

# Estrategia terapéutica basada en análogos de ANXA1 para el tratamiento de la fibrosis quística.

Beatriz Escobar Doncel<sup>a</sup>, Susana Mendoza Tamajón<sup>b</sup>, Miriam Morales Gallego<sup>c</sup>, Rocío Ruiz Jiménez<sup>d</sup>

Máster Universitario en Dianas Terapéuticas en Señalización Celular, Investigación y Desarrollo. Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá, 28871, Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. beatrizescobardoncel1998@gmail.com b. smendozatomajon@outlook.es c. miriam\_moralesgallego@outlook.com d. rocioruizjimenez96@outlook.es

VI Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2021.

29 de marzo a 30 de abril, 2021. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España.

**Keywords:** Fibrosis Quística (FQ), inflamación, Fosfolipasa A2 $\alpha$  citosólica (cPLA2 $\alpha$ ), Anexina A1 (ANXA1), diana terapéutica

## Abstract

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad multisistémica crónica de origen genético que cursa con anomalías en las mucosas epiteliales, siendo el pulmón el órgano principalmente afectado. A nivel mundial, se estima que solo 70.000 personas padecen la enfermedad por lo que actualmente es reconocida como una enfermedad rara. La ausencia de un tratamiento específico y eficaz, junto con la baja esperanza de vida, pone de manifiesto la necesidad de identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan desarrollar tratamientos para mejorar la calidad de vida y curar la enfermedad. La FQ tiene su origen en una mutación puntual que afecta al canal transmembrana regulador de la fibrosis quística (CFTR), un canal de cloro esencial en la homeostasis de agua e iones. A nivel pulmonar, dicha mutación causa una pérdida de función del canal y aumenta la secreción mucosa, lo que genera una inflamación persistente, favorece la obstrucción de vías aéreas y dificulta una correcta función pulmonar. A nivel molecular, se ha descrito un aumento de la actividad de la enzima fosfolipasa A2 $\alpha$  citosólica (cPLA2 $\alpha$ ) en células epiteliales y neutrófilos como responsable de la inflamación, debido a su capacidad de producir una gran cantidad de mediadores proinflamatorios. En condiciones fisiológicas, la actividad de PLA2 está regulada por anexina A1 (ANXA1), que ejerce un papel inhibitorio; sin embargo, se ha observado que los pacientes con FQ presentan niveles reducidos de este inhibidor, lo que provoca un desequilibrio entre mediadores proinflamatorios y pro-resolución, que se traduce en la pérdida de la homeostasis. Este proyecto tiene como objetivo identificar un análogo de ANXA1 con capacidad de inhibir la actividad de la cPLA2 $\alpha$  tanto en células epiteliales como en neutrófilos a nivel pulmonar, posibilitando una resolución inflamatoria y evitando, en última instancia, las afecciones que conducen al paciente al trasplante de pulmón. Mediante ensayos biológicos de cribado, ensayos in vitro e in vivo, se pretende seleccionar, optimizar y evaluar compuestos específicos que, administrados por vía inhalatoria y con efecto local, disminuyan drásticamente la inflamación sin ocasionar grandes efectos secundarios no deseados a los pacientes. A falta de una validación formal, este proyecto propone a los análogos de ANXA1 como tratamiento innovador y potencialmente terapéutico que ejerce un papel directo sobre la desregulación inflamatoria que caracteriza a los pacientes con fibrosis quística.

**Citation:** Escobar Doncel, Beatriz; Mendoza Tamajón, Susana; Morales Gallego, Miriam; Ruiz Jiménez, Rocío (2021) Estrategia terapéutica basada en análogos de ANXA1 para el tratamiento de la fibrosis quística. Proceedings of the VI Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2021. 29 de marzo a 30 de abril, 2021. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España. *dianas* 10 (1): e202103fa. ISSN 1886-8746 (electronic) *journal.dianas.e202103fa* <http://www3.uah.es/dianas?e202103fa>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Escobar-Doncel B, Mendoza-Tamajón S, Morales-Gallego M, Ruiz-Jiménez R. Some rights reserved. This is an open-access work licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

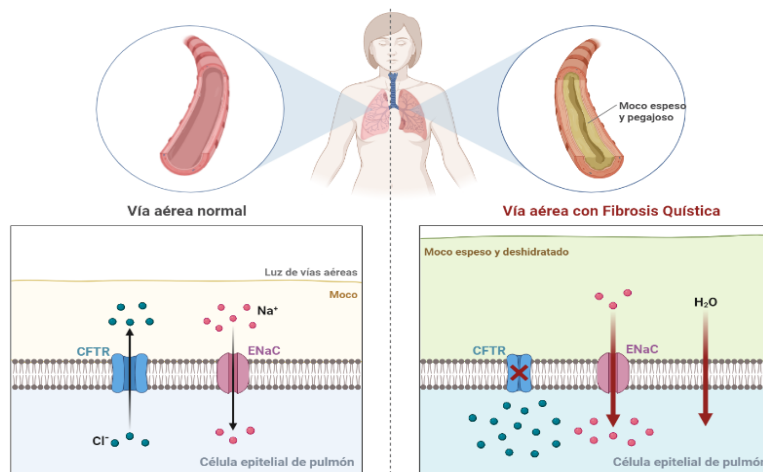
## Introducción

### Fibrosis quística

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad multisistémica crónica de origen genético con un patrón hereditario autosómico recesivo que se caracteriza por la acumulación excesiva de moco en los órganos afectados, siendo estos principalmente los pulmones y el páncreas [1,2]. Se clasifica como una enfermedad rara pues se estima que solo 70.000 personas han sido diagnosticadas a nivel mundial. Afecta por igual tanto a mujeres como a hombres con una incidencia aproximada de 1/ 4.500 nacidos vivos y con una esperanza de vida media de 40 años [3].

