



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Máster

### **Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer: hipertermia combinada**

Development of new therapeutic strategies against  
cancer: combined hyperthermia

Autora

**Doria Elena Moraru**

Director/es

**Raquel Moreno Loshuertos**  
**Ángel Millán Escolano**

## **Abreviaturas empleadas**

ADP: Adenosín difosfato

AMF: Campo magnético alterno

ATF4: Activating Transcription Factor 4

ATP: Adenosín trifosfato

BN-PAGE: Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis

BSA: Bovine Serum Albumin

cDNA: DNA complementario

Ct: Ciclo umbral

CoQ: Coenzima Q

Cyt c: Citocromo c

DLS: Dynamic Light Scattering

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

Drp1: Dynamin-related protein 1

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDS: Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EELS: Espectroscopia de pérdida de energía de electrón

EIF2 $\alpha$ : Factor de iniciación de la traducción eucariota 2

ETC: Cadena de transporte de electrones

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

FADH<sub>2</sub>: Dinucleótido de flavina y adenina reducido

GTP: Guanosín trifosfato

HIF-1 $\alpha$ : Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HT: Hipertermia

HSP70: 70-kDa heat shock protein

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

IMM: Inner Mitochondrial Membrane

IMS: Intermembrane Space

IGA: Actividad en gel

KEAP1: Kelch like ECH associated protein 1

MFI: Intensidad Media de Fluorescencia

MNPs: Nanopartículas magnéticas

mtDNA: DNA mitocondrial

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

MOPS: Ácido  $\gamma$ -morfolinopropanosulfónico

NADH: Dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido

NBT: Cloruro de nitroblue tetrazolium

nDNA: DNA nuclear

NHS: N-hidroxisuccinimida

NOS: Especies reactivas de nitrógeno

NOX1: NADPH oxidasa 1

Nrf2: Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2

OMM: Outer Mitochondrial Membrane

Opa1: Optic atrophy protein 1

OXPHOS: Sistema de fosforilación oxidativa

PBS: Tampón fosfato salino

PBS-T: Tampón fosfato salino + 0.1 % Tween 20

PDVF: Fluoruro de polivinilideno

PS: Fosfatidilserina

qPCR: PCR en tiempo real

RIPA: Tampón para análisis de radioinmunoprecipitación

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rRNA: RNA ribosomal

SCs: Supercomplejos

Sd: Desviación estándar

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

STEM: Microscopía electrónica de transmisión de barrido

Sulfo-NHS: N-hidroxisulfosuccinimida

TNBC: Cáncer de mama triple negativo

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TEMED: Tetrametiletilendiamina

tRNA: RNA de transferencia

UPR: Unfolded protein response

WB: Western Blot

## Índice

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1 Cáncer .....	3
2.1.1 Cáncer de mama .....	3
2.1.2 Metabolismo del cáncer y genes más relevantes .....	4
2.2 La mitocondria .....	5
2.2.1 Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) .....	6
2.2.2 Papel de la mitocondria en la señalización celular .....	7
2.2.3 Papel de la mitocondria en el cáncer .....	8
2.2.4 Papel de la mitocondria en la termogénesis .....	8
2.2.5 Papel de la mitocondria como diana para tratamientos tumorales .....	8
2.3 Hipertermia para el tratamiento del cáncer .....	9
2.3.1 Hipertermia magnética con nanopartículas .....	10
2.4 Funcionalización de nanopartículas .....	11
2.4.1 Anticuerpos .....	11
2.4.2 Bioconjugación vía carbodiimida .....	12
2.4.3 Cetuximab en la terapia del cáncer .....	12
3. OBJETIVOS .....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
4.1 Cultivos celulares .....	14
4.1.1 Líneas celulares .....	14
4.1.2 Medio de cultivo .....	14
4.1.3 Mantenimiento de los cultivos celulares .....	14
4.1.4 Congelación y descongelación de células .....	15
4.1.5 Contaje y determinación de la viabilidad celular .....	15
4.2 Tratamientos de hipertermia .....	16
4.3 Análisis de la expresión génica .....	16
4.3.1 Extracción de RNA total con TRizol™ .....	16
4.3.2 Cuantificación de RNA total por espectrofotometría .....	16
4.3.3 Síntesis de cDNA a partir de RNA .....	16
4.3.4 Análisis de expresión por qPCR .....	17
4.4 Ensayo MTT para medir citotoxicidad .....	17
4.5 Extracción y purificación de mitocondrias .....	18
4.6 Análisis de complejos mitocondriales .....	19

4.6.1 Electroforesis en gel Blue Native .....	19
4.6.2 Ensayo de actividad en gel (IGA).....	19
4.6.3 Ensayo Western Blot .....	19
4.6.3.1 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF .....	19
4.6.3.2 Inmunodetección de proteínas.....	20
4.7 Extracción de proteínas totales .....	20
4.8 Análisis de proteínas totales .....	21
4.8.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	21
4.8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE .....	21
4.9 Análisis estadístico.....	21
4.10 Síntesis de nanopartículas .....	22
4.10.1 Síntesis de los núcleos magnéticos.....	22
4.10.2 Revestimiento de los núcleos magnéticos con polímero .....	22
4.10.3 Conjugación de las MNPs con el anticuerpo anti-EGFR Cetuximab .....	22
4.11 Caracterización de nanomateriales .....	23
4.11.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS) .....	23
4.11.2 Microscopia electrónica de transmisión de barrido (STEM) .....	24
4.11.3 Electroforesis en gel SDS-PAGE .....	24
4.12 Evaluación de la internalización de MNPs .....	24
4.12.1 Por generador de imágenes de células fluorescentes .....	24
4.12.2 Por citometría de flujo .....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1 Cuantificación de la expresión génica .....	26
5.1.1 Análisis de la expresión basal de los genes.....	26
5.1.2 Análisis de la expresión de los genes tras el tratamiento de hipertermia .....	27
5.1.2.1 Análisis de la expresión de HIF-1 $\alpha$ .....	27
5.1.2.2 Análisis de la expresión de ICAM-1 .....	27
5.1.2.3 Análisis de la expresión de factores de transcripción .....	28
5.1.4 Análisis de la expresión de GTPasas .....	29
5.2 Análisis de la expresión proteica de HSP70.....	29
5.3 Medida de la citotoxicidad inducida en presencia de dos inhibidores .....	30
5.3.1 Evaluación de la citotoxicidad de tratamientos combinados de M-divi-1 e hipertermia.....	30
5.3.1.1 Efecto de la temperatura sobre la sensibilidad al fármaco.....	30
5.3.1.2 Efecto del fármaco sobre la sensibilidad a la temperatura.....	33

5.3.2 Evaluación de la citotoxicidad de tratamientos combinados de metformina e hipertermia.....	33
5.3.2.1 Efecto de la temperatura sobre la sensibilidad al fármaco.....	33
5.3.1.2 Efecto del fármaco sobre la sensibilidad a la temperatura.....	35
5.4 Análisis del ensamblaje de los complejos mitocondriales .....	35
5.4.1 Medida de la actividad del complejo I.....	35
5.4.2 Inmunodetección de los complejos individuales del sistema OXPHOS .....	36
5.5 Caracterización de MNPs.....	37
5.5.1 Evaluación de MNPs revestidas con polímero .....	37
5.5.2 Evaluación de MNPS conjugadas con cetuximab .....	38
5.6 Detección de cetuximab mediante un gel SDS-PAGE .....	40
5.7 Internalización de MNPs en las líneas MDA-MB-468 y MDA-MB-231 .....	40
6. DISCUSIÓN .....	42
6.1 Expresión génica en la reprogramación metabólica .....	42
6.2 Hipertermia y uso de inhibidores como estrategia terapéutica .....	43
6.3 La hipertermia causa daño en la función y estructura mitocondrial .....	44
6.5 Análisis de la funcionalización de MNPs .....	44
6.6 Presencia de cetuximab en MNPs .....	45
6.7 Determinación de la bioactividad de los conjugados MNPs-cetuximab.....	46
7.CONCLUSIONES .....	47
8. BIBLIOGRAFÍA.....	49
9. ANEXO.....	55
9.1 ANEXO I: Información adicional al desarrollo experimental .....	55
9.2 ANEXO II: Información adicional a los resultados.....	59

## 1. RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades más letales actualmente, por lo que es necesario encontrar estrategias terapéuticas más eficientes. Para ello es importante conocer los mecanismos de la reprogramación metabólica en la carcinogénesis, donde la mitocondria ejerce un papel esencial. Una posible estrategia terapéutica es la hipertermia (HT), mediante la que se consigue calentar el tumor hasta 45 °C, de manera que se induce selectivamente la muerte celular en células cancerosas hipóxicas, siendo menos dañina para el tejido sano circundante. Además, se puede conseguir una mayor efectividad en esta terapia, utilizando nanopartículas magnéticas (MNPs) que proporcionan un calentamiento selectivo cuando son irradiadas por un campo magnético alterno. Las MNPs más empleadas son los óxidos de hierro, particularmente la maghemita ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), debido a que son biocompatibles, fácilmente metabolizados por el organismo y presentan superficies que pueden ser modificadas para su funcionalización con biomoléculas activas de interés. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la hipertermia en líneas tumorales procedentes de cáncer de mama como una posible estrategia terapéutica de forma individual o combinada con otras terapias.

Los resultados revelan que tras la hipertermia se producen cambios en la expresión génica y daños en la estructura y organización de los supercomplejos mitocondriales. Además, el tratamiento combinado con fármacos que tienen como diana la mitocondria parece incrementar el efecto de la hipertermia sobre la viabilidad celular. Por otro lado, con el objetivo de poner a punto la hipertermia magnética local como terapia antitumoral, se han sintetizado nanopartículas magnéticas con un núcleo de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  conjugadas con cetuximab, un anticuerpo que reconoce el receptor del factor de crecimiento epidérmico para favorecer su incorporación específica por parte de células tumorales que expresen dicho receptor. El análisis de las MNPs conjugadas ha mostrado que, aunque es necesario optimizar el método de conjugación para conseguir una unión de anticuerpo óptima sin necesidad de afectar a la estabilidad coloidal, y una unión covalente de la mayor parte del anticuerpo, todo apunta a que cetuximab se pueda unir con una orientación adecuada. La internalización de las MNPs en dos líneas celulares parece mayor en la línea MDA-MB-468 debido a la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico en dicha línea celular.

## ABSTRACT

Cancer is currently one of the most lethal diseases, making it necessary to find more efficient therapeutic strategies. To achieve this, it is important to understand the mechanisms of metabolic reprogramming in carcinogenesis, where the mitochondrion plays an essential role. One possible therapeutic strategy is hyperthermia (HT), which involves heating the tumor up to 45°C, selectively inducing cell death in hypoxic cancer cells while being less harmful to the surrounding healthy tissue. Additionally, the effectiveness of this therapy can be increased by using magnetic nanoparticles (MNPs) that provide selective heating when irradiated by an alternating magnetic field. The most commonly used MNPs are iron oxides, particularly maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), because they are biocompatible, easily metabolized by the body, and have surfaces that can be modified for functionalization with active biomolecules of interest. The objective of this study is to investigate the effect of hyperthermia on tumor cell lines derived from breast cancer as a possible therapeutic strategy, either individually or in combination with other therapies.

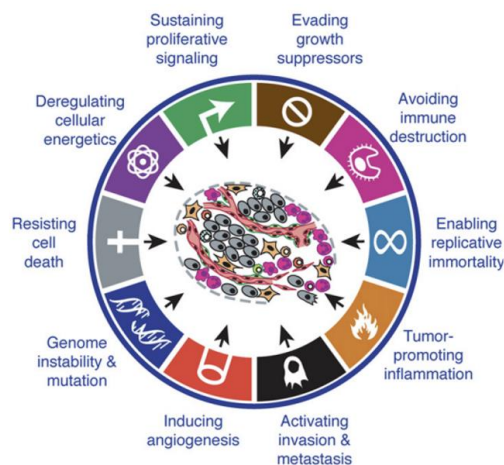
The results reveal that after hyperthermia, changes occur in gene expression and damage to the structure and organization of mitochondrial supercomplexes. Additionally, combined treatment with drugs targeting the mitochondria appears to enhance the effect of hyperthermia on cell viability. Furthermore, with the aim of developing local magnetic hyperthermia as an anti-tumor therapy, magnetic nanoparticles with an  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  core conjugated with cetuximab have been synthesized. Cetuximab is an antibody that recognizes the epidermal growth factor receptor to promote its specific uptake by tumor cells expressing this receptor. The analysis of the conjugated MNPs has shown that, although it is necessary to optimize the conjugation method to achieve optimal antibody binding without affecting colloidal stability and to ensure covalent binding of most of the antibody, everything indicates that cetuximab can bind with an appropriate orientation. The internalization of the MNPs in two cell lines appears to be greater in the MDA-MB-468 line due to the overexpression of the epidermal growth factor receptor in this cell line.

## 2.INTRODUCCIÓN

### 2.1 Cáncer

El cáncer constituye un grupo heterogéneo de más de 100 enfermedades que se caracterizan por la proliferación continua y desregulada de células que crecen y se dividen de manera incontrolada invadiendo tejidos y órganos sanos, e incluso, en ocasiones, diseminándose por todo el cuerpo, proceso conocido como metástasis. La transformación tumoral tiene su origen en la acumulación de mutaciones genéticas debidas a errores que ocurren cuando las células se dividen, a la acción de sustancias nocivas presentes en el medioambiente que dañan el DNA, o a la herencia genética. Estos cambios producidos en el DNA pueden conllevar que los protooncogenes, genes implicados en el crecimiento celular normal, se conviertan en oncogenes, provocando así un crecimiento celular descontrolado<sup>1</sup>, o que se produzca la pérdida de función de genes supresores de tumores.

Hanahan y Weinberg<sup>2</sup> describen 8 características que presentan las células tumorales (Figura 1): (i) señalización proliferativa sostenida, (ii) evasión de supresores de crecimiento, (iii) evasión de la apoptosis, (iv) invasión y metástasis, (v) activación de un potencial de replicación inmortal, (vi) angiogénesis sostenida, (vii) reprogramación del metabolismo energético y (viii) evasión de la destrucción inmune. Estas características son adquiridas en el desarrollo del cáncer por distintos mecanismos y su desarrollo se ve favorecido por la inestabilidad genómica<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Características de las células tumorales<sup>2</sup>.

#### 2.1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es uno de los cánceres más frecuentes y la causa de muerte más común de cáncer en mujeres<sup>3</sup>. Por lo general se puede clasificar en tres grupos, el que expresa receptores hormonales (receptor de estrógeno o progesterona), el que expresa el receptor humano del factor de crecimiento 2 (HER2) y el cáncer de mama triple negativo (TNBC), que no presenta ninguno de los tres receptores mencionados anteriormente. Éste último, se caracteriza por presentar una alta invasividad, alto potencial metastásico, propensión a la recaída y un peor pronóstico<sup>3</sup>.

El tratamiento depende del subtipo de cáncer y del grado de propagación desde el seno hacia los ganglios linfáticos (estadios II o III) u otras partes del cuerpo (estadio IV). Los pacientes suelen recibir una combinación de tratamientos. Entre ellos, destacan la cirugía para extirpar el tumor

de mama, radioterapia y fármacos para eliminar las células cancerosas y prevenir su propagación, entre los que se incluyen, las terapias hormonales, la quimioterapia o terapias biológicas dirigidas<sup>4</sup>. Aproximadamente el 30% de los pacientes diagnosticados con cáncer de mama acaban desarrollando metástasis, por lo que el objetivo en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer es el control local del tumor, así como centrarse en los efectos sistémicos para detener las células cancerosas y evitar, la metástasis<sup>5</sup>.

### **2.1.2 Metabolismo del cáncer y genes más relevantes**

En el año 1924, Otto Warburg, determinó que las células tumorales metabolizan la glucosa de manera diferente a las células sanas, ya que las células cancerosas utilizan la glucólisis anaeróbica seguida de la fermentación láctica como fuente de energía, aun habiendo una cantidad suficiente de oxígeno para la respiración<sup>6</sup>. Esta reprogramación metabólica en el microentorno tumoral, denominada efecto Warburg, puede ser causada por: hipoxia; mutaciones en genes supresores de tumores; mutaciones en la ruta catabólica de la glucosa; la actividad de oncogenes; o, simplemente, para llevar a cabo una obtención más rápida de ATP y secreción de lactato.

Bajo condiciones de hipoxia, la proliferación celular se reduce para prevenir un aumento de las células consumidoras de O<sub>2</sub>. Sin embargo, las mutaciones celulares cancerosas y las alteraciones genéticas en oncogenes o genes supresores de tumores, junto con la reprogramación metabólica, permiten la proliferación celular, a pesar de la baja concentración de O<sub>2</sub><sup>7</sup>. Al darse la hipoxia, se activa el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1-alpha), que codifica proteínas que aumentan la disponibilidad de O<sub>2</sub> y controlan la expresión de genes y proteínas implicadas en la angiogénesis, glucólisis, apoptosis, invasión y resistencia, entre otras<sup>8</sup>. Además, la hipoxia puede inducir la respuesta de proteínas desplegadas, UPR (unfolded protein response), activándose ATF4 (Activating Transcription Factor 4), que participa ampliamente en la regulación del metabolismo de aminoácidos, la autofagia, la homeostasis redox y el estrés del retículo endoplasmático en los tumores<sup>9</sup>.

También se han relacionado las condiciones de hipoxia en los tumores, con la activación de ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), que ejerce un papel esencial en la interacción célula-célula, célula-matriz extracelular, señalización celular y proceso inmunitario. Los procesos fisiológicos regulados por ICAM-1 incluyen interacciones célula endotelial-leucocito y migración transendotelial de leucocitos, regulación de la función efectora de leucocitos en la inflamación, reparación tisular promoviendo neovascularización y reepitelización, y carcinogénesis facilitando la extravasación y supervivencia de células tumorales circulantes<sup>10</sup>

Por otra parte, las mutaciones en genes supresores de tumores también pueden dar lugar al efecto Warburg. Una de las mutaciones más frecuentes en el cáncer es la de la proteína p53, codificada por el gen TP53 y cuya función es inhibir alteraciones fenotípicas y genómicas relacionadas con el desarrollo del cáncer. Dicha función se lleva a cabo mediante la interacción de p53 con varias vías de señalización celular que desempeñan procesos celulares esenciales, como la división celular, el mantenimiento de la estabilidad genómica, apoptosis, autofagia, respuesta inmunitaria y regulación del microambiente tumoral<sup>11</sup>.

Además, en los últimos años se ha reconocido a Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2), como un factor de transcripción clave que media la reprogramación metabólica en las células

cancerosas. Su función principal es regular un conjunto de genes citoprotectores que contienen elementos de respuesta antioxidante, cuya expresión se induce en respuesta al estrés celular. En células sanas, bajo condiciones basales, los niveles de Nrf2 son bajos debido a su continua degradación proteosomal mediada por KEAP1 (Kelch like ECH associated protein 1), proteína adaptadora de sustrato regulada por redox para un complejo de ubiquitina quinasa dependiente de Cul<sub>3</sub>. En células cancerosas, la señalización oncogénica, mutaciones genéticas, alteraciones en la autofagia o alteraciones metabólicas conducen a la pérdida de la función de KEAP1 y a la estabilización de Nrf2<sup>12,13</sup>.

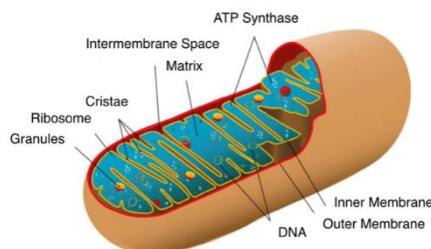
Otra alteración producida en el metabolismo del cáncer es la debida a la dinámica mitocondrial. La morfología mitocondrial experimenta un equilibrio dinámico entre la fusión y la fisión en respuesta a diferentes señales intra y extracelulares. La glucólisis altamente activada en las células cancerosas ha sido vinculada a la fisión mitocondrial, mientras el metabolismo oxidativo activo se ha relacionado con la fusión mitocondrial. Algunas de las GTPasas involucradas en la dinámica mitocondrial son Opa1 y Drp1<sup>14</sup>. Opa1 (Optic atrophy protein 1), además de regular la fusión de la membrana interna mitocondrial, influye en otros procesos del cáncer como la liberación de citocromo c y apoptosis, la respiración mitocondrial, la proliferación celular y la angiogénesis<sup>15</sup>. Por otro lado, Drp1 (Dynamain-related protein 1), ubicada en el citosol regula la fisión mitocondrial. En células cancerosas, el aumento de la fisión mitocondrial provoca una reducción en la señal pro-apoptótica, por lo que la fisión excesiva conduce a una menor captación de Ca<sup>2+</sup> por las mitocondrias, y esto posteriormente reduce la regulación a la baja de factores pro-apoptóticos como Bax<sup>16</sup>.

Las proteínas de choque térmico HSP70s (70-kDa heat shock proteins) también participan de manera directa en las características del cáncer, al sobreexpresarse en respuesta a agentes físicos y químicos, como el calor o el estrés, entre otros. Proporcionan a las células cancerosas una ventaja al suprimir múltiples vías apoptóticas, regular la necrosis, eludir el programa de senescencia celular, interferir con la inmunidad tumoral, promover la angiogénesis y la metástasis. Estas proteínas tienen diversas funciones: secuestro de múltiples complejos proteicos; transporte de cadenas polipeptídicas nacientes a través de la membrana celular; regulación del plegamiento proteico; y actúan como chaperonas de otras proteínas inducidas en estados específicos de desarrollo tales como la diferenciación y oncogénesis<sup>17</sup>.

## **2.2 La mitocondria**

La mitocondria es un orgánulo celular citoplasmático de origen endosimbiótico, cuya función principal es generar energía química en forma de ATP para activar las reacciones bioquímicas de la célula. Este orgánulo está formado por un sistema de doble membrana, la membrana externa (OMM, Outer Mitochondrial Membrane) y la membrana interna (IMM, Inner Mitochondrial Membrane) (Figura 2). La membrana externa es permeable a moléculas pequeñas debido a que contiene unas proteínas llamadas porinas, que forman canales que permiten la libre difusión de moléculas menores a unos 6000 Da. Por otro lado, la membrana interna es impermeable a la mayoría de los iones y moléculas pequeñas, lo que le ayuda a mantener el gradiente de protones que impulsa la fosforilación oxidativa, y es el lugar principal de generación de ATP en la mitocondria. Su estructura formada por unos pliegues denominados crestas, favorece el aumento de su superficie, lo que permite incrementar la producción de ATP. La membrana externa e interna están separadas por un espacio intermembrana (IMS, Intermembrane Space),

cuya función es la recepción de protones provenientes del bombeo de los complejos enzimáticos. Además de la membrana interna, la matriz constituye un compartimento funcional en la mitocondria, ya que contiene el sistema genético mitocondrial y las enzimas responsables de las reacciones del metabolismo oxidativo, entre otras<sup>18</sup>.



**Figura 2.** Estructura de la mitocondria<sup>19</sup>.

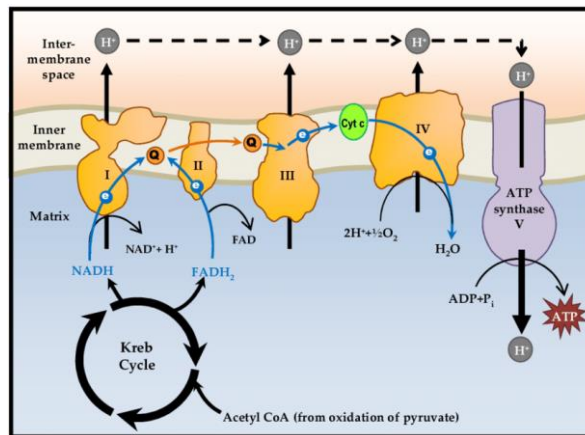
Las mitocondrias contienen su propio genoma, que es separado y distinto del genoma nuclear de la célula. El genoma mitocondrial humano contiene moléculas de DNA circulares de unos 16 kb, y codifica 13 proteínas implicadas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa, que se designan como componentes de los complejos respiratorios I, III, IV o V. También codifica 22 tRNA (RNA de transferencia) y 2 rRNA (RNA ribosomales), 12S y 16S, indispensables para la traducción de las proteínas codificadas en el mtDNA<sup>18</sup>.

### **2.2.1 Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)**

El sistema de fosforilación oxidativa, OXPHOS, se localiza en la membrana interna mitocondrial y se encarga de obtener energía en forma de ATP a través del transporte de electrones que se da en la cadena respiratoria (complejos I al IV) y el bombeo de protones a través de la membrana interna, resultando en un gradiente electroquímico que genera una fuerza motriz que promueve la producción de ATP a través de la ATP sintasa o complejo V. Además de los cinco complejos proteicos hay dos transportadores de electrones (CoQ y Cyt c) embebidos o asociados a la membrana interna. Los sustratos procedentes de la degradación de los nutrientes se catabolizan hasta acetil-CoA después de procesos como la glucólisis y la oxidación del piruvato, la  $\beta$ -oxidación o conversiones enzimáticas para luego ingresar en el ciclo de Krebs donde se transforman en CO<sub>2</sub> liberando GTP y moléculas reducidas como el NADH y el FADH<sub>2</sub>, que ceden sus electrones hasta la cadena de transporte de electrones. El complejo I (NADH-deshidrogenasa), se encarga de oxidar el NADH y transferir protones al espacio intermembranoso, mientras el complejo II (succinato deshidrogenasa) se encarga de oxidar el FADH<sub>2</sub>. Los complejos I y II transfieren los electrones generados en ambas reacciones al CoQ (coenzima Q), también denominado ubiquinona. Después esos electrones pasan al complejo III (ubiquinol-citocromo c- oxidorreductasa) lo que genera más protones que bombear. Los electrones del complejo III pasan al complejo IV (citocromo c oxidasa) mediante el Cyt c (citocromo c) generándose así más protones y reduciéndose el oxígeno molecular a agua. Por último, el complejo V (ATP sintasa) emplea el gradiente de protones generado para sintetizar ATP a partir de ADP como se muestra en la Figura 3 <sup>20,21</sup>

La forma en la que se organiza el sistema OXPHOS en la membrana interna mitocondrial ha sido objeto de debate en las últimas décadas entre los defensores de dos modelos de organización del sistema OXPHOS, el modelo fluido y el modelo sólido. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que, los diferentes complejos respiratorios (I al IV) se ensamblan en estructuras

supramoleculares (supercomplejos) para desempeñar su función ("respirasomas"), pero también se encuentran de forma individual en la IMM dependiendo del tejido o del estado metabólico celular. Este modelo, ampliamente aceptado se denomina modelo de plasticidad<sup>22</sup>.



