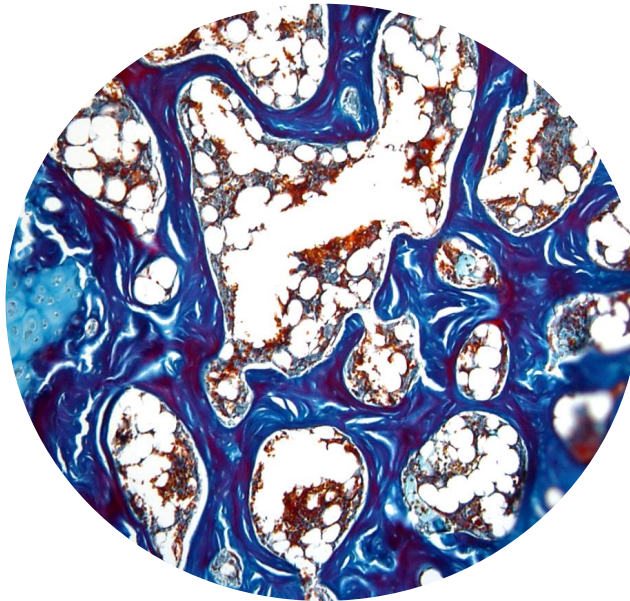

Silenciamiento de *SFRP1* mediante nanopartículas híbridas para el tratamiento de la osteoporosis



Trabajo de Fin de Máster

Sara Santana Rivero

Tutorizado por: Ricardo Reyes Rodríguez y Patricia Díaz Rodríguez

Grupo de Investigación: Sistemas de Liberación de Fármacos

Máster en Biomedicina 2020-2021

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

El Dr. Ricardo Reyes Rodríguez, y la Dra. Patricia Díaz Rodríguez, componentes del grupo de investigación “Sistemas de Liberación de Fármacos”, adscrito a la titulación de Máster en Biomedicina por la ULL

CERTIFICAN

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado “*Silenciamiento de SFRP-1 mediante nanopartículas híbridas para el tratamiento de la osteoporosis*” ha sido realizado bajo nuestra supervisión por D^a Sara Santana Rivero, matriculada en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2020-2021.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, damos nuestro consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 31 de mayo de 2021

DIAZ RODRIGUEZ,
PATRICIA
(AUTENTICACIÓN)

Firmado digitalmente por
DIAZ RODRIGUEZ, PATRICIA
(AUTENTICACIÓN)
Fecha: 2021.06.01 00:31:52
+02'00'

Dr. Ricardo Reyes Rodríguez

Dra. Patricia Díaz Rodríguez

Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado, Edificio Central, Campus Central, 38071 La Laguna.
C/ Delgado Barreto S/N. Tfno. (00 34) 922 31 9000
<http://www.escuelas.ull.es/view/centros/escueladoctorado/inicio-master@ull.es>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3470543 Código de verificación: n3i4QX0A

Firmado por: Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 31/05/2021 09:50:18

1 / 1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. ABSTRACT..... | 1 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 6 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 7 |
| 5.1 Materiales..... | 7 |
| 5.2 Preparación de las nanopartículas híbridas | 7 |
| 5.3 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas híbridas | 9 |
| 5.4 Modelo de experimentación animal..... | 9 |
| 5.5 Evaluación histológica, inmunohistoquímica e histomorfométrica..... | 10 |
| 5.5.1 Evaluación histológica | 10 |
| 5.5.2 Evaluación histomorfométrica | 11 |
| 5.5.3 Evaluación inmunohistoquímica | 11 |
| 5.6 Análisis estadístico | 12 |
| 6. RESULTADOS | 13 |
| 6.1 Características fisicoquímicas de las nanopartículas híbridas | 13 |
| 6.2 Análisis histológico..... | 13 |
| 6.3 Análisis histomorfométrico..... | 15 |
| 6.4 Análisis inmunohistoquímico | 16 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 17 |
| 8. CONCLUSIONES | 19 |
| 9. CONCLUSIONS..... | 19 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 20 |

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

1. RESUMEN

La osteoporosis (OP) es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una baja formación de hueso y un aumento del tejido adiposo en la médula ósea. Se ha demostrado que el silenciamiento del gen *SFRP1* que codifica la proteína secretada relacionada con frizzled 1 (*Sfrp1*) antagonista de la vía de señalización Wnt/ β catenina, promueve el potencial osteogénico de las células madre mesenquimales (MSC). En este trabajo se elaboraron nanopartículas híbridas cargadas con un GapmeR capaz de inhibir la expresión del gen *SFRP1* y su idoneidad para promover la formación ósea, tras su administración intravenosa, fue estudiada en ratonas osteoporóticas. Los resultados obtenidos de la evaluación histológica, histomorfométrica e inmunohistoquímica de los fémures reveló el éxito de los nanotransportadores desarrollados para bloquear la expresión de *SFRP1* "in vivo" y revertir el fenotipo osteoporótico.

Palabras clave: Células madre mesenquimales, GapmeR, histomorfometría, nanopartículas híbridas, osteosíntesis, Wnt/ β -catenina.

2. ABSTRACT

Osteoporosis (OP) is a systemic skeletal disease characterized by low bone formation and an increased adipose tissue in the bone marrow. Silencing of the *SFRP1* gene encoding secreted the frizzled related protein 1 (*Sfrp1*), antagonist of the Wnt/ β catenin signaling pathway, has been shown to promote the osteogenic potential of mesenchymal stem cells (MSC). In this work, hybrid nanoparticles loaded with a GapmeR capable of inhibiting the gene expression of *SFRP1* were elaborated and "in vivo" tested in osteoporotic mice in terms of bone formation induction. The histological, histomorphometric and immunohistochemical results obtained from the evaluation of the femurs pointed out the success of the developed nanotransporters to block the expression of *SFRP1* "in vivo" and reverse the osteoporotic phenotype.

Key words: GapmeR, histomorphometry, hybrid nanoparticles, mesenchymal stem cells, osteosynthesis, Wnt / β -catenin.

3. INTRODUCCIÓN

La osteoporosis (OP) es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por la disminución de la masa ósea y el deterioro de la microarquitectura del hueso que ocasiona una mayor fragilidad y riesgo de fractura, comprometiendo seriamente la calidad de vida de las personas que la padecen (Amir *et al.* 2017). Varios factores de riesgo contribuyen al desarrollo de esta patología como: factores genéticos, consumo de alcohol, raza blanca, sedentarismo y tabaquismo (Pouresmaeili *et al.* 2018). Sin embargo, el envejecimiento es el factor con mayor influencia en la aparición y progresión de la enfermedad, tanto en mujeres como en hombres, presentando mayor incidencia en mujeres posmenopáusicas, donde la proporción de tejido óseo afectado aumenta con el déficit de estrógenos y causa daño constante al hueso (Aghebati-Maleki *et al.* 2019). Así, debido al aumento de la esperanza de vida de la población global, la OP se ha convertido en una de las principales enfermedades de la sociedad actual (Posada *et al.* 2016).

La etiopatogenia de la OP es el resultado de un desequilibrio en el proceso de remodelación ósea (Aghebati-Maleki *et al.* 2019). La remodelación ósea consiste en el reemplazo continuo del hueso senescente y deteriorado por hueso nuevo para mantener la fuerza y la elasticidad óseas. En este proceso intervienen principalmente dos tipos de células: los osteoclastos, que se originan a partir de células hematopoyéticas, y pertenecen al sistema mononuclear-fagocítico, responsables de la resorción ósea; y los osteoblastos, que se originan a partir de células madre mesenquimales (en inglés MSC) y son responsables de la formación de hueso nuevo (Moerman *et al.* 2004). No obstante, en la OP el proceso de remodelación está alterado y la resorción ósea excede a la formación (Whitaker *et al.* 2012). Además, varios estudios afirman que la OP no solo está relacionada con una baja formación de hueso, sino también con un aumento del tejido adiposo en la médula ósea. Esto es debido a que, durante el desarrollo de la OP, las MSC de la médula ósea, exhiben una capacidad reducida para diferenciarse en osteoblastos y una mayor capacidad para diferenciarse en adipocitos (Hu *et al.* 2018).