La etiología de la FQ es una mutación puntual en el gen CFTR, que codifica para el canal transmembrana regulador de la fibrosis quística (CFTR), un canal de cloro esencial en la homeostasis de agua e iones [1,2]. Existen más de 2.000 mutaciones diferentes de CFTR, siendo la más frecuente la delección de la

fenilalanina en la posición 508 ( $\Delta F508$ ) [3]. La mutación en el gen CFTR se traduce en un funcionamiento anómalo del canal de cloro que conlleva al bloqueo del flujo de iones cloro ( $\text{Cl}^-$ ). Esto tiene como consecuencia el aumento de la reabsorción de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y agua. Dicha reabsorción excesiva de agua ocasiona la deshidratación de la secreción mucosa producida por las células epiteliales, generando un moco espeso y grueso que no puede ser movilizado por los cilios celulares que, a nivel pulmonar, produce la obstrucción de las vías aéreas (Figura 1). La incapacidad de eliminar el moco, junto con el aumento de la concentración de cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ) en el interior celular que inhibe la acción de péptidos antimicrobianos, favorece la aparición de infecciones microbianas persistentes. Dicha infección desencadena la secreción de citoquinas proinflamatorias como  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 e IL8 que inducen el reclutamiento y la migración de neutrófilos responsables de la inflamación crónica que caracteriza a estos pacientes. Cuando la inflamación tiene lugar en los pulmones conduce al daño estructural tisular e insuficiencia respiratoria que puede llevar a la muerte [1,3,4].



**Figura 1. Fisiopatología de la fibrosis quística a nivel pulmonar.** En condiciones normales, el canal CFTR permite un correcto flujo de iones  $\text{Cl}^-$  que desencadena una reabsorción moderada de  $\text{Na}^+$  y agua al interior celular, permitiendo que el agua que permanece en el exterior reduzca el espesor del moco y este sea eliminado sin interrumpir las vías aéreas. En la fibrosis quística, el incorrecto funcionamiento de CFTR impide la salida de iones  $\text{Cl}^-$  al exterior celular, aumentando sus concentraciones interiores y promoviendo la reabsorción exacerbada de  $\text{Na}^+$  y agua. La ausencia de agua en el exterior celular aumenta el espesor del moco impidiendo que sea eliminado, siendo este el responsable del bloqueo de las vías aéreas.

Las manifestaciones clínicas que presentan las personas con FQ pueden aparecer a cualquier edad, son diversas y de gravedad variable entre las que cabe destacar, de mayor a menor importancia, insuficiencia respiratoria, bronquiectasias, sinusitis y rinitis a nivel pulmonar; insuficiencia y mala absorción de grasas a nivel pancreático; y altas concentraciones de  $\text{NaCl}$  en el sudor de los pacientes [5].

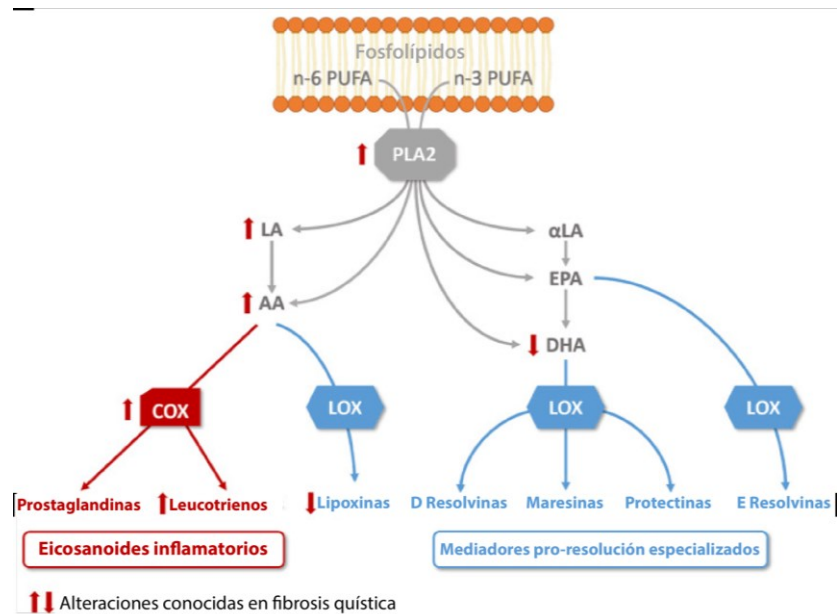
La FQ puede ser detectada desde el nacimiento del individuo, por lo que el estudio de tripsina inmunorreactiva en un cribado neonatal es un método frecuente de diagnóstico. El método empleado por excelencia es el test del sudor donde se analizan niveles de  $\text{Cl}^-$  en el sudor de los pacientes. En el caso de requerirse otras alternativas diagnósticas, se puede proceder a estudios de diferencia de potencial nasal y estudios genéticos que detectan hasta el 80% de las mutaciones [6].