**Figura 3.** Representación esquemática del sistema mitocondrial OXPHOS<sup>23</sup>.

### 2.2.2 Papel de la mitocondria en la señalización celular<sup>24</sup>

Además de la producción de energía, las mitocondrias son esenciales en diversas vías de señalización celular, como la homeostasis del calcio, el estado redox y la apoptosis. Mediante la señalización de calcio entre el citosol y la matriz, las mitocondrias se pueden comunicar con el citosol manteniendo el equilibrio entre la demanda y producción de energía celular, de manera que los iones  $Ca^{2+}$  pueden influir en la síntesis de ATP, ya que estos pueden ingresar en el espacio intermembranoso de las mitocondrias. La mayor parte del  $Ca^{2+}$  intracelular se almacena en el retículo endoplásmico, y cuando éste se activa, libera  $Ca^{2+}$  al citosol, aumentando así la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico. Esta elevada concentración induce microdominios de altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  dentro de la membrana externa de la mitocondria, permitiendo así la captación de  $Ca^{2+}$  mediante la activación del uniportador de calcio mitocondrial.

La señalización redox se produce debido a cambios en el nivel de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y NOS) o cambios en el estado redox de un grupo sensible. La formación de ROS, como consecuencia de que las mitocondrias utilizan oxígeno para sintetizar ATP durante la fosforilación oxidativa, puede causar daño oxidativo a componentes celulares, pero son vitales en muchas vías de señalización. Las ROS mitocondriales son convertidas en  $H_2O_2$  por la enzima superóxido dismutasa en la matriz, de manera que el  $H_2O_2$  más estable difunde a través de la membrana oxidando residuos de tiol en proteínas, funcionando así, como una señal redox entre las mitocondrias y el resto de la célula.

La apoptosis, vía de muerte celular, es producida por dos vías, extrínseca e intrínseca. La apoptosis producida en las mitocondrias es generada por estímulos internos a la célula, como las ROS, y está controlada por proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, que regulan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, de modo que liberan proteínas del espacio intermembranoso mitocondrial y facilitan la activación de caspasas.

### **2.2.3 Papel de la mitocondria en el cáncer**

Se puede decir que hay, al menos, 5 mecanismos concretos en los que la mitocondria está involucrada en el cáncer. Primero, se ha demostrado que un gran número de enfermedades están relacionadas con mutaciones en el mtDNA, principalmente las producidas en la cadena de transporte de electrones (ETC). En segundo lugar, la generación del cáncer y su progresión hacia la malignidad está relacionada con el estrés oxidativo producido por las ROS, que se encuentran en una mayor proporción en comparación con las células sanas. El tercer mecanismo se relaciona con que las mitocondrias están directamente involucradas en la regulación de la muerte celular, incluyendo a la apoptosis y necrosis. En cuarto lugar, mutaciones en genes que codifican enzimas del ciclo de Krebs promueven la transformación maligna de modo que, la acumulación de metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs, tiene efectos procarcinogénicos. Por último, la transcriptasa inversa de la telomerasa se dirige a las mitocondrias en condiciones de estrés oxidativo, preservando las funciones mitocondriales y protegiendo el mtDNA y nDNA del daño oxidativo, evitando así la apoptosis<sup>25</sup>.

### **2.2.4 Papel de la mitocondria en la termogénesis**

La mitocondria tiene un papel esencial tanto en la producción de ATP como en la producción de calor, siendo el sistema OXPHOS el principal determinante de la generación de calor, ya que se libera más energía en forma de calor, que como ATP. La oxidación de un mol de glucosa, que contiene aproximadamente 2871 kJ de energía produce 38 moles de ATP, los cuales representan 1386 kJ ( $\approx 48\%$ ). Los 1503 kJ ( $\approx 52\%$ ) restantes son disipados en forma de calor<sup>26</sup>.

Las temperaturas por encima de los límites fisiológicos inducen estrés oxidativo, y pueden provocar daños en la estructura y función celular, provocando la muerte celular. Chrétien et al. concluyeron que la temperatura de las mitocondrias funcionales es 10 °C mayor que la temperatura fisiológica normal, debido a la actividad de los complejos de la cadena respiratoria, alcanzando su máximo potencial a 48 °C<sup>27</sup>. Sin embargo, estos resultados, contradicen a las leyes de la física térmica, resultando sorprendente la gran diferencia de temperatura entre el citosol y la mitocondria, lo que da lugar a nuevas investigaciones sobre la temperatura real en la mitocondria y su diferencia con la del citosol<sup>28</sup>.

En lo que respecta a las células tumorales, se sabe que éstas presentan una mayor sensibilidad a la temperatura que las células sanas, debido a que, las células cancerosas presentan una menor vascularización, produciéndose una disminución del flujo sanguíneo. Esta reducción en el suministro de sangre limita la capacidad para disipar el calor, dando lugar a un aumento selectivo de la temperatura en el tumor<sup>29</sup>. Debido a esta mayor sensibilidad a la temperatura, una estrategia terapéutica contra el cáncer es la hipertermia, siendo un aspecto importante, estudiar los límites de temperatura aplicados, para no producir un daño celular en el tejido sano circundante.

### **2.2.5 Papel de la mitocondria como diana para tratamientos tumorales**

Las disfunciones en las funciones vitales asociadas a las mitocondrias contribuyen en el desarrollo del cáncer. La producción de energía y metabolitos para el crecimiento tumoral y la generación de ROS en la ETC, son factores esenciales para el desarrollo del tumor, por lo que las alteraciones mitocondriales en las células cancerosas son objeto de estudio para desarrollar tratamientos antitumorales<sup>30</sup>. Los estudios que llevó a cabo Warburg, indicando que las células

tumorales presentan una glucólisis aumentada en comparación con las células sanas, indican que el sistema OXPHOS está disminuido en el cáncer de manera que una estrategia terapéutica podría ser el uso de inhibidores del sistema OXPHOS<sup>31</sup>. Uno de los más utilizados, es la metformina, que inhibe el complejo I mitocondrial y, además, permite reducir la proliferación celular tumoral mediante la disminución de los niveles de insulina, ya que ésta promueve la proliferación celular<sup>32</sup>.

Además, las proteínas involucradas en la regulación de la dinámica mitocondrial son interesantes en el estudio de nuevas estrategias terapéuticas. En los últimos años, se han llevado a cabo estudios en los que se han demostrado que, M-divi-1, un inhibidor de la proteína de fisión mitocondrial Drp1, induce estrés oxidativo y reduce el metabolismo mitocondrial en el cáncer. Durante la fisión mitocondrial, Drp1 interactúa con los receptores en la membrana mitocondrial externa y posteriormente se polimeriza y promueve la constricción y fisión mitocondrial. M-divi-1 se dirige a Drp1 uniéndose y suprimiendo tanto el autoensamblaje de Drp1 en estructuras similares a anillos alrededor de las mitocondrias como su capacidad para catalizar la hidrólisis de GTP. Este inhibidor provoca una rápida formación de mitocondrias interconectadas sin afectar a otras estructuras celulares como el citoesqueleto o el retículo endoplasmático<sup>33</sup>.

Por otro lado, la vía mitocondrial que conlleva a la apoptosis también podría ser una diana terapéutica, debido a que en esta vía hay varios genes y familias de proteínas cuya expresión y función se ven alteradas en células tumorales, como el gen p53 o la familia de proteínas Bcl-2 (compuesta por proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas que mantienen un balance en condiciones normales)<sup>34</sup>.

### **2.3 Hipertermia para el tratamiento del cáncer<sup>35</sup>**

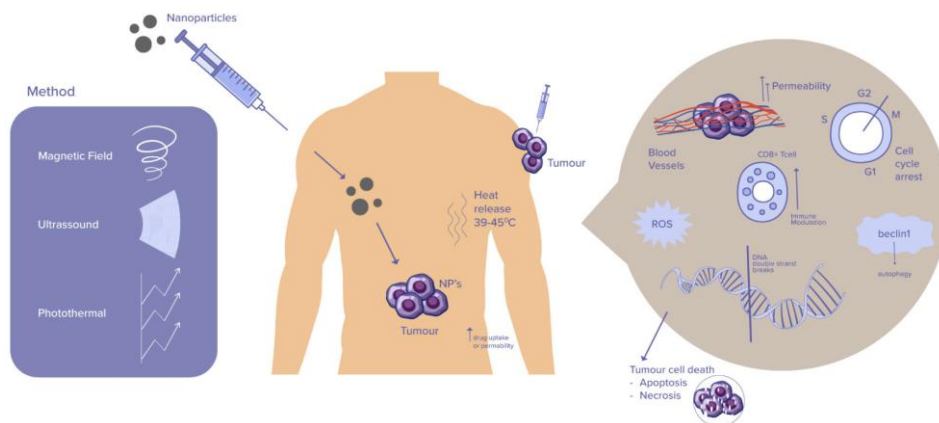
La combinación de la extirpación del tumor y la quimioterapia con o sin radiación es frecuentemente utilizada en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, aún existen ciertas limitaciones, como la toxicidad, los efectos secundarios e incluso la resistencia adquirida al tratamiento. En los últimos años, se están estudiando nuevas terapias, como la inmunoterapia, la terapia génica o las nanoterapias dirigidas, pero debido al alto coste y a que la investigación en estas áreas todavía es incipiente, es conveniente explorar otras alternativas para el tratamiento del cáncer.

Un enfoque prometedor es la hipertermia (HT), utilizada como terapia adyuvante con tratamientos convencionales, como la quimioterapia o la radioterapia. Mediante la HT se consigue calentar el tumor hasta 45 °C, de manera que se induce selectivamente la muerte celular mediante apoptosis o necrosis, en células cancerosas hipóxicas y se aumenta la citotoxicidad de las células inmunitarias contra las células cancerosas objetivo, lo que la hace menos dañina para el tejido sano. Por lo que la HT tiene efectos directos sobre las células tumorales y efectos indirectos mediados por el sistema inmunológico. Existen tres tipos de HT, que se aplican según la etapa y el tipo de cáncer: (i) HT de cuerpo entero, que se aplica en aquellos cánceres que se han ido diseminando por todo el cuerpo; (ii) HT regional, en la que se aplica calor en áreas extensas de tejido; y la (iii) HT local, en la que se aplica calor sobre un área pequeña. Algunos de los métodos más empleados para inducir calor, son la radiación infrarroja, la energía de radiofrecuencia y la energía electromagnética de microondas.

La aplicación de HT genera cambios fisiológicos celulares que, crean un entorno favorable para la aplicación de tratamientos tradicionales contra el cáncer. Es decir, las células tumorales se vuelven más permeables a los medicamentos debido a alteraciones que se producen en la membrana, como la fluidez. A su vez, los niveles intracelulares de iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  se modifican promoviendo la señalización de la muerte celular. Además, el aumento de la permeabilidad de la pared tumoral incrementa la acumulación de fluidos y proteínas en el microambiente tumoral, lo que conduce a un fuerte aumento de la presión del líquido intersticial sobre los vasos sanguíneos, reduciendo así, la perfusión vascular en los tumores.

### 2.3.1 Hipertermia magnética con nanopartículas

Las técnicas de hipertermia descritas anteriormente presentan ciertos efectos secundarios, como ampollas, quemaduras, dolor y crecimiento tisular desregulado. Además, los métodos convencionales de HT local no se consideran del todo efectivos, debido a que no producen una distribución homogénea de la temperatura y causan sobrecalentamiento en las áreas más profundas del tejido canceroso. Una alternativa es, la hipertermia por inducción magnética, empleando nanopartículas magnéticas (MNPs), que puede ofrecer una mayor seguridad, viabilidad y efectividad en la terapia de HT local. Esta técnica se basa en el calentamiento experimentado en las MNPs cuando son irradiadas con un campo magnético alterno. Estas MNPs pueden ser inyectadas directamente en el interior del tumor o acumuladas en el área del tumor mediante la manipulación con un campo magnético alterno<sup>36</sup>, lo que permite su acción local, minimizando los efectos en el tejido sano circundante. Los principales mecanismos de hipertermia relacionados con el cáncer inducen la apoptosis y necrosis (Figura 4), lo que contribuye a la expansión del compartimento intersticial y esto resulta en una mayor porosidad tumoral que facilita la redistribución de MNPs.



**Figura 4.** Mecanismos de hipertermia relacionados con el cáncer mediados por nanopartículas<sup>35</sup>.

Las MNPs más empleadas en la hipertermia son los óxidos de hierro y, particularmente, la maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )<sup>37</sup>, debido a que son biocompatibles, fácilmente metabolizados por el organismo y presentan superficies que pueden ser modificadas para su funcionalización con biomoléculas activas de interés. Además, cuando las MNPs presentan un tamaño  $<20$  nm, pasan de ferromagnéticas a superparamagnéticas, de manera que las partículas individuales se magnetizan y pueden alinearse en presencia de un campo magnético externo, pero pierden su magnetización y se disgregan al retirar el campo. El calor disipado por las MNPs, en presencia de un campo magnético alterno (AMF) se puede generar por dos mecanismos diferentes: por fricción de la nanopartícula con el medio al rotar físicamente para seguir el movimiento del AMF

(relajación de Brown); o mediante la rotación de su momento magnético interno a lo largo de su eje de fácil imanación (relajación de Néel)<sup>38</sup>.

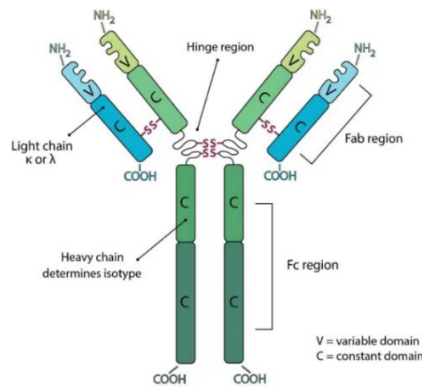
Para poder ser utilizadas en el interior del cuerpo humano, las suspensiones coloidales de MNPs deben presentar una larga estabilidad en medios acuosos. Otros requisitos que deben presentar para su uso en biomedicina son los siguientes: biocompatibilidad, buena biodistribución (evitar ser atrapadas por el sistema reticuloendotelial de forma inmediata), funcionalización específica y naturaleza inerte<sup>37</sup>. En los últimos años, han tenido gran interés las nanopartículas “core-shell” con núcleo magnético revestido con una capa de polímero debido a las ventajas que este recubrimiento presenta debido a su capacidad de encapsular fármacos y modular sus características biofarmacéuticas, propiedades farmacocinéticas y eficacia terapéutica. Además, presentan una elevada estabilidad en fluidos biológicos y hay una amplia disponibilidad de polímeros que pueden ser activados en función de estímulos específicos. Por otra parte, las nanopartículas basadas en polímeros deben presentar unas características fisicoquímicas determinadas en cuanto a tamaño, forma, polidispersidad y características superficiales para llevar a cabo una correcta encapsulación de fármacos y obtener una mejor acumulación dentro de los tumores<sup>39</sup>.

## **2.4 Funcionalización de nanopartículas**

La eficacia como transportadoras de fármacos de las MNPs poliméricas puede mejorarse mediante el llamado *targeting* activo. Éste puede implementarse mediante la unión a receptores sobreexpresados en células diana que están poco expresados o incluso ausentes en células normales. Mediante el *targeting* activo, las MNPs facilitan la entrega de los fármacos en la ubicación deseada, evitando así los tejidos sanos y mejorando la eficiencia terapéutica. La internalización de las MNPs ocurre habitualmente mediante endocitosis mediada por receptor. Los ligandos más utilizados para el *targeting* activo son los anticuerpos, debido a su alta especificidad, diversidad y eficiencia de reconocimiento<sup>40</sup>

### **2.4.1 Anticuerpos**

Los anticuerpos son glicoproteínas que forman parte del sistema inmunitario, producidas por las células B y capaces de reconocer moléculas específicas, denominadas antígenos. La estructura de los anticuerpos consta de dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas mediante puentes disulfuro (Figura 5). La cadena pesada define la clase o isotipo de un anticuerpo y la ligera se define como  $\kappa$  o  $\lambda$  según diferencias en la secuencia polipeptídica. Cada cadena presenta un dominio variable amino terminal y uno o dos dominios carboxilo terminales. Las cadenas ligeras contienen un dominio constante, en cambio, las cadenas pesadas pueden contener tres o cuatro dominios constantes. Por lo general una cadena ligera típica tiene una masa de 25 kDa y una cadena pesada de tres dominios constantes, tiene una masa de aproximadamente 55 kDa. Funcionalmente los anticuerpos se dividen en una región Fab, formada por las cadenas ligeras y un dominio variable y uno constante de la cadena pesada, que está involucrada en el reconocimiento del antígeno. Y una región Fc (fragmento cristalizable) formada por los dominios restantes de la cadena pesada, que lleva a cabo funciones efectoras<sup>41</sup>.

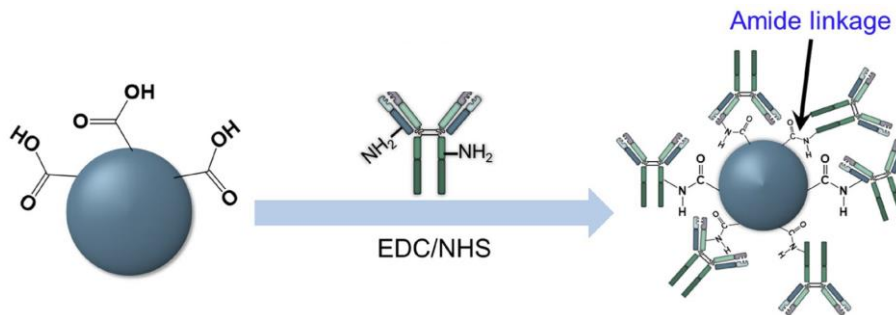


**Figura 5.** Estructura de un anticuerpo<sup>41</sup>.

### 2.4.2 Bioconjugación vía carbodiimida

Las estrategias para la funcionalización de MNPs con anticuerpos pueden llevarse a cabo a través del fenómeno de adsorción, la unión de naturaleza covalente o la unión mediante el uso de moléculas adaptadoras. La inmovilización del anticuerpo en la superficie de las MNPs debe garantizar tanto la cantidad adecuada de anticuerpos por MNPs como la orientación apropiada del anticuerpo.

Una de las estrategias más empleadas es la conjugación covalente a través de la reacción de las aminas primarias de los anticuerpos con grupos carboxilo incorporados a la superficie de las MNPs (Figura 6). Para ello, previamente los grupos carboxilo de las MNPs deben ser activados mediante la adición de agentes de entrecruzamiento, siendo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) el más utilizado. Para una mayor eficiencia del acoplamiento también se puede añadir N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), permitiendo así la formación de la amida a temperatura ambiente<sup>40</sup>.



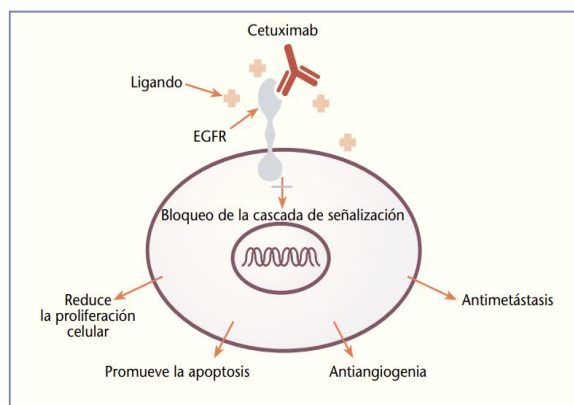
**Figura 6.** Esquema de la conjugación de nanopartículas con grupos terminales -COOH con anticuerpos por el método de la carbodiimida<sup>40</sup>.

### 2.4.3 Cetuximab en la terapia del cáncer

Cetuximab es el primer anticuerpo monoclonal de la subclase IgG1 aprobado en 2004 por la Administración de Alimentos y Medicación (FDA) para uso clínico, que se dirige al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para inhibir la señalización de EGF en las células cancerosas.

La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) está formada por cuatro tirosinas quinasas transmembrana (EGFR1/ErbB1, Her2/ErbB2, Her3/ErbB3 y Her4/ErbB4) y 13 ligandos polipeptídicos secretados. Los EGFR están sobreexpresados en muchos tumores sólidos, incluidos los de mama y su activación estimula el crecimiento y metástasis tumoral, la

proliferación, la angiogénesis, la invasión y la reparación celular. Esta sobreexpresión de EGFRs está asociada con un peor pronóstico y, además, se reconoce que existe un potencial de desregulación de la señalización de EGFR1 en los tumores a través de varios mecanismos alternativos, incluyendo mutaciones de EGFR1, aumento de la expresión de ligandos y heterodimerización con otros EGFRs, por lo que cetuximab inhibe la activación de la tirosina quinasa del receptor mediada por el ligando al unirse con alta afinidad a EGFR1. También media la desregulación del receptor a través de la dimerización inducida por el anticuerpo, lo que resulta en la inhibición del crecimiento<sup>42</sup>. Además, promueve la apoptosis y ejerce una actividad antimetastásica y antiangiogénica (Figura 7)<sup>43</sup>.



**Figura 7.** Actividades antitumorales propuestas de cetuximab<sup>43</sup>.

Aunque cetuximab ha sido aprobado para uso clínico, hay ciertos pacientes que son resistentes debido a la activación o sobreexpresión de vías alternativas, por lo que un enfoque prometedor es el uso de nanopartículas funcionalizadas con cetuximab<sup>44</sup>.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fin de máster es estudiar el efecto de la hipertermia en líneas tumorales procedentes de cáncer de mama como una posible estrategia terapéutica de forma individual o combinada con otras terapias. Para ello los objetivos específicos que se plantean son los siguientes:

1. Estudiar la expresión génica de distintos genes implicados en la reprogramación metabólica asociada a la transformación tumoral o en otras funciones biológicas, en especial aquellas relacionadas con la mitocondria, tras el tratamiento de hipertermia.
2. Evaluar el efecto de la combinación de la hipertermia y el uso de fármacos como posible estrategia terapéutica.
3. Analizar el efecto de la hipertermia sobre la organización del sistema OXPHOS en líneas celulares procedentes de cáncer de mama.
4. Sintetizar MNPs para su posterior conjugación con cetuximab mediante el método de carbodiimida de dos pasos utilizándose dos condiciones diferentes.
5. Comprobar la presencia de cetuximab y su correcta orientación en las MNPs mediante técnicas de caracterización y gel de electroforesis SDS-PAGE.
6. Determinar la capacidad de las MNPs conjugadas a cetuximab para unirse selectivamente a células de cáncer de mama que sobreexpresan EGFR (MDA-MB-468) en comparación con aquellas que expresan niveles bajos de EGFR (MDA-MB-231).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivos celulares

#### 4.1.1 Líneas celulares<sup>45,46</sup>

En este trabajo se han empleado tres líneas celulares tumorales humanas procedentes del tejido mamario, obtenidas comercialmente:

**-MCF7 triple positiva:** línea celular de cáncer de mama de subtipo luminal A, que a diferencia de la de subtipo luminal B, es menos agresiva. Además, se caracteriza por expresar niveles considerables de receptores de estrógeno y progesterona, pero niveles bajos del factor de crecimiento HER2. En cuanto a la expresión de EGFR, presenta niveles muy bajos de dicha proteína.

**-MDA-MB-468 triple negativa:** línea celular que no presenta receptores para estrógeno y progesterona, ni sobreexpresa el factor de crecimiento HER2. Clasificada como basal A, debido a que está enriquecida con marcadores basales. Presenta una sobreexpresión de los niveles de EGFR.

**-MDA-MB-231 triple negativa:** línea celular altamente invasiva que no presenta receptores para estrógeno, progesterona ni sobreexpresa el factor de crecimiento HER2. Clasificada como basal B, ya que sobreexpresa genes asociados con características tumorales invasivas y agresivas. Presenta una expresión menor de EGFR en comparación con la línea MDA-MB-468.

#### 4.1.2 Medio de cultivo

Para el mantenimiento de las líneas celulares el medio de cultivo empleado es el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa (Gibco™). Dicho medio contiene 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y se suplementa con un 10 % de SFB y 1 % de antibiótico (estreptomina (5 µg/mL) y penicilina G 5000 U/mL).

#### 4.1.3 Mantenimiento de los cultivos celulares

Se emplean campanas de flujo laminar (Nuair), en cuyo interior se lleva a cabo el trabajo con cultivos celulares. Antes de proceder a trabajar en la campana, ésta debe permanecer un tiempo con luz UV, y después debe limpiarse con etanol al 70%, así como todo el material introducido (puntas de pipetas, pipetas, gradillas...). Los medios de cultivo y los reactivos que se utilicen deben introducirse previamente en el baño de agua (Selecta) a 37 °C.

Todas las líneas celulares se cultivan de manera rutinaria en placas de Petri de 35, 60, 100 y 145 mm (TPP) y se mantienen en un incubador con 5 % CO<sub>2</sub> que se encuentra a 37°C (Nuair CO<sub>2</sub> Air-Jacketed Incubator) y proporciona las condiciones óptimas para el crecimiento y prevención de la contaminación de cultivos celulares. Cada 2 o 3 días se diluyen o se dividen en dos o más placas, dependiendo de la confluencia que alcanzan las células. Para ello se retira el medio de cultivo de las placas, se hace un lavado con PBS (tampón fosfato salino, GIBCO™) para eliminar cualquier resto del medio de cultivo, posteriormente, se añade tripsina-EDTA (0,05% tripsina, 0,01% EDTA en PBS) para permitir que las células se separen de la superficie y, finalmente, se retira la tripsina y se incuba la placa durante 5-10 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se añade una cantidad de medio de cultivo a la placa para recoger o repartir las células en nuevas placas.

