los ensayos de inmunofluorescencia o en los de unión e internalización de NPs. Sería necesario encontrar un sistema de cultivo que mejorara la adherencia de estas células, con vistas a poder estudiar correctamente esta línea celular.

En nuestros ensayos hemos detectado una mayor expresión del marcador CD44 en las células tumorales H69V, seguidas de las HeLa (utilizada como control positivo), observándose la menor expresión de dicho marcador en la línea no tumoral Beas-2B. En diversas líneas celulares de cáncer de pulmón, las células CD44⁺ presentan propiedades típicas de CSC (5, 21) y se piensa que puede ser un marcador relacionado con la iniciación del tumor y su capacidad de migración e invasión. Este marcador parece prometedor puesto que se haya sobreexpresado en las células tumorales de SCLC, como vemos en la línea celular H69V, en comparación con las células epiteliales normales Beas-2B.

En cuanto a la expresión del marcador ABCG2, se ve aumentada en HeLa (utilizadas como control positivo). Por el contrario, las líneas pulmonares Beas-2B y H69V presentaron una expresión reducida y muy similar. Diversos estudios previos han demostrado una expresión elevada de ABCG2 en varios tumores, y entre ellos en el SCLC (26), pero esta sobreexpresión se observó concretamente en las denominadas *side populations* de los mismos. Estos resultados, aunque no muestren dicha sobreexpresión, no excluyen totalmente la posibilidad de que la bomba ABCG2 se pueda encontrar sobreexpresada en las CSCs de SCLC, ya que las líneas celulares de nuestros estudios no están formadas por células de las *side populations* de este tipo de tumor.

Por último, en cuanto a la expresión de CXCR4, observamos una alta expresión en las células HeLa (utilizadas como control positivo). Los niveles de expresión en Beas-2B y H69V fueron similares, aunque en la línea tumoral H69 fueron ligeramente superiores respecto a la línea control Beas-2B. Este receptor media la migración, la activación de integrina y la adhesión de las células tumorales del cáncer de pulmón a las células estromales, por lo que está relacionado con la capacidad de metástasis. Diversos estudios han demostrado que se expresa en la mayoría de las muestras de cáncer de pulmón NSCLC, estando asociada su sobreexpresión con peor pronóstico de supervivencia (25).

La expresión en superficie de los marcadores es una característica necesaria para su utilización como dianas en un sistema de direccionamiento

de fármacos. Por ello, hemos analizado la expresión de CXCR4, ABCG2 y CD44 en la superficie de las tres líneas celulares mediante un ensayo de inmunofluorescencia sin permeabilizar las membranas. Nuestros resultados han revelado una mayor densidad en la expresión del marcador CD44 en las células tumorales HeLa y H69V comparado con las células no tumorales Beas-2B. Estos resultados coinciden con el patrón de expresión observados en las densitometrías. Además, mientras que el patrón de expresión en las líneas tumorales HeLa y H69V fue homogéneo, en las células pulmonares no-tumorales Beas-2B solo una subpoblación presentó marcaje positivo. Sin embargo, el método usado no es cuantitativo, por lo que dicho resultado necesitaría ser confirmado mediante algún método cuantitativo. Este marcador parece prometedor puesto que se haya aumentado en las células tumorales de SCLC, como vemos en la línea celular H69V, en comparación con las células epiteliales normales Beas-2B. Estos resultados se corroboran con diversos estudios que han demostrado que en líneas celulares de cáncer de pulmón, las células CD44⁺ presentaron propiedades típicas de CSC (5, 21).

Aunque en nuestros ensayos el modelo celular H69V no es de CSCs de SCLC, el marcaje de CD44 se trata de un marcaje muy positivo. Por lo tanto, esta línea celular puede ser usada para desarrollar un sistema de direccionamiento de NPs dirigidas contra este receptor. Debemos destacar, además, que al tratarse de células tumorales de SCLC, el comportamiento de este sistema se asemejará en cierta medida a los futuros modelos *in vivo* sobre este tipo de tumor.