Los tratamientos que existen a día de hoy para la FQ son de naturaleza muy variable, pero ninguno de ellos permite curar la enfermedad. Entre las terapias aplicadas destacan los broncodilatadores para facilitar la apertura de las vías aéreas, mucolíticos para el control de moco, antiinflamatorios, antibioterapia, y trasplante pulmonar en los casos más extremos [7]. Existen también fármacos con un mecanismo de acción más específico como son los moduladores de CFTR, que se clasifican en potenciadores (Ivacaftor), correctores (Lumacaftor) o combinaciones de ambos (Elexacaftor + Tezacaftor + Ivacaftor) [8,9]. La gran desventaja de los moduladores de CFTR es la edad mínima que se requiere para su administración y su capacidad de actuar sobre un espectro específico y reducido de mutaciones, lo que se traduce en la imposibilidad de tratar a un número amplio de pacientes con características diferentes [7]. En los últimos años, se han desarrollado nuevas tecnologías terapéuticas genéticas como la terapia de reemplazo genético y la edición genómica, pero debido a la connotación ética que estas presentan, no tienen un alcance clínico relevante a día de hoy [1,3]. Todas las razones anteriormente expuestas ponen de manifiesto la urgente necesidad de identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan desarrollar tratamientos que mejoren la calidad de vida de los pacientes y curen la enfermedad.

## Diana terapéutica

### Fosfolipasa A2 e inflamación

La fosfolipasa A2 $\alpha$  citosólica (cPLA2 $\alpha$ ) es una enzima que escinde el ácido graso en la posición dos de los fosfolípidos, hidrolizando el enlace entre la segunda "cola" de ácido graso y la molécula de glicerol. Esta enzima tiene como sustrato ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) para sintetizar productos como el ácido araquidónico (AA) que participa en la respuesta inflamatoria, y el ácido docosahexaenoico (DHA) que se asocia con la resolución de la inflamación y el retorno a la homeostasis. Se ha descrito que mutaciones en el canal CFTR producen un incremento en la actividad de cPLA2 $\alpha$  en las vías respiratorias [10]. Esto tiene como consecuencia un aumento de AA en los pacientes con FQ, que a través de la actividad de la ciclooxigenasa (COX) produce mediadores proinflamatorios como prostaglandinas y leucotrienos. Además, también como consecuencia de la alta actividad de cPLA2 $\alpha$ , se observa una disminución de DHA, un precursor que utiliza la lipooxigenasa (LOX) para sintetizar resolvinas, protectinas y maresinas que funcionan como mediadores pro-resolución. Todos estos eventos desencadenan una respuesta inflamatoria exacerbada debido a un desequilibrio entre metabolitos de eicosanoides proinflamatorios y pro-resolutivos (Figura 2) [4,11]. Por este motivo, como se ha propuesto en varias publicaciones, se considera interesante controlar los niveles de actividad de la cPLA2 $\alpha$  con el fin de regular la inflamación.



**Figura 2. Esquema del metabolismo lipídico alterado en fibrosis quística.** La actividad de la fosfolipasa A2 (cPLA2 $\alpha$ ) está aumentada en las células epiteliales bronquiales en FQ, induciendo la síntesis de ácido linoleico n-6 (LA) y ácido araquidónico libre (AA). Esto se traduce en una mayor actividad de ciclooxigenasa (COX), generando en última instancia un aumento de los niveles de leucotrienos. Al ser el AA también sustrato de las lipoxigenasas (LOX), los niveles de lipoxinas se encuentran reducidos. Por otro lado, la disminución de ácido docosahexaenoico (DHA) originada por el aumento de cPLA2 $\alpha$  provoca una menor producción de mediadores pro-resolución. Adaptado de Briottet et al. [12].

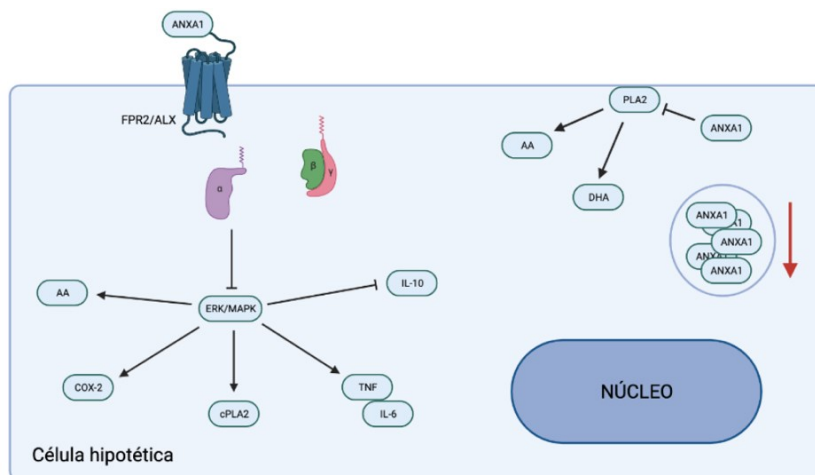
### Anexina A1 y resolución de la inflamación

Debido al papel que juega la inflamación en el desarrollo de la FQ, se han llevado a cabo diversos estudios que buscan inhibir este proceso para poder recuperar la homeostasis. Estudios previos demuestran los beneficios que presentan los inhibidores de la cPLA2 $\alpha$  gracias a su capacidad de atenuar la sobreproducción de moco en células epiteliales humanas y en ratones *Cftr*<sup>-/-</sup> [10]. Uno de los tratamientos actuales para frenar la inflamación es la terapia con glucocorticoides por su capacidad de regular a una proteína endógena conocida como lipocortina-1 o anexina A1 (ANXA1). Originariamente, ANXA1 se identificó como un inhibidor directo de la cPLA2 $\alpha$  y, por tanto, de la síntesis de eicosanoides que promueven la inflamación. Posteriormente fue reconocida como un modulador endógeno de la respuesta inflamatoria al participar no solo en acciones proinflamatorias, sino también en acciones pro-resolutivas a través del receptor formil péptido tipo 2 / receptor de lipoxina A4 (FPR2/ALX), el cual forma parte de una familia de receptores acoplados a proteína G de siete dominios transmembrana [12].

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales y polimorfonucleares (PMN) poseen una proporción abundante de ANXA1 intracelular encapsulada en gránulos que, al activarse, se transloca a la superficie celular. En esta localización, ANXA1 puede interactuar con el receptor FPR2/ALX, al que se dirige de

forma paracrina y/o autocrina para asegurar un grado homeostático apropiado de activación. Por otro lado, en diferentes estudios de investigación, se determinó que la mutación en CFTR se asocia con una menor expresión de ANXA1 en células epiteliales y neutrófilos. En los pacientes con FQ, una reducción en los niveles de esta proteína provoca que la respuesta inflamatoria sea más prolongada; y en el caso de los neutrófilos, se induce mayor respuesta migratoria al sitio de inflamación. Asimismo, se han demostrado funciones pro-apoptóticas *in vivo* durante la auto-resolución de la inflamación [13].

Los efectos de ANXA1 sobre la respuesta inflamatoria se deben a la regulación que esta produce sobre la cPLA2 $\alpha$  y diferentes vías de señalización a través de FPR2/ALX. ANXA1 inicia una cascada *downstream* del FPR2/ALX por activación de la subunidad G $\alpha$ , promoviendo la inactivación de ERK y de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que impide la actividad de cPLA2 $\alpha$  (Figura 3). Por esta razón, ANXA1 previene la formación de precursores inflamatorios como AA, induce la formación de factores antiinflamatorios (IL-10 o TGF- $\beta$ ), inhibe la formación de COX-2 y óxido nítrico sintasa, la migración de neutrófilos, así como la síntesis y liberación de interleuquinas (IL-6) y TNF [14, 15].



**Figura 3. Papel de la ANXA1 en la respuesta inflamatoria.** En condiciones fisiológicas, ANXA1 se encuentra en el interior de gránulos, mientras que en un contexto patológico disminuye su expresión. De manera extracelular ANXA1 se une al receptor FPR2/ALX activando una vía de señalización que culmina con la inhibición de la cPLA2 $\alpha$ . A nivel intracelular, ANXA1 también puede unirse directamente a la cPLA2 $\alpha$  inhibiendo su actividad de manera directa. AA: ácido araquidónico, IL: interleuquina, COX: ciclooxigenasa, DHA: ácido docosahexaenoico, ERK: quinasa regulada extracelular, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, TNF: factor de necrosis tumoral.

La disminución de ANXA1 en pacientes con FQ y el papel de esta proteína en la homeostasis de la inflamación, son algunos de los motivos por los que consideramos a ANXA1 una potencial diana terapéutica para controlar la respuesta inflamatoria exacerbada que se presenta en esta enfermedad. Por ello, proponemos la utilización de análogos de ANXA1 a través de dos estrategias diferentes administradas, si es posible, simultáneamente. Por un lado, de forma extracelular para permitir su unión al receptor FPR2/ALX en células epiteliales y neutrófilos; y por otro lado intracelularmente, sólo en las células epiteliales, para inhibir cPLA2 $\alpha$  de manera directa. Esto permitiría disminuir los niveles de mediadores proinflamatorios y aumentar los mediadores pro-resolución. La ventaja de combinar ambas estrategias es que se proporcionaría un mejor control de la inflamación y con ello, un mejor pronóstico de la enfermedad.

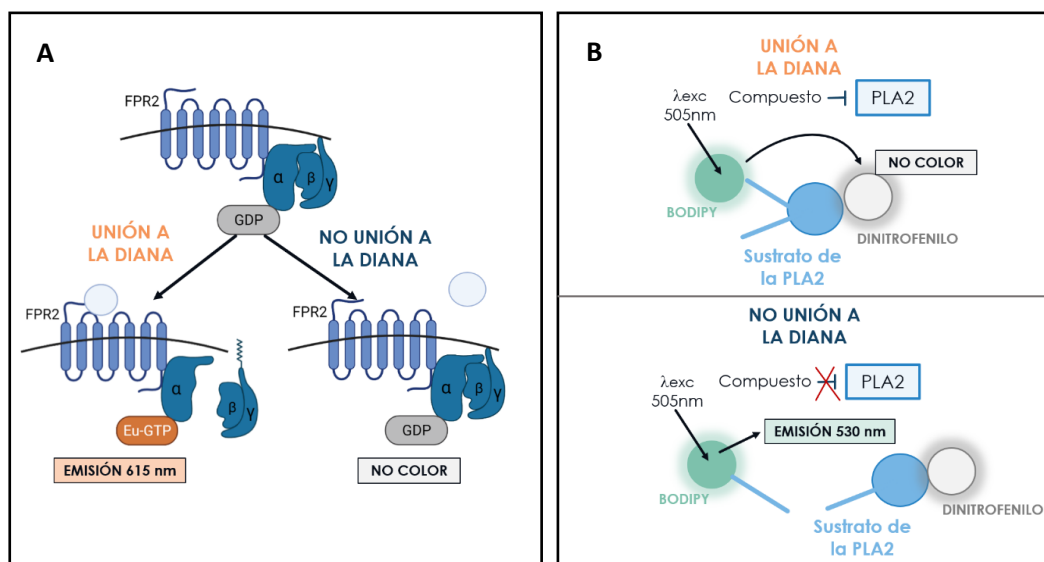
## Diseño HTS

El High Throughput Screening (HTS) o cribado de alto rendimiento es un proceso que permite evaluar grandes bibliotecas de compuestos para seleccionar aquellos que posean la actividad deseada [16]. Por ello, en este estudio para conseguir la estrategia terapéutica planteada se realizarían dos ensayos HTS.

En primer lugar, para seleccionar aquellos compuestos que fuesen capaces de unirse al receptor FPR2 y activarlo se utilizaría un kit de fraccionamiento celular que está diseñado para separar y aislar la fracción membrana de las células cultivadas [17]. En nuestro caso, usaríamos las células CFBE41o y HL-60 que se explicarán más en detalle en el apartado de ensayos *in vitro*. Una vez aisladas las fracciones membranas de interés, se procedería a realizar el ensayo de unión a GTP basado en fluorescencia resuelta en el tiempo de receptores acoplados a proteínas Gs. En el caso de que el compuesto de interés se uniese al receptor FPR2 y lo activase, el GDP se intercambiaría por el GTP unido a europio (Eu-GTP). Al excitar a una longitud de onda de 340 nm, el Eu-GTP emitiría una longitud de onda de 615 nm y se vería un color naranja. Por el contrario, en el caso de que el compuesto no se uniese al receptor FPR2, el GDP no se intercambiaría por el Eu-GTP. Al excitar a una longitud de onda de 340 nm, no se vería color. Por lo

tanto, mediante este ensayo se podrían seleccionar los compuestos que se uniesen al receptor FPR2 y lo activasen [18].

En segundo lugar, para seleccionar aquellos compuestos que fuesen capaces de unirse a la cPLA2 $\alpha$  e inhibirla se realizaría un ensayo basado en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). En el caso de que el compuesto se uniese a la cPLA2 $\alpha$ , esta no podría actuar sobre el sustrato. Al excitar a una longitud de onda de 505 nm, la energía emitida por la molécula conocida como bodipy sería absorbida por el dinitrofenilo y no se vería ningún tipo de color. Por el contrario, en el caso de que el compuesto no se uniese a la cPLA2 $\alpha$ , esta quedaría libre y podría actuar sobre el sustrato. Al excitar a una longitud de onda de 505 nm, la energía emitida por bodipy no podría ser absorbida por el dinitrofenilo. De este modo, al emitirse una longitud de onda de 530 nm se vería un color verde. Por lo tanto, mediante este ensayo se podrían seleccionar los compuestos que se uniesen a la cPLA2 $\alpha$  y la inhibiesen [19].



**Figura 4. Ensayos HTS. A)** Ensayo de unión a GTP basado en fluorescencia resuelta en el tiempo para receptores acoplados a proteínas Gs en fracciones de membrana previamente aisladas. Al excitar a  $\lambda$ 340 nm, si el compuesto se une al receptor FPR2 y lo activa, el GDP se intercambia por Eu-GTP y se emite un color naranja. Si el compuesto no se une al receptor FPR2, el GDP no se intercambia por Eu-GTP y no se emite color. **B)** Ensayo basado en la transferencia de energía de resonancia de Förster. Al excitar a  $\lambda$ 505 nm, si el compuesto se une a la cPLA2 $\alpha$  la energía emitida por bodipy será absorbida por el dinitrofenilo y no se emite color. Si el compuesto no se une a la cPLA2 $\alpha$ , esta actúa sobre el sustrato y la energía emitida por bodipy no será absorbida por el dinitrofenilo y emitirá color verde.

## Diseño de ensayos *in vitro*

Una vez realizado el ensayo HTS, se llevarían a cabo estudios de relación estructura actividad (SAR) para la obtención de los cabezas de serie (leads). A continuación, se diseñarían una serie de ensayos *in vitro* para testar la actividad de los leads seleccionados. Para la realización de estos estudios, se utilizarían dos líneas celulares distintas. Por un lado, la línea celular epitelial bronquial humana CFBE41o es derivada de un paciente con FQ homocigoto para la mutación de interés CFTR  $\Delta$ F508 [20]. Por otro lado, la línea celular de leucemia humana HL-60 es derivada de un paciente con leucemia promielocítica aguda. Como las HL-60 no contienen la mutación de interés, los promielocitos neutrofilicos serían tratados con ácido retinoico para su posterior diferenciación a neutrófilos. Posteriormente, mediante la tecnología de CRISPR/Cas9 se induciría la mutación de interés CFTR  $\Delta$ F508 [21].