Las terapias actuales para el tratamiento de la OP están basadas principalmente en agentes capaces de inhibir la resorción ósea o mejorar el anabolismo óseo. Los fármacos antirresortivos (bifosfonatos o denosumab) son las terapias más comunes, sin embargo, a largo plazo pueden producir efectos secundarios importantes, como osteonecrosis de la mandíbula o fracturas femorales atípicas (Cheng *et al.* 2020). También existen agentes

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

anabólicos óseos como la teriparatida, un análogo de la hormona paratiroidea, que promueve la formación de hueso, estimulando la diferenciación de los osteoblastos e inhibiendo su apoptosis, o romosozumab un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG2) que se une e inhibe la esclerostina, un regulador negativo de la formación ósea secretado por los osteocitos, con el doble efecto de aumentar la formación de hueso y disminuir la resorción ósea (Vahle *et al.* 2004; Cosman *et al.* 2016). No obstante, las terapias más novedosas para el tratamiento de la OP se basan en el uso de MSC (Hu *et al.* 2018).

Las MSC son de particular interés para el tratamiento de las enfermedades óseas, ya que tienen el potencial de diferenciarse en adipocitos, condroblastos y osteoblastos (Cheng *et al.* 2020). Como se mencionó anteriormente, los huesos de pacientes osteoporóticos muestran un aumento del tejido adiposo en la médula ósea, en detrimento del hueso trabecular, lo que sugiere que se producen cambios que predisponen a las MSC hacia un fenotipo adipogénico en lugar de hacia un fenotipo osteogénico (Moerman *et al.* 2004). Por lo tanto, una manera exitosa de tratar la OP podría ser redirigir el proceso de diferenciación de las MSC de nuevo, hacia la vía de diferenciación osteogénica.

Durante las últimas décadas se ha demostrado que varias vías de señalización regulan la diferenciación de las MSC en osteoblastos y adipocitos. Entre ellas, las vías de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP), mediada por BMP-2 y BMP-7, y la vía de señalización Wnt/ β -catenina son dos vías críticas (Scarfi, 2016; Hu *et al.* 2018). La vía de señalización Wnt/ β -catenina, también conocida como vía de señalización Wnt canónica, contribuye a la formación de tejido óseo a través de la activación del factor de transcripción Runx2, que promueve la diferenciación de las MSC en osteoblastos (Gaur *et al.* 2005). La unión de las proteínas Wnt a un complejo receptor dual formado por el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Lrp5) y el receptor frizzled (Fz) desencadena una cascada de señalización que conduce a la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β). La GSK3 β inhibida, no es capaz de fosforilar a la β -catenina que se acumula en el citoplasma celular y es importada al núcleo donde se asocia con un complejo formado por la unión del factor de transcripción de células T (TCF) / factor de unión del potenciador linfocitario (LEF) para promover la transcripción de *RUNX2* y la diferenciación de las MSC en osteoblastos (Etheridge *et al.* 2004; Gaur *et al.* 2005; Kramer *et al.* 2010; Pai *et al.* 2017) (Figura 1A). Sin embargo, la vía Wnt/ β -catenina está estrechamente regulada por una serie de moléculas inhibitoras, entre las que se encuentran las proteínas secretadas relacionadas con frizzled (Sfrp) como la 1 (Sfrp1). La

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

proteína Sfrp1 tiene un dominio rico en cisteína en su extremo amino terminal que secuestra a las proteínas Wnt y evita que se unan al complejo receptor Fz / Lrp5 (Figura 1B). Además, esta proteína también puede unirse directamente al receptor Fz y bloquear la señalización intracelular (Gaur *et al.* 2009; Baharudin *et al.* 2020). Varios estudios, han demostrado que la delección de Sfrp1, se correlaciona con un incremento de la formación ósea, una supresión de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos, y una mejora en la proliferación y diferenciación de células del linaje osteoblástico, así como, en la mineralización. Por tanto, la disminución de los niveles de Sfrp1, mediada por el silenciamiento del gen *SFRP1* podría ser útil como diana para la intervención farmacológica en la OP (Bodine *et al.* 2004; Gaur *et al.* 2009).

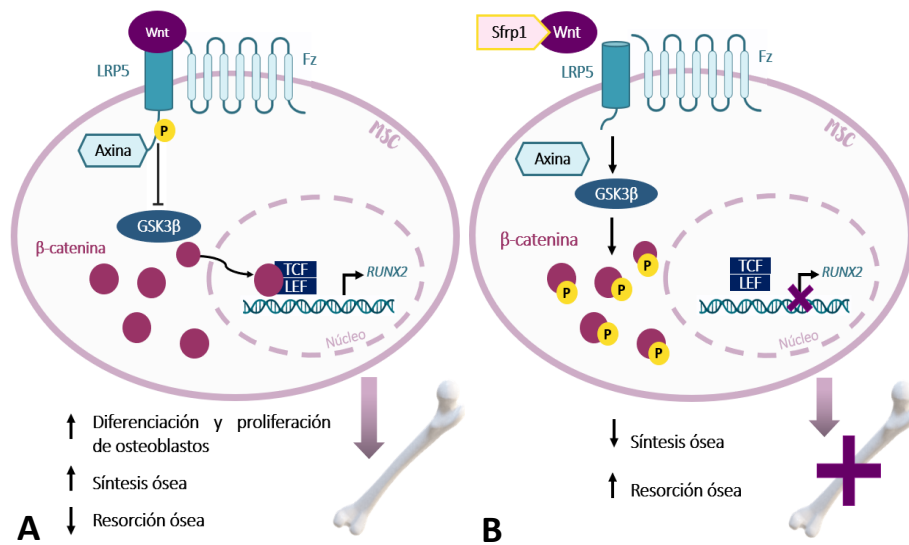


Figura 1. Vía de señalización Wnt/β-catenina y los efectos de la inhibición ejercida por el antagonista Sfrp1. (A) Cuando Wnt se une a los correceptores Lrp-5 y Fz, se produce la inhibición del complejo de destrucción de β-catenina. La β-catenina acumulada en el citoplasma es importada al núcleo, lo que lleva a la transcripción de genes que responden a Wnt y a la formación de hueso. (B) La unión de Sfrp1 a Wnt evita que se una al complejo receptor Fz / Lrp-5. La vía de señalización Wnt/β-catenina queda inhibida y se reduce el anabolismo óseo. Modificado de Lim & Bolster (2017).

El silenciamiento de genes se ha convertido en una herramienta prometedora para el tratamiento de enfermedades complejas como el cáncer o trastornos metabólicos sistémicos como la OP (Lundin *et al.* 2015). Actualmente una de las estrategias más empleadas para el silenciamiento de la expresión génica se basa en el uso de oligonucleótidos antisentido monocatenarios (ASO) que actúan principalmente en el núcleo celular produciendo la escisión selectiva de ARNm a los que se unen por

complementariedad de bases, mediante un mecanismo dependiente de RNasa H (Juliano, 2016; Bennett, 2019). Un tipo especial de ASO, son los denominados GapmeR, que presentan un diseño específico en el que la secuencia de nucleótidos de ADN se encuentra flanqueada en ambos extremos por ácidos nucleicos bloqueados (LNA) caracterizados por presentar un puente de metileno entre las posiciones 2' y 4' de la ribosa (Figura 2). Así, los LNA que forman parte de los GapmeR, contribuyen a aumentar la estabilidad de la hebra, su resistencia a la degradación por nucleasas y la capacidad de hibridación con el ARNm (Watts & Corey, 2012; Lundin *et al.* 2015; Abewe *et al.* 2020). No obstante, una desventaja importante de los tratamientos basados en el uso de ASO son las altas dosis necesarias para lograr el efecto terapéutico (García-García *et al.* 2019).