Por otra parte, en la realización de los ensayos de unión e internalización de las NPs a CD44 encontramos algunos inconvenientes. Se detectó que las NPs anti-CD44 se adherían a la solución de soporte de las células Beas-2B. Además, en el caso de las NPs dirigidas hacia CD44, observamos que las NPs no se formaban correctamente, por lo que posiblemente el número de NPs anti-CD44 utilizadas en la incubación con las células no fuera el óptimo. Esto puede deberse a distintas causas. Hemos demostrado anteriormente en los otros ensayos que sí existe expresión en superficie de dicho marcador, así que probablemente el problema esté en la estructura de la NP o del anticuerpo. En cuanto a nuestros controles de unión con NPs cubiertas de anticuerpos

inespecíficos o con NPs sin anticuerpo, los resultados fueron completamente negativos, lo que demuestra que la unión observada en los ensayos con NPs fue, efectivamente, específica. Tampoco pudimos cuantificar la capacidad de unión, ni el porcentaje de internalización y el ratio NPs/célula en las células tumorales H69V de las NPs dirigidas a ABCG2 ya que no se obtuvieron un número de campos suficientes para su evaluación. Por tanto, será necesario continuar con los ensayos con este marcador, para poder obtener suficientes resultados.

En los ensayos para evaluar la capacidad de unión de las NPs dirigidas hacia CXCR4, ABCG2 y CD44 en las líneas no tumorales Beas-2B y tumorales H69V se observó una unión significativa de las NPs anti-ABCG2, y en menor medida de las NPs anti-CXCR4. Sin embargo, este dato deberá confirmarse al no haber sido posible cuantificar los datos en las células tumorales H69V. Al igual que en el caso anterior, es necesario continuar con los ensayos para poder obtener estos resultados.

Nuestros controles de unión con NPs provistas de anticuerpos inespecíficos o NPs desnudas (sin vector de direccionamiento) fueron completamente negativos, lo que demuestra que la unión observada en los ensayos fue específica y no es debida a la presencia de anticuerpo en la superficie de la NP, ni a la NP *per se*.

En los ensayos de internalización de las NPs anti-CXCR4 y anti-CD44, se observaron porcentajes de internalización muy similares entre ambas líneas celulares, con un pequeño incremento en la línea control Beas-2B. Sin embargo, el número de NPs asociadas por célula en la línea tumoral H69V fue superior al detectado en las células Beas-2B, principalmente en las NPs anti-CXCR4.

En conjunto, estos resultados podrían indicar que CXCR4, ABCG2 y CD44 no son dianas apropiadas para terapias dirigidas contra las CSCs del SCLC, ya que las células normales no-tumorales se verían afectadas por este tipo de terapia, puesto que según el modelo con células Beas-2B, expresarían estos marcadores en número considerable e internalizarían dichas NPs. No obstante, hay que tener en cuenta varios factores antes de desechar estos

marcadores como posibles dianas para futuras terapias dirigidas mediante NPs. En primer lugar, se ha descrito sobreexpresión de CXCR4, ABCG2 y CD44 en las CSCs de éste y de otros tipos de tumores, pudiendo llegar a ser la expresión en este subgrupo de células tumorales considerablemente mayor a la expresión encontrada en las células normales, en nuestro caso Beas-2B (5, 22, 26, 27). No debemos olvidar que en nuestro estudio se han usado líneas celulares de SCLC, y no líneas de CSCs de SCLC en concreto.

Por último, es preciso señalar que todos nuestros estudios se han realizado en modelos *in vitro*, y el comportamiento en un modelo *in vitro* difiere en gran medida del modelo *in vivo*, donde el efecto de aumento de permeabilidad y retención (efecto EPR) que se produce en los vasos sanguíneos de los tumores sólidos juega un papel importante, facilitando notablemente la acumulación de NPs en el tejido tumoral. De esta forma, la especificidad que tendría el tratamiento con NPs dirigidas a las CSCs sería más alta que la observada en nuestros estudios *in vitro*, pudiendo superar en eficacia al tratamiento convencional aplicado hasta ahora en el SCLC.

Por otra parte, nuestros ensayos muestran un mayor número de NPs anti-CXCR4 por célula en la línea tumoral H69V en comparación con la línea no tumoral Beas-2B, y en menor medida, de NPs anti-CD44. A pesar de ser necesarios más estudios que puedan corroborar nuestros resultados, éstos apoyan el posible uso de CXCR4, ABCG2 y CD44 como dianas para el desarrollo de un sistema de direccionamiento con NPs dirigidas a estos marcadores en CSCs en el SCLC.

6. Conclusiones

1. Las dos líneas celulares pulmonares estudiadas, Beas-2B y H69V, muestran expresión en superficie de CXCR4, ABCG2 y CD44, siendo mayor esta expresión en la línea tumoral H69V.
2. Las NPs anti-CXCR4 y anti-ABCG2 presentan una unión eficiente y específica a las dos líneas celulares.
3. La unión de las NPs anti-CXCR4, anti-ABCG2 y anti-CD44 induce la endocitosis de dichas NPs en ambas líneas celulares.
4. El número de NPs anti-CXCR4 y anti-CD44 por célula es más elevado en la línea tumoral H69V comparado con la línea no tumoral Beas-2B.