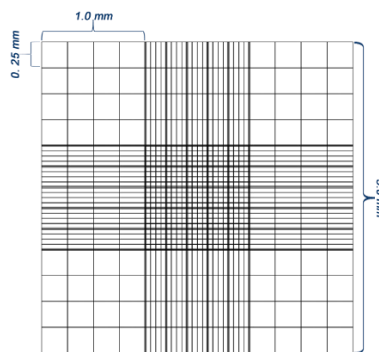
#### 4.1.4 Congelación y descongelación de células

La congelación de células se lleva a cabo en tubos criogénicos. Para ello, en primer lugar, las células son tripsinizadas y recogidas añadiendo PBS al 10% de SFB (suero fetal bovino). Después se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante, de modo que el pellet se resuspende en medio DMEM y se transfiere a un tubo criogénico al que se añade DMSO (dimetilsulfóxido), un agente crioprotector, a una concentración final del 10%. Finalmente, los tubos criogénicos se congelan a -80 °C, utilizando un contenedor para la crioconservación de células que contiene isopropanol y permite una congelación gradual de las células (1 °C/min).

Para la descongelación de células, los tubos criogénicos se sacan del congelador y se atemperan a 37 °C añadiendo medio de cultivo caliente, después se pasa el contenido del tubo criogénico a una placa de cultivo de 100 mm de diámetro completando hasta 10 mL con medio de cultivo.

#### 4.1.5 Contaje y determinación de la viabilidad celular

Para realizar el recuento celular se emplea la cámara de Neubauer o Hematocitómetro, que es un grueso portaobjetos de cristal dividido en 3 secciones, la sección media presenta un rayado fino formado por una cuadrícula de 3 mm x 3 mm. En esta sección se encuentran 4 cuadrantes identificables al microscopio, divididos cada uno de ellos en un conjunto de 4 x 4, observándose en la parte central un cuadro de 1 x 1 mm dividido en 25 cuadrantes de 0,2 x 0,2 mm, según se muestra en la Figura 8. Los 4 cuadrantes de los extremos son utilizados para el recuento celular.



**Figura 8.** Dimensiones de la cámara de Neubauer<sup>47</sup>.

El procedimiento del recuento celular es el siguiente: las células se recogen por tripsinización, se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en medio de cultivo, tomándose una alícuota de 50 µL a la que se añade 50 µL de azul tripano, que permite distinguir entre células viables y no viables. Al tener la suspensión de células mezcladas con azul de tripano, se añade una cantidad a la cámara de Neubauer y se coloca en el microscopio para realizar el recuento celular. La fórmula empleada para calcular la concentración de células viables es la siguiente:

$$\text{Concentración células viables} \left( \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ cel viables} \cdot \text{factor de dilución} \cdot 10^4}{\text{n}^{\circ} \text{ cuadrantes}}$$

## **4.2 Tratamientos de hipertermia**

Para llevar a cabo los distintos estudios, las células se someten previamente a distintos tratamientos a temperaturas superiores a 37 °C, introduciendo las placas Petri en un incubador (SANYO CO<sub>2</sub> Incubator MCO-5AC) a las temperaturas correspondientes durante 1 hora. Tras el tratamiento, las células se recogen por tripsinización y se lavan dos veces con PBS. Los pellets celulares se almacenan a -80°C hasta su uso (extracción de RNA, mitocondrias o proteínas).

## **4.3 Análisis de la expresión génica**

### **4.3.1 Extracción de RNA total con TRizol™**

Una vez obtenidos los pellets celulares tras los tratamientos de hipertermia a 37, 43, 45 y 47 °C de las tres líneas celulares estudiadas, se procede a extraer el RNA total mediante el reactivo TRizol™ (Invitrogen™), que contiene tiocianato de guanidinio, un potente desnaturante de proteínas, y fenol, un disolvente orgánico. Este reactivo permite mantener la integridad del RNA, romper las células y desnaturar las proteínas. Para ello, se añaden 300 µL de TRizol a los eppendorf que contienen los pellets celulares, resuspendiendo, y se dejan incubando en hielo durante 5 minutos. Después, se añaden 60 µL de cloroformo con posterior agitación vigorosa, se dejan incubando durante 2-3 minutos en hielo y se centrifuga 15 minutos a 12000 g y 4 °C. Tras la centrifugación se observan 3 fases, la fase acuosa, que contiene RNA, la interfase, que contiene DNA y la fase orgánica, que contiene proteínas y lípidos. Por lo que se recoge la fase acuosa y se añaden 150 µL de isopropanol para precipitar el RNA. Seguidamente, se incuban las muestras 10 minutos en hielo, se centrifugan durante 10 minutos a 12000 g y 4°C, se descarta el sobrenadante y se realiza un lavado añadiendo 300 µL de etanol al 75 %. Posteriormente se agitan las muestras en un agitador vórtex y se centrifugan 5 minutos a 7500 g y 4 °C. Seguidamente, se descarta el sobrenadante y se dejan secar los pellets de RNA al aire y a temperatura ambiente. Una vez secos se añaden 20 µL de H<sub>2</sub>O Gibco® y se incuban los pellets en un termoblock a 55 °C con agitación durante 10 minutos y a 450 rpm para favorecer la disolución del RNA.

### **4.3.2 Cuantificación de RNA total por espectrofotometría**

Con el objetivo determinar la concentración y pureza del RNA total aislado, se utiliza un espectrofotómetro Nanodrop®, en el que se adicionan 2 µL de muestra en el pedestal del equipo, obteniéndose así la concentración en ng/µL y la pureza como relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm ( $Abs_{260}/Abs_{280}$ ), teniendo en cuenta que  $Abs_{260}/Abs_{280} \sim 2$  indica que la muestra presenta RNA puro.

### **4.3.3 Síntesis de cDNA a partir de RNA**

Se lleva a cabo la retrotranscripción de los mRNAs maduros con cola poliA en su extremo 3' a cDNA monocatenario a partir del RNA total extraído, utilizando el kit comercial NZY First-Strand cDNA Synthesis. Para ello se prepara una mezcla con las muestras de RNA y los reactivos del kit comercial según se muestra en la Tabla A1, Anexo I, siendo el volumen final 20 µL.

Después se agita la muestra y se incuba durante 10 minutos a 25 °C en el termociclador (Biometra), pasado este tiempo se incuba durante 30 minutos a 55 °C y posteriormente se añade 1 µL de NZY RNase H, que elimina el RNA unido al cDNA. Finalmente, se incuba la muestra 20 minutos a 37 °C en el termociclador y los cDNA monocatenarios sintetizados se almacenan a -80 °C.

#### 4.3.4 Análisis de expresión por qPCR

Para estudiar la expresión génica se lleva a cabo una qPCR empleándose el kit comercial PowerUp™ SYBR™ Green (Thermo Scientific). Para ello, en una placa de 96 pocillos se añaden los reactivos necesarios para la qPCR (Tabla A2, Anexo I), siendo el volumen final 10 µL (9 µL de la mezcla de los reactivos y 1 µL de cada muestra de cDNA monocatenario diluido 1/5 en agua estéril). Hay que tener en cuenta que el procedimiento se debe realizar con poca cantidad de luz y en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones. Para cada muestra se realizan tres triplicados biológicos (n=3) para el estudio de los distintos genes normalizados con los datos obtenidos de la actina, gen housekeeping utilizado como control interno, cuya expresión se mantiene constante en comparación con otros genes que pueden ser regulados de manera más viable en respuesta a condiciones específicas.

Una vez añadidos los reactivos de la qPCR y la muestra de cDNA monocatenario, se centrifuga la placa y finalmente se introduce en el termociclador en el que se amplifican las muestras siguiendo un programa estándar de qPCR: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos e hidridación a 60 °C durante 1 minuto). Finalmente se valora el Ct o ciclo en que se supera el umbral de fluorescencia marcado por el equipo de cada muestra, obteniéndose el nivel de expresión de la muestra respecto al control mediante las siguiente formulas:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen blanco}} - Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{control}} - (Ct_{\text{gen blanco}} - Ct_{\text{gen referencia}})_{\text{muestra}}$$
$$\text{Nivel de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

#### 4.4 Ensayo MTT para medir citotoxicidad

Dicho ensayo se basa en que el bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), perteneciente a la familia de las sales de tetrazolio soluble en agua y con color amarillo, es reducido por deshidrogenasas mitocondriales principalmente, en formazán, un compuesto perteneciente a la familia de formazanos de color violeta e insoluble en agua, que precipita en forma de cristales. Estos cristales disueltos en DMSO presentan un máximo de absorción a 550 nm. La medida de la absorbancia es, por consiguiente, directamente proporcional al número de células viables. Las deshidrogenasas mitocondriales son las que principalmente actúan sobre el MTT, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares, de modo que las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT en formazano.

Para llevar a cabo el ensayo se siembran las células en placas de 96 pocillos y se deja la placa incubando a 37 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se llevan a cabo dos aproximaciones metodológicas: (i) se realizan incubaciones a 43 y 45 °C durante 1 hora, después se añaden los

inhibidores a distintas concentraciones y se deja incubando la placa a 37 °C durante 48 horas; (ii) se añaden los inhibidores, dejando la placa incubando 48 horas a 37 °C y posteriormente se realizan las incubaciones, dejando la placa finalmente incubando 24 horas a 37 °C.

Una vez añadido los inhibidores, realizado las incubaciones y haber dejado la placa incubando el tiempo necesario, se absorbe el medio, se añaden 200 µL de medio de cultivo sin inhibidores a cada pocillo y se añaden 50 µL de MTT (5 mg/mL), sin retirar el medio. Posteriormente se deja incubando la placa de 1 a 6 horas a 37 °C en oscuridad, hasta que se observe la formación de cristales. Transcurrido este tiempo, se quita el medio y se añaden 200 µL de DMSO para así, disolver los cristales. Finalmente se mide la absorbancia a 550 nm, y ésta se relaciona con la viabilidad, utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Biochrom™ EZ Reader 400 Microplate Reader – Fisher scientific). Los datos son obtenidos mediante el software ADAP. Por lo que se obtienen medidas del índice viabilidad de las células en cada pocillo comparando la absorbancia de cada tratamiento con la de las células sin tratar, como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de viabilidad} = \frac{\text{Abs}_{550}(\text{células tratadas})}{\text{Abs}_{550}(\text{células sin tratar})}$$

Además, para llevar un seguimiento más exhaustivo de cómo la temperatura y la adición de los inhibidores puede afectar en la viabilidad de las células, se toman fotografías con un generador de imágenes de células fluorescentes (Zoe™ Fluorescent Cell Imager de Biorad).

#### **4.5 Extracción y purificación de mitocondrias**

Tras los tratamientos de hipertermia a 37, 45 y 47 °C de las tres líneas celulares (según como se explica en el apartado 3.2), se procede a extraer y purificar las mitocondrias. Una vez descongelados los pellets, éstos se resuspenden en buffer hipotónico (83 mM sacarosa, 10 mM MOPS, pH=7,2). Se debe ajustar el volumen de buffer hipotónico según el volumen de células (100 µL de pellet de células en 700 µL de buffer hipotónico aproximadamente). Se incuban los pellets resuspendidos en el buffer hipotónico durante 2 minutos y se homogeniza mediante 10 buenos “pops”. Seguidamente se añade un volumen de buffer hipertónico (250 mM sacarosa, 30 mM MOPS, pH=7,2) se mezcla y se centrifuga durante 5 minutos a 1000 g y 4 °C para así, eliminar núcleos y células que han quedado sin romper. Después, se recoge el sobrenadante de cada muestra en dos eppendorfs y se centrifuga durante 2 minutos a 9000 g y 4 °C. Los pellets obtenidos se resuspenden en medio A (10 mM Tris-HCl, pH=7,4, 0,32 M sacarosa, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), juntando el contenido de los dos eppendorfs en uno, y se centrifuga de nuevo durante 5 minutos 1000 g y 4 °C. Una vez eliminado el medio de lavado, la fracción mitocondrial se resuspende en medio BN sample buffer (50 mM NaCl, 50 mM imidazol/HCl, 2 mM ácido 6-aminohexanoico, 1 mM EDTA, pH=7,0) para que la concentración final de proteínas quede en torno a 10 mg/mL. Seguidamente se añade digitonina al 10% para que quede en una proporción de 4 g de digitonina por g de proteína mitocondrial (0,4 mL/mL suspensión mitocondrial), la digitonina es una solución detergente utilizada para lisar mitocondrias y permite observar la formación de SCs. Posteriormente, se incuban las muestras en hielo durante 5 minutos y por último se centrifuga durante 25 minutos a 13000 rpm y 4 °C y se recoge el sobrenadante.

## **4.6 Análisis de complejos mitocondriales**

### **4.6.1 Electroforesis en gel Blue Native**

Una vez extraídas las mitocondrias y obtenidos los lisados celulares, como se explica en el apartado 3.5, se lleva a cabo el análisis de proteínas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida Blue Native (BN-PAGE, siglas del inglés Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis). Es una técnica optimizada que se basa en la extracción de los complejos multiproteicos del sistema OXPHOS de las membranas mitocondriales empleando detergentes neutros suaves y separación electroforética en condiciones nativas. Además, se utilizan una combinación de buffers que mantienen las interacciones entre los componentes de los complejos individuales y de los supercomplejos. Para cuantificar las cantidades de enzimas activas completamente ensambladas, el BN-PAGE suele combinarse ya sea con tinción de Coomassie, Western blot (WB) e inmunodetección de los complejos individuales de OXPHOS utilizando anticuerpos contra subunidades estructurales específicas, o con experimentos de actividad en gel (IGA), basados en ensayos histoquímicos para los complejos I, II, III, IV y V <sup>48</sup>.

Tras añadir el Azul de Coomassie G-250 (5% en 0,75 M ácido aminocaproico) al sobrenadante obtenido en el apartado 4.5, el gel BN-PAGE se coloca en el soporte y se añade el buffer del ánodo (50 mM Bis-Tris, pH=7,0) y el buffer del cátodo A (50 mM Tris, 15 mM Bis-Tris pH=7,0 (4 °C), 0.02% G-250)). Posteriormente, se cargan los geles, añadiendo unos 10 µL de muestra en cada calle para el WB y 12,5 µL para el ensayo de actividad en gel (correspondientes a unos 60 a 80 µg de proteína mitocondrial). Se deja el gel correr a 80 V durante 30 minutos, después se sube el voltaje a 150 V y se deja correr durante otros 30 minutos. Pasado este tiempo y cuando el frente de tinción esté en medio del gel, se elimina el buffer del cátodo A y se adiciona en su lugar, el buffer del cátodo B (50 mM Tris, 15 mM Bis-Tris pH=7,0 (4 °C), 0.002% G-250) que presenta 10 veces menos colorante que el cátodo A, lo que permite una mayor visualización de los complejos proteicos. Finalmente se dejan correr los geles 1 hora y 30 minutos a 155 V. Todo el procedimiento debe realizarse en cámara fría a 4 °C.

### **4.6.2 Ensayo de actividad en gel (IGA)**

Tras llevar a cabo la electroforesis, y por lo tanto haber separado los complejos y SCs de la cadena respiratoria se realiza un ensayo de actividad en gel del complejo I (NADH deshidrogenasa). Primero el gel debe colocarse en una caja y se incuba a temperatura ambiente y con agitación en la disolución correspondiente para estudiar el complejo I (5 mM Tris-HCl, pH=7,4, 0.1 mg/ml NADH, 2.5 mg/ml NBT), empezando a mostrarse la actividad pocos minutos después y pudiendo desarrollarse durante varias horas. Para detener la reacción, una vez las bandas tienen una intensidad adecuada, se retira la disolución y se fija el gel añadiendo una disolución 40% metanol y 10% ácido acético y se documenta mediante fotografía.

### **4.6.3 Ensayo Western Blot**

#### **4.6.3.1 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF**

La transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), se realiza mediante electrotransferencia húmeda, utilizando el sistema Mini Trans-Blot® Cell de Bio-Rad. Para ello se recorta un pedazo de membrana de PVDF, se activa

con metanol durante 10 segundos, se lava varias veces con agua destilada, y se equilibra en el tampón de transferencia BSN (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%(v/v)), sumergiéndose el gel en el mismo tampón de transferencia. Posteriormente se recortan 4 papeles Whatman que también son sumergidos en el tampón de transferencia. A continuación, se procede a montar el sándwich que posteriormente se encaja en el soporte que tiene los electrodos y se introduce en la cubeta como se indica en las instrucciones del fabricante. La transferencia se lleva a cabo en cámara fría a 80 V durante 2 horas a 4 °C y en agitación constante con un imán a 500 rpm. Una vez acabada la transferencia, las proteínas se fijan a la membrana con metanol y por último se lava la membrana con PBS-T (PBS + 0.1 % Tween 20) y se conserva sumergida en PBS-T a 4 °C hasta su uso.

#### **4.6.3.2 Inmunodetección de proteínas**

En primer lugar, debe bloquearse la membrana mediante una incubación en una disolución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. A continuación, se elimina el exceso de agente bloqueante mediante varios lavados cortos con PBS-T y se procede a realizar la incubación con el anticuerpo primario. Para ello se diluye el anticuerpo primario en la proporción adecuada en 10 mL de PBS-T con 0,1 % de leche en polvo (esta cantidad es variable y depende del anticuerpo a usar) y se incuba la membrana con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación. Después, se retira la disolución que contiene el anticuerpo primario y se realizan dos lavados de 10 minutos con PBS-T, para así poder incubar la membrana con el anticuerpo secundario (anti IgG de ratón o conejo, según el origen biológico del anticuerpo primario y conjugado con peroxidasa de rábano) cuya disolución se ha realizado en las mismas condiciones que el anticuerpo primario y en la proporción adecuada. Esta vez se incuba la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. Finalmente se elimina el anticuerpo secundario y se realizan varios lavados con PBS-T. En la Tabla A4 del Anexo I se muestran los anticuerpos utilizados (primarios y secundario).

Para la detección de proteínas se mezclan los reactivos del kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, añadiendo 800 µL de cada uno sobre la membrana, de forma que quede repartida por toda la membrana y se deja incubar durante 1 minuto. Seguidamente se coloca la membrana previamente escurrida entre dos plásticos y se revela en el equipo Amersham™ Imager 680. Al acabar el revelado la membrana se puede reutilizar, para ello ésta se sumerge en una solución stripping (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 1 M, pH 6,7), se incuba durante 30 minutos a 58 °C y se lava varias veces la membrana con PBS-T.

#### **4.7 Extracción de proteínas totales**

La extracción de proteínas totales se lleva a cabo a partir de los pellets obtenidos tras los tratamientos de hipertermia durante 1 hora a 37, 43, 45 y 47 °C. Para ello se resuspenden los pellets en el volumen adecuado de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH=7,4, NaCl 50 mM, Triton X100 1%, desoxicolato de sodio 0,5 %, EDTA 5mM), que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets de Roche) y se trasvasa a un tubo eppendorf. Seguidamente, se incuba en una rueda giratoria 15 minutos a 4 °C y posteriormente se centrifuga durante 15 minutos a 13000 rpm y 4 °C. Finalmente se recupera el sobrenadante y se guarda a -80 °C hasta su uso.

## **4.8 Análisis de proteínas totales**

### **4.8.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

El método de Bradford es un método de ensayo cuantitativo, basado en la unión del compuesto Azul de Coomassie G250 a una muestra de proteína, y mediante la medición de absorbancia a 595 nm se construye una recta de calibrado con cantidades conocidas de una proteína, normalmente seroalbúmina bovina (BSA, Bovine Serum Albumin)<sup>49</sup>.

La recta de calibrado se construye a partir de BSA de concentración 1 mg/mL, para ello se preparan patrones con concentraciones de BSA 0, 1, 3, 5, 10 y 20 µg/mL. En cuanto a las muestras, se adicionan 3 µL de muestra, tanto a los patrones como a las muestras, adicionándose, además, 200 µL del reactivo de Bradford (Bio-rad Protein Assay) y la cantidad de agua destilada necesaria para tener un volumen final de 1 mL. Las medidas de absorbancia de los patrones y de las muestras se miden a 595 nm en un espectrofotómetro. Con la recta de calibrado obtenida se interpolan los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras para calcular la concentración de proteína presente en éstas.

### **4.8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE**

La separación electroforética de las proteínas que conforman los extractos celulares totales se lleva a cabo en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE, utilizando el sistema Mini Protean III de BioRad. En primer lugar, se vierte el gel separador entre los dos cristales que forman el soporte dejando unos 2 cm para el gel concentrador. En la Tabla A5, Anexo I se encuentra la composición de las disoluciones para la preparación de los geles separador y concentrador al 12,5 % de acrilamida. Tras la polimerización del gel se llena la cubeta con tampón de electroforesis 1X preparado a partir del tampón de electroforesis 10X (Tris-HCl 250 mM, glicina 1,92 M, SDS 1%(p/v)) y se cargan las muestras mezcladas con el tampón de carga 4X (Glicerol 20 %, Tris- HCl 0.16 M pH 6,8, EDTA 20 mM, SDS 8 % (p/v), azul de bromofenol 0.4 % (p/v), β-mercaptoetanol 4 % (v/v)). El primer pocillo se carga con el marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein™ Standards (BioRad). La electroforesis se lleva a cabo a una intensidad constante de 10 mA por gel hasta que las muestras lleguen al gel separador y posteriormente se sube la intensidad a 20 mA/gel hasta que las muestras lleguen al final del gel. Posteriormente se lleva a cabo la transferencia de proteínas a membranas de PVDF y la inmunodetección de proteínas según se describe en los apartados 4.6.3.1 y 4.6.3.2. En la Tabla A6, Anexo I, se muestran los anticuerpos utilizados, empleándose la tubulina para normalizar.

## **4.9 Análisis estadístico**

El análisis de los datos obtenidos en los diferentes ensayos se lleva a cabo mediante un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) y el test de Dunnett para comparar cada uno de los tratamientos con el control o el test de Tukey para realizar comparaciones múltiples, en el software GraphPad Prism.

## 4.10 Síntesis de nanopartículas

### 4.10.1 Síntesis de los núcleos magnéticos

Los núcleos magnéticos de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  fueron sintetizadas por coprecipitación en combinación con un tratamiento hidrotérmal realizado a 120 °C durante 15 horas siguiendo el protocolo de Gu *et. al.*<sup>50</sup> Este procedimiento incluye un tratamiento de opsonización con  $\text{HNO}_3$  para aumentar la carga superficial de las partículas y la re-dispersión en HCl diluido a pH=2 para obtener un ferrofluido.

### 4.10.2 Revestimiento de los núcleos magnéticos con polímero

Las nanopartículas magnéticas core-shell se obtuvieron mediante recubrimiento de los núcleos magnéticos con un copolímero bloque (P4VP-b-P(MPEGA-co-RhodPEGMA-co-carboxylic PEGMA)) funcionalizado con un fluoróforo (rodamina) y con grupos reactivos carboxilo (-COOH) aptos para la conjugación de las nanopartículas con anticuerpos (Figura A1, Anexo I). El copolímero fue sintetizado mediante polimerización radical por transferencia de átomo (ATRP)<sup>51</sup> en el grupo de acuerdo con Gu *et. al.*<sup>47</sup>. Se prepararon varias muestras de MNPs core-shell con distintas proporciones de polímero, y se seleccionó la que presentaba mejores propiedades de estabilidad y ausencia de agregación. El procedimiento se puede describir como sigue: en un vial se adicionan: 7,65 mL  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ; 5,35 mL de una disolución de polímero (18,7 mg polímero/mL) en HCl 0,05 M; y 7 mL de la mezcla de ferrofluido ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) con 11,80 mg ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )/mL, que es previamente sonicada (Hielscher Ultrasonics, Ciclo 0,5; Amplitud 40%) durante 10 minutos y filtrada por un filtro de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  (Milipore). A continuación, se vuelve a sonicar la muestra obtenida, durante 2 minutos y se adiciona NaOH 0,25 M gota a gota, para elevar gradualmente el pH hasta 7,36. Una vez elevado el pH, se vuelve a sonicar el ferrofluido durante 4 minutos y se filtra primero por un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y después por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Milipore). Finalmente, las MNPs se purifican mediante separación magnética empleando una columna LS (Miltenyi Biotec) y un separador magnético (Miltenyi Biotec), de forma que las MNPs se quedan retenidas en la columna, para lavarlas y luego recuperarlas con 2x1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ.

Para determinar la concentración de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  en la muestra final se lleva a cabo un análisis elemental, el procedimiento consiste en digerir 50  $\mu\text{L}$  de la muestra de MNPs en 1 mL de HCl concentrado. La concentración de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  se determina mediante Espectroscopía de Emisión Atómica en plasma ICP (ICP-OES) Thermo Scientific i CAP PRO XP Duo en el servicio de análisis químico-SAI de la Universidad de Zaragoza. La concentración final de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  de las MNPs revestidas con polímero fue de 3,75 mg/mL.

### 4.10.3 Conjugación de las MNPs con el anticuerpo anti-EGFR Cetuximab

Lo siguiente que se lleva a cabo es la conjugación del anticuerpo a las MNPs empleando el método de carbodiimida de dos pasos, teniendo en cuenta estudios previos del Grupo de acuerdo con Puertas *et. al.*<sup>52</sup> modificado en el TFM de Gustavo Lou Ramírez<sup>53</sup>. En primer lugar, se activan los grupos carboxilo de las MNPs mediante la adición de EDC formándose así un aducto de O-acilurea. Este aducto no reacciona específicamente con los grupos amino del anticuerpo y además puede dar lugar a una N-acilurea, que no es reactiva, por tanto, se adiciona NHS para dar lugar a un éster activo intermedio que posteriormente reacciona con los grupos amino con una mayor especificidad. El mecanismo de la reacción se muestra en la Figura A2, Anexo I.

El procedimiento se puede describir como sigue: se sonicar las MNPs revestidas con el copolímero, se añade la cantidad necesaria de MES 0,1 M para ajustar el pH a un valor de 6,1 y la concentración final del buffer a 10 mM, y se vuelve a sonicar; se toman dos alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  de las MNPs, de forma que se tratan independientemente, a cada alícuota se adiciona las cantidades correspondientes de disoluciones de EDC (Sigma-Aldrich, pureza: 98%) y NHS (Indagoo, pureza: 98%) 400 mM, para que las proporciones sean de 2  $\mu\text{mol}$  y 3  $\mu\text{mol}$  respectivamente por cada mg de MNPs, y se incuban durante 45 minutos en agitación a temperatura ambiente; finalmente se vuelve a sonicar la muestra y se purifica por retención en una columna magnética y re-dispersión en 1500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ.