Figura 2. Estructura de un GapmeR formado por una porción de ADN flanqueada en ambos extremos por LNA. Las secuencias de LNA aumentan la afinidad por el objetivo y confieren resistencia a nucleasas, en cambio, la secuencia central de ADN se encarga de promover la activación de la RNasa H. Creado en BioRender

En los últimos años se ha logrado un progreso sustancial en el desarrollo de sistemas nanoparticulados que permiten la incorporación de varias moléculas terapéuticas (como los ASO) en su estructura y la liberación específica de estas en las células diana. La tendencia actual es el desarrollo de nanopartículas híbridas lípido-polímero (HNPs) que fusionan las características de las nanopartículas poliméricas y los liposomas (Figura 3). Estas están constituidas por un núcleo polimérico hidrofóbico que encapsula la molécula terapéutica y una monocapa lipídica que rodea al núcleo, aunque en ocasiones también se suele añadir en la capa externa moléculas de lípido-poli(etilenglicol) (lípido-PEG) que actúan como un estabilizador para prolongar el tiempo de circulación sistémica y evita su destrucción por el sistema mononuclear-fagocítico (Zhang *et al.* 2008; Mukherjee *et al.* 2019). Asimismo, para llevar a cabo la administración dirigida de agentes terapéuticos, las HNPs se pueden funcionalizar en su superficie con anticuerpos, ligandos de ácidos nucleicos (aptámeros), péptidos o moléculas pequeñas que sean capaces de unirse de forma específica a antígenos de superficie presentes en las células o tejidos diana (Zhang

et al. 2007). Los aptámeros (Apt) son oligonucleótidos de ADN o ARN que, a través de interacciones intramoleculares, se pliegan en conformaciones únicas capaces de unirse a antígenos diana con alta afinidad y especificidad (Farokhzad *et al.* 2006). Además, estos presentan características favorables como: su pequeño tamaño, la falta de inmunogenicidad y la facilidad de aislamiento, que los convierte en una de las herramientas más prometedoras para la administración dirigida de nanopartículas (Farokhzad *et al.* 2004).

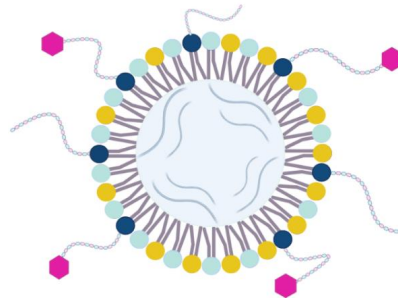


Figura 3. Estructura de una nanopartícula híbrida lípido-polímero que comprende un núcleo de polímero y una capa de lípido / lípido-PEG. Creado en BioRender.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo plantea como hipótesis que la administración sistémica de nanopartículas híbridas funcionalizadas con Apt específicos para las MSC y cargadas con un GapmeR capaz de inhibir la expresión del gen *SFRP1* que codifica la proteína Sfrp1, antagonista de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, podría promover el aumento del potencial osteogénico de las MSC, favoreciendo la formación de nuevo tejido óseo en OP.

Teniendo esto en cuenta, el objetivo general de este trabajo es elaborar nanopartículas híbridas funcionalizadas que introduzcan en las MSC un GapmeR capaz de silenciar el gen *SFRP1*, para estudiar el efecto de la inhibición de la proteína Sfrp1 en la remodelación ósea en un modelo animal de ratón osteoporótico. Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Elaborar nanopartículas híbridas que contengan un GapmeR capaz de inhibir la expresión del gen *SFRP1*.
- Evaluar histológica, inmunohistoquímica e histomorfométricamente el efecto de la inhibición de *SFRP1* en el hueso osteoporótico.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Para la elaboración de las HNPs se emplearon los siguientes productos: DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano; Sigma-Aldrich), Sulfato de protamina, L- α -fosfatidilcolina (Lecitina; Avanti Polar Lipids), DSPE-PEG₂₀₀₀ (Nanosoft Polymers), DSPE-PEG₂₀₀₀ terminado en maleimida (DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL; Nanosoft Polymers), poli (D, L láctico-co-glicólico) (PLGA; Reseomer[®] 502H, Evonik), Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP; Sigma-Aldrich), GapmeR específico para el silenciamiento de *SFRP1* (Secuencia del GapmeR *SFRP1*: 5'-GGTCAGTAACTAAGTT-3'; Qiagen), GapmeR control (Secuencia del GapmeR control: 5'-AACACGTCTATACGC-3'; Qiagen) Aptámero para vectorización selectiva (Secuencia del Apt: 5'-GAATTCAGTCGGACA GCGACGACGGTGATATGTCAAGGTCGTATGCACGAGTCAGAGGGATGGACG AATATCGTCTCCC-3'; Integrated DNA Technologies TM).

5.2 Preparación de las nanopartículas híbridas

Se prepararon nanopartículas híbridas de lípido-polímero mediante el método de nanoprecipitación modificada de un solo paso. En primer lugar, se preparó la fase acuosa formada por los componentes lipídicos: lecitina, DSPE-PEG₂₀₀₀ y DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL. Se pesó la cantidad total necesaria de cada componente (Tabla 1) y se disolvieron, por separado, en etanol-agua 4%, bajo agitación magnética, a 65°C, hasta su completa disolución.

Paralelamente se prepararon los componentes de la fase orgánica. Para ello, se disolvieron PLGA y DOTAP en las cantidades representadas en la Tabla 1 en 1mL de acetona y, aparte, se disolvió la protamina en agua destilada. Cada oligonucleótido GapmeR control o GapmeR-*SFRP1* se condensó con la proteína catiónica protamina (que contribuye a mantener el GapmeR dentro de la nanopartícula y a aumentar su estabilidad) en una relación en peso oligonucleótido: protamina 2: 1, a temperatura ambiente, 40 minutos antes de comenzar la elaboración de las HNPs.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

Tabla 1. Cantidad en mg y μg de los componentes de las HNPs.

| Fase orgánica | | Fase acuosa | |
|---------------|------------------|--------------|--------|
| PLGA | 5mg | Lecitina | 0,2mg |
| DOTAP | 0,3mg | DSPE-PEG | 0,47mg |
| Protamina | 45 μg | DSPE-PEG-MAL | 0,16mg |

A continuación, se pipeteó la disolución de protamina + GapmeR (50 μL) sobre el resto de los componentes de la fase orgánica, disueltos en 1 mL de acetona. Por último, los componentes de la fase orgánica se vertieron sobre 10 mL de la fase acuosa, como se muestra en la Figura 4, dando lugar a la formación de las nanopartículas por precipitación del polímero y ensamblaje de los lípidos alrededor del núcleo polimérico, tras una rápida difusión del disolvente orgánico al medio acoso, en agitación magnética. La suspensión de nanopartículas se mantuvo en una campana de extracción de gases, durante 1 hora, para favorecer la evaporación del solvente.

Una vez elaboradas las nanopartículas se incubaron con el Apt reducido, en una relación en cantidad molar maleimida: Apt 1:0,1 durante 1 hora a temperatura ambiente. Como paso previo a la funcionalización de las nanopartículas el Apt oxidado (con sus átomos de azufre protegidos por un enlace S=S) se incubó con TCEP durante 2 horas a temperatura ambiente, para obtener el Apt reducido (grupo tiol (-SH)), capaz de unirse covalentemente a la maleimida.