Por lo tanto, los receptores CXCR4, ABCG2 y CD44 pueden ser una buena diana para el desarrollo de un sistema dirigido mediante NPs para el tratamiento del cáncer microcítico de pulmón.

7. Bibliografía

1. Wu X, Chen H, Wang X. Can lung cancer stem cells be targeted for therapies? *Cancer Treatment Reviews*, 2012; 38(6):580-588.
2. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en 2014. [en línea] Fecha de consulta: 12 de Noviembre del 2015, 2014, Vol. Disponible en:
<http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_cifras_del_cancer_2014.pdf>.
3. Minna JD, Schiller JH. Neoplasias de pulmón. En: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison Principios de Medicina Interna*. 17ª ed. México DF: McGraw-Hill y 551-62., 2009. p.
4. Peacock CD, Watkins DN. Cancer Stem Cells and the Ontogeny of Lung Cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2008; 26(17):2883-2889.
5. Lundin A, Driscoll B. Lung cancer stem cells: progress and prospects. *Cancer letters*, 2013; 338(1):89-93.
6. Escuín JS. El cáncer de pulmón en España. Epidemiología, supervivencia y tratamiento actuales. *Archivos de Bronconeumología*, 2009; 45(7):341-8.
7. Eramo A, Lotti F, Sette G et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, 2008; 15(3):504-14.
8. Wang K, Wu X, Wang J, Huang J. Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*, 2013; 8:899-908.
9. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer Stem Cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2012; 44(12):2144-2151.

10. Carney DN, Gazdar AF, Bunn PA, Jr., Guccion JG. Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients. *Stem cells*. 1982; 1(3): 149-64.
11. O'Flaherty JD, Barr M, Fennell D, Richard D, Reynolds J, O'Leary J, et al. The cancer stem-cell hypothesis: its emerging role in lung cancer biology and its relevance for future therapy. *J Thorac Oncol*. 2012; 7(12): 1880-90.
12. Nurwidya F, Murakami A, Takahashi F, Takahashi K. Lung cancer stem cells: tumor biology and clinical implications. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2012; 8(3): 217-22.
13. Iyer AK, Singh A, Ganta S, Amiji MM. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65(13-14): 1784-802.
14. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest*. 2010; 120(1): 41-50.
15. Yi SY, Hao YB, Nan KJ, Fan TL. Cancer stem cells niche: a target for novel cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev*. 2013; 39(3): 290-6.
16. Blanco E, Hsiao A, Mann AP, Landry MG, Meric-Bernstam F, Ferrari M. Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects. *Cancer Sci*. 2011; 102(7): 1247-52.
17. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(5): 1310-6.
18. Biswas S, Torchilin VP. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014; 66: 26-41.
19. Muro S. Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. *J Control Release*. 2012; 164(2): 125-37.
20. Garnacho C. *Current Pharmaceutical Design*. In press.

21. Leung EL, Fiscus RR, Tung JW et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One*, 2010; 5(11):e14062.
22. Kondo K, Miyoshi T, Hino N et al. High frequency expressions of CD44 standard and variant forms in nonsmall cell lung cancers, but not in small cell lung cancers. *J Surg Oncol.*, 1998; 69(3):128-36.
23. Gutova M, Najbauer J, Gevorgyan A et al. Identification of uPAR-positive chemoresistant cells in small cell lung cancer. *PLoS One*, 2007; 2(2):e243.
24. Wang P, Gao Q, Suo et al. Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. *PLoS One*, 2013; 8(3):e57020.
25. Burger M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Graff A, Silberstein LE, Fujii N, et al. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene*. 2003; 22(50): 8093-101.
26. Kin YH, Ishii G, Goto K, Ota S et al. Expression of breast cancer resistance protein is associated with a poor clinical outcome in patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2009; 65(1):105-11.
27. Garnacho C, Shuvaev V, Thomas A, McKenna L, Sun J, Koval M, et al. RhoA activation and actin reorganization involved in endothelial CAM-mediated endocytosis of anti-PECAM carriers: critical role for tyrosine 686 in the cytoplasmic tail of PECAM-1. *Blood*. 2008; 111(6): 3024-33.