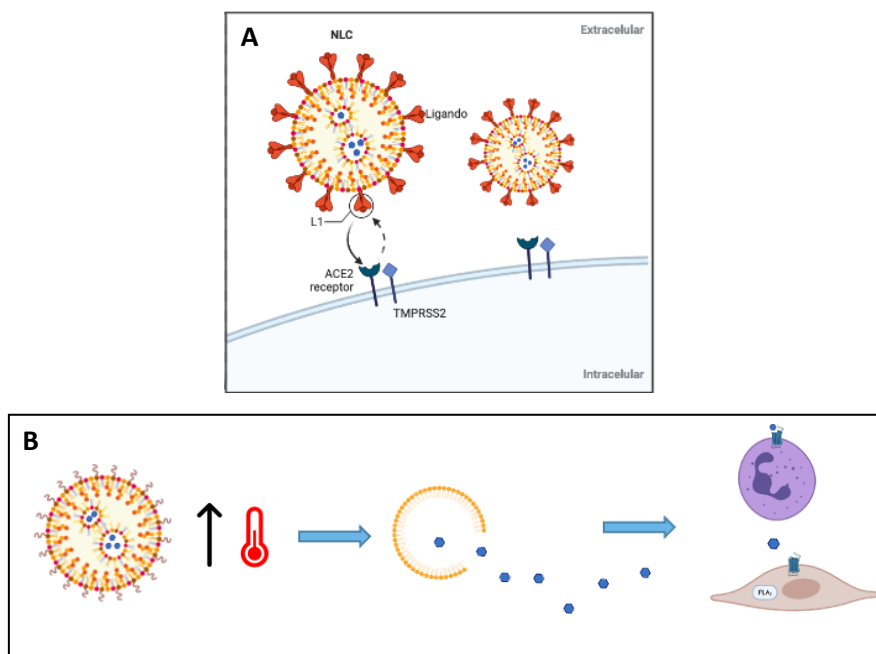
En ambas líneas celulares se medirían, en primer lugar, los niveles de actividad de la cPLA2 $\alpha$  mediante un kit para comprobar que los compuestos análogos de ANXA1 fuesen capaces de disminuir la actividad de esta enzima [22]. Asimismo, se medirían los niveles de actividad de la COX2 mediante otro kit para comprobar que los compuestos disminuirían la actividad de esta enzima [23]. Finalmente, se medirían los niveles de expresión de la interleucina antiinflamatoria IL-10 y de la interleucina proinflamatoria IL-8 mediante Western Blot para comprobar que los compuestos reducirían la inflamación [17,18].

## Diseño de ensayos *in vivo*

### Vehiculización del fármaco

Para conseguir una acción eficaz del fármaco, así como reducir al máximo los posibles efectos secundarios que pudiera tener su administración, se propone la encapsulación de los compuestos seleccionados en nanoestructuras lipídicas (NLCs), las cuales liberan el fármaco cuando llegan al órgano diana. Estas están compuestas por lípidos biocompatibles como ácidos grasos o triglicéridos que, asociados a diferentes excipientes, como surfactante, posibilitan el transporte eficiente de gran cantidad de fármacos liposolubles [26].

Debido a que nuestro objetivo es actuar sobre dos tipos celulares diferentes, se propondrían dos tipos de vehiculización del fármaco ligeramente diferentes, pero específicos para cada una de las células diana (Figura 5). En las células epiteliales de pulmón, basándonos en el mecanismo de acción del SARS-Cov2 [27], se funcionalizarían las NLCs de tal manera que en su capa externa portasen ligandos específicos para los receptores ACE2, muy abundantes en el epitelio pulmonar. Una vez que ligando y receptor interaccionasen, la nanoestructura se internalizaría en la célula, donde se encargaría de liberar el fármaco, consiguiendo una inhibición directa de cPLA2 $\alpha$  de forma intracelular. Por otro lado, tanto en neutrófilos como en células epiteliales, se diseñarían unas NLCs que liberasen el fármaco a través de un transporte activo mediado por estímulos, en concreto, un cambio de temperatura. Las vías respiratorias superiores presentan una temperatura de aproximadamente 32°C, mientras que a medida que avanzamos hacia el interior del pulmón, esa temperatura aumenta hasta los 36°C, cambio de temperatura que dispara la liberación del fármaco, produciéndose una inhibición de cPLA2 $\alpha$  a través de los receptores extracelulares FPR2. Ambos mecanismos conseguirían de forma sinérgica reducir considerablemente la inflamación pulmonar característica en los pacientes con FQ.



**Figura 5. Estrategias terapéuticas para inhibir cPLA2 $\alpha$ .** **A)** Inhibición intracelular a través de la interacción entre ligandos específicos con los receptores ACE2 presentes en el epitelio pulmonar. Dicha interacción produce la invaginación de la NLC, que una vez dentro libera el fármaco en el interior celular. **B)** Inhibición extracelular mediante la liberación del fármaco de las NLCs gracias a un aumento de temperatura en el interior de las vías respiratorias inferiores. El fármaco se une a los receptores FPR2 tanto en neutrófilos como en células epiteliales.

Para optimizar las NLCs, se estudiaría el perfil de liberación del fármaco, su viabilidad y la penetración en el moco en las líneas celulares CFBE41o y HL-60, mediante estudios de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-Anexina I (A28868) de conejo, reconocido por un anticuerpo secundario biotinilado (A63808) para obtener la fluorescencia [28]. Asimismo, el análisis de biodistribución *in vivo* del fármaco se llevaría a cabo mediante la conjugación de las NLCs con la sonda  $^{124}\text{I}$ , con la finalidad de comprobar la localización de las nanoestructuras independientemente de la profundidad del tejido y permitiendo una cuantificación más precisa [29].

## Diseño del ensayo *in vivo*

El modelo animal elegido, FVB/129-CFTR<sup>tm1EUR</sup>, es un ratón albino modificado genéticamente para que exprese la mutación exacta que presentan los pacientes humanos de FQ, y del cual se utilizarían ambos sexos para la realización del estudio [30].