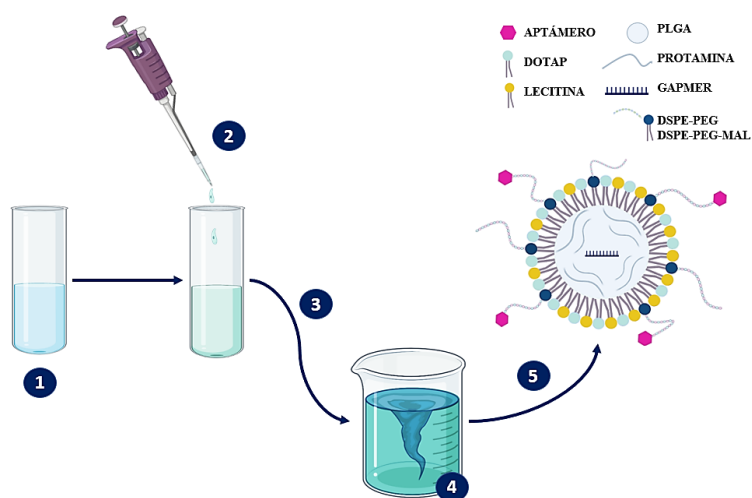


Figura 4. Técnica de nanoprecipitación modificada de un solo paso para la preparación de HNPs. **1.** 1 mL de acetona (PLGA+ DOTAP). **2.** 50 μL de agua destilada (Protamina + GapmeR). **3.** Adición de 10 mL agua 4% etanol (lecitina + DSPE-PEG + DSPE-PEG-MAL). **4.** Agitación magnética 1h. **5.** Incubación de las HNPs con el Apt. Creado en BioRender.

5.3 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas híbridas

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas se caracterizaron en términos de diámetro medio, índice de polidispersidad (PdI) y potencial zeta (potencial ζ) en un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Las muestras se diluyeron adecuadamente en agua ultrapura Milli-Q y se sonicaron durante 1 min en un baño de agua como paso previo a la caracterización (P Selecta, España). Las mediciones se realizaron para los tres lotes de HNPs elaborados para cada una de las formulaciones (GapmeR control y GapmeR-*SFRPI*).

5.4 Modelo de experimentación animal

En este estudio se emplearon 18 ratones hembra ovariectomizadas y tratadas durante 3 meses con una dosis de 3 mg / kg de dexametasona-21-isonicotinato (DEX) administrada por vía subcutánea, para inducir el estado osteoporótico. Los ratones se dividieron en tres grupos experimentales, de seis animales cada uno y se asignó un tratamiento distinto para cada grupo (Tabla 2).

Durante un periodo de 3 meses se le administró, por vía intravenosa a cada ratón, 50 μ L del tratamiento correspondiente una vez al mes. Así, una vez, finalizado este periodo los ratones se sacrificaron y se llevó a cabo la técnica de fijación por perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4% para preservar las características histológicas del tejido óseo como paso previo a la extracción de los fémures para el análisis histológico (Llontop *et al.* 2021).

Tabla 2. Tratamientos administrados a los grupos de experimentación.

| Grupo | Comentario |
|----------------------|--|
| Ctrl | Grupo control: inyección de suero salino |
| GapmeR-Ctrl | Grupo control del tratamiento: administración de HNPs cargadas con el GapmeR control |
| GapmeR- <i>SFRPI</i> | Grupo terapéutico: administración de HNPs cargadas con el GapmeR- <i>SFRPI</i> |

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

5.5 Evaluación histológica, inmunohistoquímica e histomorfométrica

Para determinar el efecto de la inhibición de *SFRP1* sobre la estructura ósea, se extrajeron los fémures de todas las ratonas y se procesaron para el análisis histológico.

Inicialmente, las muestras se fijaron por inmersión durante 24 horas en formol tamponado al 4% y seguidamente se descalcificaron en Histofix® (solución descalcificante comercial). Tras la descalcificación se procedió a la inclusión en parafina, para ello, las muestras se lavaron en alcohol de 70°, se deshidrataron en una serie de alcoholes de gradación creciente (70°, 96° y 100°) y se diafanizaron en xilol como paso previo a la incubación en parafina. A continuación, las muestras se incubaron en estufa a 60°C en tres baños de parafina de pureza creciente, durante 2, 8 y 12 horas respectivamente, tras lo cual se confeccionaron los bloques utilizando moldes metálicos y casetes histológicos. Los bloques se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

Los bloques se cortaron en un microtomo de rotación de precisión (Shandon Finesse 325) en secciones de 5 µm de grosor y se montaron sobre portaobjetos adherentes en placa calefactora. Las secciones se trasladaron a una estufa a 37°C durante 24 horas para retirar toda la humedad. Una vez secas, se sumergieron, en tres baños de xilol, durante 15 minutos y acto seguido, en una serie de alcoholes de gradación decreciente (100°, 96° y 70°) en intervalos de 5 minutos, hasta agua destilada, para desparafinarlas y rehidratarlas respectivamente.

5.5.1 Evaluación histológica

Para la evaluación histológica, se empleó la tinción de hematoxilina-eritrosina (H-Er), para identificar la formación de hueso nuevo, mientras que el grado de mineralización ósea se evaluó de forma indirecta con la tinción tricrómica de VOF, en la que la coloración rojo-marrón indica zonas de mineralización avanzada, mientras que la coloración azul indica zonas de mineralización más reciente o menos mineralizadas y, por tanto, más inmaduras (Martínez-Sanz *et al.* 2011). Las muestras desparafinadas y rehidratadas se tiñeron siguiendo los protocolos mostrados en la Tabla 3. Asimismo, el análisis de las muestras se realizó con un microscopio óptico (Leica DM4000B) y las imágenes se capturaron con una cámara digital (Leica DFC300FX).

Tabla 3. Protocolos empleados para la tinción H-Er y tricrómico de VOF.

| Hematoxilina-Eritrosina | | Tricrómico de VOF | |
|-------------------------------------|-----------|---|-----------|
| Hematoxilina de Harris | 2 minutos | Hematoxilina de Harris | 4 minutos |
| Agua corriente | 5 minutos | Agua corriente | 5 minutos |
| Agua destilada | 1 minuto | Agua destilada | 1 minuto |
| Eritrosina | 2 minutos | VOF (disolución de 0,4% Verde luz, 0,5% Orange G, 0,6% Fucsina ácida y 1,5% ácido fosfotúngstico) | 4 minutos |
| Deshidratación y montaje con EUKITT | | Deshidratación y montaje con EUKITT | |

5.5.2 Evaluación histomorfométrica

Los parámetros histomorfométricos estructurales proporcionan información sobre la microarquitectura ósea. En este estudio, las muestras teñidas con H-Er y VOF se emplearon para valorar diferentes parámetros en el hueso de las ratonas osteoporóticas, como: el grosor del hueso cortical (Ct.Wi) y el número (Tb.N), ancho (Tb.Wi) y separación (Tb.Sp) de las trabéculas en el hueso esponjoso (Moreira & Dempster, 2010). De manera que, se adquirieron entre 4 y 6 imágenes en las regiones de hueso cortical y hueso esponjoso a un aumento de 100x. Posteriormente se realizaron las mediciones de Ct.Wi, y Tb.Wi y Tb.Sp en micras y del número de trabéculas en cada una de las fotomicrografías utilizando el software libre de análisis de imágenes ImageJ 1.5 (NIH, Bethesda, Maryland).

5.5.3 Evaluación inmunohistoquímica

Para la evaluación inmunohistoquímica se aplicó la técnica de inmunofluorescencia indirecta con la finalidad de detectar proteínas relacionadas con la osteogénesis y el proceso de mineralización ósea, en concreto la presencia de colágeno tipo I (Col-I), un marcador de osteogénesis temprana, y la osteocalcina (OC), un marcador de osteogénesis tardía y mineralización.