A continuación, se adiciona la cantidad necesaria de MES 0,1 M para ajustar el pH a un valor de 6,1 y la concentración final del buffer a 10 mM, y se vuelve a sonicar la muestra. Una vez ajustado el pH, se incuban ambas alícuotas de MNPs con el anticuerpo (250  $\mu\text{g}$  anticuerpo por mg de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) monoclonal cetuximab (Erbix, 5 mg/ml) durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. El anticuerpo es previamente centrifugado empleando los filtros Amicon Ultra 0,5 mL centrifugal filters de Sigma-Aldrich (en las condiciones que se muestran en la Tabla A7, Anexo I), para así eliminar compuestos que puedan interferir en la reacción. Finalmente, se bloquea el exceso de grupos reactivos, añadiendo 250  $\mu\text{L}$  de glicina (PanReac AppliChem, pureza: 99,5 %) 25 mM, durante 30 minutos en agitación. Finalmente, las MNPs se separan magnéticamente recogéndolas en 1500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ y adicionando posteriormente MES 0,1 M. Las concentraciones de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  determinadas por mediante Espectroscopía de Emisión Atómica en plasma ICP-OES de ambas alícuotas fueron 0,76 (1ª alícuota) y 1,48 (2ª alícuota) mg/mL.

Para poner a punto la conjugación, se preparan dos muestras conjugadas, una activada con sulfo-NHS y la otra con NHS, utilizando el mismo procedimiento que se describe anteriormente, pero en este caso, los tiempos de incubación se realizan a 37 °C para favorecer la reacción y el bloqueo se lleva a cabo utilizando polietilenglicol (PEG). Estas dos muestras solo se utilizan en el ensayo de detección del anticuerpo mediante electroforesis el gel SDS-PAGE antes de añadir el PEG, debido a que tras la reacción de bloqueo se produjo una agregación de las MNPs.

## **4.11 Caracterización de nanomateriales**

### **4.11.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)**

Se llevan a cabo mediciones de tamaño hidrodinámico y potencial zeta de las MNPs empleando la técnica de dispersión de luz dinámica, DLS (Dynamic Light Scattering), una técnica de análisis espectroscópico no destructiva que permite medir la distribución de tamaños de partícula en un rango de 1 a 1000 nm en suspensiones líquidas a partir de la intensidad de luz láser dispersada por las nanopartículas, de forma que la detección de la luz dispersada en interacciones luz-materia proporciona información sobre las propiedades físicas de la muestra. Las partículas suspendidas en un líquido experimentan un movimiento aleatorio: el movimiento browniano. Generalmente la medición por DLS se basa en el principio del efecto Doppler, que establece que la frecuencia de la luz dispersada por una partícula se desplaza dependiendo de la velocidad de la partícula. Las partículas pequeñas se mueven más rápidamente en el medio que las grandes, lo que resulta en una señal de intensidad más variable y rápida<sup>54</sup>.

Las medidas de DLS (Tabla A8, Anexo I) se llevan a cabo a 25 °C en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) equipado con un láser HeNe laser (633 nm), en el que se introduce la muestra diluida (dilución 1:20) en  $\text{H}_2\text{O}$  o en MES 10 mM en una cubeta de

poliestireno y una celda-z Celda capilar plegada (DTS1070, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) para medir el tamaño hidrodinámico y potencial zeta, respectivamente. En la Tabla A8, Anexo I se muestran las medidas de tamaño hidrodinámico en MES 10 mM, ya que tanto en H<sub>2</sub>O como en MES 10 mM, las medias de tamaño hidrodinámico no varían (Figura A3, Anexo I), esto nos indica que no se está produciendo agregación en la muestra. Se realizan 3 medidas de cada muestra, para así garantizar la reproducibilidad de los resultados. Los datos representados corresponden a la media de las medidas realizadas.

#### **4.11.2 Microscopia electrónica de transmisión de barrido (STEM)**

Las muestras de MNPs sin conjugar y conjugadas son observadas con el microscopio electrónico de transmisión de barrido (STEM) de alta resolución, Thermo Fisher Scientific Titan Analítico, que se encuentra en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA). El STEM es una combinación de SEM y TEM, de modo que se obtiene una imagen de transmisión utilizando un método de barrido. Es decir, es una técnica utilizada para visualizar la estructura y composición en escalas de longitud nanométrica o subatómica. Proporciona imágenes de alta resolución y datos espectroscópicos al escanear un haz de electrones enfocado a través de una muestra muy delgada y recolectar varias señales en paralelo. Además, se puede combinar con espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS o EDX) o espectroscopia de pérdida de energía de electrón (EELS) para obtener mapas espectrales de composición elemental y estructura electrónica<sup>55,56</sup>. Las muestras para el análisis STEM se preparan por recubrimiento por inmersión (*dip-coating*), en una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono.

#### **4.11.3 Electroforesis en gel SDS-PAGE**

La eficiencia de la bioconjugación de las MNPs se estudia mediante electroforesis en gel SDS-PAGE, empleándose el gel comercial Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels de BioRad (Gradiente poli(acrilamida) 4-15%, 15 well, 15 µL). Una vez colocado el gel en la cubeta, ésta se llena con tampón de electroforesis 1X preparado a partir del tampón de electroforesis 10X (Tris-HCl 250 mM, glicina 1,92 M, SDS 1%(p/v)) y se cargan las muestras mezcladas con el tampón de carga 4X (Glicerol 20 %, Tris- HCl 0.16 M pH 6,8, EDTA 20 mM, SDS 8 % (p/v), azul de bromofenol 0.4 % (p/v), β-mercaptoetanol 4 % (v/v)). De manera que se carga el marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein™ Standards (BioRad), las MNPs conjugadas con el anticuerpo, el anticuerpo y el sobrenadante de las MNPs conjugadas. La electroforesis se lleva a cabo a 120 V durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se lleva a cabo una tinción del gel con plata empleándose el kit comercial ProteoSilver™ Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich).

### **4.12 Evaluación de la internalización de MNPs**

#### **4.12.1 Por generador de imágenes de células fluorescentes**

El polímero (Figura A1, Anexo I) con el que están revestidas las MNPs presenta rodamina, compuesto químico que posee fluorescencia. Por tanto, mediante un generador de imágenes de células fluorescentes (Zoe™ Fluorescent Cell Imager de Biorad), se obtienen imágenes de fluorescencia de las células una vez internalizadas las MNPs, empleándose el canal rojo que utiliza un LED verde cuya longitud de onda es de 556 nm. El procedimiento para internalizar las MNPs en las células es el que se describe a continuación: en una placa de 96 pocillos se siembran 2000 células/pocillo de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468, tras 24 horas en la

incubadora a 37 °C, se adicionan las MNPs a concentraciones de 100 y 300 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/mL y se deja la placa incubando durante 1 hora. Pasado este tiempo, se toman las fotografías.

#### **4.12.2 Por citometría de flujo**

Se evalúa la internalización de las MNPs tanto conjugadas como sin conjugar en las líneas celulares MDA-MB-468 y MDA-MB-231 realizándose un marcaje con Anexina V-FITC. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca<sup>2+</sup> de 35-36 kDa que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina (PS), fosfolípido situado en la cara interna de la membrana celular que sufre una translocación a la parte externa en los primeros estadios del proceso apoptótico. La anexina V puede conjugarse con fluorocromos, incluido el FITC, de manera que conserva su alta afinidad por la PS y, por lo tanto, sirve como una sonda sensible para el análisis de células que están experimentando apoptosis<sup>57</sup>. Por lo que, en este caso, se va a dar un doble marcaje: por un lado, la rodamina presente en las MNPs (FL2); y, por otro lado, el marcaje de anexina V-FITC (FL1).

El procedimiento se puede describir como sigue: se siembran las células en una placa de cultivo de 12 pocillos (100.000 células/pocillo) y se incuban a 37 °C. Tras 24 horas, se adicionan las MNPs a concentraciones de 100 y 300 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/mL y se deja la placa incubando durante 1 hora. Pasado este tiempo, se recogen las células de los pocillos sembrados y se resuspenden durante 5 minutos a 1500 rpm (Eppendorf™ MiniSpin™). El pellet obtenido se resuspende con una solución de ABB 1x (Anexin Binding Buffer, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4) y anexina V-FITC. Tras el marcaje se dejan los tubos en oscuridad durante 15 minutos y seguidamente se pasan las muestras por el citómetro FACSCalibur (BD) que se encuentra en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza. Los datos son recogidos con el software CellQuestPro y analizados utilizando el programa FlowJo 10.8.1.

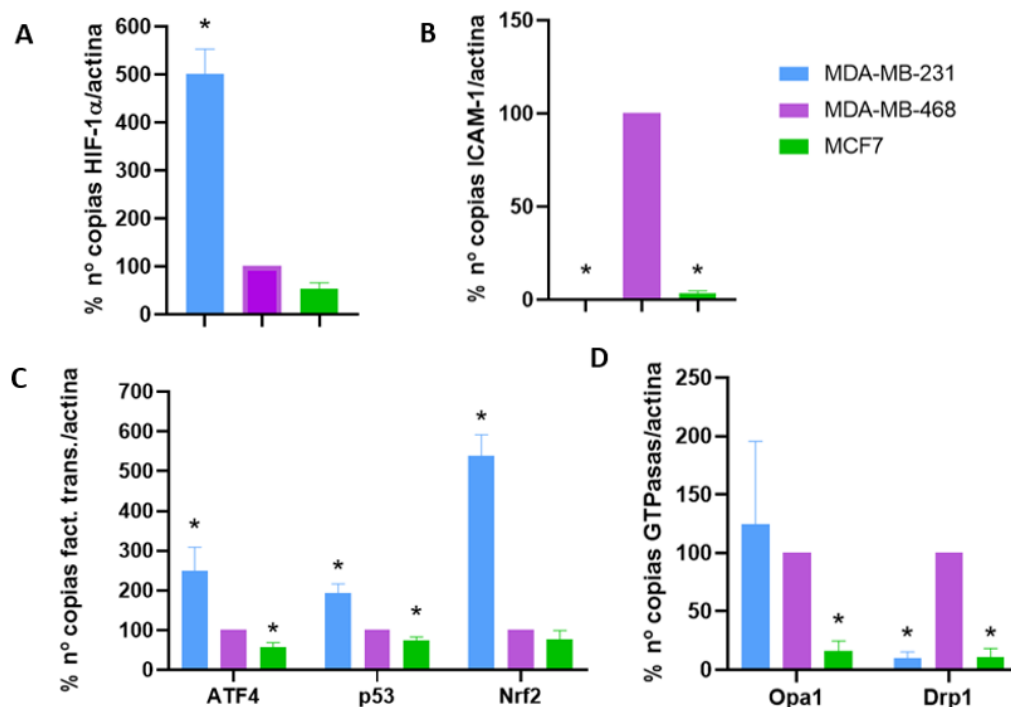
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cuantificación de la expresión génica

Con el objetivo de evaluar si la hipertermia modifica la expresión génica de genes implicados en la reprogramación metabólica asociada a la transformación tumoral o en otras funciones biológicas en las distintas líneas celulares, se llevan a cabo ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) tras incubar las células a distintas temperaturas (apartado 4.3).

#### 5.1.1 Análisis de la expresión basal de los genes

En primer lugar, se estudia la expresión de los distintos genes a analizar a 37 °C, para así determinar cuál es la expresión basal en las distintas líneas celulares y determinar si hay diferencias entre ellas. La Figura 9 muestra las representaciones del porcentaje del número de copias de los genes estudiados expresadas con respecto a la actina a 37 °C. La media de los valores representados (n=3) se calculan con respecto a la línea celular MDA-MB-468.



**Figura 9.** Representación del porcentaje del número de copias de los genes en las distintas líneas celulares a 37 °C. (A) HIF-1α; (B) ICAM-1; (C) Factores de transcripción, ATF4, p53 y Nrf2; (D) GTPasas, Opa1 y Drp1. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  sd (n=3) con respecto a la línea celular MDA-MB-468. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a la línea MDA-MB-468.

En la Figura 9 (A) se puede observar que, en la línea MDA-MB-231 la expresión de HIF-1α es mucho mayor que en las otras dos líneas, en las que no hay diferencias significativas entre ellas. Por otro lado, la expresión de ICAM-1 (Figura 9 (B)), es muy elevada en la línea MDA-MB-468 en comparación con las otras dos líneas celulares, siendo prácticamente indetectable la expresión de la proteína en la línea MDA-MB-231. En cuanto a la expresión de los factores de transcripción, ATF4, Nrf2 y p53 (Figura 9 (C)), la línea celular MDA-MB-231 presenta una sobreexpresión, en los tres casos con respecto a la línea MDA-MB-468. En cambio, la expresión en la línea MCF7 es menor respecto a la línea MDA-MB-468 o no presenta diferencias significativas. Por último, en la Figura 9 (D) se observa la expresión de las GTPasas relacionadas con la dinámica mitocondrial,

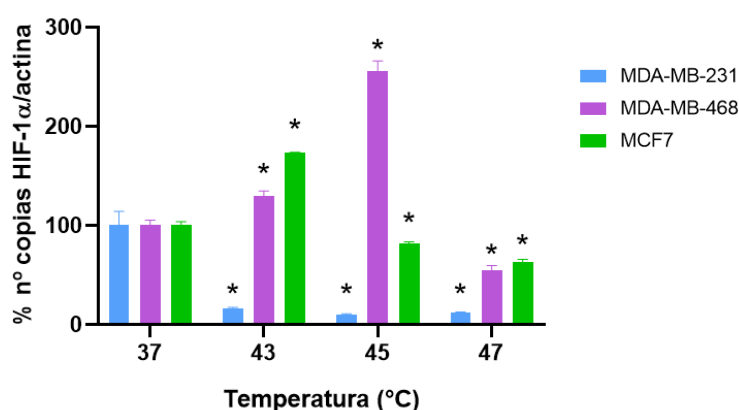
Opa1 y Drp1. Las dos líneas celulares de tipo TNBC, presentan una mayor expresión de Opa1, lo que indicaría un incremento en los procesos de fusión mitocondrial. Por otro lado, la línea MDA-MB-468 presenta una mayor expresión de Drp1, gen implicado en fisión mitocondrial, en comparación con las otras dos líneas celulares, que no presentan diferencias significativas entre ellas.

### 5.1.2 Análisis de la expresión de los genes tras el tratamiento de hipertermia

Una vez estudiados los niveles de transcritos de los genes a 37 °C, se procede a analizar cómo el aumento de temperatura puede afectar a la expresión génica de estos mismos genes en cada una de las tres líneas.

#### 5.1.2.1 Análisis de la expresión de HIF-1 $\alpha$

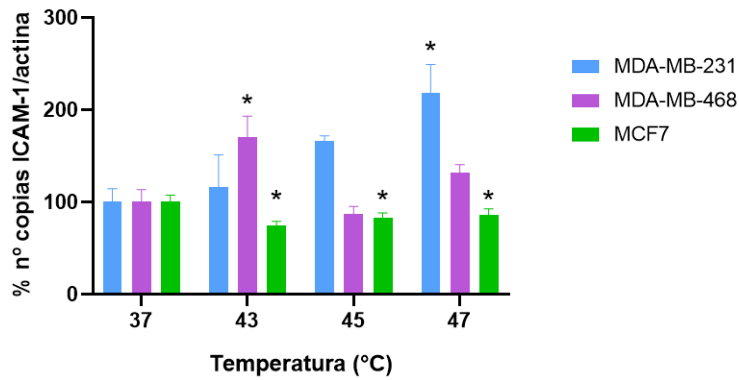
En la Figura 10 se muestra la expresión de HIF-1 $\alpha$  en las distintas líneas celulares. Se observa una disminución significativa de la expresión de la proteína al aumentar la temperatura en la línea MDA-MB-231. En cambio, en el caso de las líneas MDA-MB-468 y MCF7, que partían de niveles de expresión basal más bajos, la expresión de HIF-1 $\alpha$  aumenta, presentándose la máxima expresión a 45 y 43 °C respectivamente. A temperaturas superiores se observa que la expresión del mRNA disminuye, probablemente porque las células ya estén demasiado afectadas por el incremento de la temperatura.



**Figura 10.** Representación del porcentaje del número de copias de HIF-1 $\alpha$  respecto a la actina en función de la temperatura. En la gráfica se muestran las medias  $\pm$  sd ( $n=3$ ). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a la expresión de cada línea a 37 °C.

#### 5.1.2.2 Análisis de la expresión de ICAM-1

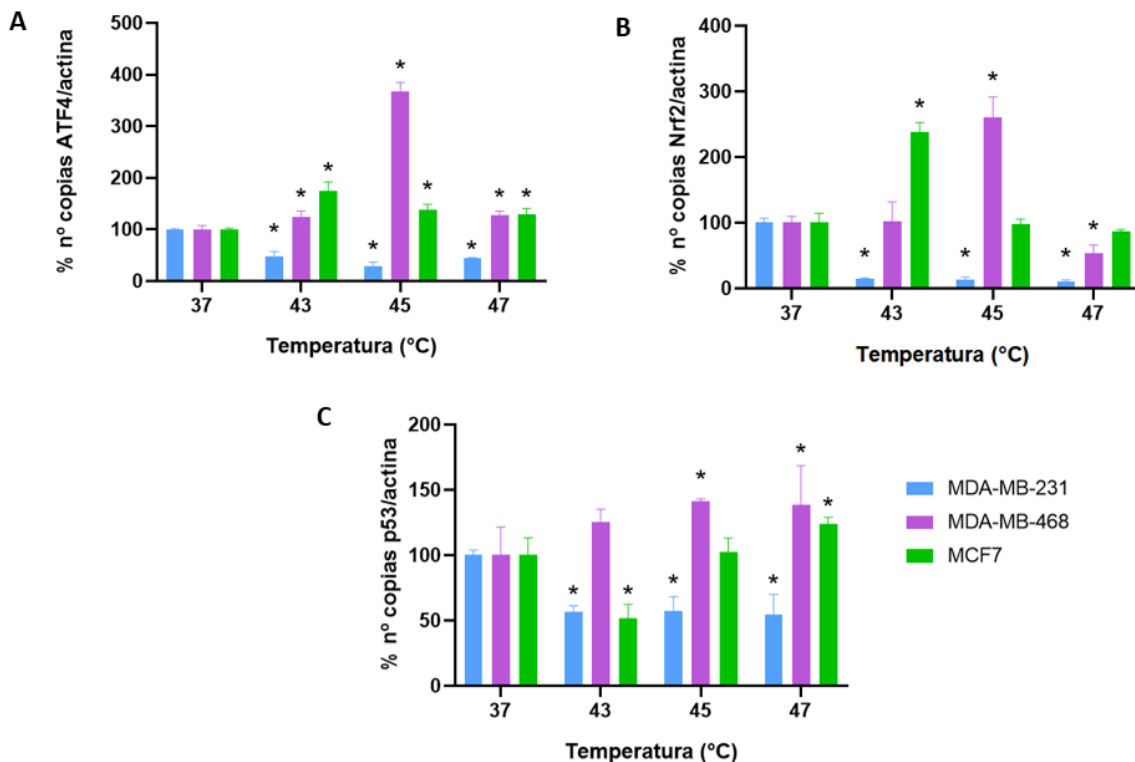
La expresión de ICAM-1 se muestra en la Figura 11, en la que se aprecia una disminución de los niveles de mRNA en la línea celular MCF7 presentando diferencias significativas respecto a su expresión a 37 °C. Por el contrario, en las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-468 se produce un aumento de la expresión de ICAM-1 cuyos máximos son a 47 y 43 °C respectivamente. En el caso de la línea MDA-MB-468, a temperaturas mayores que 43 °C, la expresión del gen disminuye con respecto a los niveles de mRNA a 37 °C.



**Figura 11.** Representación del porcentaje del número de copias de ICAM-1 respecto a la actina en función de la temperatura. En la gráfica se muestran las medias  $\pm$  sd ( $n=3$ ). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) respecto a la expresión de cada línea a 37 °C.

### 5.1.2.3 Análisis de la expresión de factores de transcripción

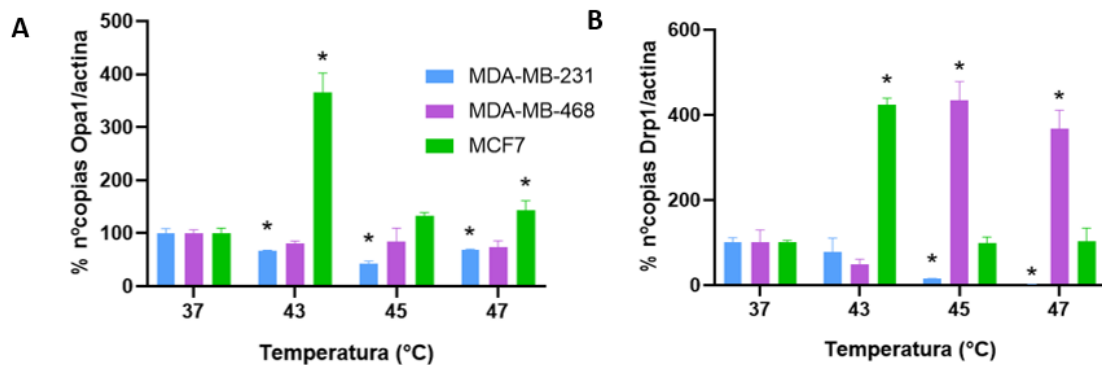
El estudio de la expresión de los factores de transcripción, ATF4, Nrf2 y p53 se muestra en la Figura 12. La expresión de los tres factores de transcripción se encuentra aumentada en las líneas MDA-MB-468 y MCF7 con el incremento de temperatura. En el caso de la línea MDA-MB-468, los tres genes presentan la máxima expresión a 45 °C, mientras que en la línea MCF7, ATF4 y Nrf2 presentan el máximo de expresión a 43 °C, en cambio, p53 lo presenta a 47 °C. Por otro lado, en la línea MDA-MB-231, que presentaba mayores niveles de expresión a 37 °C, el número de copias de los mRNA de los factores de transcripción disminuye al aumentar la temperatura.



**Figura 12.** Representación del porcentaje del número de copias de los factores de transcripción respecto a la actina en función de la temperatura. (A) ATF4. (B) Nrf2. (C) p53. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  sd ( $n=3$ ). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) respecto a la expresión de cada línea a 37 °C.

#### 5.1.4 Análisis de la expresión de GTPasas

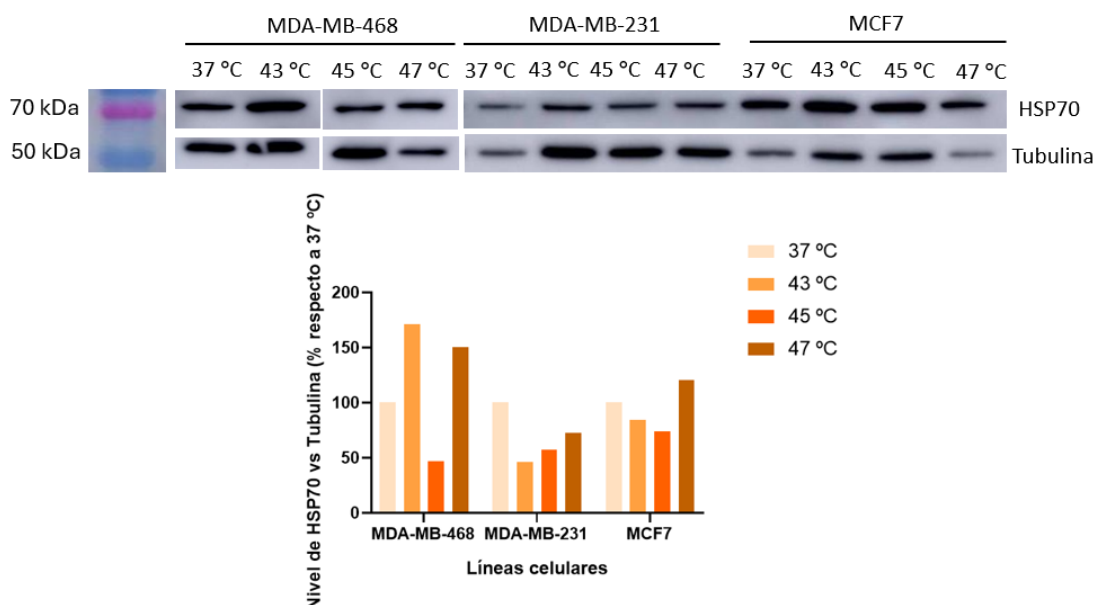
La expresión de las GTPasas involucradas en la dinámica mitocondrial se muestra en la Figura 13. La expresión tanto de Opa1 como de Drp1 aumenta con la temperatura en la línea MCF7, presentando su máximo a 43 °C. Por otro lado, en la línea MDA-MB-468 solo Drp1 presenta cambios en la expresión al incrementar la temperatura observándose un aumento a 45 °C. Por último, la línea MDA-MB-231 presenta una disminución de la expresión de Opa1 y Drp1 al aumentar la temperatura, que es estadísticamente significativa en casi todas las temperaturas ensayadas.



**Figura 13.** Representación del porcentaje del número de copias de GTPasas respecto a la actina en función de la temperatura. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  sd (n=3). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a la expresión de cada línea a 37 °C.

#### 5.2 Análisis de la expresión proteica de HSP70

Con el propósito de estudiar si la expresión de HSP70 se modifica al someter las células a estrés térmico, se lleva a cabo un ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE seguido de un ensayo Western Blot. En la Figura 14 se muestran los resultados del Western Blot y la cuantificación de bandas respecto a 37 °C normalizada respecto a la tubulina. En el caso de las líneas MDA-MB-468 y MCF7 se produce un aumento en los niveles proteicos de HSP70, presentándose el máximo a 43 y 47 °C respectivamente, a 45 °C se observa una disminución de los niveles proteicos en la línea MDA-MB-468. Por el contrario, en la línea MDA-MB-231, a 43 °C disminuye la expresión proteica respecto a 37 °C presentando un aumento a 45 y 47 °C respecto a 43 °C.



**Figura 14.** Efecto de la temperatura en la proteína HSP70 en las tres líneas celulares. Se muestran los resultados del Western Blot y la cuantificación de bandas respecto a 37 °C normalizada con respecto a la tubulina.