Con la finalidad de poder analizar correctamente los efectos del fármaco tras su administración, se fijarían cuatro tiempos distintos en los que se analizarían diferentes parámetros, siendo los más relevantes la inflamación pulmonar y la presencia de moco. Dichos tiempos serían: A) antes del tratamiento; B) 48h después del tratamiento; C) 3 meses después del tratamiento; D) 6 meses después del tratamiento.

Los efectos que produce el análogo de ANXA1 tanto en las células epiteliales como en neutrófilos se analizarían mediante TAC y lavado broncoalveolar, cuyos componentes celulares se aislarían y caracterizarían mediante citometría de flujo. Además, se llevarían a cabo analíticas de sangre donde se analizarían diferentes parámetros para comprobar que las NLCs no estarían causando ningún efecto adverso con afectación a otros sistemas. Por último, sería conveniente llevar a cabo tinciones como H&E y Tricómico de Masson, así como técnicas de inmunofluorescencia con distintos anticuerpos específicos de inflamación para determinar con exactitud los efectos del fármaco.

## Vía de administración

Para poder elegir una vía de administración correcta nos basamos en *The Human Protein Atlas* [31]. Comprobamos que ANXA1 es una proteína que se expresa en gran abundancia en el tracto gastrointestinal, por lo cual descartamos completamente la vía oral. Aun no presentando una elevada expresión en el torrente sanguíneo, se prescindió de la vía intravenosa por ser un riesgo de grandes efectos adversos en los sistemas del organismo, mientras que en los pulmones su nivel de expresión es intermedio. Por lo tanto, la vía de administración más adecuada para el compuesto encapsulado en las NLCs para el tratamiento de la FQ sería de forma inhalada, a través de una composición en forma de polvo seco, generando de esta forma un efecto localizado, aumentando la especificidad del compuesto y minimizando posibles efectos adversos.

## Efectos adversos

La terapia que proponemos se basa en una inhibición de cPLA2 $\alpha$  de dos formas distintas (intracelular y extracelular), en dos tipos celulares diferentes, aun ejerciendo el efecto de forma localizada en los pulmones. Esto podría desencadenar una disminución drástica de la inflamación, generando una inmunodepresión severa a nivel local que empeorase el pronóstico de un paciente con fibrosis quística ante las comunes infecciones recurrentes que suelen sufrir.

Por otro lado, está descrito que niveles elevados de ANXA1 sobreactivan la vía de MAPK, así como factores implicados en transición epitelio-mesénquima (EMT), cuya señalización culmina con señales de proliferación celular e invasión [32]. En gran cantidad de tumores, esta vía se encuentra exacerbada, por lo que esta terapia, aplicada a largo plazo, podría en última instancia generar una tumorigénesis no deseada, especialmente en los pulmones.

## Perspectivas futuras

Los análogos de ANXA1 podrían ser una potencial diana terapéutica para el tratamiento de la FQ gracias a su papel inmunodepresor y antiinflamatorio.

Debido a los efectos adversos que podría llegar a ocasionar este tratamiento, cabe destacar que lo más beneficioso sería implementar una medicina personalizada, adaptando la terapia a las características de cada paciente con la finalidad de minimizar al máximo los efectos adversos y conseguir mejorar la calidad de vida de los pacientes con fibrosis quística.

## Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a la Universidad de Alcalá y a la organización del máster en Dianas Terapéuticas en Señalización Celular por la excelente formación recibida y haber hecho posible la realización de este proyecto. Gracias a los profesores de la asignatura “*Taller de diseño y selección de MBA*” por darnos sus directrices para iniciar este trabajo, facilitarnos las herramientas que nos han permitido desarrollarlo y por confiar en nosotros. Por último, y no menos importante, agradecer a los antiguos alumnos del máster que han colaborado en algunas sesiones de la asignatura y nos han aconsejado para mejorar y sacar el máximo partido a este estudio.

## Referencias

- [1] J. S. Elborn, “Cystic fibrosis,” *Lancet*, vol. 388, no. 10059, pp. 2519–2531, 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)00576-6.

- [2] J. R. Riordan *et al.*, “Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA,” *Science (80-. )*, vol. 245, no. 4922, pp. 1066–1073, 1989, doi: 10.1126/science.2475911.
- [3] Á. Paez, E. Zamar, S. Risso, M. Casiraghi, A. Fiameni, and N. Evangelista, *Tratado de Fibrosis Quística*, vol. 89, no. 8. 2012.
- [4] E. A. Roesch, D. P. Nichols, and J. F. Chmiel, “Inflammation in cystic fibrosis: An update,” *Pediatr. Pulmonol.*, vol. 53, no. June, pp. S30–S50, 2018, doi: 10.1002/ppul.24129.
- [5] J. C. Davies, E. W. F. W. Alton, and A. Bush, “Cystic fibrosis,” *Br. Med. J.*, vol. 335, no. 7632, pp. 1255–1259, 2007, doi: 10.1136/bmj.39391.713229.AD.
- [6] K. De Boeck, F. Vermeulen, and L. Dupont, “The diagnosis of cystic fibrosis,” *Press. Medicale*, vol. 46, no. 6P2, pp. e97–e108, 2017, doi: 10.1016/j.lpm.2017.04.010.
- [7] C. Mitri, Z. Xu, P. Bardin, H. Corvol, L. Touqui, and O. Tabary, “Novel Anti-Inflammatory Approaches for Cystic Fibrosis Lung Disease: Identification of Molecular Targets and Design of Innovative Therapies,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, no. July, pp. 1–25, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.01096.
- [8] E. D. Deeks, “Lumacaftor/Ivacaftor: A Review in Cystic Fibrosis,” *Drugs*, vol. 76, no. 12, pp. 1191–1201, 2016, doi: 10.1007/s40265-016-0611-2.
- [9] P. G. Middleton *et al.*, “Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 381, no. 19, pp. 1809–1819, 2019, doi: 10.1056/nejmoa1908639.
- [10] F. Dif *et al.*, “Critical role of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  in bronchial mucus hypersecretion in CFTR-deficient mice,” *Eur. Respir. J.*, vol. 36, no. 5, pp. 1120–1130, Nov. 2010, doi: 10.1183/09031936.00183409.
- [11] M. Briottet, M. Shum, and V. Urbach, “The Role of Specialized Pro-Resolving Mediators in Cystic Fibrosis Airways Disease,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, Sep. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.01290.
- [12] M. A. Sugimoto, J. P. Vago, M. M. Teixeira, and L. P. Sousa, “Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/8239258.
- [13] J. Dalli, G. Rosignoli, R. P. G. Hayhoe, A. Edelman, and M. Perretti, “CFTR inhibition provokes an inflammatory response associated with an imbalance of the annexin A1 pathway,” *Am. J. Pathol.*, vol. 177, no. 1, pp. 176–186, 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.091149.
- [14] G. Shao, H. Zhou, Q. Zhang, Y. Jin, and C. Fu, “Advancements of Annexin A1 in inflammation and tumorigenesis,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. Volume 12, pp. 3245–3254, Apr. 2019, doi: 10.2147/ott.s202271.
- [15] P. F. Han, X. Da Che, H. Z. Li, Y. Y. Gao, X. C. Wei, and P. C. Li, “Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways,” *Chinese J. Traumatol. - English Ed.*, vol. 23, no. 2, pp. 96–101, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.cjtee.2020.02.002.
- [16] W. Zeng, L. Guo, S. Xu, J. Chen, and J. Zhou, “High-Throughput Screening Technology in Industrial Biotechnology,” *Trends in Biotechnology*, vol. 38, no. 8. 2020, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.01.001.
- [17] “Cell Fractionation Kit”, *Cell Signalling Technology #9038*, 2012, Protocol online, <https://www.cellsignal.com/products/experimental-controls/cell-fractionation-kit/9038>.
- [18] P. Kasila, H. Harney, and G. Warner, “Time-Resolved Fluorescence Based GTP Binding Assay for G s-Protein Coupled Receptors,” *Perkin Elmer #AS0167*, 2003, [https://www.perkinelmer.com/content/relatedmaterials/posters/sps\\_trfbasedgtpbindingassay.pdf](https://www.perkinelmer.com/content/relatedmaterials/posters/sps_trfbasedgtpbindingassay.pdf)
- [19] G. A. Jones and D. S. Bradshaw, “Resonance energy transfer: From fundamental theory to recent applications,” *Frontiers in Physics*, vol. 7, no. JULY. 2019, doi: 10.3389/fphy.2019.00111.
- [20] “CFBE41o- human CF bronchial epithelial cell line derived from a cystic fibrosis patient homozygous for the  $\Delta$ F508 CFTR mutation,” *Merck*.
- [21] B. Glo, “Organism: Homo sapiens, human Tissue: peripheral blood Disease: acute promyelocytic leukemia Cell Type: promyeloblast Age: 36 years Gender: female Morphology: lymphoblast-like Growth Properties: suspension Isoenzymes,” 2021.
- [22] “cPLA2 Assay Kit,” *Cayman chemical #765021*,



- <https://www.caymanchem.com/pdfs/765021.pdf>.
- [23] “COX Assay Kit.” *Cayman chemical* #760151, <https://www.caymanchem.com/pdfs/760151.pdf>.
- [24] “IL-10 (E-10): sc-8438,” *S. Cruz Biotechnology*, <https://datasheets.scbt.com/sc-8438.pdf>.
- [25] “IL-8 (B-2): sc-8427,” *S. Cruz Biotechnology*, <https://datasheets.scbt.com/sc-8427.pdf>.
- [26] I. Chauhan, M. Yasir, M. Verma, and A. P. Singh, “Nanostructured lipid carriers: A groundbreaking approach for transdermal drug delivery,” *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 10, no. 2, pp. 150–165, 2020, doi: 10.34172/apb.2020.021.
- [27] S. Boopathi, A. B. Poma, and P. Kolandaivel, “Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment,” *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1080/07391102.2020.1758788.
- [28] “Anti-Annexin I Anticuerpo (A28868) | Antibodies.com.” .
- [29] M. M. n, Eunsung Mouradian. *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1021/nn901146y.In.
- [30] B. J. Scholte, D. J. Davidson, M. Wilke, and H. R. De Jonge, “Animal models of cystic fibrosis,” *J. Cyst. Fibros.*, vol. 3, no. SUPPL. 2, pp. 183–190, 2004, doi: 10.1016/j.jcf.2004.05.039.
- [31] “ANXA1 protein expression summary - The Human Protein Atlas.” .
- [32] G. Shao, H. Zhou, Q. Zhang, Y. Jin, and C. Fu, “Advancements of Annexin A1 in inflammation and tumorigenesis.” *Onco. Targets. Ther.*, vol. Volume 12, pp. 3245–3254, 2019, doi: 10.2147/ott.s202271.