En primer lugar, las muestras desparafinadas y rehidratadas se sometieron a un doble lavado, de 10 minutos cada uno, en solución salina tamponada TBS 0,1M (Tris Buffer Saline) pH 7,4 antes de proceder al desenmascaramiento antigénico mediante incubación

en tampón citrato 0,1M (pH 6) a 90°C durante 5 minutos. A continuación, se saturaron los sitios de unión inespecíficos en una solución de bloqueo (suero bovino fetal al 1% en TBS) durante 20 minutos y una vez transcurrido este tiempo, las muestras se sometieron a un doble lavado, de 10 minutos cada uno, con TBS para eliminar el exceso de caseína. Para permeabilizar las membranas y facilitar el paso del anticuerpo, como paso previo a la incubación se lavaron 10 minutos con TBS-Tritón (disolución de Tritón X-100 al 0,2% en TBS). Posteriormente, las secciones se incubaron con el antisero primario específico diluido en TBS-Tritón (Tabla 4) durante 12 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Tabla 4. Antiseros primarios y diluciones empleadas en las técnicas de inmunohistoquímica.

| Antisero Primario | Dilución |
|-----------------------|----------|
| Anti Bovine-Col I pAb | 1:100 |
| Anti Rat-OC pAb | 1:100 |

Transcurridas 12 horas, las muestras se sometieron a tres lavados con TBS y a un lavado con TBS-Tritón de 10 minutos cada uno. Una vez permeabilizadas, se efectuó la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Cy3 a una dilución 1:2000 en TBS-Tritón durante 1 hora, en cámara húmeda. A continuación, las secciones se sometieron nuevamente a dos lavados con TBS de 10 minutos cada uno y se montaron con glicerina tamponada. Finalmente, el análisis de las muestras se realizó en un microscopio óptico (Leica DM4000B) con lámpara de fluorescencia, y las imágenes se capturaron con una cámara digital (Leica DFC300FX).

5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el software SPSS 21.0. En primer lugar, se comprobó la normalidad y la homocedasticidad de los datos a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y el test de Levene respectivamente. A continuación, se llevó a cabo un análisis de la varianza unidireccional (ANOVA I) con una prueba posterior de comparación múltiple de Tukey. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE) y se consideran diferencias estadísticamente significativas valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Características fisicoquímicas de las nanopartículas híbridas

En este estudio, a partir del método de nanoprecipitación modificada de un solo paso, se obtuvieron con éxito tres lotes de nanopartículas híbridas lípido-polímero para cada formulación (GapmeR-Ctrl o GapmeR-SFRPI). Ambas formulaciones se funcionalizaron superficialmente mediante unión covalente con el Apt específico para vectorización a MSC de médula ósea. Los resultados de la caracterización fisicoquímica (Tabla 5) muestran que en ambas formulaciones las HNPs presentaron un tamaño medio de 204 nm y mostraron una distribución de tamaños homogénea reflejado por un índice de polidispersidad bajo (PDI ~0,3). Asimismo, los valores de potencial ζ registrados se encontraron dentro del rango de ± 30 mV en ambos casos.

Tabla 5. Tamaño medio, PDI y potencial ζ de las HNPs

| | Tamaño (nm) | PDI | Potencial ζ (mV) |
|--------------------------|------------------|-------------------|------------------------|
| HNPs GapmeR -Ctrl | 203,9 \pm 70,4 | 0,316 \pm 0,153 | -15,23 \pm 3,56 |
| HNPs GapmeR-SFRPI | 203,8 \pm 27,7 | 0,352 \pm 0,095 | 10,11 \pm 4,29 |

6.2 Análisis histológico

El análisis histológico de los fémures reveló cambios evidentes en la estructura y microarquitectura del hueso entre los diferentes grupos experimentales (Ctrl, GapmeR-Ctrl y GapmeR-SFRPI). Las muestras de fémur teñidas con H-Er mostraron aparentemente menor porosidad en el hueso esponjoso o trabecular y un aumento de grosor del hueso cortical, en el grupo GapmeR-SFRPI respecto al resto de los grupos experimentales. En cuanto, al hueso esponjoso, este presentó un aspecto más confluyente en los fémures del grupo GapmeR-SFRPI, observándose trabéculas más gruesas con abundantes osteocitos y osteoblastos en su superficie. Sin embargo, en los fémures de los grupos Ctrl y GapmeR-Ctrl el hueso esponjoso presentó trabéculas más delgadas y grandes cavidades vasculares con tejido hematopoyético. Además, cabe destacar, que la médula ósea en los fémures de los tres grupos experimentales se caracterizó por presentar adipocitos uniloculares, siendo menos frecuentes en el grupo GapmeR-SFRPI (Figura 5).

Por último, los resultados del estudio de la mineralización ósea en las muestras teñidas con tricrómico de VOF, mostraron que los fémures del grupo GapmeR-*SFRP1* presentaban áreas de mineralización más extensas a las de los otros grupos, siendo mayor el grado de mineralización del hueso, como muestra claramente la coloración rojo intensa tanto en el hueso trabecular como en el hueso cortical (Figura 6).

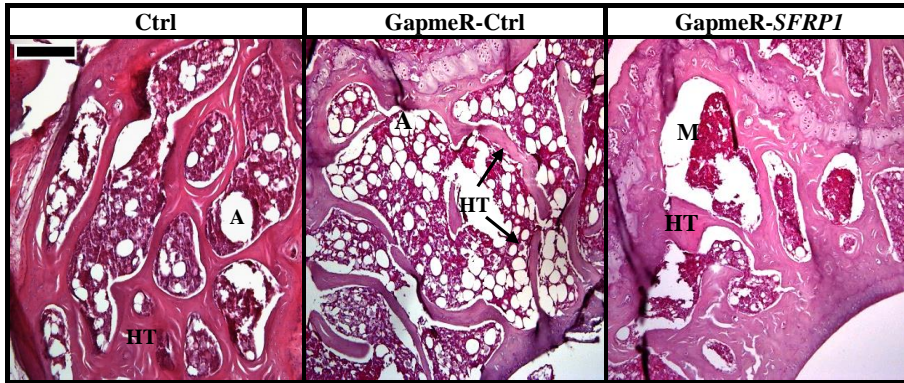


Figura 5. Análisis histológico de las muestras de fémur de los distintos grupos experimentales (Ctrl, GapmeR-Ctrl y GapmeR-*SFRP1*). Imágenes representativas de las regiones de hueso esponjoso de los fémures teñidos con H-Er, donde se muestran diferencias en la microarquitectura del hueso trabecular entre los diferentes grupos. HT: Hueso trabecular; A: Adipocitos unicelulares; M: Médula ósea. Escala= 200 μ m.

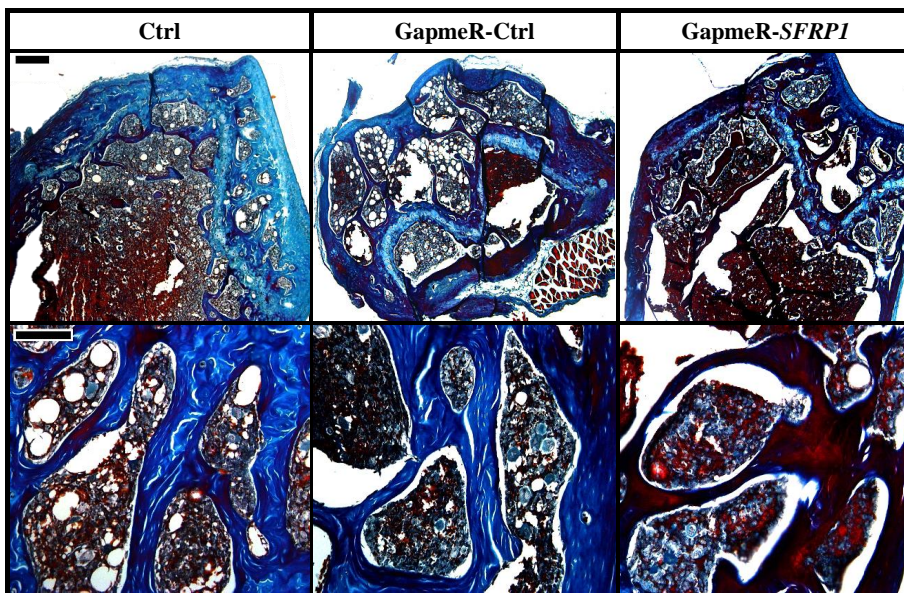


Figura 6. Estudio de la mineralización ósea en las muestras de fémur de los distintos grupos experimentales (Ctrl, GapmeR-Ctrl y GapmeR-*SFRP1*). Imágenes representativas de las regiones de hueso esponjoso de los fémures teñidos con tricrómico VOF, donde se muestran diferencias en el grado de mineralización del hueso trabecular entre los diferentes grupos. Escala: Fila superior 250 μ m; Fila inferior 100 μ m.

6.3 Análisis histomorfométrico

El análisis histomorfométrico (Figura 7) de las muestras de fémur, reveló cambios en la microarquitectura ósea entre los distintos grupos experimentales, confirmando las observaciones histológicas. Por un lado, se encontraron diferencias significativas en el grosor del hueso cortical (Ct.Wi) en los distintos grupos. Así, los fémures del grupo GapmeR-*SFRP1* mostraron un aumento del Ct.Wi ($222,45 \pm 23,72 \mu\text{m}$) respecto a los del grupo Ctrl ($187,23 \pm 20,29 \mu\text{m}$) y GapmeR-Ctrl ($184,29 \pm 23,73 \mu\text{m}$), no observándose diferencias significativas entre estos últimos (Figura 7A). Por otro lado, respecto a la evaluación de la estructura del hueso esponjoso, cabe destacar, que no se encontraron diferencias significativas en el número de trabéculas (Tb.N) entre los distintos grupos (Figura 7B). Sin embargo, las muestras de fémur pertenecientes al grupo GapmeR-*SFRP1* presentaron un aumento significativo del grosor de las trabéculas (Tb.Wi) con respecto a los grupos GapmeR-Ctrl y Ctrl (Figura 7C), también se observó una disminución en la separación de las trabéculas (Tb.Sp) en las epífisis del grupo GapmeR-*SFRP1*, en comparación con los otros grupos experimentales (Figura 7D).

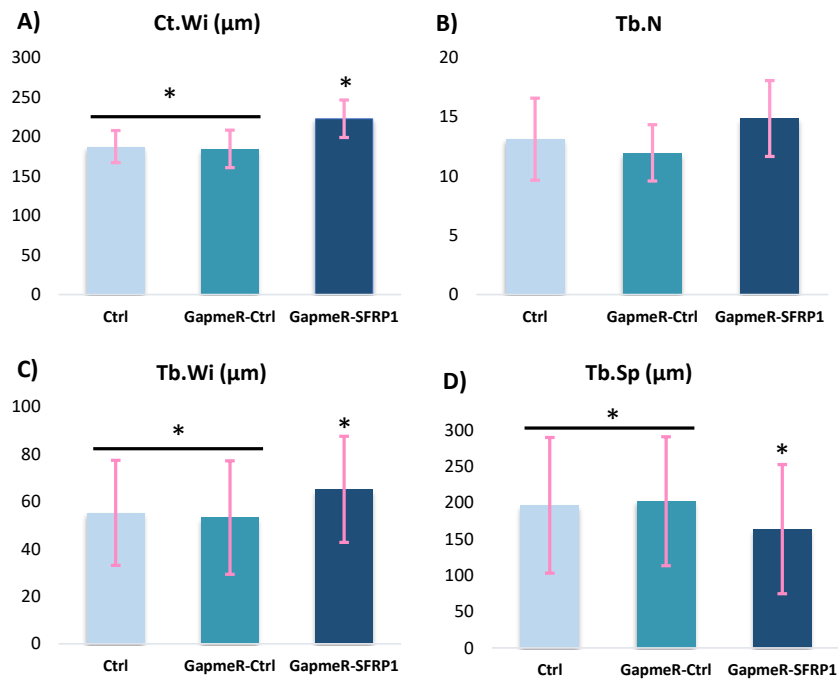


Figura 7. Análisis histomorfométrico de los parámetros estructurales evaluados en las muestras de fémur en los diferentes grupos experimentales (Ctrl, GapmeR-Ctrl y GapmeR-*SFRP1*): (A) Ct. Wi (μm), (B), Tb. N, (C) Tb. Wi (μm) y (D) Tb. Sp (μm). Las barras representan medias \pm DE; * $p < 0.05$. El asterisco en diferentes barras indica diferencias significativas.

6.4 Análisis inmunohistoquímico

Los resultados obtenidos a partir del análisis inmunohistoquímico de los fémures mostraron diferencias en el colágeno tipo I (Col-I), marcador de osteogénesis temprana y la osteocalcina (OC), marcador de osteogénesis tardía y mineralización, entre los distintos grupos experimentales. Como se puede observar en la figura 8, los fémures de los grupos Ctrl y GapmeR-Ctrl mostraron una baja inmunorreacción para la OC en comparación con el grupo GapmeR-SFRP1. La inmunorreactividad para el Col-I también mostró diferencias entre los distintos grupos experimentales, siendo mayor en el grupo GapmeR-SFRP1 (Figura 8).

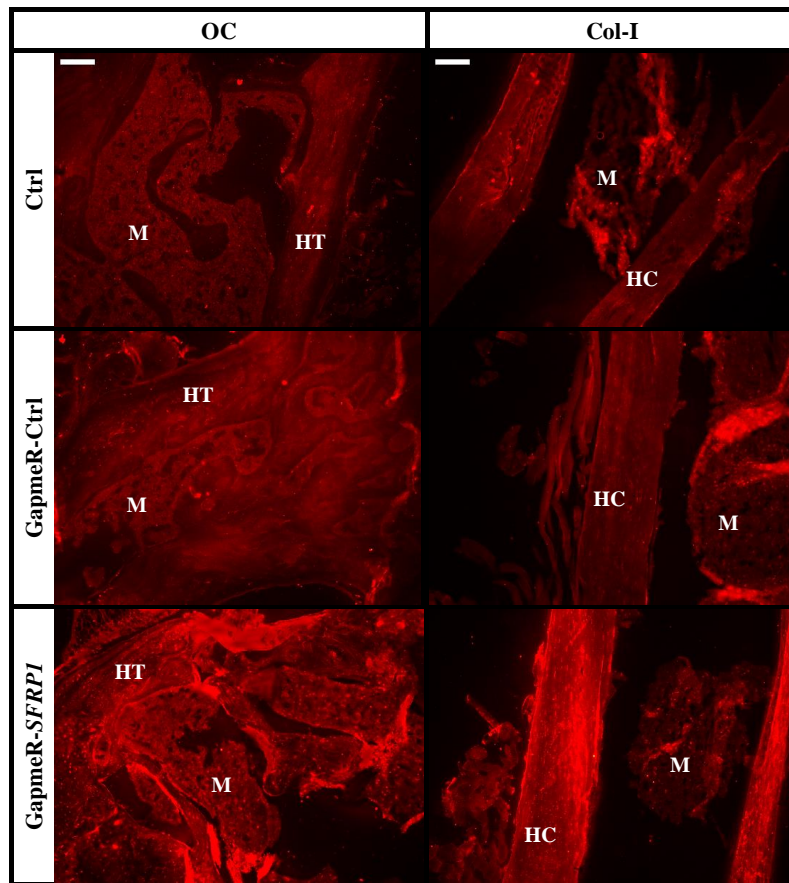


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de las muestras de fémur de los distintos grupos experimentales (Ctrl, GapmeR-Ctrl y GapmeR-SFRP1). La columna de la izquierda muestra imágenes representativas de la inmunorreactividad para la OC en el hueso esponjoso, mientras que la columna de la derecha muestra imágenes de la inmunorreactividad para el Col-I en el hueso cortical de los distintos grupos experimentales. HT: Hueso trabecular; M: Médula ósea; HC: Hueso cortical. Escala= 200 μ m.