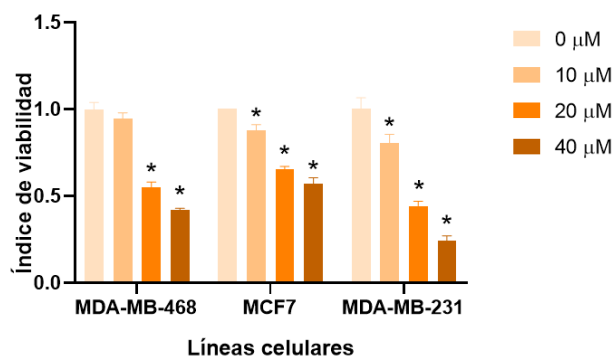
### 5.3 Medida de la citotoxicidad inducida en presencia de dos inhibidores

Una de las estrategias terapéuticas para el desarrollo del cáncer asociado con las disfunciones y alteraciones producidas en la mitocondria es el uso de inhibidores de la función del orgánulo. Para estudiar si la combinación de la hipertermia y el uso de inhibidores podría resultar en una estrategia terapéutica más eficiente, se lleva a cabo un ensayo MTT (apartado 4.4) en el que se mide la inhibición del crecimiento celular tras el tratamiento combinado de hipertermia e inhibición farmacológica. Se llevaron a cabo dos aproximaciones metodológicas para estudiar (i) el efecto de la temperatura sobre la sensibilidad al fármaco y, (ii) el efecto del fármaco sobre sensibilidad a la temperatura. Las medidas del índice de viabilidad se llevan a cabo en presencia de: metformina, inhibidor del complejo I mitocondrial; y M-divi-1, inhibidor de la proteína de fisión mitocondrial Drp1.

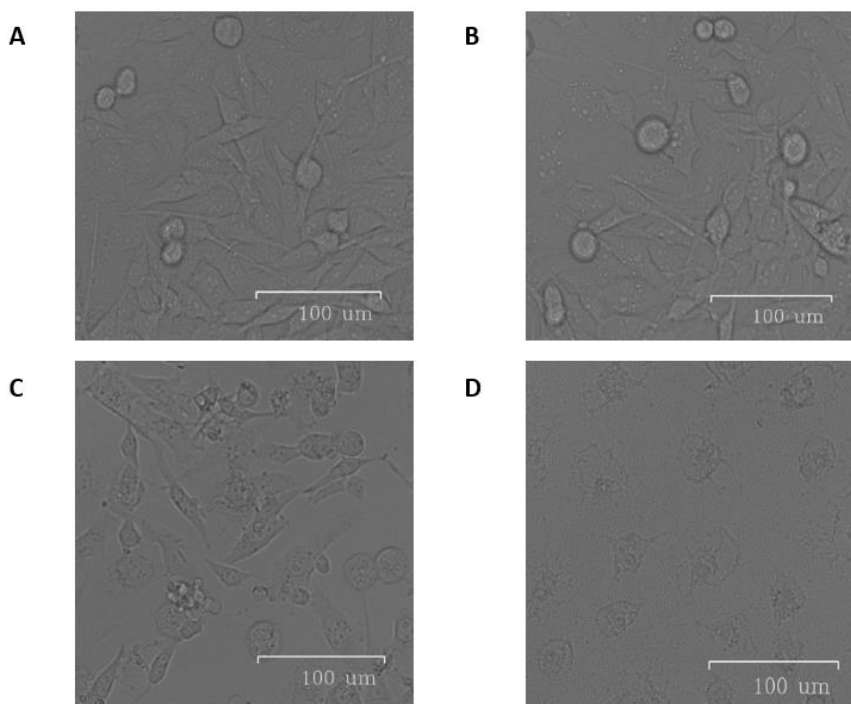
#### 5.3.1 Evaluación de la citotoxicidad de tratamientos combinados de M-divi-1 e hipertermia

##### 5.3.1.1 Efecto de la temperatura sobre la sensibilidad al fármaco

Primeramente, se analiza el índice de viabilidad a 37 °C de las tres líneas celulares a las distintas concentraciones de **M-divi-1** (Figura 15). Se puede observar que, al aumentar la concentración del inhibidor el índice de viabilidad disminuye en las tres líneas celulares. Además, se puede deducir que, de las tres líneas la más sensible al inhibidor es la MDA-MB-231, presentando un menor índice de viabilidad a todas las concentraciones evaluadas en comparación con las de las otras líneas celulares. En la Figura 16 se muestran las imágenes tomadas con el microscopio de la línea celular MDA-MB-231, en las que se observa que a medida que aumenta la concentración del inhibidor, las células se encuentran más destruidas.



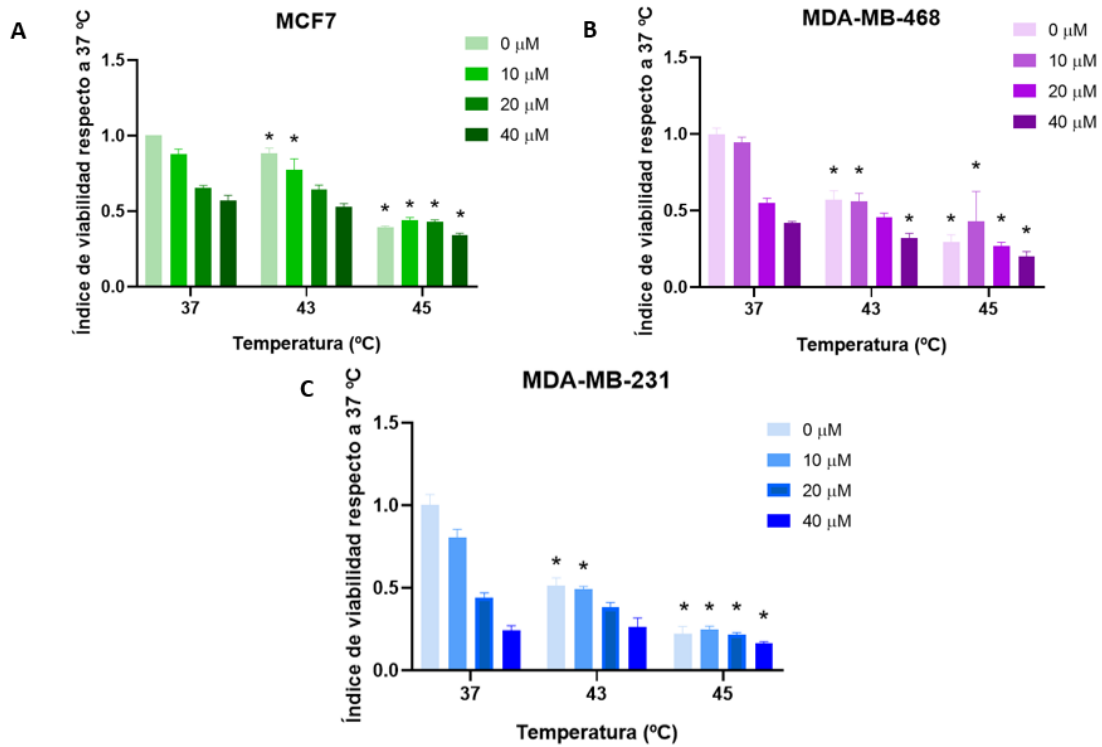
**Figura 15.** Índice de viabilidad a 37 °C en las distintas líneas celulares a las distintas concentraciones de *M-divi-1*. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  sd (n=3). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a la concentración 0  $\mu$ M en cada línea celular.



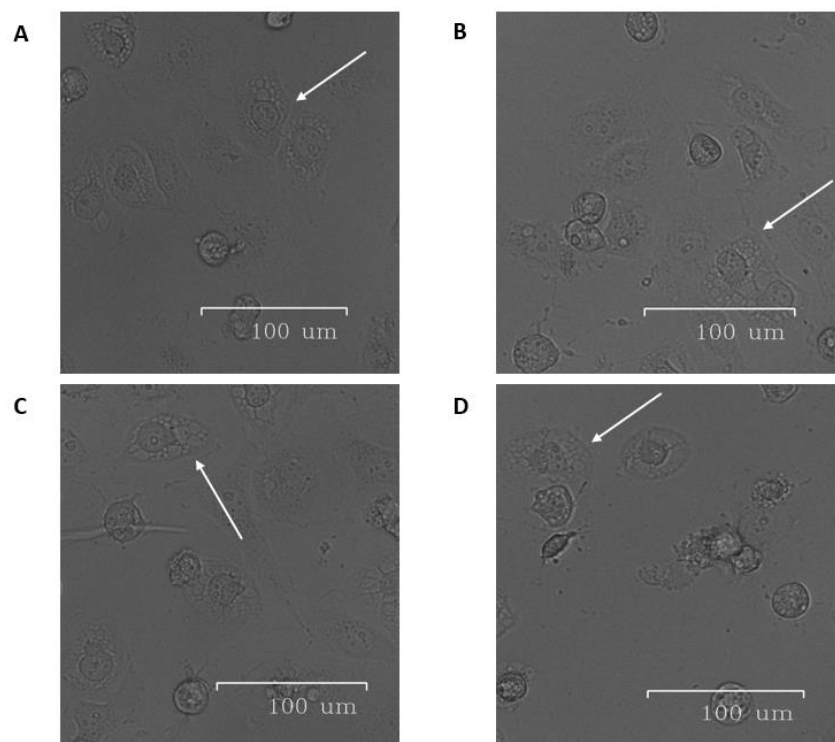
**Figura 16.** Imágenes de las células *MDA-MB-231* tomadas con el microscopio a 37 °C a las distintas concentraciones de *M-divi-1*: (A) 0  $\mu$ M; (B) 10  $\mu$ M; (C) 20  $\mu$ M; (D) 40  $\mu$ M

A continuación, se estudia el efecto de la temperatura en la sensibilidad al fármaco (Figura 17). Para ello, tras llevarse a cabo las incubaciones a 43 y 45 °C durante 1 hora, se añaden los inhibidores a distintas concentraciones y se deja incubando la placa a 37°C durante 48 horas. En general, en las tres líneas celulares se observa que el efecto del fármaco a 43 °C produce una disminución en el índice de viabilidad con respecto al control, sin embargo, a 45 °C el índice de viabilidad se mantiene prácticamente constante. Ahora bien, el efecto de aumentar la temperatura produce cambios significativos en las tres líneas celulares en el índice de viabilidad a 45 °C respecto a 37 °C a cada concentración de *M-divi-1*, sin embargo, a 43°C a concentraciones elevadas de fármaco no se produce cambio en el índice de viabilidad. En las imágenes tomadas con el microscopio (Figura 18) se puede apreciar que la línea *MDA-MB-468* a 45 °C no presenta cambios muy significativos al aumentar la concentración de *M-divi-1*. No obstante, a altas temperaturas se aprecian sobre todo en las líneas *MDA-MB-468* y *MDA-MB-231* una especie de vacuolas alrededor de las células, lo que podría deberse a vesículas de

autofagia o acumulación de gotas lipídicas, lo que indica que las células están siendo sometidas a algún tipo de estrés.



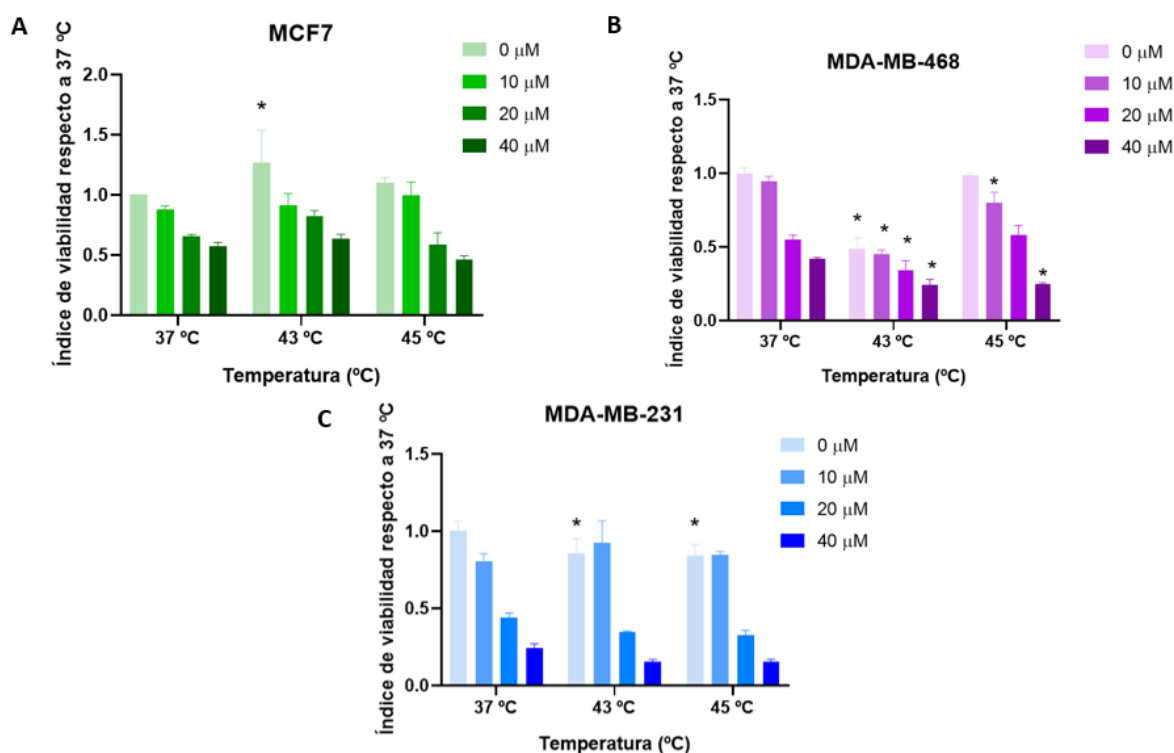
**Figura 17.** Índice de viabilidad en función de la temperatura a las distintas concentraciones de **M-divi-1** en las distintas líneas celulares normalizados por el valor de viabilidad de cada una de ellas a 37 °C en ausencia de fármaco: (A) MCF7; (B) MDA-MB-468; (C) MDA-MB-231. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  sd ( $n=3$ ). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) respecto a 37 °C a cada concentración de M-divi-1.



**Figura 18.** Imágenes de las células **MDA-MB-468** tomadas con el microscopio tras 1 hora de incubación a 45 °C a las distintas concentraciones de **M-divi-1**: (A) 0 μM; (B) 10 μM; (C) 20 μM; (D) 40 μM. Las flechas señalan las vacuolas alrededor de las células.

### 5.3.1.2 Efecto del fármaco sobre la sensibilidad a la temperatura

De la misma manera, se estudia el efecto del fármaco en la sensibilidad a la temperatura en las distintas líneas celulares (Figura 19). Para ello, se añade el inhibidor, dejando la placa incubando 48 horas a 37 °C y posteriormente se realizan las incubaciones, dejando la placa finalmente incubando 24 horas a 37 °C. En este caso, tanto a 43 como a 45 °C se produce una disminución del índice de viabilidad a medida que aumenta la concentración, presentando diferencias significativas con respecto a la concentración 0 μM en cada temperatura. Sin embargo, no se producen diferencias significativas al aumentar la temperatura en el índice de viabilidad respecto a 37 °C a cada concentración de inhibidor en las líneas MCF7 y MDA-MB-231. Por el contrario, en la línea MDA-MB-468 a 43 °C se produce una disminución del índice de viabilidad respecto a 37 a cada concentración de M-divi-1.



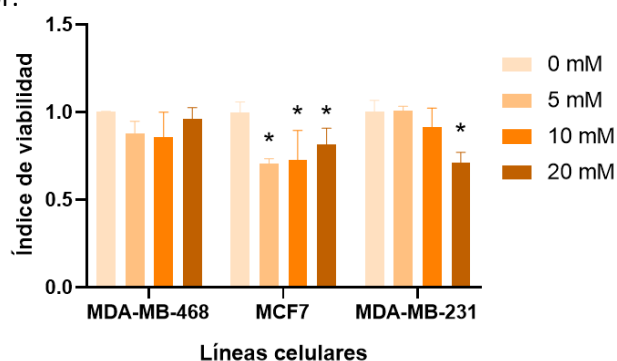
**Figura 19.** Índice de viabilidad en función de la temperatura a las distintas concentraciones de **M-divi-1** en las distintas líneas celulares normalizados por el valor de viabilidad a 37 °C en ausencia de fármaco: (A) MCF7; (B) MDA-MB-468; (C) MDA-MB-231. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  sd ( $n=3$ ). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) respecto a 37 °C a cada concentración de M-divi-1.

### 5.3.2 Evaluación de la citotoxicidad de tratamientos combinados de metformina e hipertermia

#### 5.3.2.1 Efecto de la temperatura sobre la sensibilidad al fármaco

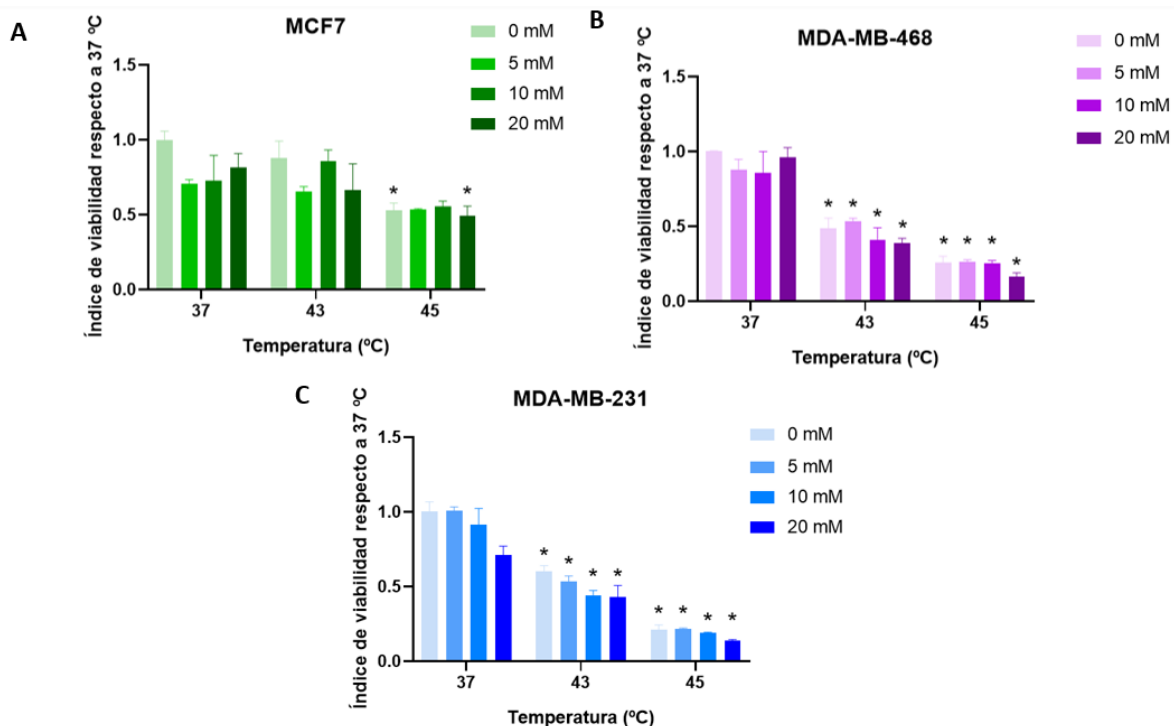
Al analizar el índice de viabilidad a las distintas concentraciones de **metformina**, a 37 °C en las tres líneas celulares, se observan comportamientos distintos (Figura 20). En la línea MDA-MB-468, el aumento de concentración de metformina no produce diferencias significativas en el índice de viabilidad. Sin embargo, en las otras dos líneas se aprecia una disminución del índice de viabilidad al aumentar la concentración del inhibidor. En el caso de la línea MCF7, dicha disminución, se produce a la concentración de 10 mM, no presentando diferencias significativas con respecto a 10 mM a mayores concentraciones. Por otro lado, la línea MDA-MB-231,

presenta una disminución significativa del índice de viabilidad solamente a la mayor concentración de inhibidor.



**Figura 20.** Índice de viabilidad a 37 °C en las distintas líneas celulares a las distintas concentraciones de metformina. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  sd ( $n=3$ ). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) respecto a la concentración 0 mM en cada línea celular.

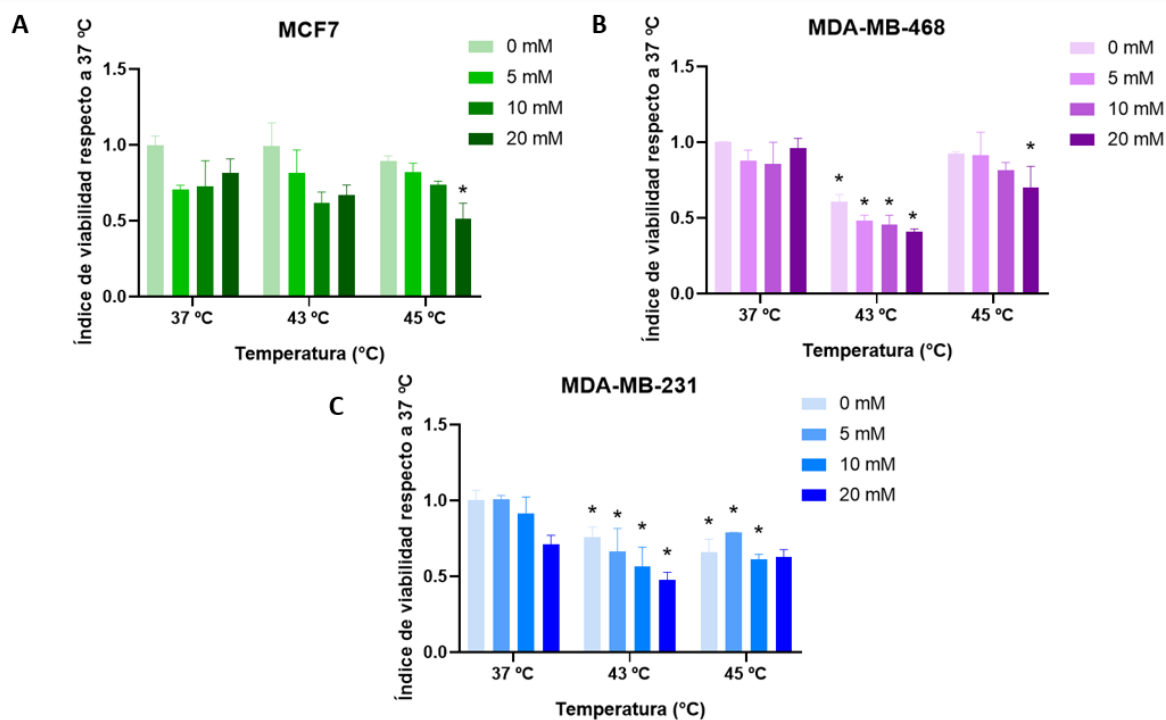
Una vez evaluado el efecto del fármaco sobre las líneas celulares, se estudia cómo afecta la temperatura a la viabilidad celular en las distintas líneas celulares a cada concentración de metformina (Figura 21). Al analizar el efecto del inhibidor en cada temperatura, se observa que, a 43 °C, el índice de viabilidad va disminuyendo al aumentar la concentración en la línea MDA-MB-231, no produciéndose dicha disminución en la línea MDA-MB-468 y MCF7. Sin embargo, a 45 °C, no se observan diferencias significativas en las tres líneas. Por otro lado, al analizar el efecto de la temperatura en cada concentración de inhibidor, se observa que tanto a 43 como a 45 °C, el índice de viabilidad disminuye presentando diferencias significativas respecto a 37 °C en las líneas MDA-MB-468 y MDA-MB-231.



**Figura 21.** Índice de viabilidad en función de la temperatura a las distintas concentraciones de metformina en las distintas líneas celulares normalizados por el valor de viabilidad a 37 °C en ausencia de fármaco: (A) MCF7; (B) MDA-MB-468; (C) MDA-MB-231. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  sd ( $n=3$ ). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) respecto a 37 °C a cada concentración de metformina.

### 5.3.1.2 Efecto del fármaco sobre la sensibilidad a la temperatura

El efecto del fármaco sobre la sensibilidad a la temperatura se muestra en la Figura 22. En este caso, tanto a 43 como a 45 °C se produce una disminución del índice de viabilidad en las líneas MCF7 y MDA-MB-468. En la línea MDA-MB-231 a 45 °C no se presentan diferencias significativas en el índice de viabilidad. Ahora bien, el efecto de la temperatura provoca diferencias en el índice de viabilidad a 43 con respecto a 37 °C a cada concentración de metformina en las líneas MDA-MB-468 y MDA-MB-231. A 45 °C el efecto de la temperatura no es tan significativo en las tres líneas celulares respecto a 37 °C.



**Figura 22.** Índice de viabilidad en función de la temperatura a las distintas concentraciones de metformina en las distintas líneas celulares normalizados por el valor de viabilidad a 37 °C en ausencia de fármaco: (A) MCF7; (B) MDA-MB-468; (C) MDA-MB-231. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  sd ( $n=3$ ). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) respecto a 37 °C a cada concentración de metformina.

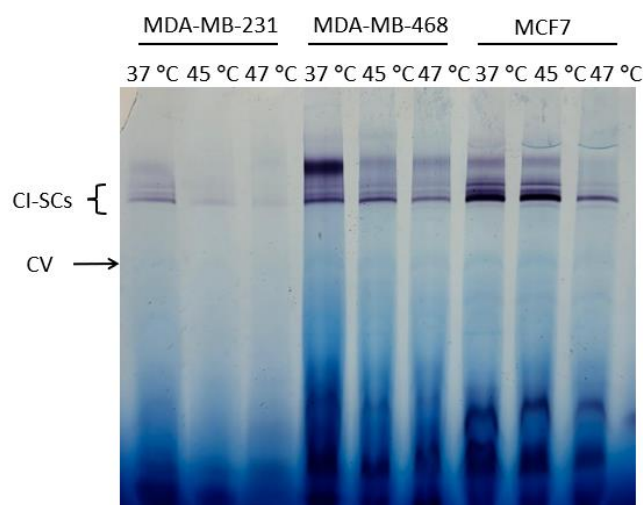
## 5.4 Análisis del ensamblaje de los complejos mitocondriales

Estudios previos llevados a cabo por el grupo de investigación demuestran que, las temperaturas mayores a 43 °C pueden causar daños en la estructura y función mitocondrial<sup>27</sup>. Con el objetivo de confirmar cómo la hipertermia puede afectar a la organización del sistema OXPHOS en las distintas líneas celulares estudiadas, se llevan cabo ensayos de electroforesis en gel Blue Native seguido de un ensayo IGA y Western Blot tras los tratamientos a 45 y 47 °C.

