

RESUMEN EN ESPAÑOL

Los tumores de cabeza y cuello son el séptimo tipo de neoplasia más común a nivel mundial. Aproximadamente el 40% de los pacientes con tumores de cabeza y cuello tratados con radioterapia desarrollan xerostomía debido a la irradiación involuntaria de las glándulas salivales. Estos órganos exocrinos, localizados en las regiones oral y faríngea, son responsables de la producción de saliva, esencial para mantener la salud bucal, facilitar la deglución y la fonación. El daño causado por la radioterapia en las células acinares de las glándulas salivales, junto con la pérdida de células madre, fundamentales para el recambio y la regeneración del tejido, compromete la correcta función y reparación de estos órganos. Esto puede dar lugar a una disfunción glandular a largo plazo, afectando gravemente la calidad de vida de los pacientes.

En los últimos años, para reducir los efectos secundarios de la radioterapia, se han logrado avances importantes en las técnicas de irradiación. Un ejemplo clave es la terapia con protones, que ofrece una mayor precisión para dirigir el tratamiento al tumor y reduce la exposición de los tejidos sanos circundantes. Sin embargo, a pesar de estos avances, los daños en los tejidos adyacentes al tumor aún pueden ocurrir y persistir a lo largo de toda la vida.

Modelos avanzados de investigación, como los organoides de glándulas salivales, representan una plataforma prometedora para estudiar las respuestas tisulares a la radiación. Estos organoides, enriquecidos con células madre y compuestos por diversas poblaciones celulares, permiten investigar en detalle los mecanismos moleculares activados por la irradiación. El conocimiento obtenido de estos modelos podría guiar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, orientadas a preservar la integridad de los tejidos sanos mientras se maximiza la eficacia de los tratamientos oncológicos.

Las células madre adultas son esenciales para mantener la homeostasis y promover la regeneración de los tejidos. Sin embargo, el estrés genotóxico (daño al ADN) puede afectar significativamente su longevidad y función. El **Capítulo 2** ofrece una visión general de las principales vías de señalización y eventos moleculares activados por el daño al ADN, destacando su impacto en el microambiente y en la función de las células madre y progenitoras. En los últimos años, los sensores de ADN de doble hebra (dsDNA), como cGAS, han sido identificados como componentes clave en la activación de respuestas inmunitarias e inflamatorias, tanto en tejidos sanos como tumorales. Más recientemente, otros sensores, como los receptores de ARN de doble hebra (dsRNA) RIG-I y MDA5, así como el sensor ZBP1, han surgido como reguladores complementarios en la activación de respuestas inflamatorias.

El daño al ADN también puede inducir senescencia celular, un proceso caracterizado por la detención permanente del ciclo celular y un fenotipo

inflamatorio. La senescencia inducida por radiación es especialmente relevante para la degeneración tisular y la pérdida del potencial regenerativo de las células madre. Durante este proceso, la secreción de citocinas puede reclutar células inmunitarias, contribuyendo a una respuesta inflamatoria local en el tejido. En conjunto, estas respuestas inmunomoduladoras mediadas por el daño al ADN pueden alterar la homeostasis de las células madre adultas, llevando a condiciones degenerativas en los tejidos en los que residen. Al mismo tiempo, la liberación de citocinas específicas puede mejorar la plasticidad y la capacidad regenerativa de estas células, y en algunos casos, estimular la actividad de las células madre tumorales, favoreciendo potencialmente la progresión del tumor.

Los mitocondrios son orgánulos dinámicos esenciales para el mantenimiento del metabolismo y la función celular. La disfunción mitocondrial se ha asociado con la aparición de senescencia celular y el deterioro de la función de las células madre adultas, contribuyendo al desarrollo de diversas patologías. El **Capítulo 3** analiza cómo la irradiación afecta la función mitocondrial y su impacto en la senescencia y en la capacidad de autorrenovación de las células madre y progenitoras. Después de la irradiación con fotones (rayos gamma), los organoides de glándulas salivales mostraron una alteración de los procesos de mitofagia y de la dinámica mitocondrial, procesos esenciales para garantizar la correcta eliminación y recambio de mitocondrios dañados. De hecho, los organoides irradiados mostraron una acumulación significativa de mitocondrios alargados y disfuncionales, asociados con senescencia celular y agotamiento de las células madre y progenitoras. Las intervenciones farmacológicas con inductores de la fisión mitocondrial o de la mitofagia restauraron estos procesos, mejorando significativamente la función mitocondrial, reduciendo la senescencia y potenciando las capacidades regenerativas de los organoides. Estos resultados sugieren una posible estrategia para restaurar la función de las células madre tras la irradiación, actuando sobre la disfunción mitocondrial y la senescencia.

La limitada disponibilidad de estudios sobre las respuestas de los tejidos sanos a la irradiación ha dejado importantes vacíos en la comprensión de los efectos de los fotones y protones en los tejidos no tumorales, en particular en las glándulas salivales. En el **Capítulo 4**, utilizamos nuestro modelo de organoides de glándulas salivales para investigar los mecanismos moleculares activados por estos dos tipos de irradiación. Ambos tipos de irradiación indujeron una respuesta de señalización del interferón tipo I (IFN-I), mediada principalmente por la formación de micronúcleos y la activación de cGAS en las primeras fases, y por el reconocimiento del ADN mitocondrial (mtDNA) en las fases posteriores. Estos resultados destacan el papel crucial de estos mecanismos en la modulación de la respuesta inflamatoria en los tejidos sanos. Una observación interesante es que la irradiación con protones provocó una respuesta interferónica más intensa que la inducida por fotones,

principalmente mediada por la formación de dsRNA derivado de la expresión de elementos transponibles (TE) y la posterior activación de RIG-I. Esta respuesta potenciada resultó ser esencial para la capacidad de regeneración y proliferación de las células madre. En particular, el tratamiento con interferón-beta (IFN- β) mejoró significativamente el crecimiento de los organoides y la proliferación de las células madre y progenitoras en las muestras irradiadas con fotones. Los experimentos *in vivo* confirmaron aún más el papel importante de IFN- β en la promoción de la actividad de las células madre y progenitoras después de la irradiación. Este estudio no solo esclarece los mecanismos subyacentes a las respuestas inflamatorias post-irradiación, sino que también proporciona una base sólida para el desarrollo de estrategias innovadoras que mejoren los resultados de la radioterapia y favorezcan la regeneración de los tejidos sanos.

En el **Capítulo 5**, se adoptó un enfoque multi-ómico para caracterizar en detalle las poblaciones celulares que componen los organoides de las glándulas salivales, analizando sus dinámicas en diferentes fases temporales y en respuesta a los daños inducidos por radiación. El análisis de los organoides mediante "single-cell RNA-sequencing" (scRNA-seq) reveló la presencia de poblaciones potenciales de células madre y progenitoras, caracterizadas por marcadores típicos y propiedades de células madre elevadas. En particular, se identificó una nueva población celular que podría representar un precursor de las células acinares, caracterizada por rasgos epitelio-mesenquimatosos y un fenotipo migratorio. Análisis bioinformáticos adicionales y validaciones *in vitro* destacaron que las células madre y progenitoras de las glándulas salivales dependen de la señalización de Notch para mantener su capacidad migratoria y su potencial regenerativo tras la irradiación. Estos resultados también fueron confirmados en otros tejidos glandulares, tanto murinos como humanos, como la tiroides y las glándulas mamarias, subrayando el papel crucial de Notch en la regulación de la capacidad de autorrenovación y el potencial de diferenciación de estas poblaciones celulares.

Además de la señalización de Notch, la vía de señalización de Hippo también juega un papel fundamental en la regulación del crecimiento y la regeneración tisular. En el **Capítulo 6**, se utilizaron modelos *in vivo* e *in vitro* para estudiar el papel de YAP, un componente clave de esta vía, en la homeostasis y la regeneración de las glándulas salivales adultas. A través de la modulación farmacológica y genética de la actividad de YAP, se observaron cambios dinámicos entre condiciones homeostáticas y de daño. En condiciones homeostáticas, la actividad de YAP era baja, mientras que aumentaba significativamente después de una lesión. En particular, la activación de la translocación nuclear de YAP mejoró significativamente la regeneración y la proliferación de las células de las glándulas salivales. Estos resultados resaltan el papel crucial de YAP en la regulación de la plasticidad y la capacidad regenerativa de las glándulas salivales dañadas.

En conclusión, esta tesis demuestra cómo los modelos de organoides pueden utilizarse para revelar los mecanismos moleculares afectados por la radiación con fotones y protones. La validación de estos resultados en contextos (pre)clínicos es fundamental para optimizar los tratamientos del cáncer de cabeza y cuello, mejorando la calidad de vida y la recuperación de los pacientes. La integración de células inmunitarias en modelos más avanzados permitiría evaluar las respuestas inflamatorias e inmunitarias en condiciones más fisiológicas. Además, una comprensión más profunda de las poblaciones de células madre y progenitoras en las glándulas salivales, junto con sus complejas redes de regulación, favorecería el desarrollo de enfoques terapéuticos personalizados más eficaces.