7. DISCUSIÓN

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una baja formación de hueso y un aumento de tejido adiposo en la médula ósea (Hu, et al., 2018). Estudios previos han demostrado que la inhibición de la expresión del gen *SFRP1* que codifica la proteína Sfrp1, antagonista de la vía de señalización Wnt/ β catenina, promueve un aumento del potencial osteogénico de las MSC en el hueso (Gaur *et al.* 2005; Bodine *et al.* 2009). El presente estudio fue diseñado con la finalidad de elaborar nanopartículas híbridas funcionalizadas con Apt específicos para su vectorización a MSC y cargadas con un GapmeR capaz de inhibir la expresión génica de *SFRP1*, promoviendo el aumento del potencial osteogénico de las MSC y favoreciendo la formación de nuevo tejido óseo en ratones osteoporóticos.

Las características fisicoquímicas y la composición de las nanopartículas condicionan su comportamiento "in vivo". En un estudio previo realizado por el grupo de investigación se puso a punto un método de elaboración de nanopartículas de lípido-PLGA PEGiladas con carga superficial variable capaces de incorporar un GapmeR (García-García *et al.* 2021). Teniendo en cuenta el estudio anterior y la capacidad de controlar las características de las HNPs en función de la composición, en este trabajo se desarrollaron nanopartículas funcionalizadas superficialmente mediante un enlace covalente con el aptámero específico para MSC. Para el ensayo "in vivo" se prepararon dos formulaciones de HNPs de igual composición, pero conteniendo el GapmeR-Ctrl o el GapmeR-*SFRP1*. Ambas formulaciones mostraron un diámetro medio adecuado y una distribución monodispersa

La osteoporosis, además de caracterizarse por una disminución de la masa y una alteración de la estructura y la microarquitectura ósea, se asocia también con un aumento de la adipogénesis medular, y una disminución de la osteoblastogénesis (Li *et al.* 2016). Los resultados de la evaluación histológica e histomorfométrica, evidenciaron esta situación en las muestras de fémur de los ratones OP tratados con suero salino (grupo Ctrl) y con el GapmeR-Ctrl. Sin embargo, los ratones tratados con el GapmeR terapéutico (GapmeR-*SFRP1*) mostraron una recuperación de la estructura y microarquitectura ósea, con aumento de grosor del hueso cortical y mejores parámetros estructurales en el hueso esponjoso, así como, una reducción del tejido adiposo en la médula ósea. Estos resultados proporcionan evidencia experimental que sugiere que en el

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

fémur de los ratones osteoporóticos tratados con el GapmeR terapéutico se ha producido incremento en la osteosíntesis, debido probablemente a un aumento del potencial osteogénico de las MSC inducido por la inhibición del gen *SFRP1*.

En el año 2004, Bodine *et al.* obtuvieron resultados similares en un estudio, en el que ratones knockout *SFRP1* mostraron un aumento en la masa ósea trabecular como resultado de un incremento en la proliferación y diferenciación de osteoblastos. Asimismo, en un artículo posterior informaron de que la falta de *SFRP1* en ratones conduce a una reducción de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos (Bodine *et al.* 2005). También se ha demostrado que la diarilsulfona sulfonamida, un inhibidor de bajo peso molecular, puede unirse e inhibir a *Sfrp1* estimulando la vía de señalización Wnt / β -catenina para aumentar la formación de hueso (Bodine *et al.* 2009). Los resultados obtenidos a partir de estos estudios confirmaron el papel de *Sfrp1* en la formación de hueso y sugieren que la inhibición del gen *SFRP1* puede ser un objetivo terapéutico potencial para aumentar la formación ósea.

La formación de hueso es un proceso complejo llevado a cabo por los osteoblastos que incluye la formación de una matriz extracelular (MEC) compleja compuesta principalmente de colágeno I, proteoglicanos, y proteínas no colágenas como la osteocalcina y la osteopontina, que posteriormente se mineraliza por la deposición de hidroxiapatita. La MEC contiene además moléculas de señalización adsorbidas, como factores de crecimiento y citoquinas, de enorme importancia en la homeostasis tisular (Martínez-Sanz *et al.* 2011). Respecto a la formación de la MEC, el análisis inmunohistoquímico de los fémures del grupo GapmeR-*SFRP1* mostró mayor inmunoreactividad para el Col-I, marcador de osteogénesis temprana y para la OC, marcador de osteogénesis tardía y mineralización. Además, estos fémures presentaron áreas de mineralización más extensas que el resto de los grupos experimentales como se observó en la tinción de VOF. Por lo tanto, los resultados del análisis inmunohistoquímico y de mineralización ósea concuerdan con los resultados histomorfométricos comentados en el apartado anterior que demuestran que los fémures en los ratones tratados con el GapmeR terapéutico muestran un aumento de la actividad de síntesis ósea mediada previsiblemente por el incremento del número de osteoblastos.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio evidencian el éxito de los nanotransportadores desarrollados para bloquear la expresión del gen *SFRP1* "in vivo". Además, coinciden con los resultados obtenidos en trabajos previos (Bodine *et al.* 2004;

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

Bodine *et al.* 2005; Bodine *et al.* 2009; Gaur *et al.* 2009), al demostrar que la inhibición de la expresión de *SFRP1*, gen que codifica la proteína Sfrp1, incrementa la formación de hueso, debido a un aumento de la proliferación y diferenciación de osteoblastos.

8. CONCLUSIONES

- Las nanopartículas híbridas lípido-polímero elaboradas y funcionalizadas con aptámeros específicos para MSC constituyen un vehículo adecuado capaz de liberar “in vivo” de manera eficiente GapmeRs inhibidores de la expresión del gen *SFRP1*.
- Los fémures de los ratones osteoporóticos tratados con suero salino (Ctrl) y con GapmeR-Ctrl presentaron características histológicas compatibles con un hueso osteoporótico, mientras que los ratones tratados con GapmeR-*SFRP1* mostraron una mejora en la estructura y microarquitectura del hueso, un aumento de la osteosíntesis y una disminución del tejido adiposo en la médula ósea.
- Los fémures de los ratones osteoporóticos tratados con GapmeR-*SFRP1* mostraron mayor inmunoreactividad frente a los dos marcadores óseos analizados (Col-I y OC) con respecto a los ratones osteoporóticos tratados con suero salino (Ctrl) y con GapmeR-Ctrl.
- En general Sfrp1 puede considerarse como una diana farmacológica potencial para las enfermedades esqueléticas como la osteoporosis.

9. CONCLUSIONS

- Hybrid lipid polymer nanoparticles made and functionalized with specific aptamers for MSC constitute a suitable method capable of efficiently releasing GapmeRs inhibiting the expression of the *SFRP1* gene "in vivo".
- The femurs of the osteoporotic mice treated with saline (Ctrl) and with GapmeR-Ctrl presented histological characteristics compatible with an osteoporotic bone, while the mice treated with GapmeR-*SFRP1* showed an improvement in the structure and microarchitecture of the bone, an increase in osteosynthesis and a decrease in adipose tissue in the bone marrow.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