### 5.4.1 Medida de la actividad del complejo I

La Figura 23 muestra el ensayo de actividad del complejo I en gel en las tres líneas celulares estudiadas a 37, 45 y 47 °C. En general, en las tres líneas celulares el complejo I aparece mayoritariamente en forma de SCs respiratorios. Además, se puede observar cómo al aumentar la temperatura, la intensidad de las bandas de los SCs que contienen el complejo I va disminuyendo. La disminución de la intensidad de las bandas es más notoria a 47 °C que a 45 °C, observándose este efecto sobre todo en la línea celular MCF7. Además de las bandas del CI-SCs, se puede observar la aparición de una banda correspondiente al complejo V que es visible por

la presencia de colorante Coomassie Blue-G tanto en el tampón de electroforesis como en el de carga de las muestras.



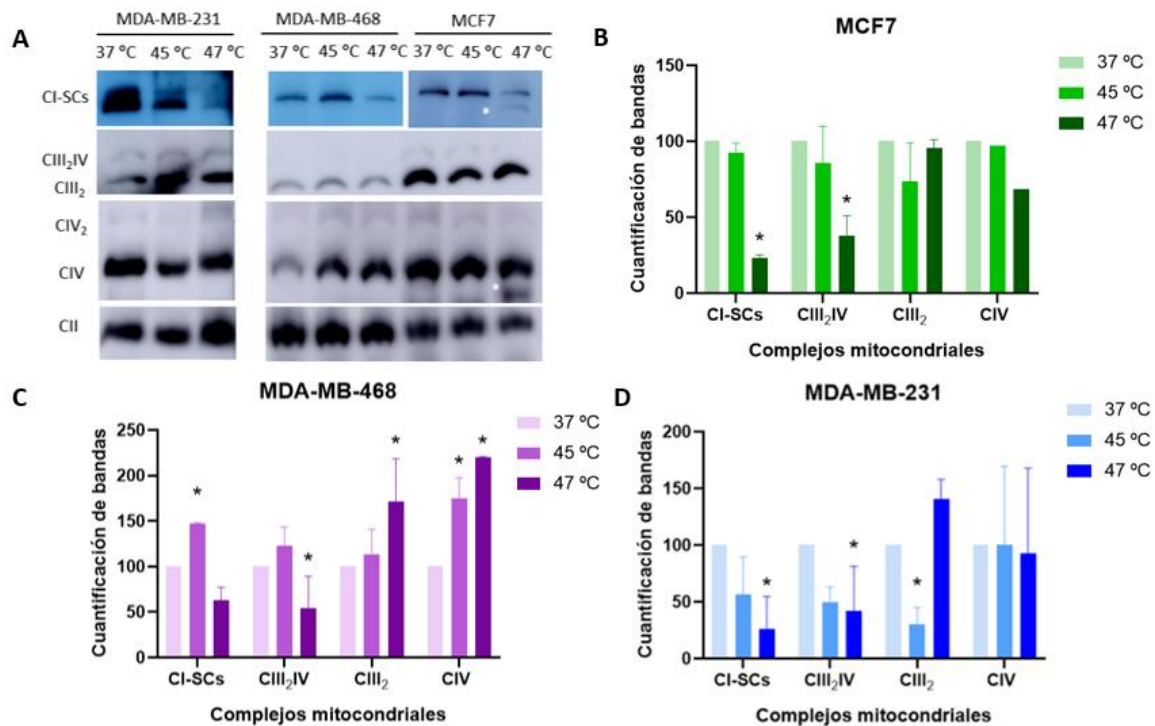
**Figura 23.** Ensayo de actividad del complejo I en gel.

#### 5.4.2 Inmunodetección de los complejos individuales del sistema OXPHOS

En la Figura 24 (A) se muestran las bandas obtenidas en el Western Blot, por otro lado, en la Figura 24 (B-D), se observa la cuantificación de bandas respecto a 37 °C normalizada con respecto al CII. En general, en las tres líneas celulares, se muestra la misma tendencia observada en el ensayo de actividad del complejo I, al aumentar la temperatura se produce una fuerte disminución de la intensidad de las bandas del CI-SCs, sin embargo, en la línea celular MDA-MB-468 se produce un aumento significativo a 45 °C, posiblemente por una cuantificación poco precisa del CII debido a su saturación. (Figura 24 (C)). Además, en la línea MCF7 a 47 °C se observa una banda (asterisco blanco) debajo de la banda correspondiente al CI-SCs que correspondería a SCs de menor peso molecular que contienen CIII, probablemente fruto de la degradación del SC debido a la temperatura.

En cuanto al complejo III, se observan las bandas correspondientes al CIII libre y al CIII asociado al CIV en forma de complejo III<sub>2</sub>IV. En las tres líneas celulares se observa una disminución de la intensidad del CIII-SCs conforme aumenta la temperatura, presentando nuevamente la línea MDA-MB-468 un aumento a 45 °C. En cambio, el CIII libre presenta el comportamiento contrario, aumenta conforme aumenta la temperatura, no presentando apenas diferencias en la línea MCF7 (Figura 24 (D)).

Por último, el complejo IV, aparece, además de asociado en el CIII, en sus formas dimérica y monomérica. El aumento de temperatura produce un aumento de la intensidad del CIV monomérico en el caso de la línea celular MDA-MB-468, una disminución en el caso de las líneas MCF7 y no produce ningún cambio en la línea MDA-MB-231. En el caso de la línea MCF7 a 47 °C se vuelve a observar una banda debajo de la banda correspondiente al CIV.



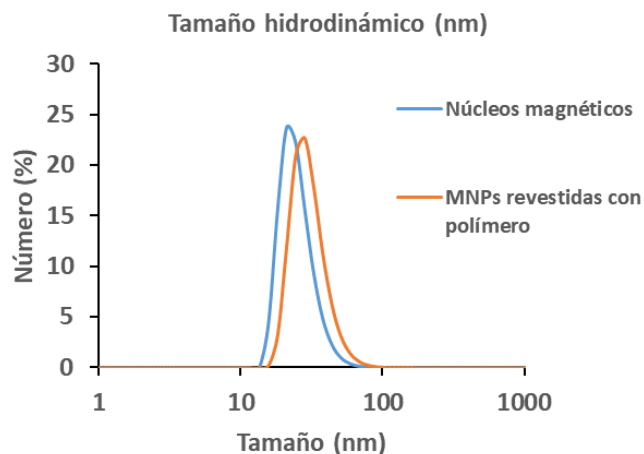
**Figura 24.** Efecto de la temperatura en los complejos y SCs mitocondriales en las tres líneas celulares. (A) Resultados del Western Blot; Cuantificación de bandas respecto a 37 °C normalizada con respecto al CII de las líneas celulares (B) MCF7, (C) MDA-MB-468, (D) MDA-MB-231. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a 37 °C. Las cuantificaciones representan la media  $\pm$  sd de tres ensayos independientes (triplicados biológicos).

## 5.5 Caracterización de MNPs

Una vez sintetizadas las MNPs como se indica en los apartados 4.10.1 y 4.10.2 y funcionalizadas con cetuximab para dirigir las específicamente a células que expresen en su superficie el receptor de EGF (EGFR) (apartado 4.10.3), se procedió a su análisis previo a su uso en cultivos celulares.

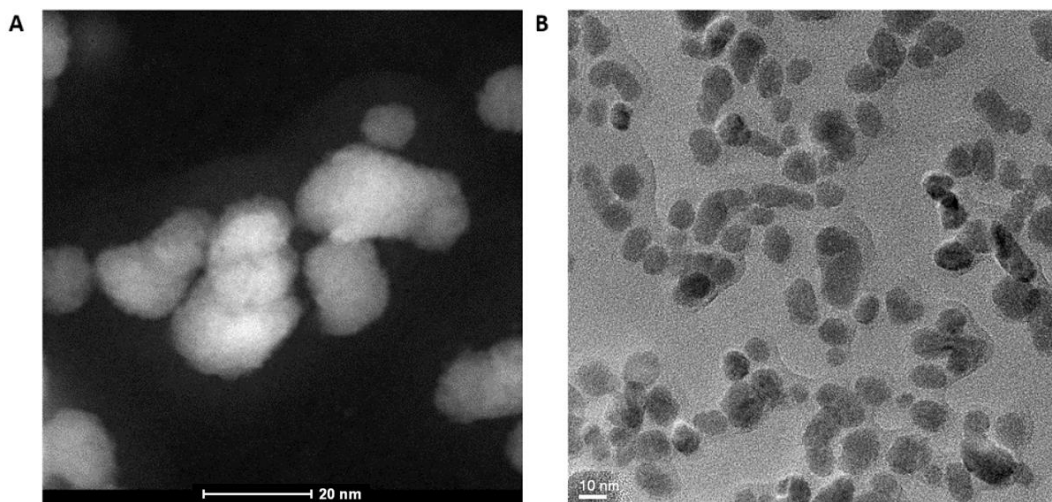
### 5.5.1 Evaluación de MNPs revestidas con polímero

Mediante DLS se mide el tamaño y potencial zeta, que determina la carga superficial (Tabla A8, del Anexo I). En la Figura 25 se muestra el tamaño hidrodinámico de los núcleos magnéticos ( $25 \pm 7,7$  nm) y las MNPs revestidas con polímero ( $30,72 \pm 9,54$  nm), observándose cómo el tamaño aumenta. Respecto a la carga superficial, tras revestir las MNPs con polímero se produce una disminución de ésta debido a la presencia de grupos carboxilo, presentando los núcleos magnéticos un valor de  $36,5 \pm 2$  mV y las MNPs un valor de  $-7,62 \pm 7,84$  mV.



**Figura 25.** Tamaño hidrodinámico de los núcleos magnéticos y de las MNPs core-shell revestidas con polímero.

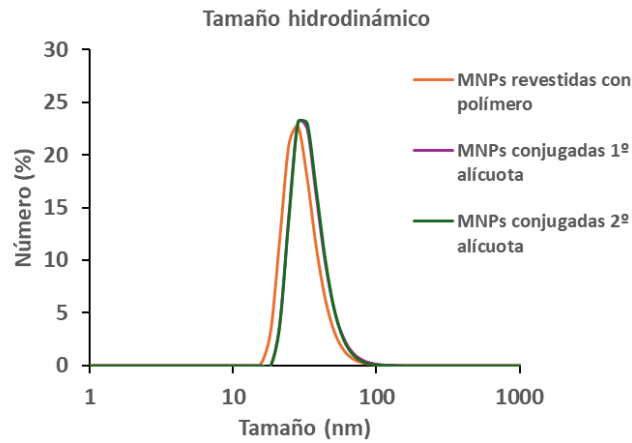
En la Figura 26 se observan las imágenes reales obtenidas mediante STEM y TEM de las MNPs. En ambas imágenes se observan que las MNPs presentan un tamaño de alrededor de 20 nm, similar al observado mediante DLS y además alrededor de éstas se puede confirmar la presencia del polímero. En el espectro STEM-EDS (Figura A4, Anexo II) se observan los picos correspondientes a los siguientes elementos: C, Fe, O y Si (la aparición de este último no implica necesariamente su presencia en la muestra, sino que se puede considerar como un artefacto del detector).



**Figura 26.** Imágenes reales obtenidas de las MNPs revestidas con polímero mediante (A) STEM a una escala de 20 nm (B) TEM a una escala de 10 nm.

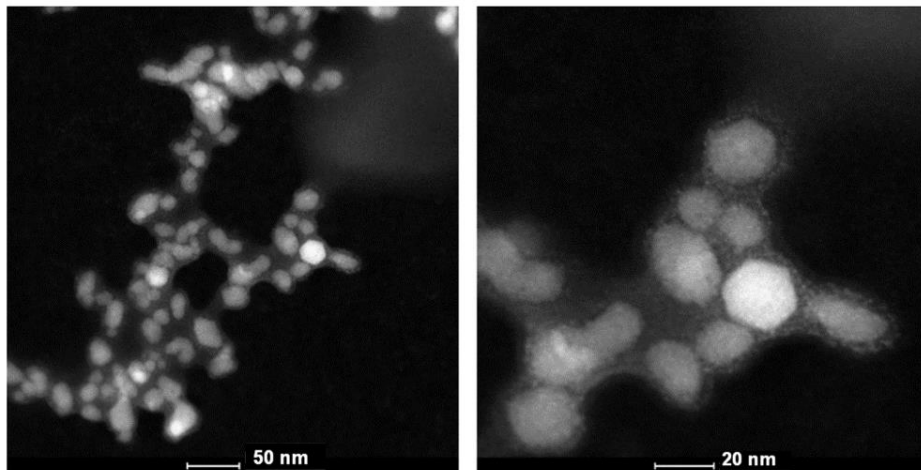
### 5.5.2 Evaluación de MNPS conjugadas con cetuximab

Una vez llevada a cabo la conjugación de las MNPs con el anticuerpo se vuelve a medir el tamaño hidrodinámico y potencial zeta mediante DLS (Tabla A8, Anexo I). En la Figura 27 se muestra el tamaño hidrodinámico de las dos alícuotas de las MNPs conjugadas en comparación con las MNPs revestidas con polímero. Ambas alícuotas presentan un tamaño hidrodinámico mayor que las MNPs revestidas con polímero (1ª alícuota:  $34,62 \pm 11,06$  nm; 2ª alícuota:  $34,42 \pm 10,15$  nm) y un potencial zeta similar al de las MNPs revestidas con polímero (1ª alícuota:  $-7,91 \pm 4,83$  mV; 2ª alícuota:  $-6,82 \pm 5,12$  mV).

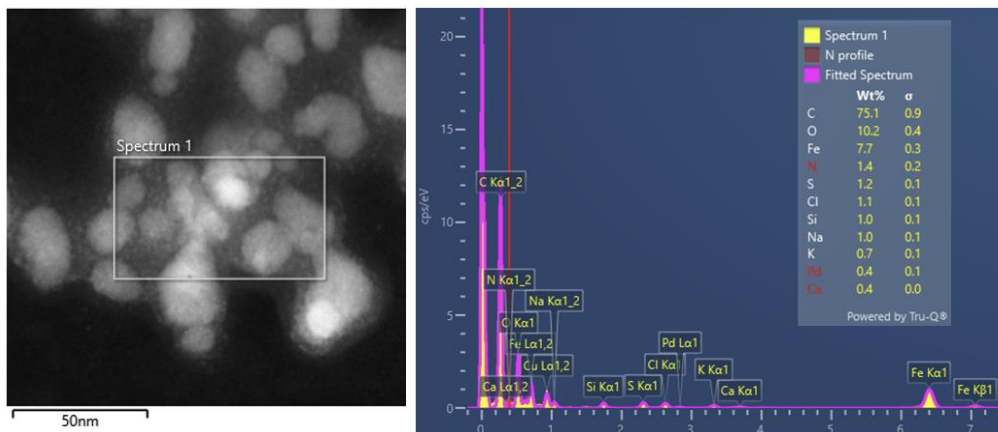


**Figura 27.** Tamaño hidrodinámico de las MNPs conjugadas con cetuximab (1ª y 2ª alícuota) en comparación con las MNPs revestidas con polímero.

Además, se toman imágenes mediante STEM de ambas muestras conjugadas para comprobar la presencia de anticuerpo (Figura 28). Los análisis elementales por espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS o EDX) (Figura 29), demuestran la presencia de anticuerpo debido a señales correspondientes al azufre y nitrógeno en ambas muestras. Además, se observan señales correspondientes a los siguientes elementos: K, Ca, Na, Cl, Si y Pd.



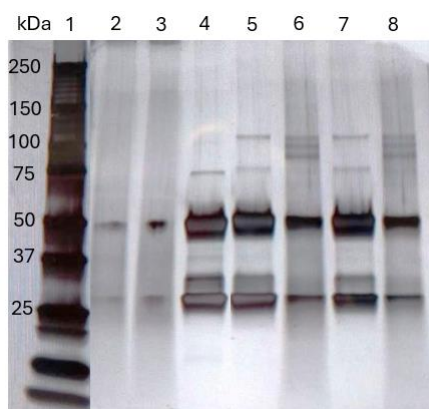
**Figura 28.** Imágenes reales obtenidas mediante STEM de las MNPs conjugadas a distintas escalas.



**Figura 29.** Imagen de la 1ª alícuota de las MNPs conjugadas mediante STEM y su correspondiente espectro STEM-EDS con los respectivos % en peso molecular de cada elemento.

## 5.6 Detección de cetuximab mediante un gel SDS-PAGE

Se realiza una electroforesis en gel SDS-PAGE (apartado 4.11.3) de una muestra referencia (pocillo 1), de las dos alícuotas de MNPs conjugadas con cetuximab (pocillos 2 y 3), del anticuerpo solo (pocillo 4), del sobrenadante y las MNPs activadas con sulfo-NHS (pocillos 5 y 6 respectivamente) y del sobrenadante y las MNPs activadas con NHS (pocillos 7 y 8 respectivamente). Es preciso puntualizar que en las dos últimas muestras activadas con sulfo-NHS y NHS la temperatura de reacción fue de 37 °C y se utilizó PEG-NH<sub>2</sub> para el bloqueo de los grupos -COOH libres, mientras que la activación con NHS de las dos alícuotas (pocillo 2 y 3) se realizó a temperatura ambiente (RT) y se utilizó glicina como bloqueante (Figura 30). En todas las muestras de MNPs conjugadas se pueden apreciar las dos bandas correspondientes al anticuerpo. La banda de peso molecular 50 kDa (más intensa) corresponde a la cadena pesada, y la banda en torno a 25 kDa, a la cadena ligera. Además, se pueden apreciar diferencias de intensidad entre las bandas correspondientes a muestras preparadas en distintas condiciones (i.e. muestras pocillo 6 y 8 respectivamente). En los sobrenadantes de estas muestras (pocillo 5 y 7) también se observan ambas bandas, por lo que parte del anticuerpo no se ha unido. Respecto, a las dos alícuotas diferentes de MNPs conjugadas (pocillo 2 y 3) se observa una mayor intensidad en las bandas en el caso de la 2ª alícuota (pocillo 3), por lo que esta muestra se selecciona para los estudios de internalización de las MNPs en células.

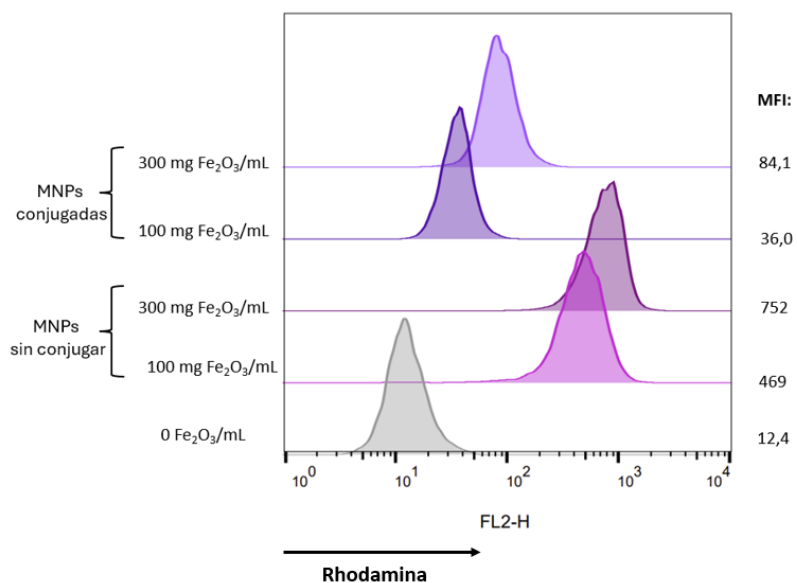


**Figura 30.** Electroforesis en gel SDS-PAGE para la detección de cetuximab en las MNPs conjugadas. (1) marcador de pesos moleculares; (2) 1ª alícuota MNPs conjugadas; (3) 2ª alícuota MNPs conjugadas; (4) cetuximab; MNPs conjugadas en distintas condiciones (5 y 6) sobrenadante y MNPs activadas con sulfo-NHS respectivamente; (7 y 8) sobrenadante y MNPs activadas con NHS respectivamente.

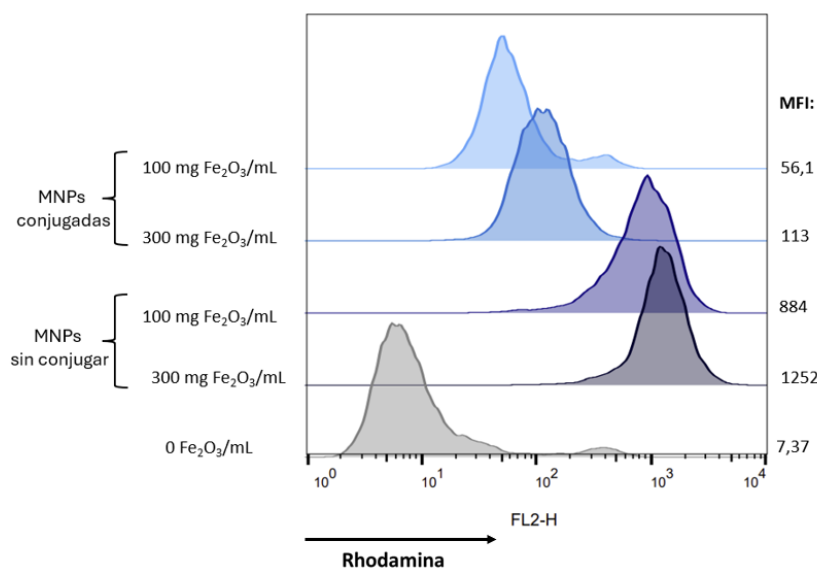
## 5.7 Internalización de MNPs en las líneas MDA-MB-468 y MDA-MB-231

La evaluación de la internalización de las MNPs en ambas líneas celulares se lleva a cabo mediante un generador de imágenes de células fluorescentes (Figura A5, Anexo II) y citometría de flujo. En las Figuras 31 y 32 se observa cómo a medida que aumenta la concentración de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tanto en las MNPs sin conjugar como en las conjugadas se produce un aumento de la fluorescencia media (MFI) en ambas líneas celulares. Por otro lado, si se compara las MNPs conjugadas y sin conjugar a la misma concentración de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, se observa una mayor intensidad de fluorescencia en las células con MNPs sin conjugar que en las conjugadas. Para evaluar si hay diferencias en la internalización de las MNPs en líneas celulares con diferente expresión del EGFR, se analizó la incorporación de MNPs conjugadas en las líneas MDA-MB-468, que presenta una expresión muy elevada del EGFR, y MDA-MB-231, cuya expresión es menor<sup>46</sup>. En la Tabla 1 se presenta la proporción de MFI de las MNPs conjugadas respecto a las MNPs sin conjugar,

observándose un mayor índice de MFI en las línea MDA-MB-468 y, por lo tanto, una mayor internalización, respecto a la línea MDA-MB-231.



**Figura 31.** Representación de la intensidad de fluorescencia con sus respectivos valores de MFI de la línea celular **MDA-MB-468** con las MNPs sin conjugar y conjugadas a distintas concentraciones de  $Fe_2O_3$ .



**Figura 32.** Representación de la intensidad de fluorescencia con sus respectivos valores de MFI de la línea celular **MDA-MB-231** con las MNPs sin conjugar y conjugadas a distintas concentraciones de  $Fe_2O_3$ .

**Tabla 1.** Valores de la proporción MFI en MNPs conjugadas respecto a las MNPs sin conjugar en ambas líneas celulares a las dos concentraciones de  $Fe_2O_3$  estudiadas.

Línea celular	Concentración $Fe_2O_3$ (mg/mL)	Proporción MFI en MNPs conjugadas/sin conjugar
<b>MDA-MB-468</b>	100	7,67
	300	11,2
<b>MDAMB-231</b>	100	6,34
	300	9

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Expresión génica en la reprogramación metabólica

El primer objetivo de este trabajo era analizar la expresión de distintos genes implicados en la reprogramación metabólica y la implicación de la HT en dicha expresión. Mediante ensayos de qPCR, se ha podido confirmar que, la HT produce cambios significativos en la expresión génica. Respecto a HIF-1 $\alpha$  se ha observado una elevada expresión a 37 °C en la línea MDA-MB-231, lo que podría estar asociado a la alta invasividad de dicha línea celular. Se ha demostrado en estudios de la literatura, que al aplicar temperaturas entre 39-43 °C durante 1 hora se activa HIF-1 $\alpha$ , produciéndose mejoras en la oxigenación del tumor y que además las ROS juegan un papel esencial en la regulación al alza de HIF-1 $\alpha$  ya que la HT activa la NADPH oxidasa mediante inducción de la expresión de NADPH oxidasa 1 (NOX1)<sup>58</sup>. Esto podría coincidir con lo observado en el caso de las líneas MDA-MB-468 y MCF7, sin embargo, la línea MDA-MB-231 no presenta dicho comportamiento, posiblemente porque la respuesta adaptativa de aumentar la expresión del gen podría estar limitada en esta línea, por su elevada expresión basal a 37 °C. Por lo que la disminución en la expresión de HIF-1 $\alpha$  en la línea MDA-MB-231 podría implicar una mayor sensibilización a otros tratamientos.

En cuanto a la expresión de ICAM-1, se ha observado una elevada expresión a 37 °C en el caso de la línea MDA-MB-468 y una expresión prácticamente nula en la línea MDA-MB-231. La baja expresión en esta última línea podría deberse a que ésta es clasificada como claudin-low, caracterizada por presentar una baja expresión de proteínas de adhesión intercelular<sup>59</sup>. Tras el tratamiento de temperatura, parece que la hipertermia podría sensibilizar a las células MDA-MB-231 a la acción del sistema inmunitario por el incremento en la expresión de ICAM-1.