- The femurs of the osteoporotic mice treated with GapmeR-*SFRP1* showed greater immunoreactivity against two bone markers analysed (Col-I and OC) compared to the osteoporotic mice treated with saline (Ctrl) and with GapmeR-Ctrl.
- In general, Sfrp1 can be considered as a potential drug target for skeletal diseases such as osteoporosis.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abewe, H., Deshmukh, S., Mukim, A. & Beliakova-Bethell, N. (2020). Use of GapmeRs for gene expression knockdowns in human primary resting CD4+ T cells. *Journal of Immunological Methods*, 476: 112674.
2. Aghebati-Maleki, L., Dolati, S., Zandi, R., Fotouhi, A., Ahmadi, M., Aghebati, A., Nouri, M., Shakouri, S., Yousefi, M. (2019). Prospect of mesenchymal stem cells in therapy of osteoporosis: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 8570–8578.
3. Amir, Q., Forciea, M., McLean, R. & Denberg, T. (2017). Treatment of Low Bone Density or Osteoporosis to Prevent Fractures in Men and Women: A Clinical Practice Guideline Update From the American College of Physicians. *Annals of Internal Medicine*, 166, 818-839.
4. Baharudin, R., Tieng, F., Lee, L. & Mutalib, N. (2020). Epigenetics of SFRP1: The Dual Roles in Human Cancers. *Cancers*, 12 (2), 445.
5. Bennett, F. (2019). Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annual Review of Medicine*, 70, 307-321.
6. Bodine, P., Billiard, J., Moran, R., Ponce-de León, H., McLarney, S., Mangine, A., Scrimo, M., Bhat, R., Stauffer, B., Green, J., Stein, G., Lian, J., Komm, B. (2005). The Wnt Antagonist Secreted Frizzled-Related Protein-1 Controls Osteoblast and Osteocyte Apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96, 1212–1230.
7. Bodine, P., Stauffer, B., Ponce-de León, H., Bhat, R., Mangine, A., Seestaller-Wehr, L., Moran, R., Billiard, J., Fukayama, S., Komm, B., Pitts, K., Krishnamurthy, G., Gopalsamy, A., Shi, M., Kern, J., Commons, T., Woodworth, R., Wilson, M., Welmaker, G., Trybulski, E., Moore, W. (2009). A small molecule inhibitor of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 stimulates bone formation. *Bone*, 44, 1063–1068.
8. Bodine, P., Zhao, W., Kharode, Y., Bex, F., Lambert, A., Goad, M., Gaur, T., Stein, G., Lian, J., Komm, B. (2004). The Wnt Antagonist Secreted Frizzled-Related Protein-1 Is a Negative Regulator of Trabecular Bone Formation in Adult Mice. *Molecular Endocrinology*, 18 (5), 1222–1237.
9. Cheng, C., Wentworth, K. & Shoback, D. (2020). New Frontiers in Osteoporosis Therapy. *Annual Review of Medicine*, 71, 277-288.
10. Cosman, F., Crittenden, D., Adachi, J., Binkley, N., Czerwinski, E., Ferrari, S., Hofbaue, L., Lau, E., Lewiecki, E., Miyauchi, A., Zerbini, C., Milmont, C., Chen, L., Maddox, J., Meisner, P., Libanati, C., Grauer, A. (2016). Romosozumab Treatment in

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

Postmenopausal Women with Osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*, 375(16), 1532-1543.

11. Etheridge, S., Spencer, G., Heath, D. & Genever, P. (2004). Expression Profiling and Functional Analysis of Wnt Signaling Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 22, 849–860.
12. Farokhzad, O., Cheng, J., Teply, B., Sherifo, I., Jon, S., Kantoff, P., Richie, J., Langer, R. (2006). Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6315–6320.
13. Farokhzad, O., Jon, S., Khademhosseini, A., Tran, T., La Van, D., Langer, R. (2004). Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates: A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 64, 7668 –7672.
14. García-García, P., Briffault, E., Landin, M., Evora, C., Diaz-Rodriguez, P., Delgado, A. (2021). Tailor-made oligonucleotide-loaded lipid-polymer nanosystems designed for bone gene therapy. *Drug Delivery and Translational Research*, 11, 598–607.
15. García-García, P., Ruiz, M., Reyes, R., Delgado, A., Évora, C., Riancho, J., Rodríguez-Rey, J., Pérez-Campo, F. (2019). Smurf1 Silencing Using a LNA-ASOs/Lipid Nanoparticle System to Promote Bone Regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, 8, 1306–1317.
16. Gaur, T., Lengner, C., Hovhannisyann, H., Bhat, R., Bodine, P., Komm, B., Javed, A., Wijnen, A., Stein, J., Stein, G., Lian, J. (2005). Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33132–33140.
17. Gaur, T., Wixted, J., Hussain, S., O’Connell, S., Morgan, E., Ayers, D., Komm, B., Bodine, P., Stein, G., Lian, J. (2009). Secreted Frizzled Related Protein 1 is a Target to Improve Fracture Healing. *Journal of Cellular Physiology*, 220 (1), 174–181.
18. Hu, L., Yin, C., Zhao, F., Ali, A., Ma, J., Qian, A. (2018). Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2), 360.
19. Juliano, R. (2016). The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 44 (14), 6518–6548.
20. Kramer, I., Halleux, C., Keller, H., Pegurri, M., Gooi, J., Weber, P., Feng, J., Bonewald, L., Kneissel, M. (2010). Osteocyte Wnt/ β -Catenin Signaling Is Required for Normal Bone Homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 30 (12), 3071–3085.
21. Li, J., Liu, X., Zuo, B. & Zhang, L. (2016). The Role of Bone Marrow Microenvironment in Governing the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis. *Aging and Disease*, 7, 514-525.
22. Lim, S. & Bolster, M. (2017). Profile of romosozumab and its potential in the management of osteoporosis. *Drug Desing, Development Therapy*, 11, 1221–1231.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

23. Llontop, P., Sánchez, A., Albadalejo, L., Barnese, P., Rivero, S., Sánchez, F., Rodríguez-Bobada, M., Asensio, F. (2021). Técnica de perfusión intracardiaca en ratones: mejorando la bioseguridad y la metodología. *Animales de laboratorio*, 88, 18-22.
24. Lundin, K., Gissberg, O. & Smith, E. (2015). Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Human Gene Therapy*, 26(8), 475-485.
25. Martínez-Sanz, E., Ossipov, D., Hilborn, J., Larsson, S., Jonsson, K., Varghese, O. (2011). Bone reservoir: Injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. *Journal of Controlled Release*, 152, 232–240.
26. Moerman, E., Kui, T., Lipschitz, D. & Lecka-Czernik, B. (2004). Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- γ 2 transcription factor and TGF- β /BMP signaling pathways. *Aging Cell*, 3, 379–389.
27. Moreira, C. & Dempster, D. (2010). Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 54(2), 87-98.
28. Mukherjee, A., Waters, A., Kalyan, P., Achrol, A., Kesari, S., Yenugonda, V. (2019). Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a nextgeneration drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 1937–1952.
29. Pai, S., Carneiro, B., Mota, J., Costa, R., Leite, C., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J., Chae, Y., Giles, F. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology*, 10 (1), 101.
30. Posada, A., Aguirre, H., Casallas, J., Patiño, J., Oñate, R. (2016). Nuevas terapias en osteoporosis. *Revista Colombiana de Reumatología*, 23 (1), 34-43.
31. Pouresmaeili, F., Kamalidehghan, B., Kamarehei, M. & Goh, Y. (2018). A comprehensive overview on osteoporosis and its risk factors. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 14, 2029–2049.
32. Scarfí, S. (2016). Use of bone morphogenetic proteins in mesenchymal stem cell stimulation of cartilage and bone repair. *World Journal of Stem Cells*, 8(1), 1-12.
33. Vahle, J., Long, G., Sandusky, G., Westmore, M., Ma, Y., Sato, M. (2004). Bone Neoplasms in F344 Rats Given Teriparatide [rhPTH(1-34)] Are Dependent on Duration of Treatment and Dose. *Toxicologic Pathology*, 32 (4), 426–438.
34. Watts, J. & Corey, D. (2012). Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *Journal of Pathology*, 226, 365–379.
35. Whitaker, M., Guo, J., Kehoe, T. & Benson, G. (2012). Bisphosphonates for Osteoporosis — Where Do We Go from Here?. *The New England Journal of Medicine*, 366, 2048-2051.
36. Zhang, L., Chan, J., Gu, F., Rhee, J., Wang, A., Radovic-Moreno, A., Alexis, F., Langer, R., Farokhzad, O. (2008). Self-Assembled Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. *ACS Nano*, 2(8), 1696–1702.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40

37. Zhang, L., Radovic-Moreno, A., Alexis, F., Gu, F., Basto, P., Bagalkot, V., Jon, S., Langer, R., Farokhzad, O. (2007). Co-Delivery of Hydrophobic and Hydrophilic Drugs from Nanoparticle–Aptamer Bioconjugates. *ChemMedChem*, 2, 1268 – 1271.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3478146 Código de verificación: 5NvDt71z

Firmado por: SARA SANTANA RIVERO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 02/06/2021 11:20:55

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2021 11:48:40