En relación con los tres factores de transcripción analizados en este trabajo, la línea MDA-MB-231 presenta una sobreexpresión de éstos a 37 °C. Esto podría explicar la elevada capacidad proliferativa de dicha línea celular, ya que, tanto ATF4 como Nrf2 promueven la proliferación celular en respuesta a varios estímulos<sup>9,12</sup>. Por otro lado, la elevada expresión de p53, gen supresor de tumores, podría deberse a una mutación en dicho gen, bastante frecuente en células cancerosas y presente en la línea MDA-MB-231<sup>11</sup>. Tras los tratamientos de hipertermia, la línea MDA-MB-231 presenta una disminución de la expresión de dichos factores de transcripción, posiblemente por su elevada expresión basal a 37 °C. Por el contrario, tras los tratamientos de hipertermia, las líneas MDA-MB-468 y MCF7 presentan una sobreexpresión de los tres factores de transcripción. Se ha demostrado que, el estrés térmico aumenta la transcripción de proteínas clave de la UPR, respuesta adaptativa a las perturbaciones en la homeostasis del ER, a causa del desorden de los niveles de calcio, acumulación de proteínas mal plegadas y la hipoxia. El proceso de UPR depende de la activación de tres principales proteínas sensoras transmembrana del ER, PERK, IRE1 $\alpha$  y ATF6. La activación de PERK permite la fosforilación de la subunidad alfa del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 (eIF2 $\alpha$ ), que bajo condiciones de estrés favorece el aumento de la traducción de mRNA de un número de proteínas, siendo una de ellas ATF4<sup>60</sup>. Además, la HT induce la apoptosis a través de la generación de ROS, por lo que después del estrés térmico se inducen los sistemas antioxidantes que las células utilizan para mantener el control de su equilibrio redox. Uno de los sistemas que reacciona a este estrés oxidativo involucra genes regulados de manera coordinada por transcripción a través del elemento de respuesta antioxidante que se activa mediante la unión a Nrf2<sup>61</sup>. Dichas condiciones de estrés por calor también activan a p53, a través de la apoptosis mediada por Bax mediante la activación de la caspasa-3 en células cancerosas<sup>62</sup>.

Por último, el gen Opa1 en la línea MDA-MB-231 se encuentra sobreexpresado a 37 °C en comparación con las otras dos líneas celulares, esto se ha asociado con un pronóstico desfavorable<sup>15</sup>. Por otro lado, a 37 °C Drp1 se encuentra sobreexpresado en la línea MDA-MB-468, relacionado también con un peor pronóstico<sup>16</sup>. En condiciones de estrés térmico, se ha visto en nuestros resultados que la expresión de Opa1 o bien no varía, o presenta un ligero aumento de la expresión, o en el caso de la línea MCF7, presenta un aumento a 43 °C. Por el contrario, la expresión de Drp1 se ve aumentada en el caso de las líneas MCF7 y MDA-MB-468. Los cambios no significativos en Opa1 y la elevada expresión de Drp1 se han descrito en estudios llevados a cabo en músculo de ratones, donde se vio que, tras la exposición al calor, se produce un aumento de la fragmentación mitocondrial, sin embargo, en las proteínas relacionados con la fusión mitocondrial no tuvo ningún efecto<sup>63</sup>.

Para confirmar las modificaciones producidas a nivel de proteína, deberían llevarse a cabo estudios utilizando otras técnicas, como la citometría para analizar, por ejemplo, la expresión de la proteína ICAM-1 en la superficie celular, análisis proteómicos, inmunocitoquímica o Western Blot. De confirmarse estas modificaciones, la hipertermia podría ser una buena terapia para sensibilizar a estos tumores frente a la acción del sistema inmunitario, debido al aumento de la expresión de ICAM-1 y a la acción de otras terapias por la disminución de HIF-1 $\alpha$  y de los factores de transcripción, ATF4, Nrf2 y p53.

Como se ha comentado en la introducción, HSP70 juega un papel importante en el desarrollo del cáncer. El crecimiento rápido de las células cancerosas demanda una síntesis constante de proteínas que participan en la replicación, esto da lugar a alteraciones significativas en las vías de transducción de señales y estrés metabólico. Por lo que las células cancerosas dependen de proteínas como las HSP inducibles por estrés, que presentan actividad de chaperonas moleculares para llevar a cabo el plegamiento de proteínas normales a su forma nativa. Siendo así, las funciones citoprotectoras de las HSP esenciales para el mantenimiento y supervivencia de las células cancerosas<sup>64</sup>. Con el objetivo de detectar si la HT modifica la expresión proteica de HSP70, se evaluó su expresión mediante un ensayo de Western Blot. En éste, se observa un aumento en los niveles proteicos de HSP70 en las líneas celulares MDA-MB-468 y MCF7, no observándose dicho aumento en la línea MDA-MB-231. El principal problema de la HT es la elevada expresión de HSP70, esto favorece que las proteínas se mantengan en las células cancerosas aumentando así, su tolerancia. Por tanto, una posible estrategia para controlar el aumento de la expresión es el uso de inhibidores de HSP70 en combinación con la HT<sup>64</sup>.

## **6.2 Hipertermia y uso de inhibidores como estrategia terapéutica**

Lo siguiente que se plantea es estudiar si la HT en combinación con el uso de fármacos podría resultar en una estrategia terapéutica eficiente. Los fármacos estudiados actúan: inhibiendo la dinámica mitocondrial, como es el caso de M-divi-1, inhibidor de la proteína de fisión mitocondrial Drp1; o bien inhibiendo el sistema OXPHOS como es el caso de la metformina, que inhibe el complejo I mitocondrial. Para evaluar las condiciones óptimas, se plantean dos ensayos: (i) estudiar el efecto de la temperatura sobre la sensibilidad al fármaco; (ii) estudiar efecto del fármaco sobre la sensibilidad a la temperatura.

Mediante un ensayo de MTT se ha podido concluir que, en general no parece que la combinación de la HT y M-divi-1 pueda presentar un efecto sinérgico significativo en el índice de viabilidad, pero sí un efecto de la temperatura y el fármaco por separado en las líneas MCF7 y MDA-MB-231. Sin embargo, en el caso de la línea MDA-MB-468 en el segundo ensayo, parece que la combinación de ambos tratamientos podría resultar eficiente a 43 °C (Figura 19). A 45 °C en las

imágenes tomadas con el microscopio se han observado una especie de vacuolas alrededor de las células, que podrían deberse a vesículas de autofagia o acumulación de gotas lipídicas. En condiciones de estrés, se produce un aumento en el flujo de la autofagia a través de modificaciones postraduccionales y una activación de factores transcripcionales sensibles al estrés como p53 y Nrf2<sup>65</sup>. Esto se podría relacionar con el aumento de la expresión de p53 y Nrf2 tras los tratamientos de hipertermia en la línea celular MDA-MB-468 (apartado 5.1.2.3). El estrés celular promueve la acumulación de gotas lipídicas en células cancerosas, que llevan a cabo importantes funciones como el almacenamiento de energía, regulación del tráfico lipídico, gestión y control de calidad de las proteínas y replicación viral<sup>66</sup>. Para conseguir una mayor eficiencia en la combinación de la HT y el uso de M-divi-1 en las líneas MCF7 y MDA-MB-231, podría resultar conveniente, llevar a cabo el segundo ensayo, es decir, aplicar la HT en células pre-tratadas con los fármacos, permitiendo la recuperación de las células a 37 °C tras la hipertermia antes de analizar la inhibición del crecimiento celular por la combinación de los dos tratamientos. Posiblemente así, se podría observar un mayor efecto de la combinación del fármaco y la hipertermia, debido a que la hipertermia puede tener un efecto sobre el crecimiento celular que no sea inmediato.

Por el contrario, la combinación de la HT y metformina, parece que resulta efectiva en el caso de la línea MDA-MB-231 a 43 °C, como se observa en el primer ensayo (Figura 21). En las otras dos líneas celulares a 43 °C el índice de viabilidad no sigue un patrón determinado (MCF7) o no presenta diferencias al aumentar la concentración de fármaco (MDA-MB-468). Del mismo modo, en el segundo ensayo, parece que resulta efectiva la combinación de ambos tratamientos en las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Es decir, al llevar a cabo el tratamiento combinado de hipertermia e inhibición farmacológica, se podría conseguir una mayor eficiencia sobre la viabilidad celular empleando una menor concentración del fármaco.

### **6.3 La hipertermia causa daño en la función y estructura mitocondrial**

Se puede concluir que, el estrés térmico produce una fuerte degradación del CI-SCs en las tres líneas celulares, así como una disminución moderada de la asociación III<sub>2</sub>IV, que va acompañado de un aumento más o menos marcado de los niveles de CIII dimérico sobre todo en las líneas MDA. Además, produce un efecto diferente sobre el ensamblaje de CIV con un aumento en la línea MDA-MD-468 y una disminución en la línea MCF7. En el caso de la línea MCF7 a 47 °C se observa una banda anormal de SCs que migran por debajo del CI-SCs (marcada con un asterisco blanco), esto podría deberse a una alteración en su composición debido a la pérdida de algunas subunidades presentes en estas asociaciones. También se detecta un subcomplejo que revela la degradación parcial del CIV. Por lo que, se puede confirmar que, las temperaturas mayores a 43 °C producen una alteración del sistema OXPHOS, además de que se pueden observar diferencias entre las diferentes líneas celulares estudiadas, reflejando así diferencias en la capacidad respiratoria de las células.

### **6.5 Análisis de la funcionalización de MNPs**

Mediante DLS y STEM se lleva a cabo una caracterización previa de las MNPs revestidas de polímero, para asegurar que sus propiedades físicoquímicas son adecuadas para su posterior funcionalización con el anticuerpo. Mediante DLS, se observa que las MNPs revestidas con polímero presentan un tamaño hidrodinámico mayor que los núcleos magnéticos y un potencial zeta menor, lo que podría indicar el correcto revestimiento de los núcleos magnéticos y la presencia de cargas negativas debido a los grupos carboxilo del polímero. Mediante las imágenes de STEM y TEM también se puede apreciar una capa de ligero contraste, que se puede

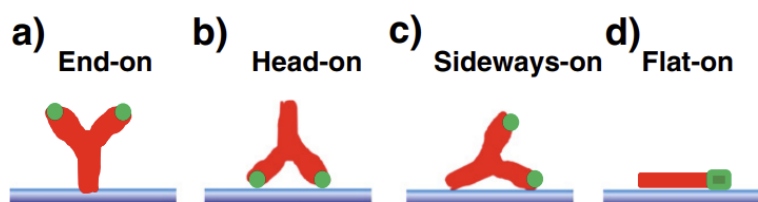
asignar al recubrimiento de polímero, alrededor de los núcleos de fuerte contraste que según el espectro STEM-EDS están compuestos de óxido de hierro.

El análisis de las MNPs mediante DLS muestra un aumento del tamaño hidrodinámico en ambas alícuotas tras la conjugación con el anticuerpo consecuente con la incorporación del anticuerpo a la superficie de las MNPs, mientras que, el potencial zeta apenas varía debido a las cargas negativas correspondientes a los grupos carboxilo del anticuerpo. Por otra parte, los datos de STEM-EDS corroboran la presencia de cetuximab, por la aparición de picos de N y S presentes en su estructura y las señales de K, Ca, Na, Cl, que pueden corresponder a los excipientes utilizados en la preparación del fármaco<sup>67</sup>. Sorprendentemente en ambas muestras de las MNPs conjugadas aparece el elemento Pd en el espectro STEM-EDS, aunque un análisis por emisión atómica (ICP-OES) descarta la presencia de este elemento en la muestra original por lo que se puede atribuir la aparición de esta señal a alguna contaminación en la preparación de la rejilla para la observación por TEM/STEM.

### 6.6 Presencia de cetuximab en MNPs

La presencia de cetuximab y su orientación en las MNPs después de la conjugación por el método de la carbodiimida se analiza mediante electroforesis de gel SDS-PAGE. Aparentemente el rendimiento de la conjugación con cetuximab es mayor cuando se realiza en condiciones de 37 °C y utilizando PEG como bloqueante puesto que la intensidad de las dos bandas correspondientes al anticuerpo es mucho mayor en comparación con las dos muestras de MNPs conjugadas a temperatura ambiente y utilizando glicina como bloqueante. Sin embargo, a pesar de que la intensidad de las bandas sea mayor, este procedimiento genera una abundante agregación, probablemente atribuible a una neutralización de las cargas superficiales y la consecuente ausencia de repulsiones electrostáticas entre las nanopartículas. Es evidente que se precisa una optimización de las condiciones de reacción, de las proporciones MNPs/anticuerpo y la utilización de procesos de separación y purificación magnética durante el procedimiento. Aunque dicha optimización queda para posteriores investigaciones. Mientras tanto, las MNPs conjugadas a temperatura ambiente y bloqueadas con glicina, no generan ninguna agregación, aunque incorporen una menor cantidad de anticuerpo.

En cuanto a la orientación del anticuerpo, éste puede adoptar cuatro posiciones: (a) end-on; (b) head-on; (c) sideways-on; (d) flat-on (Figura 33). La posición end-on, se considera la orientación óptima, debido a que se produce la conjugación a través de fragmento Fc, dejando así la región Fab libre para el reconocimiento de antígenos. Las posiciones head-on y sideways-on no son adecuadas, ya que la eficiencia del reconocimiento del antígeno de las MNPs funcionalizadas se ve obstaculizada debido a la interferencia estérica. Por último, la orientación flat-on también se podría considerar adecuada, ya que no altera la actividad de unión al antígeno<sup>68</sup>.



**Figura 33.** Representación esquemática de las cuatro posiciones diferentes de los anticuerpos sobre superficies<sup>68</sup>.

En el método carbodiimida de dos pasos se ve favorecida la orientación flat-on en MNPs con un tamaño hidrodinámico grande donde se unen tanto las cadenas pesadas como ligeras por lo que en el gel SDS-PAGE no se verían las bandas correspondientes a ambas cadenas. Sin embargo, en MNPs con un tamaño hidrodinámico menor se favorece la unión a través de las cadenas pesadas, observándose en el gel predominantemente la banda correspondiente a las cadenas ligeras (25 kDa). En el gel SDS-PAGE (Figura 30) se observa la presencia tanto de cadenas pesadas como de ligeras, siendo la intensidad de las cadenas pesadas similar a la de las cadenas ligeras en los pocillos 2 y 3, pero si se compara la intensidad de las cadenas pesadas de las MNPs conjugadas con respecto a las del anticuerpo libre, se observa una disminución de la intensidad, por lo que se puede deducir que el anticuerpo podría estar mayoritariamente orientado en la disposición end-on<sup>69</sup>. La presencia de cadenas pesadas podría deberse a que, no todo el anticuerpo se une covalentemente. Como se apuntaba arriba, el método podría mejorarse llevando a cabo una separación y purificación tras añadir el anticuerpo y optimizando la cantidad de anticuerpo añadida para conseguir una unión de anticuerpo óptima sin necesidad de afectar a la estabilidad coloidal. Por otra parte, serán los estudios de afinidad celular los que den una medida más certera de la eficacia de la conjugación.

### **6.7 Determinación de la bioactividad de los conjugados MNPs-cetuximab**

Mediante imágenes de células fluorescentes y citometría de flujo se estudia la capacidad de los conjugados cetuximab-MNPs de reconocer y unirse a su ligando biológico, EGFR, en dos líneas celulares, MDA-MB-468 (sobrexprende EGFR) y MDA-MB-231 (presenta menores niveles de expresión de EGFR). En primer lugar, se observa una mayor proporción de MFI a mayores concentraciones de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, pero, al comparar las MNPs conjugadas y sin conjugar, se observa una mayor MFI en éstas últimas en ambas líneas celulares, a pesar de expresar niveles distintos de EGFR. En un Trabajo de Fin de Máster previo<sup>53</sup> se estudió la internalización de conjugados nimotuzumab-MNPs en líneas MDA-MB-468 y SKBR-3 (expresa niveles bajos de EGFR), observándose una mayor internalización de los conjugados con respecto a las MNPs sin conjugar en la línea MDA-MB-468 y una menor internalización de las MNPs conjugadas en la línea SKBR-3. Esto podría deberse a que nimotuzumab, que es un anticuerpo anti-EGFR como el cetuximab, pero con una afinidad más baja, interfiere solo con la activación dependiente del ligando, reduciendo así fuertemente la señalización de EGFR a nivel basal, independientemente del ligando. Por otro lado, cetuximab, inhibe tanto la dimerización del EGFR dependiente de ligando como la independiente de ligando, bloqueando la unión del EGF e interfiriendo estéricamente con la conformación activa y no anclada del receptor<sup>70</sup>.

En cambio, cuando se comparan los valores de MFI de las MNPs conjugadas respecto a las MNPs sin conjugar en ambas líneas celulares estudiadas, se observa una mayor proporción de MFI en la línea MDA-MB-468 respecto a la línea MDA-MB-231. Aunque la diferencia no sea muy significativa, debido a la necesidad de optimizar el procedimiento de conjugación, estas líneas celulares podrían ser adecuadas para estudiar la bioactividad de los conjugados cetuximab-MNPs que deberían unirse preferentemente a la línea MDA-MB-468.

## 7.CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y su comparación con otras investigaciones se puede concluir lo siguiente:

1. La expresión génica presenta cambios tras los tratamientos de hipertermia, lo que podría resultar en un enfoque terapéutico para sensibilizar a los tumores frente a la acción del sistema inmunitario y a la acción de otros tratamientos.
2. El tratamiento combinado de hipertermia e inhibición farmacológica parece resultar eficiente utilizando los dos inhibidores. Quizás se podría conseguir una mayor eficiencia en el caso de M-divi-1 optimizando el tiempo de recuperación de las células a 37 °C tras la hipertermia antes de analizar la inhibición del crecimiento celular por la combinación de los dos tratamientos.
3. La hipertermia causa daño en la función y estructura mitocondrial, produciendo una fuerte degradación del CI-SCs, que va acompañado de un aumento más o menos marcado de los niveles del CIII dimérico. En cuanto al CIV, la hipertermia provoca un efecto diferente sobre el ensamblaje de este complejo en las tres líneas celulares estudiadas.
4. Es necesario llevar a cabo una re-optimización del método de carbodiimida de dos pasos en las dos condiciones utilizadas en la funcionalización de las MNPs con cetuximab, debido a problemas en la estabilidad coloidal y en la aparición de cadenas pesadas en el gel SDS-PAGE probablemente porque no todo el anticuerpo se esté uniendo covalentemente.
5. La línea MDA-MB-468 presenta una mayor proporción de internalización de las MNPs conjugadas respecto a la línea MDA-MB-231. Aunque la diferencia no sea muy significativa, debido a la necesidad de optimizar el procedimiento de conjugación, estas líneas celulares podrían ser adecuadas para estudiar la bioactividad de los conjugados cetuximab-MNPs que deberían unirse preferentemente a la línea MDA-MB-468.

## CONCLUSIONS

Based on the results obtained in this work and their comparison with other research, the following conclusions can be drawn:

1. Gene expression shows changes after hyperthermia treatments, which could result in a therapeutic approach to sensitize tumors to the action of the immune system and the action of other treatments.
2. The combined treatment of hyperthermia and pharmacological inhibition seems to be effective using both inhibitors. Greater efficiency could be achieved with M-divi-1 by optimizing the cell recovery time at 37°C after hyperthermia before analyzing cell growth inhibition by the combination of the two treatments.
3. Hyperthermia causes damage to mitochondrial function and structure, producing a strong degradation of CI-SCs, accompanied by a more or less marked increase in the levels of dimeric CIII. Regarding CIV, hyperthermia causes a different effect on the assembly of this complex in the three cell lines studied.
4. It is necessary to re-optimize the two-step carbodiimide method under the two conditions used for functionalizing MNPs with cetuximab, due to issues with colloidal stability and the appearance of heavy chains in the SDS-PAGE gel, probably because not all of the antibody is covalently bound.

5. The MDA-MB-468 line shows greater internalization of the conjugated MNPs compared to the MDA-MB-231 line. Although the difference is not very significant due to the need to optimize the conjugation procedure, these cell lines could be a target for studying the bioactivity of cetuximab-MNP conjugates, which should preferentially bind to the MDA-MB-468 line.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cooper, G. (2000) The Development and Causes of Cancer. *The Cell: A Molecular Approach* (2nd edition). Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- (2) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*. March 4, 2011, pp 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (3) Yin, L.; Duan, J. J.; Bian, X. W.; Yu, S. C. Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtyping and Treatment Progress. *Breast Cancer Research*. BioMed Central Ltd June 9, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.
- (4) World Health Organization (2024, March). *Breast cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
- (5) Sengedorj, A.; Hader, M.; Heger, L.; Frey, B.; Dudziak, D.; Fietkau, R.; Ott, O. J.; Scheidegger, S.; Barba, S. M.; Gaipl, U. S.; Rückert, M. The Effect of Hyperthermia and Radiotherapy Sequence on Cancer Cell Death and the Immune Phenotype of Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)* **2022**, *14* (9). <https://doi.org/10.3390/cancers14092050>.
- (6) Lebelo, M. T.; Joubert, A. M.; Visagie, M. H. Warburg Effect and Its Role in Tumorigenesis. *Archives of Pharmacal Research*. Pharmaceutical Society of Korea October 1, 2019, pp 833–847. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01185-2>.
- (7) Infantino, V.; Santarsiero, A.; Convertini, P.; Todisco, S.; Iacobazzi, V. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI June 1, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22115703>.
- (8) Fraga, A.; Ribeiro, R.; Medeiros, R. (2009). Hipoxia tumoral: Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urológicas Españolas*, *33*(9), 941-951. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0210-48062009000900003](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0210-48062009000900003).
- (9) Wu, D.; Liang, J. Activating Transcription Factor 4: A Regulator of Stress Response in Human Cancers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media SA 2024. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1370012>.
- (10) Bui, T. M.; Wiesolek, H. L.; Sumagin, R. ICAM-1: A Master Regulator of Cellular Responses in Inflammation, Injury Resolution, and Tumorigenesis. *Journal of Leukocyte Biology*. John Wiley and Sons Inc September 1, 2020, pp 787–799. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R>.
- (11) Marei, H. E.; Althani, A.; Afifi, N.; Hasan, A.; Caceci, T.; Pozzoli, G.; Morrione, A.; Giordano, A.; Cenciarelli, C. P53 Signaling in Cancer Progression and Therapy. *Cancer Cell International*. BioMed Central Ltd December 1, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8>.
- (12) Rojo de la Vega, M.; Chapman, E.; Zhang, D. D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell*. Cell Press July 9, 2018, pp 21–43. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>.
- (13) He, F.; Antonucci, L.; Karin, M. NRF2 as a Regulator of Cell Metabolism and Inflammation in Cancer. *Carcinogenesis* **2020**, *41* (4), 405–416. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa039>.

- (14) Dai, W.; Jiang, L. Dysregulated Mitochondrial Dynamics and Metabolism in Obesity, Diabetes, and Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A. September 3, 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00570>.
- (15) Zamberlan, M.; Boeckx, A.; Muller, F.; Vinelli, F.; Ek, O.; Vianello, C.; Coart, E.; Shibata, K.; Christian, A.; Grespi, F.; Giacomello, M.; Struman, I.; Scorrano, L.; Herkenne, S. Inhibition of the Mitochondrial Protein Opa1 Curtails Breast Cancer Growth. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **2022**, *41* (1). <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02304-6>.
- (16) Adhikary, A.; Mukherjee, A.; Banerjee, R.; Nagotu, S. DRP1: At the Crossroads of Dysregulated Mitochondrial Dynamics and Altered Cell Signaling in Cancer Cells. *ACS Omega*. American Chemical Society December 5, 2023, pp 45208–45223. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06547>.
- (17) Albakova, Z.; Armeev, G. A.; Kanevskiy, L. M.; Kovalenko, E. I.; Sapozhnikov, A. M. HSP70 Multi-functionality in Cancer. *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) March 1, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9030587>.
- (18) Cooper, G. (2000) The Development and Causes of Cancer. *Mitochondria*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/>.
- (19) StudyMind. *Eukaryotic Cells: The mitochondria*. <https://studymind.co.uk/notes/eukaryotic-cells-the-mitochondria/>
- (20) Bergman, O.; Ben-Shachar, D. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) Deficits in Schizophrenia: Possible Interactions with Cellular Processes. *Canadian Journal of Psychiatry*. SAGE Publications Inc. August 1, 2016, pp 457–469. <https://doi.org/10.1177/0706743716648290>.
- (21) Zhang, X.; Hu, Y. Mitochondrial Thermogenesis in Cancer Cells. *Oncologie*. Walter de Gruyter GmbH November 1, 2023, pp 591–603. <https://doi.org/10.1515/oncologie-2023-0298>.
- (22) Acín-Pérez, R.; Fernández-Silva, P.; Peleato, M. L.; Pérez-Martos, A.; Enriquez, J. A. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol Cell* **2008**, *32* (4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>.
- (23) Yusoff, A.; Ahmad, F.; Idris, Z.; Jaafar, H.; Abdullah, J.; (2015). Understanding Mitochondrial DNA in Brain Tumorigenesis. InTech. doi: 10.5772/58965.
- (24) Kozakiewicz, P.; Grzybowska-Szatkowska, L.; Ciesielka, M.; Rzymowska, J. The Role of Mitochondria in Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG May 2, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22105100>.
- (25) Grasso, D.; Zampieri, L. X.; Capelôa, T.; Van De Velde, J. A.; Sonveaux, P. Mitochondria in Cancer. *Cell Stress*. Shared Science Publishers OG June 1, 2020, pp 114–146. <https://doi.org/10.15698/cst2020.06.221>.
- (26) Beignon, F.; Gueguen, N.; Tricoire-Leignel, H.; Mattei, C.; Lenaers, G. The Multiple Facets of Mitochondrial Regulations Controlling Cellular Thermogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH October 1, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04523-8>.

- (27) Moreno-Loshuertos, R.; Marco-Brualla, J.; Meade, P.; Soler-Agesta, R.; Enriquez, J. A.; Fernández-Silva, P. How Hot Can Mitochondria Be? Incubation at Temperatures above 43 °C Induces the Degradation of Respiratory Complexes and Supercomplexes in Intact Cells and Isolated Mitochondria. *Mitochondrion* **2023**, *69*, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2023.02.002>.
- (28) Macherel, D.; Haraux, F.; Guillou, H.; Bourgeois, O. The Conundrum of Hot Mitochondria. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **2021**, *1862* (2). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148348>.
- (29) Martínez J.; Guirado F.; Cabrera I. Hipertermia Oncológica: Fundamentos y evidencia científica (1ª edición) Emiral Ediciones. [https://seor.es/wp-content/uploads/2020/03/Libro-Hipertermia\\_11Ene\\_300.pdf](https://seor.es/wp-content/uploads/2020/03/Libro-Hipertermia_11Ene_300.pdf).
- (30) Badrinath, N.; Yoo, S. Y. Mitochondria in Cancer: In the Aspects of Tumorigenesis and Targeted Therapy. *Carcinogenesis*. Oxford University Press December 31, 2018, pp 1419–1430. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy148>.
- (31) Ashton, T. M.; Gillies McKenna, W.; Kunz-Schughart, L. A.; Higgins, G. S. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc. June 1, 2018, pp 2482–2490. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3070>.
- (32) Liu, Y.; Sun, Y.; Guo, Y.; Shi, X.; Chen, X.; Feng, W.; Wu, L. L.; Zhang, J.; Yu, S.; Wang, Y.; Shi, Y. An Overview: The Diversified Role of Mitochondria in Cancer Metabolism. *International Journal of Biological Sciences*. Ivyspring International Publisher 2023, pp 897–915. <https://doi.org/10.7150/ijbs.81609>.
- (33) Peiris-Pagès, M.; Bonuccelli, G.; Sotgia, F.; Lisanti, M. P. *Mitochondrial Fission as a Driver of Stemness in Tumor Cells: MDIV1 Inhibits Mitochondrial Function, Cell Migration and Cancer Stem Cell (CSC) Signalling*; 2018; Vol. 9. [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget).
- (34) Wong, R. S. Y. Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2011. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>.
- (35) Bala, V. M.; Lampropoulou, D. I.; Grammatikaki, S.; Kouloulis, V.; Lagopati, N.; Aravantinos, G.; Gazouli, M. Nanoparticle-Mediated Hyperthermia and Cytotoxicity Mechanisms in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) January 1, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25010296>.
- (36) Farzin, A.; Etesami, S. A.; Quint, J.; Memic, A.; Tamayol, A. Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Advanced Healthcare Materials*. Wiley-VCH Verlag May 1, 2020. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901058>.
- (37) Gu, Y.; Yoshikiyo, M.; Namai, A.; Bonvin, D.; Martinez, A.; Piñol, R.; Téllez, P.; Silva, N. J. O.; Ahrentorp, F.; Johansson, C.; Marco-Brualla, J.; Moreno-Loshuertos, R.; Fernández-Silva, P.; Cui, Y.; Ohkoshi, S. I.; Millán, A. Magnetic Hyperthermia with  $\epsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>nanoparticles. *RSC Adv* **2020**, *10* (48), 28786–28797. <https://doi.org/10.1039/d0ra04361c>.

- (38) Arriortua O.(2015). Funcionalización y estudio de nanopartículas de magnetita para su aplicación en terapias de hipertermia magnética [Tesis doctoral, Universidad del País Vasco] <http://hdl.handle.net/10810/17845>
- (39) Gagliardi, A.; Giuliano, E.; Venkateswararao, E.; Fresta, M.; Bulotta, S.; Awasthi, V.; Cosco, D. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. February 3, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>.
- (40) Lee, J. H.; Chapman, D. V.; Saltzman, W. M. Nanoparticle Targeting with Antibodies in the Central Nervous System. *BME Frontiers*. American Association for the Advancement of Science 2023. <https://doi.org/10.34133/bmef.0012>.
- (41) Bio X Cell (2024). *Antibody Structure*. <https://bioxcell.com/educational-articles/antibody-structure/>
- (42) Maennling, A. E.; Tur, M. K.; Niebert, M.; Klockenbring, T.; Zeppernick, F.; Gattenlöhner, S.; Meinhold-Heerlein, I.; Hussain, A. F. Molecular Targeting Therapy against Egfr Family in Breast Cancer: Progress and Future Potentials. *Cancers (Basel)* **2019**, *11* (12). <https://doi.org/10.3390/cancers11121826>.
- (43) Carretero Colomer, M. (2005). *Cetuximab Inhibidor Del Crecimiento Del Cáncer Colorrectal Actualidad Científica Medicamentos de Vanguardia*. *OFFARM*, *24*(6).
- (44) Maya, S.; Kumar, L. G.; Sarmiento, B.; Sanoj Rejinold, N.; Menon, D.; Nair, S. V.; Jayakumar, R. Cetuximab Conjugated O-Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles for Targeting EGFR Overexpressing Cancer Cells. *Carbohydr Polym* **2013**, *93* (2), 661–669. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.032>.
- (45) Dai, X.; Cheng, H.; Bai, Z.; Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher 2017, pp 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>.
- (46) Liu Y, Zhou Y, Huang K, Li Y, Fang X, An L, Wang F, Chen Q, Zhang Y, Shi A, Yu S, Zhang J. EGFR-specific CAR-T cells trigger cell lysis in EGFR-positive TNBC. *Aging (Albany NY)*. 2019 Dec 4; *11*:11054-11072. <https://doi.org/10.18632/aging.102510>
- (47) *Blog del Manual del Laboratorio: Laboratorio de Bioquímica celular y de los Tejidos II. Anexo 2: Cámara de Neubauer*. <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>.
- (48) Fernandez-Vizarra, E.; Zeviani, M. Blue-Native Electrophoresis to Study the OXPHOS Complexes. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2021; Vol. 2192, pp 287–311. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0834-0\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0834-0_20).
- (49) Protein analysis. (2024). *Quantifying proteins using the Bradford method*. Qiagen. <https://www.qiagen.com/es-us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/protein/protein-analysis/quantifying-proteins-using-the-bradford-method>.
- (50) Gu, Y.; Piñol, R.; Moreno-Loshuertos, R.; Brites, C. D. S.; Zeler, J.; Martínez, A.; Maurin-Pasturel, G.; Fernández-Silva, P.; Marco-Brualla, J.; Téllez, P.; Cases, R.; Belsué, R. N.; Bonvin, D.; Carlos, L. D.; Millán, A. Local Temperature Increments and Induced Cell Death

- in Intracellular Magnetic Hyperthermia. *ACS Nano* **2023**, *17* (7), 6822–6832. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00388>.
- (51) Piñol, R.; Brites, C. D. S.; Bustamante, R.; Martínez, A.; Silva, N. J. O.; Murillo, J. L.; Cases, R.; Carrey, J.; Estepa, C.; Sosa, C.; Palacio, F.; Carlos, L. D.; Millán, A. Joining Time-Resolved Thermometry and Magnetic-Induced Heating in a Single Nanoparticle Unveils Intriguing Thermal Properties. *ACS Nano* **2015**, *9* (3), 3134–3142. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00059>.
- (52) Puertas, S.; Batalla, P.; Moros, M.; Polo, E.; Del Pino, P.; Guisán, J. M.; Grazú, V.; De La Fuente, J. M. Taking Advantage of Unspecific Interactions to Produce Highly Active Magnetic Nanoparticle-Antibody Conjugates. *ACS Nano* **2011**, *5* (6), 4521–4528. <https://doi.org/10.1021/nn200019s>.
- (53) Ramírez, G. (2015). *Functionalization of Magnetic Nanoheaters with the Therapeutic Anti-EGFR Antibody Nimotuzumab for Cancer Targeting* [Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Zaragoza].
- (54) Jia, Z.; Li, J.; Gao, L.; Yang, D.; Kanaev, A. Dynamic Light Scattering: A Powerful Tool for In Situ Nanoparticle Sizing. *Colloids and Interfaces*. MDPI March 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/colloids7010015>.
- (55) Laboratorio de Microscopías Avanzadas. (2023). *Titan Analítico*. <https://lma.unizar.es/titan-analitico/>
- (56) *Nanoscience Instruments*. (2024). *Scanning Transmission Electron Microscopy: What is scanning transmission electron microscopy (STEM)?* <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-transmission-electron-microscopy/>
- (57) BD Biosciences. (2024). *BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I*. <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/panels-multicolor-cocktails-ruo/fitc-annexin-v-apoptosis-detection-kit-i.556547>
- (58) Moon, E. J.; Sonveaux, P.; Porporato, P. E.; Danhier, P.; Gallez, B.; Batinic-Haberle, I.; Nien, Y. C.; Schroeder, T.; Dewhirst, M. W. NADPH Oxidase-Mediated Reactive Oxygen Species Production Activates Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) via the ERK Pathway after Hyperthermia Treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (47), 20477–20482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006646107>.
- (59) Herschkowitz, J. I.; Simin, K.; Weigman, V. J.; Mikaelian, I.; Usary, J.; Hu, Z.; Rasmussen, K. E.; Jones, L. P.; Assefnia, S.; Chandrasekharan, S.; Backlund, M. G.; Yin, Y.; Khramtsov, A. I.; Bastein, R.; Quackenbush, J.; Glazer, R. I.; Brown, P. H.; Green, J. E.; Kopelovich, L.; Furth, P. A.; Palazzo, J. P.; Olopade, O. I.; Bernard, P. S.; Churchill, G. A.; Van Dyke, T.; Perou, C. M. Identification of Conserved Gene Expression Features between Murine Mammary Carcinoma Models and Human Breast Tumors. *Genome Biol* **2007**, *8* (5). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r76>.
- (60) Ahmed, K.; Zaidi, S. F.; Mati-ur-Rehman; Rehman, R.; Kondo, T. Hyperthermia and Protein Homeostasis: Cytoprotection and Cell Death. *Journal of Thermal Biology*. Elsevier Ltd July 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102615>.

- (61) Xie, W.; Tan, B.; Yang, Z.; Yu, X.; Chen, L.; Ran, D.; Xu, Q.; Zhou, X. Nrf2/ARE Pathway Activation Is Involved in Negatively Regulating Heat-Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2020**, *52* (4), 439–445. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa013>.
- (62) Ohnishi, K.; Ohnishi, T. Heat-Induced P53-Dependent Signal Transduction and Its Role in Hyperthermic Cancer Therapy. *International Journal of Hyperthermia*. 2001, pp 415–427. <https://doi.org/10.1080/02656730110063604>.
- (63) Yu, T.; Ferdjallah, I.; Elenberg, F.; Chen, S. K.; Deuster, P.; Chen, Y. Mitochondrial Fission Contributes to Heat-Induced Oxidative Stress in Skeletal Muscle but Not Hyperthermia in Mice. *Life Sci* **2018**, *200*, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.031>.
- (64) Somu, P.; Mohanty, S.; Basavegowda, N.; Yadav, A. K.; Paul, S.; Baek, K. H. The Interplay between Heat Shock Proteins and Cancer Pathogenesis: A Novel Strategy for Cancer Therapeutics. *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) February 1, 2024. <https://doi.org/10.3390/cancers16030638>.
- (65) Alvarez-Meythaler, J. G.; Garcia-Mayea, Y.; Mir, C.; Kondoh, H.; Lleonart, M. E. Autophagy Takes Center Stage as a Possible Cancer Hallmark. *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A. October 22, 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.586069>.
- (66) Petan, T.; Jarc, E.; Jusović, M. Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Molecules*. MDPI AG 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23081941>.
- (67) CIMA: Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS. (2022). Ficha técnica Erbitux 5 mg/mL solución para perfusión. [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/04281003/FT\\_04281003.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/04281003/FT_04281003.html).
- (68) Montenegro, J. M.; Grazu, V.; Sukhanova, A.; Agarwal, S.; de la Fuente, J. M.; Nabiev, I.; Greiner, A.; Parak, W. J. Controlled Antibody/(Bio-) Conjugation of Inorganic Nanoparticles for Targeted Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. May 2013, pp 677–688. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.12.003>.
- (69) Puertas, S.; Moros, M.; Fernandez-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Grazu, V.; De La Fuente, J. M. Designing Novel Nano-Immunoassays: Antibody Orientation versus Sensitivity. *J Phys D Appl Phys* **2010**, *43* (47). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/43/47/474012>.
- (70) Talavera, A.; Friemann, R.; Gómez-Puerta, S.; Martínez-Fleites, C.; Garrido, G.; Rabasa, A.; López-Requena, A.; Pupo, A.; Johansen, R. F.; Sánchez, O.; Krengel, U.; Moreno, E. Nimotuzumab, an Antitumor Antibody That Targets the Epidermal Growth Factor Receptor, Blocks Ligand Binding While Permitting the Active Receptor Conformation. *Cancer Res* **2009**, *69* (14), 5851–5859. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4518>.

## 9. ANEXO

### 9.1 ANEXO I: Información adicional al desarrollo experimental

**Tabla A1.** Reactivos para la síntesis de cDNA monocatenario.

Reactivo	Cantidad
RNA total	1 µg
NZYRT Enzyme Mix <sup>(1)</sup>	2 µL
NZYRT 2x Master Mix <sup>(2)</sup>	10 µL
DEPC-treated water	Hasta 20 µL

(1) Incluye la transcriptasa reversa NZY y el inhibidor de la ribonucleasa NZY

(2) Incluye el oligo(dT)18, hexámeros aleatorios, Mg<sup>2+</sup> y dNTPs.

**Tabla A2.** Reactivos utilizados en la qPCR.

Reactivo	Volumen
Primers (Tabla A3)	0,5 µL
Master Mix 2X*	5 µL
H <sub>2</sub> O (RNasa free)	3,5 µL

\*El Master Mix 2X contiene colorante SYBR Green, DNA polimerasa Taq Dual-Lock, dNTP con mezcla de dUTP/dTTP, UDG termolábil, colorante de referencia pasiva ROX y componentes de tampón optimizados.

**Tabla A3.** Primers utilizados en la qPCR.

Gen	Primer directo	Primer reverso
HIF-1α	ACATCGCGGGGACCGAT	TCAATATCCAAATCACCAGCATCC
ICAM-1	TGTGACCAGCCCAAGTTGTT	TAAGGTTCTTGCCCACTGGC
Nrf2	CACATCCAGTCAGAAACCAAGTGG	GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
Drp1	GATGCCATAGTTGAAGTGGTGAC	CCACAAGCATCAGCAAAGTCTGG
ATF4	ATGGGTTCTCCAGCGACAAG	GAAGGCATCCTCCTTGCTGT
Opa1	GTGGTTGGAGATCAGAGTGCTG	GAGGACCTTCACTCAGAGTCAC
p53	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC

**Tabla A4.** Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de proteínas (WB) para el análisis de complejos mitocondriales.

Complejo	Anticuerpo	Casa comercial	Concentración	Anticuerpo secundario	Casa comercial
I	$\alpha$ -NDUFB6 monoclonal antibody de ratón	Invitrogen	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen
II	$\alpha$ -SDHA monoclonal antibody de ratón	Invitrogen	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen
III	$\alpha$ -UQCRC2 monoclonal antibody de ratón	Invitrogen	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen
IV	$\alpha$ -CO1 monoclonal antibody de ratón	Invitrogen	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen

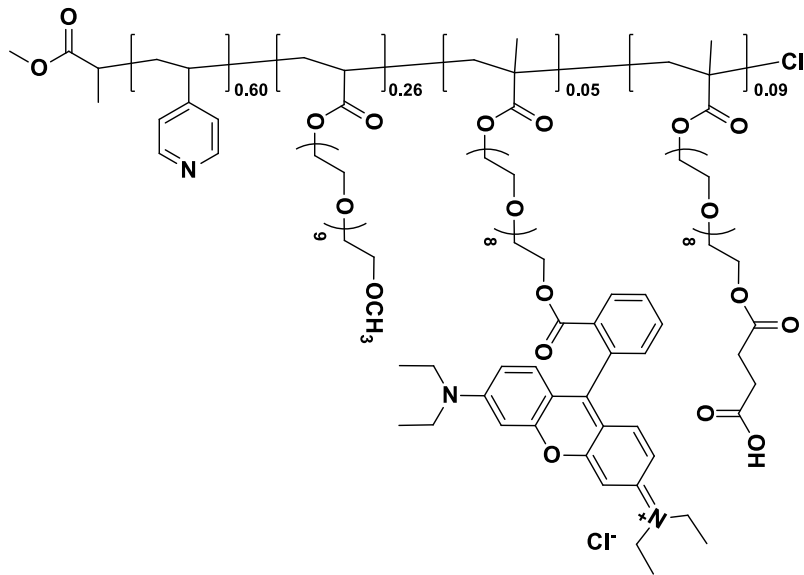
**Tabla A5.** Composición de las disoluciones para la preparación de los geles separador (12,5 % de acrilamida) y concentrador para la electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

	Gel separador (12,5%)	Gel concentrador (12,5%)
<b>Acrilamida:Bisacrilamida (30%)</b>	2,084 mL	0,33 mL
<b>Tampón 4X*</b>	1,25 mL	0,5 mL
<b>SDS 20%</b>	25 $\mu$ L	10 $\mu$ L
<b>H2O destilada</b>	1,641 mL	1,17 mL
<b>APS 20%</b>	15 $\mu$ L	10 $\mu$ L
<b>TEMED</b>	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

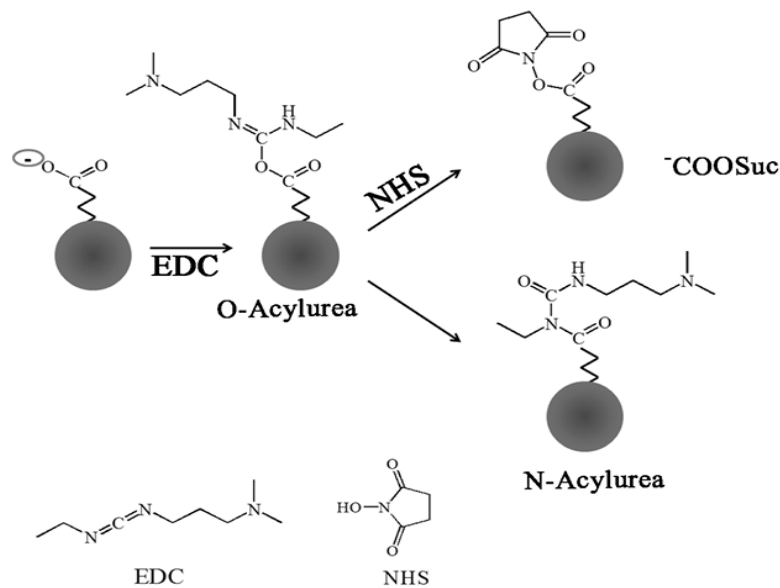
\*Tampón 4X gel separador (Tris-HCl 1,5 M pH=8,8, SDS 0.4%, EDTA 8 mM) y tampón 4X gel concentrador (Tris-HCl 0,5 M pH=6.8, SDS 0.4%, EDTA 8 mM)

**Tabla A6.** Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de proteínas (WB) para el análisis de proteínas totales.

Anticuerpo primario	Casa comercial	Concentración	Anticuerpo secundario	Casa comercial
Tubulina	Sigma-Aldrich	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen
HSP70	Novus	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen



**Figura A1.** Estructura química del copolímero P4VP-b-P(MPEGA-co-RhodPEGMA-co-carboxylic PEGMA)<sup>37</sup>



**Figura A2.** Esquema del mecanismo de activación de los grupos COOH de las MNPs mediante el acoplamiento de carbodiimida asistido o no por NHS. Para simplificar, el EDC se ha representado en forma neutra, aunque se encuentra en forma catiónica en las condiciones de reacción<sup>52</sup>.

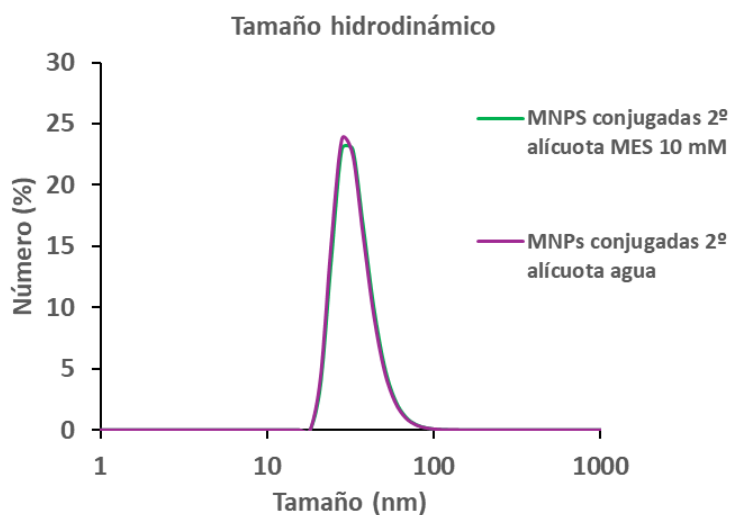
**Tabla A7.** Retención de proteínas empleando los filtros Amicon Ultra 0,5 mL centrifugal filters de Sigma-Aldrich.

Concentración	Peso molecular	NMWL	Retención %	Tiempo (min)
Tiroglobulina	677,000	100K	>95	10
IgG (1 mg/mL)	156,000	100K	>95	10
Ovoalbúmina	45,000	100K	<30	10

\*Condiciones: rotor con un ángulo fijo de 40°, 14000x g, temperatura ambiente, volumen de partida 500 µL

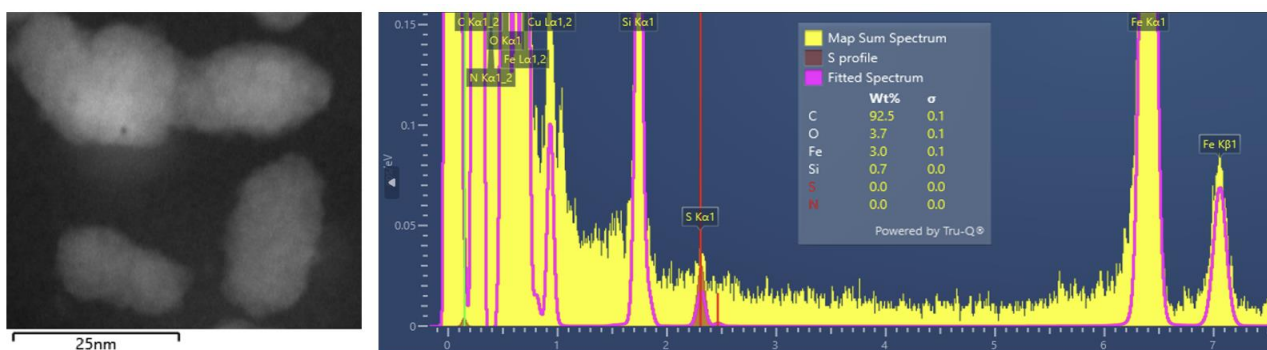
**Tabla A8.** Medidas de tamaño hidrodinámico (nm) y potencial zeta (mV) con sus respectivas sd en MES 10 mM medido en DLS.

Muestra	Tamaño hidrodinámico (nm)	Potencial zeta (mV)
Núcleos magnéticos	25±7,7	36,5±2
MNPs sin conjugar	30,72±9,54	-7,62±7,84
MNPs conjugadas 1ª alícuota	34,62±11,06	-7,91±4,83
MNPs conjugadas 2ª alícuota	34,42±10,15	-6,82±5,12

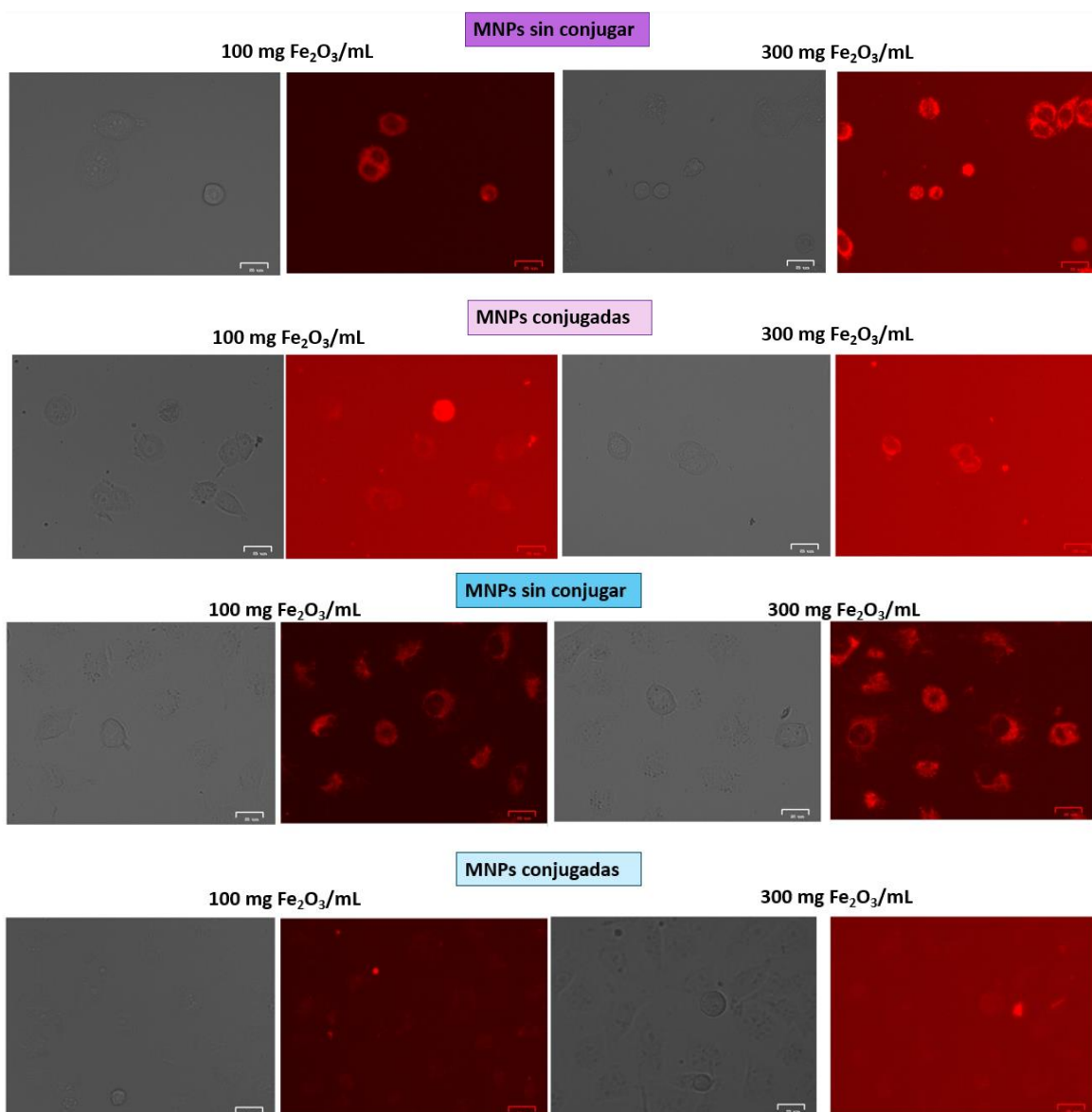


**Figura A3.** Tamaño hidrodinámico de las MNPs conjugadas 2ª alícuota en MES 10 mM y en H<sub>2</sub>O.

## 9.2 ANEXO II: Información adicional a los resultados



**Figura A4.** Imagen de las MNPs revestidas con polímero mediante STEM y su correspondiente espectro STEM-EDS con los respectivos % en peso molecular de cada elemento.



**Figura A5.** Imágenes de células fluorescentes de las líneas celulares MDA-MB-468 (en morado) y MDA-MB-231 (en azul) con las MNPs sin conjugar y conjugadas a distintas concentraciones de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .