



Desarrollo de nuevas nanoformulaciones para el transporte y liberación del fármaco temozolamida

Pilar María Granado García

Tutora: Carmen Reyes Mateo Martínez

Cotutora: María José Martínez Tomé

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de conocimiento: Química-Física

Grado en Biotecnología

Curso 2017/2018

Resumen: En este trabajo se diseñan y sintetizan nanoformulaciones multifuncionales que permitan el transporte y estudio del fármaco anticancerígeno temozolamida (TMZ). Para ello se ha caracterizado previamente el fármaco y se han explorado dos posibles estrategias de vehiculización: la unión del fármaco a una proteína transportadora presente en el suero (seroalbúmina humana, HSA) y su incorporación en nanopartículas poliméricas de PMVEMA, combinadas con polielectrolitos conjugados fluorescentes que emiten en el azul (HTMA-PFP). Los resultados revelan la baja afinidad entre la TMZ y la proteína HSA, de modo que este sistema no es adecuado para el transporte del fármaco, al menos en las condiciones estudiadas. Por el contrario, los resultados muestran el éxito de las nanopartículas poliméricas con TMZ usadas en ensayos celulares frente a líneas tumorales, además de la correcta incorporación del polielectrolito conjugado, lo que dota a las nanopartículas de propiedades fluorescentes. Ante los resultados obtenidos, es posible proponer el uso potencial de estas nanopartículas multifuncionales como vehículo de transporte y monitorización mediante bioimagen.

Palabras clave: TMZ, HSA, glioblastoma, PMVEMA, polielectrolito conjugado, nanopartícula multifuncional, fluorescencia.

Abstrac: In this work multifunctional nanoformulations that allow the transport and study of anticancer drug Temozolamide (TMZ) have been designed and synthesized. For that purpose has been previously characterized the drug and two possible strategies have been explored: The binding of the drug to a carrier protein present in the serum (human serum albumin, HSA) and its incorporation into polymeric nanoparticles of PMVEMA, combined with fluorescent conjugated polyelectrolytes emitting in the blue (HTMA-PFP). The results reveal the low affinity between the TMZ and the HSA protein, so this system is not suitable for the transport of the drug, at least under the conditions studied. On the contrary, the results show the success of the polymeric nanoparticles with TMZ uses in cell culture assay against tumour lines, in addition to, the correct incorporation of the conjugated polyelectrolyte, which gives the nanoparticles properties fluorescent. In view of the results obtained, it is possible to propose the potential use of these multifunctional nanoparticles as a transport vehicle and bioimaging monitoring.

Keywords: TMZ, HSA, glioblastoma, PMVEMA, conjugated polyelectrolyte, multifunctional nanoparticle, fluorescence.

Índice

Introducción	5
1. Glioblastoma multiforme.....	5
2. Temozolamida	5
3. Nanomedicina.....	7
Antecedentes y objetivos	10
1. Seroalbúmina humana como portador de fármacos.....	10
2. Nanopartículas de PMVEMA como transportador de fármacos.....	10
3. Nanopartículas multifuncionales	11
Materiales y métodos.....	13
Resultados y discusión.....	16
1. Caracterización del fármaco temozolamida (TMZ).....	16
1.1- TMZ en agua y en TP 50 mM NaCl 100 mM.....	16
1.2- Coeficiente de extinción molar de la TMZ en agua y en TP 50 mM NaCl 100 mM. .	16
1.3- Estabilidad de la TMZ bajo distintas condiciones.....	18
1.3.1- Degradación de la TMZ.....	18
1.3.2- Efecto del pH.	18
1.3.3- Efecto de la temperatura.....	19
2. Estudio de diferentes sistemas de vehiculización de la TMZ.	20
2.1- Estudio de la proteína HSA con TMZ.....	20
2.1-1. Efecto de la TMZ sobre la estructura de la HSA.....	20
2.1-2. Efecto de la TMZ sobre la fluorescencia intrínseca de la HSA.....	21
2.1-3. Naturaleza de la interacción entre HSA y TMZ.	25
2.1-4. Comportamiento de HSA en presencia de TMZ en tampón	27
2.2- Estudio del polímero PMVEMA con TMZ.....	27
2.2-1. Caracterización de NPs de PMVEMA.	27
2.2-2. Estabilidad de la TMZ en NPs de PMVEMA.....	28
2.2-3. Estudio de la eficiencia de encapsulación.....	29
2.2-4. Cinética en condiciones de ensayo celular.	30
2.2-5. Ensayos celulares.....	31
2.2-6. Incorporación del polielectrolito HTMA-PFP en las NPs de PMVEMA.	32
2.2-7. Optimización de NPs de PMVEMA con HTMA-PFP	33
2.2-8. Marcaje celular... ..	35
Conclusiones y perspectivas futuras.....	36
Bibliografía.....	38

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIC	5-amino-imidiazol-4-carboxoamida
BCNU (Carmustina)	β -cloronitrosourea
CPEs	Polielectrolitos conjugados
DLS	Dispersión de luz dinámica
Dr.	Doctor
FRET	Transferencia de energía de resonancia
GB	Glioblastoma
HGUE	Hospital General Universitario de Elche
HSA	Seroalbúmina humana
HTMA-PFP	Poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-fluoreno-fenilo} bromuro
MC	Catión metildiazonio
MGMT	O6-methylguanine-DNA methyltransferase
MTIC	5-(3-metiltriazin-1-il)imidazol-4-carboxamida
NPs	Nanoparticulas
PMVEMA	Poli [metil vinil éter-alt- (anhídrido maléico)]
TMZ (Temozolamida)	3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidazo[5,1-d]- <i>as</i> -tetrazina-8-carboxamida
Tampón	Tampón 50 mM NaCl 100 mM
Trp	Triptófano

Introducción

1. Glioblastoma multiforme.

El glioblastoma multiforme es el tipo de tumor cerebral maligno más invasivo y común que deja una esperanza de vida de menos de 12 meses, siendo un 60-70% de todos los gliomas. Se trata con radioterapia y quimioterapia donde se usa un agente antineoplásico como la temozolamida, incrementando unos meses la supervivencia del paciente teniendo una mejor calidad de vida. Actualmente el tratamiento de tumores cerebrales sigue siendo un desafío en el campo de la neurooncología [1,2].

2. Temozolamida.

La 3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidazo[5,1-d]-as-tetrazina-8-carboxamida, con fórmula química $C_6H_6N_6O_2$ y peso molecular de 194.1 g/mol, también conocida como temozolamida (TMZ) fue sintetizada en el 1980 como parte de una serie de nuevas imidazotetrazinonas. Se trata de un profármaco alquilante citotóxico usado para el tratamiento de glioblastoma multiforme (figura 1) [3-5].

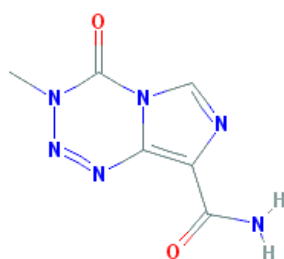


Figura 1. Estructura química de la temozolamida (TMZ).

La actividad quimioterapéutica viene dada por la conversión de la temozolamida que comienza por la hidrólisis en medio básico en la posición altamente electropositiva del C4 de la TMZ, que abre el anillo, libera un CO_2 y genera 5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC). Este último se degrada rápidamente a 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) y a un catión metildiazonio (MC) capaz de transferir el grupo metilo a las posiciones O6 y N7 de la guanidina. Este ADN aberrante no será capaz de ser corregido por la maquinaria celular y finalmente dará lugar a la muerte celular por apoptosis (figuras 2 y 3) [6-8].

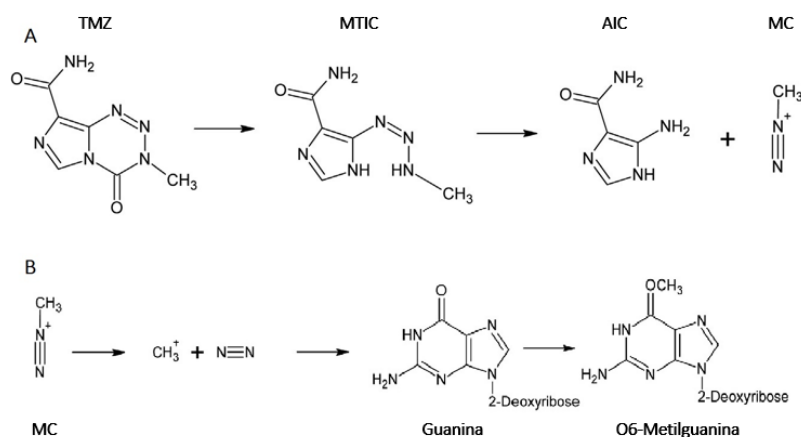


Figura 2. (A) Degradación dependiente de pH de la TMZ a sus productos MTIC, AIC e ion metildiazonio. (B) Metilación de la base guanina generando O6-Metilguanina por el catión metildiazonio [9].

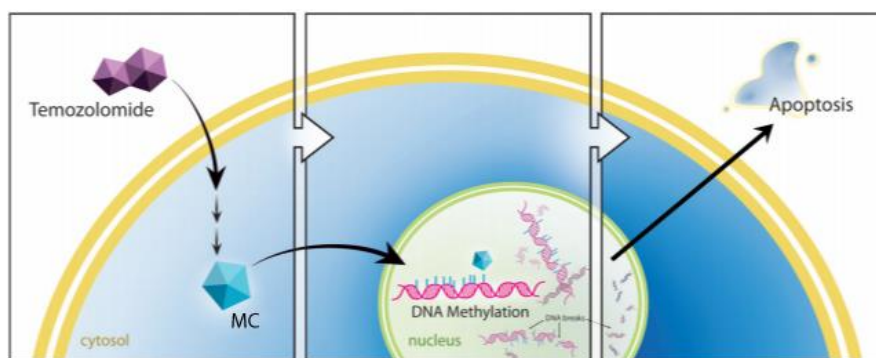


Figura 3. Ilustración de la alquilación del ADN por un grupo metildiazonio generando degradación del ADN y posterior apoptosis celular [10].

En este trabajo, para la caracterización y estudio de la TMZ, esta será detectada mediante espectroscopía-UV donde se observa un pico principal alrededor de 328 nm y un segundo pico en 255 nm generados por los heterociclos. Al ser degradada la TMZ a sus productos MTIC y AIC, los cuales poseen un solo anillo, se observará un pico hacia 266 nm y la desaparición del pico de 328 nm (figura 9).

Resistencia a la temozolamida. Un obstáculo para el éxito de los tratamientos de quimioterapia es la resistencia a fármacos que presentan las células. En este tipo de tumores existen diversos mecanismos de resistencia a los agentes anticancerígenos, entre ellos las proteínas ABC y las enzimas MGMT:

El primer mecanismo de resistencia nombrado consiste en la elevada actividad de eflujo de medicamentos producida principalmente por las proteínas ABC de la familia de casete de unión

al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, ATP binding cassette). Se trata de proteínas transmembrana dependientes de ATP expresadas en las membranas plasmáticas y en las membranas de vesículas celulares que tienen como función expulsar del interior de la célula toxinas y otras sustancias extrañas, como fármacos [11]. Es por lo que las líneas celulares que presentan una mayor actividad de estas proteínas ABC, poseen resistencia frente a fármacos anticancerígenos.

Otro mecanismo de resistencia viene dado por la enzima MGMT (metilguanina metil transferasa), una proteína pequeña de 22 kDa que está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma y se encarga de reparar los aductos O6-metilguanina del ADN lesionado por carcinógenos. De esta manera, el grupo metilo de la posición O6 de la guanina se transfiere al residuo de cisteína del sitio activo (Cys 145) de la MGMT, reparando así el ADN e inactivando la MGMT. Así, se demostró que las células deficientes en esta enzima reparadora del ADN dañado son más susceptibles al daño causado por los agentes alquilantes como la TMZ [12-15].

Debido a esta resistencia a los fármacos anticancerígenos de ciertas líneas tumorales, se hace necesario el uso de nuevas técnicas capaces de derribar estas barreras y ayudar a esclarecer en más detalle los mecanismos causantes de la resistencia. Una de las soluciones más prometedoras está enfocada a la nanomedicina.

3. Nanomedicina.

La nanomedicina es un campo emergente que integra la nanotecnología, la ingeniería biomolecular, las ciencias de la vida y la medicina. Se centra en el suministro de fármacos y la mejora de la eficacia del tratamiento, al tiempo que reduce los efectos secundarios perjudiciales para los tejidos normales. Está revolucionando y produciendo importantes avances en los diagnósticos médicos y el tratamiento de enfermedades [16-17].

La TMZ es un fármaco que afecta tanto a células sanas como a células cancerígenas generando así una toxicidad sistémica; se hace por tanto evidente el uso de nanoformulaciones biodegradables y biocompatibles capaces de transportar y liberar los fármacos de forma controlada.

En este trabajo se exploran dos posibles vehículos de administración del fármaco; el uso de una proteína transportadora del plasma sanguíneo, la seroalbúmina humana (HSA) y el uso de nanopartículas preparadas con el polímero PMVEMA (NPs de PMVEMA), para mejorar la eficacia de la administración y reducir los efectos secundarios.

Seroalbúmina humana. La seroalbúmina humana (HSA) pertenece a la familia de proteínas transportadoras globulares y solubles en agua sintetizadas en el hígado, siendo las más abundantes en el plasma sanguíneo. Son estables dentro del rango de pH de 4-9. La albúmina es un polipéptido único de 585 aminoácidos con peso molecular de 65-70 kDa. La estructura secundaria de la albúmina consiste en un 67% de hélice α y posee 17 puentes disulfuro junto con 6 vueltas. La estructura tridimensional es una especie de elipsoide alfa-helicoidal con tres dominios homólogos I, II, III que están reticulados por puentes disulfuro [18-20].

Tiene tres sitios de unión principales, uno localizado en el subdominio IIA capaz de unir compuestos voluminosos cargados negativamente, otro localizado en el subdominio IIIA que une compuestos más pequeños con cargas negativas y el tercer sitio se trata de un bolsillo localizado en el subdominio IB. En los subdominios IIA y IIIA están favorecidas las moléculas pequeñas aniónicas e hidrofóbicas, mientras que en el bolsillo del subdominio IB está más favorecida la unión de compuestos heterocíclicos complejos y ligandos endógenos [21,22] (figura 4).

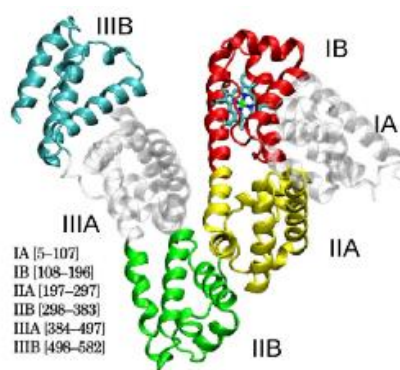


Figura 4. Estructura de la HSA.

En este trabajo se podrá estudiar la posible unión de la TMZ a la HSA, mediante espectroscopía de fluorescencia gracias a que la proteína posee un residuo de triptófano (Trp-214) en el subdominio IIA, y 18 residuos de tirosina a lo largo de la cadena polipeptídica que tras la excitación a 280 nm son responsables de su fluorescencia. Sin embargo, la mayor contribución es debido al Trp-214 por transferencia de energía de resonancia (FRET) de tirosina a triptófano [22-23].

Nanopartícula polimérica. En las últimas décadas, las NPs poliméricas se han utilizado ampliamente para diversas aplicaciones biomédicas, como la encapsulación de fármacos que está siendo un gran desafío en la nanomedicina [9].

En el presente trabajo se seleccionó el poli [metil vinil éter *-alt-* (anhídrido maleico)] (PMVEMA) (figura 5), un copolímero alterado del derivado del metil-éter-vinilo y del anhídrido maleico,

usado para sintetizar las nanopartículas, que se venden comercialmente bajo la marca genérica Gantrez[®]. Estas nanopartículas son consideradas como transportadores coloidales de dimensiones en la escala nanométrica (10-1000 nm) con propiedades fisicoquímicas únicas gracias a la mayor relación superficie-volumen, su gran estabilidad, baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Es por lo que el PMVEMA es un excelente candidato para el diseño de nanopartículas poliméricas terapéuticas [24].

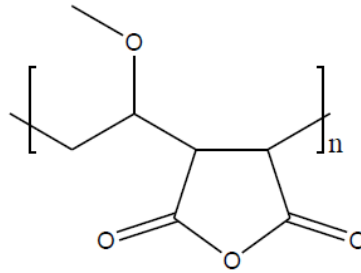


Figura 5. Estructura química del poli [metil vinil éter-alt- (anhídrido maléico)] (PMVEMA).

Además, se ha demostrado que las nanopartículas basadas en polímeros tienen un alto grado de personalización, lo que las hace candidatas adecuadas para su uso en el tratamiento del cáncer, ya que poseen muchas características ajustables, como su tamaño, morfología, funcionalidad superficial, potencial zeta y carga de fármacos [9, 25].

Antecedentes y objetivos

Antecedentes

1. Seroalbúmina humana como portador de fármacos.

En los últimos años, el uso de la seroalbúmina para aplicaciones médicas ha ido aumentando. Desde el punto de vista de la administración de fármacos, la seroalbúmina puede ser un transportador ideal debido a la combinación de sus diversas propiedades, como la baja inmunogenicidad y toxicidad, buena disponibilidad con absorción preferencial en los tejidos tumorales, junto con una buena biocompatibilidad y biodegradabilidad [26-28].

A mediados del siglo XX es cuando aparecieron los primeros informes en literatura que demuestran que los tumores son capaces de atrapar las proteínas del plasma, permitiendo así una mayor disponibilidad del fármaco en las células tumorales [28]. El primer conjugado que fue evaluado en estudios clínicos de fase I y II fue el anticancerígeno metotrexato. [29].

Hoy en día, la albúmina está jugando un papel muy importante como transportador de fármacos, usando principalmente tres tecnologías: el acoplamiento de medicamentos de bajo peso molecular a la albúmina tanto exógena como endógena, la conjugación con proteínas bioactivas y la encapsulación de fármacos en nanopartículas de albúmina [28].

2. Nanopartículas de PMVEMA como transportador de fármacos.

Estudios recientes demuestran que las NPs de PMVEMA poseen diversas aplicaciones farmacéuticas y médicas, como pueden ser agente espesante, adhesivo para dentaduras postizas o parches transdérmicos para la cicatrización de heridas. Además, numerosos estudios consideran a estas NPs prometedoras para la administración de fármacos, gracias a sus propiedades singulares, tales como la biodegradabilidad, la alta compatibilidad, baja toxicidad, una superficie modificable para su funcionalización, su fácil producción y su capacidad de liberar drogas de manera sostenida. [30]

Asimismo, esta nanoencapsulación puede aumentar significativamente la protección de los fármacos frente a la degradación ambiental, contribuir en la entrega dirigida a la diana o a la liberación controlada. Estas contribuciones son de gran interés porque podrían mejorar la eficiencia de los compuestos terapéuticos y de diagnóstico, por ejemplo, al aumentar su semivida circulante y su especificidad, y así reducir la dosis necesaria y los efectos secundarios [31,32].

En los últimos años se ha demostrado la capacidad de las NPs de PMVEMA de vehiculización de fármacos anticancerígenos, como es el caso de la administración oral de paclitaxel [30].

Resulta de gran interés el uso de estas nanopartículas poliméricas que superen las limitaciones de los métodos tradicionales para la administración, transporte y liberación controlada de fármacos.

3. Nanopartículas multifuncionales.

Los avances recientes en nanomedicina han permitido integrar varias funcionalidades en una misma nanopartícula, lo que se conoce como nanopartículas multifuncionales. Incluyen, por ejemplo, la incorporación de marcadores fluorescentes que han demostrado la gran utilidad en bioimagen o para la investigación y detección de cambios a nivel celular, detección de enfermedades, contribución en la puesta a punto de terapias para el cáncer o para el seguimiento en la administración, transporte y liberación de fármacos. [33,34].

Entre los marcadores fluorescentes encontramos pequeños fluoróforos, proteínas fluorescentes o puntos cuánticos semiconductores (quantum dots), pero poseen ciertos inconvenientes como la inestabilidad frente a la irradiación (*photobleaching*) en los pequeños fluoróforos y las proteínas fluorescentes. Por otro lado, los quantum dots están dotados de una buena estabilidad, pero poseen elementos tóxicos como el Cd o el Se [35].

Muchas de estas limitaciones pueden resolverse con los polielectrolitos conjugados (CPEs), que han surgido como materiales funcionales versátiles [35]. Además, han despertado el interés de su desarrollo para su uso en técnicas de bioimagen, detección de biomoléculas y diseño de biosensores por su baja citotoxicidad y elevada fotoestabilidad.

En este trabajo se han funcionalizado las NPs de PMVEMA con el polielectrolito conjugado poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexilo]-fluoreno-fenilo} bromuro, también llamado HTMA-PFP (figura 6), sintetizado y caracterizado por miembros del laboratorio. Se trata de un polímero π -conjugado, que posee una columna vertebral rígida con alternancia de enlaces simples y dobles con cadenas laterales solubles en agua que contienen grupos catiónicos o aniónicos. Tienen la capacidad de autoensamblarse mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con otras especies de carga opuesta, siendo reversibles. Además, gracias a la deslocalización de electrones debido a un solapamiento de orbitales a lo largo de un gran número de unidades monoméricas, están dotados de importantes propiedades ópticas. Es por ello, que las interacciones del HTMA-

PFP con otras macromoléculas pueden detectarse mediante estudios de variación de absorción y fluorescencia [23-24].

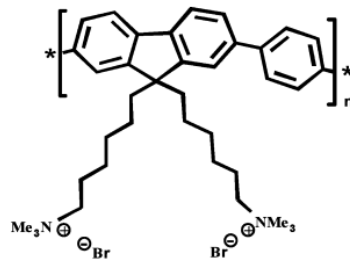


Figura 6. Estructura química del HTMA-PFP [24].

Objetivos

El objetivo de este trabajo es el diseño de nanoformulaciones multifuncionales que permitan el transporte y seguimiento del fármaco TMZ sin que pierda su actividad. Para ello se han perseguido los siguientes objetivos específicos.

- Caracterización del fármaco TMZ en diferentes disolventes y estudio de la estabilidad bajo diferentes condiciones.
- Estudio de la utilización de la HSA como vehículo de transporte de la TMZ.
- Estudio de la utilización del polímero PMVEMA como vehículo de transporte de la TMZ.
- Análisis de citotoxicidad de las nanoformulaciones desarrolladas.
- Incorporación de polielectrolitos fluorescentes en las nanoformulaciones para ampliar su funcionalidad.

Materiales y métodos

Materiales

La temozolomida, $C_6H_6N_6O_2$, (TMZ) ($M_w = 194.15$ g/mol) se adquiere de TCI. Se prepara una disolución stock de TMZ en agua con una concentración final de 4 mM de TMZ y se almacena a 4°C.

El tampón fosfato (50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.3) se prepara mezclando fosfato de sodio monobásico y dibásico con agua dos veces destilada y desionizada utilizando el equipamiento Milli-Q (Millipore, Madrid). Para que adquiera fuerza iónica, se añade NaCl.

La seroalbúmina humana, HSA, ($M_w = 66.437$ Da) en polvo se adquiere de Sigma-Aldrich. Se prepara una disolución stock de HSA con una concentración final de 6.2 μ M de HSA en agua.

El polielectrolito conjugado HTMA-PFP ($M_n = 4170$ g/mol; $M_w = 8340$ g/mol) se obtiene y caracteriza por miembros del laboratorio. Se sintetiza un lote del polímero neutro de bajo peso molecular poli[9,9-bis(6'-bromohexil)-fluoreno-fenilo] por la reacción de acoplamiento de Suzuki, utilizando Pd (II) como catalizador, y se trata con trimetilamina en fase gaseosa para obtener el correspondiente polielectrolito catiónico. Las soluciones stock de HTMA-PFP ($3,65 \cdot 10^{-4}$ M) son preparadas en DMSO y almacenadas a -20°C antes de su uso.

El polímero para la formación de las nanopartículas es poli [metil vinil éter -alt-(anhídrido maleico)], PMVEMA, ($M_w \sim 216000$; $M_n \sim 80000$) adquirido en Sigma-Aldrich.

Las líneas celulares tumorales pertenecen a pacientes del Hospital General Universitario de Elche (HGUE) en colaboración con el equipo de investigación del Dr. Miguel Saceda.

Métodos

Nanopartículas de PMVEMA sin TMZ y con TMZ. Primero se pesa 25 mg de PMVEMA y 2 mg de TMZ (en su caso) y se disuelve en 1.25 g de etanol de grado espectroscópico durante 25 minutos, mientras se agita. A continuación, se añade 500 μ L de agua miliQ previamente filtrada, y se agita de nuevo durante 10 minutos. Seguidamente, se añade 2.25 mL de agua milliQ gota a gota previamente filtrada, agitando 10 minutos. Finalmente, la muestra se pasa por un rotavapor hasta eliminar los 1.25 gramos de etanol añadido, y la suspensión resultante se enrasa hasta 2.5 mL.

Centrifugación de las NPs de PMVEMA-TMZ. Las NPs de PMVEMA-TMZ se llevan a centrifugación en un rotor JA-20 a 27000 G, 20 min y 4°C.

Nanopartículas de PMVEMA con polímero azul HTMA-PFP. Primero se pesa 25 mg de PMVEMA y se disuelve en 1.25 g de etanol de grado espectroscópico durante 10 minutos, mientras se agita. A continuación, se añade 10.3 µL de HTMA-PFP, y se agita de nuevo durante 20 minutos. Seguidamente, se añade 250 µL de agua miliQ previamente filtrada mientras se agita durante otros 10 minutos. Luego, se añade 2.25 mL de agua milliQ gota a gota previamente filtrada, agitando 10 minutos. Finalmente, la muestra se pasa por un rotavapor hasta eliminar los 1.25 gramos de etanol añadido, y la suspensión resultante se enrasa hasta 2.5 mL.

Dicroísmo circular. Para las mediciones de dicroísmo se usa el dicrógrafo J-815 (JASCO, Easton MD) equipado con un termostato Peltier (PTC-423S/15). Las muestras se colocan en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 mm recogiendo el espectro de 200 a 250 nm, usando como blanco agua. La rampa de temperatura se realiza de 25°C a 90°C.

Espectros de absorción y fluorescencia. Para las mediciones de absorción se usa un modelo de espectrofotómetro UV-2700 (Shimadzu, Tokio, Japón). Mientras que, para los espectros de fluorescencia, se emplea un espectrofluorímetro QuantaMaster (PTI, Birmingham, Nueva Jersey, EE.UU). Las cubetas utilizadas para los experimentos de absorción y fluorescencia en disolución son de cuarzo de 10x10 mm. En todos los experimentos de fluorescencia la longitud de onda de excitación para el HTMA-PFP se fija en 380 nm y se recoge el espectro de emisión entre 390 y 500 nm, usando unas rendijas 0.4/0.7, mientras que, en los experimentos de fluorescencia de la HSA, la longitud de onda de excitación se fija en 280 nm y se recoge el espectro de emisión entre 290 y 500 nm con unas rendijas 1/1. Para las mediciones de las muestras de TMZ o NPs de TMZ se realizaba una dilución 1:20.

Corrección de filtro interno. Dado que la TMZ absorbe a la longitud de onda donde se excita la HSA y que, además, pueden ocurrir procesos de reabsorción al absorber la TMZ donde emite la HSA, se hizo necesario corregir los espectros de emisión de la HSA con la siguiente fórmula denominada corrección de filtro interno.

$$I_{\text{corr}} = I_{\text{obs}} \times 10^{(A_{\lambda_{\text{ex}}} + A_{\lambda_{\text{em}}})/2} \quad \text{Ec. 1.}$$

Donde I_{corr} es el valor de la fluorescencia después de la corrección, I_{obs} es el valor medido de la fluorescencia, $A_{\lambda_{\text{ex}}}$ es el valor de absorción en la longitud de onda de excitación de la TMZ (280 nm) y $A_{\lambda_{\text{em}}}$ es el valor de absorción en la longitud de onda de emisión de la HSA [33].

Medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS). El tamaño de las partículas se estudia mediante técnicas de DLS, utilizando un Brookhaven 90 Plus Nanoparticle Size Analyzer equipado con un láser de diodo rojo 35 mW ($\lambda = 640$ nm) como fuente de luz, con un ángulo de dispersión de 90°

para las medidas de tamaño. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente y en cubetas desechables.

Ensayo celular (Equipo colaborador del Dr. Miguel Saceda). Los ensayos celulares de citotoxicidad se llevan a cabo por el equipo del Dr. Miguel Saceda a quien se le suministran las diferentes preparaciones. Para estos ensayos se depositan 200 μL en 2000 μL de células en un pocillo con suero. Se incuba a 37°C durante 24 horas y se lleva al citómetro de flujo.

Resultados y discusión

1. Caracterización del fármaco temozolamida (TMZ).

Los primeros ensayos realizados se destinan a caracterizar la molécula de TMZ para estudiar su comportamiento y comprobar su estabilidad en diferentes disolventes, condiciones de temperatura y tiempo.

1.1- TMZ en agua y en TP 50 mM NaCl 100 mM.

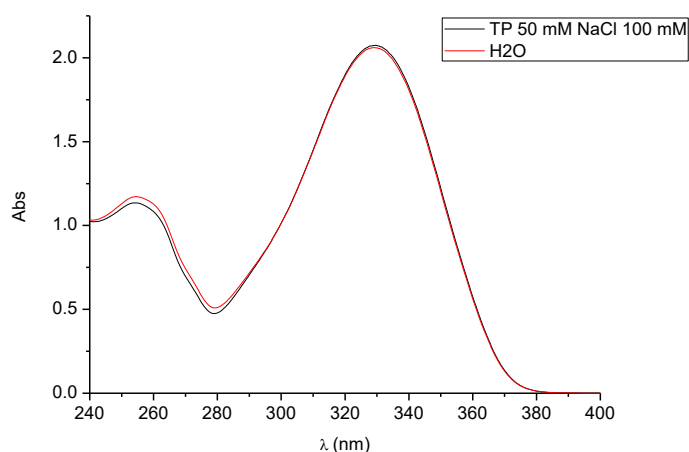


Figura 7. Espectro de absorción de la TMZ en agua (rojo) y en TP 50 mM NaCl 100 mM (negro).

En la figura 7 se muestran los espectros muy similares de absorción de la TMZ disuelto en agua y en tampón con una concentración de 0.2 mM de TMZ en ambos.

Los espectros obtenidos muestran las bandas de absorción correspondiente al TMZ, con su máximo de absorción en 328 nm, y un segundo máximo de absorción a 255 nm.

1.2- Coeficiente de extinción molar de la TMZ en agua y en tampón.

El coeficiente de extinción molar es un parámetro que define como absorbe una especie química la radiación a una longitud de onda determinada por concentración molar y viene definida por la ecuación empírica de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \quad \text{Ec. 2}$$

Donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar de la especie química, C es la concentración y l es el paso óptico en cm.

Los disolventes que nos interesan son agua y TP 50 mM NaCl 100 mM, es por lo que estudiaremos el comportamiento de la TMZ en ellos. Además, las soluciones stock se preparan en agua como se explica en el apartado de Materiales y Métodos. Para obtener el coeficiente de extinción molar en cada disolvente se representa la absorbancia máxima frente a concentraciones crecientes de TMZ de la dilución y, mediante la ecuación de Lambert-Beer, obtenemos el coeficiente de extinción molar que corresponde con la pendiente de la recta resultante.

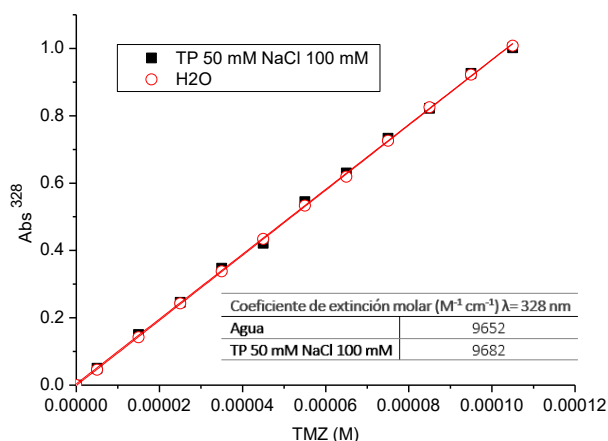


Figura 8. Curva de calibrado de la TMZ en agua y TP 50 mM NaCl 100 mM. Variación de la absorbancia a concentraciones crecientes de TMZ.

En la figura 8 se muestra el valor de la absorbancia obtenido a 328 nm tras realizar los espectros a cada concentración de TMZ, tanto para la disolución en agua como para la disolución en tampón. El carácter lineal de la curva de calibrado nos indica que la señal de absorbancia es proporcional a la concentración de TMZ en la disolución y que la TMZ se encuentra bien disuelta en ambos disolventes en el intervalo de concentraciones estudiado.

En el inserto de la figura 8 se recogen los resultados de los coeficientes de extinción molar, siendo muy similares entre ellos. Para el agua el coeficiente de extinción molar determinado a $\lambda=328 nm$ es de $9652 M^{-1} cm^{-1}$, mientras que para el tampón 50 mM NaCl 100 mM tiene un valor de $9682 M^{-1} cm^{-1}$.

1.3- Estabilidad de la TMZ bajo distintas condiciones.

1.3.1- Degradación de la TMZ.

En este ensayo se pretende conocer la degradación de la molécula de TMZ. Como se explica en la Introducción, la TMZ tiene un máximo de absorbancia alrededor de 328 nm, que al ser hidrolizado a los productos MTIC y AIC desaparece, apareciendo un máximo de absorbancia a 266 nm, como se observa en la figura 9. La figura muestra los espectros de una disolución de TMZ en agua recogidos antes de su degradación, cuando se ha degradado parcialmente y tras la degradación total. Los resultados reflejan un punto donde se cortan los espectros, llamado punto isobéptico que determina misma longitud de onda la absorbancia se mantiene constante para las especies distintas, compartiendo, además el mismo coeficiente de extinción molar.

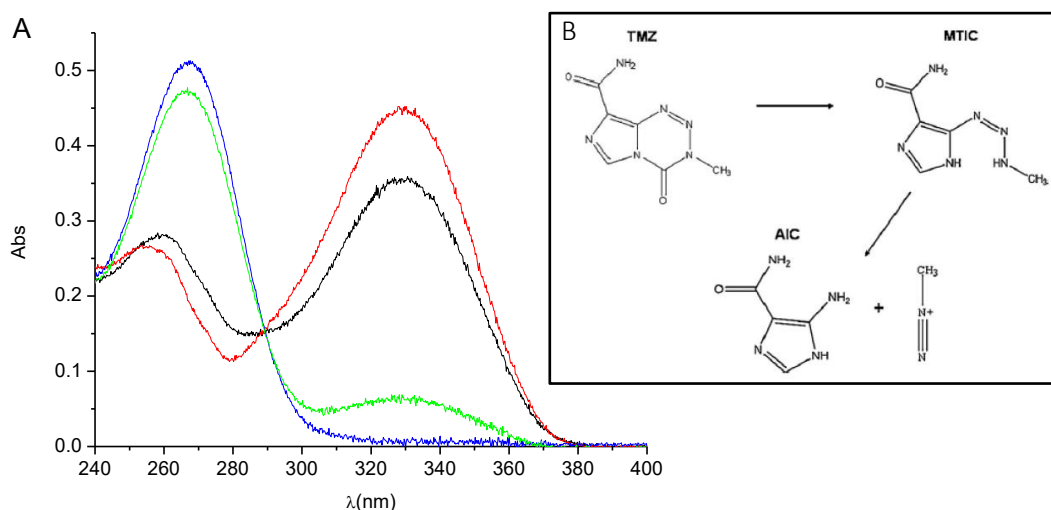


Figura 9. (A) Degradación de la TMZ en agua: situación inicial (rojo), degradación parcial (negro y verde) y producto final MTIC/AIC (azul). (B) Esquema de la degradación de la TMZ en sus productos MTIC y AIC [8].

Conociendo el comportamiento de los espectros de absorbancia de la TMZ y los espectros tras su degradación, vamos a hacer un estudio de la estabilidad de la TMZ en diferentes condiciones en el tiempo, donde se analiza la influencia del pH y de la temperatura.

1.3.2- Efecto del pH.

En el siguiente ensayo, se comprueba la estabilidad en el tiempo de la TMZ en agua (pH 5.5) y a distintos pH (pH 4.1, 7.3 y 9.3). Para ello, se recogieron los espectros a lo largo de una semana, representando los máximos de absorbancia a 328 nm en función del tiempo.

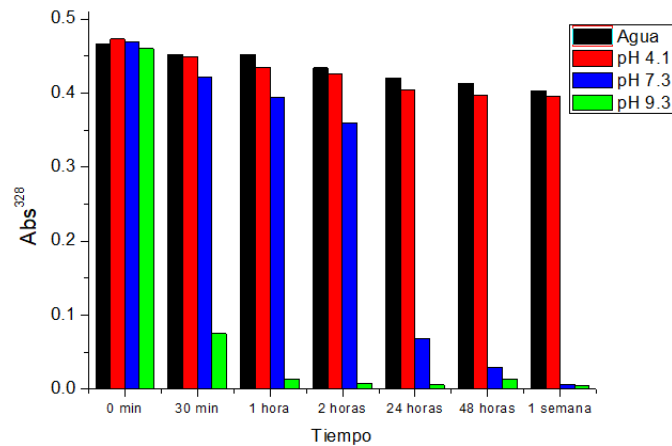


Figura 10. Degradación de la TMZ en MTIC y AIC en diferentes disoluciones (Agua, pH 4.1, pH 7.3 y pH 9.3).

En la figura 10, las gráficas exponen la evidente degradación de la TMZ a sus productos MTIC y AIC en disoluciones neutras y básicas (pH 7.3 y 9.3) a lo largo de 7 días, mientras que en disoluciones ácidas (agua y pH 4.1) la degradación es muy leve, manteniéndose prácticamente toda la TMZ estable. Como los resultados entre la estabilidad en agua y pH 4.1 son muy similares, se selecciona la TMZ en disolución en agua como mejor opción para el siguiente experimento.

1.3.3- Efecto de la temperatura.

En la siguiente figura se muestra el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la TMZ en agua a lo largo de dos días, representando los máximos de absorbancia a 328 nm en función del tiempo.

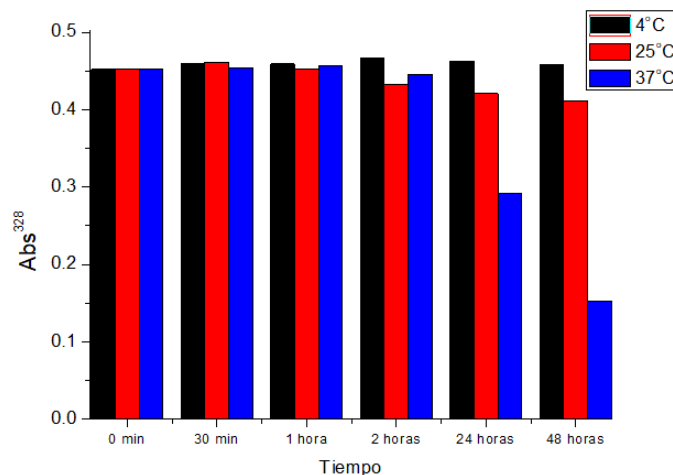


Figura 11. Degradación de la TMZ en MTIC y AIC en agua a diferentes temperaturas (4°C, 25°C y 37°C).

Los resultados obtenidos en la figura 11 revelan que en disolución a 4°C la TMZ se mantiene estable, a 25°C se aprecia una leve hidrólisis de la TMZ hacia MTIC y AIC, y a 37°C a las 48 horas prácticamente no hay señal de TMZ, estando todo degradado a sus productos MTIC y AIC.

Es por ello, que se selecciona como condiciones de almacenamiento la TMZ en agua a 4°C, que permanece hasta una semana sin degradarse.

2. Estudio de diferentes sistemas de vehiculización de la TMZ.

Como se comenta en la Introducción, a continuación, se van a explorar distintas alternativas para el transporte de la TMZ.

2.1- Estudio de la proteína HSA con TMZ.

Para conocer la posible interacción de la TMZ con la HSA se utilizan diferentes técnicas. Por un lado, se analiza la estructura secundaria de la proteína en presencia de TMZ mediante dicrósmo circular y, por otro lado, se explora la fluorescencia intrínseca de la HSA tras la adición de la TMZ.

2.1-1. Efecto de la TMZ sobre la estructura de la HSA.

Para estudiar la estructura secundaria de la HSA en presencia de concentraciones crecientes de TMZ se realizó dicrósmo circular en la región de ultravioleta lejano (200 nm-250 nm) y una rampa de temperatura para HSA y para HSA con TMZ (figura 12).

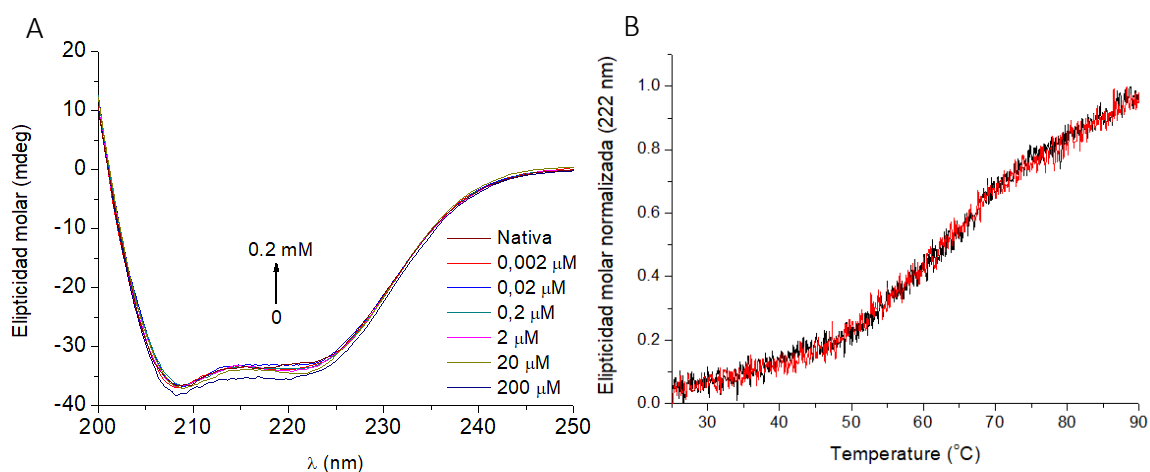


Figura 12. (A) Espectros de dicrósmo circular de HSA 3 μM en presencia de concentraciones crecientes de TMZ (0-0.2 mM). (B) Rampa de temperatura a λ=222 nm de la proteína sola 3 μM (negro) y en presencia de TMZ 20 μM (rojo).

La representación de la elipticidad molar frente a la longitud de onda nos da idea de la estructura secundaria de la HSA, siendo esta característica de la alfa hélice, donde los espectros muestran un doble mínimo a 222 nm y 208 nm. Tras añadir concentraciones crecientes de TMZ no se observa cambio en la estructura secundaria, puesto que se mantiene el espectro similar. Además, los resultados obtenidos tras realizar la rampa de temperatura de 25 °C a 90 °C de HSA y HSA con TMZ indican que la proteína no se ve afectada en presencia de TMZ. Este efecto puede ser debido a que la interacción de la TMZ no modifica la estructura de la proteína, o bien, porque hay poca afinidad entre la TMZ y la HSA. Es por ello, que el siguiente estudio se dedica a explorar la afinidad entre ambos, utilizando como herramienta la fluorescencia.

2.1-2. Efecto de la TMZ sobre la fluorescencia intrínseca de la HSA.

En la siguiente figura se muestra el espectro de emisión de fluorescencia normalizada de la HSA (procedente fundamentalmente de su triptófano) y el espectro de absorción normalizado de la TMZ. El hecho de que ambos espectros solapen sugiere que la TMZ puede desactivar la fluorescencia de la HSA, y así utilizar esta desactivación para visualizar la posible interacción.

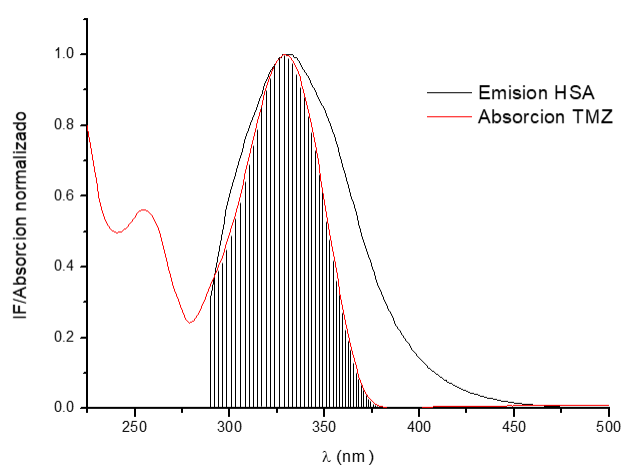


Figura 13. Solapamiento del espectro de emisión de fluorescencia normalizado de la HSA (negro) y espectro de absorción de la TMZ (rojo).

En el siguiente experimento se recogen los espectros de emisión de la HSA 6.2 μM a distintas concentraciones de TMZ, desde 0 μM hasta 50 μM . Los espectros se corrigen debido al efecto de filtro interno, como se describe en Materiales y Métodos.

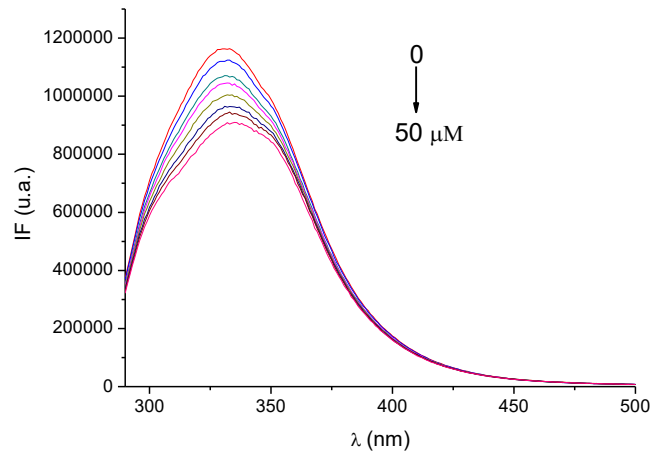


Figura 14. Espectro de emisión de HSA a distintas concentraciones de TMZ (0-50 μM), corregido según la ecuación 1.

Los espectros de la figura 14 muestran que la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la concentración de TMZ, aunque la bajada no es muy notable.

Este mismo experimento se realiza a distintas temperaturas y los resultados se representan en un gráfico de Stern-Volmer (figura 15). Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de Stern-Volmer:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad \text{Ec. 3}$$

Donde I_0 e I son las intensidades de fluorescencia de la HSA y de la HSA en presencia de TMZ, respectivamente, K_{SV} es la constante bimolecular de desactivación de Stern-Volmer, la pendiente de la gráfica que está relacionada con la accesibilidad del fluoróforo al agente desactivante (mayor accesibilidad, mayor K_{SV}), $[Q]$ es la concentración de TMZ, K_q es la constante de desactivación y τ_0 la vida media intrínseca de la HSA ($6.4 \cdot 10^{-9}$ s) [36,37]

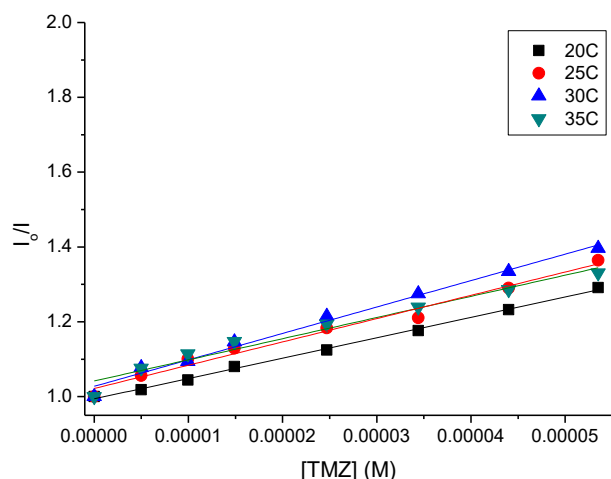


Figura 15. Gráfica de Stern-Volmer representando la desactivación de la fluorescencia en agua a distintas temperaturas (20°C, 25°C, 30°C y 35°C). $\lambda_{em} = 280 \text{ nm}$ y $\lambda_{ex} = 290 - 500 \text{ nm}$.

En el gráfico de Stern-Volmer (figura 15) se muestra como a una mayor concentración de TMZ aumenta la relación I_0/I , lo que se corresponde con una mayor desactivación de la señal de fluorescencia de la HSA. El hecho de que las pendientes no sean muy diferentes a las distintas temperaturas indica que la temperatura sólo afecta ligeramente a dicha desactivación.

Los mecanismos de desactivación de fluorescencia más usuales son el estático y el dinámico. Para establecer el mecanismo de desactivación predominante, se determinaron ciertos parámetros (K_{sv} y K_q) con la fórmula de Stern-Volmer (ecuación 3) que se recogen en la tabla 1 [38].

Tabla 1. Constantes de desactivación de Stern-Volmer y parámetros de afinidad de la HSA-TMZ a diferentes temperaturas.

T (K)	$K_{sv} (\cdot 10^3 \text{ M}^{-1})$	$K_q (\cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$K_a (\cdot 10^2 \text{ M}^{-1})$	n
293	5.86 ± 0.17	9.16 ± 0.21	13.03 ± 0.01	0.89
298	6.54 ± 0.30	10.21 ± 0.46	6.13 ± 0.01	0.76
303	7.22 ± 0.34	11.28 ± 0.54	3.73 ± 0.01	0.70
308	7.36 ± 0.50	11.50 ± 0.78	2.19 ± 0.01	0.63

El hecho de que el valor de K_q sea tan elevado (mayor de $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), determina que la desactivación no puede ser dinámica, por lo que, probablemente será estática, formándose un complejo TMZ-HSA, en el estado fundamental. El proceso causante de la desactivación podría ser

el fenómeno de transferencia de energía por resonancia (FRET) dado el extenso solapamiento entre la absorción de la TMZ y de la emisión de la HSA (figura 13).

Para comprobar que la desactivación de fluorescencia se deba en parte al FRET, se determinó el radio de Förster, R_o , que refleja la distancia entre el donador (Trp-214 de la HSA) y el aceptor (TMZ) a la que la eficiencia del FRET es del 50 %, a partir de la ecuación 4.

$$R_o = 0.211 \left[\frac{\kappa^2 \cdot \Phi_{HSA} J(\lambda)}{n^4} \right]^{\frac{1}{6}} \quad \text{Ec. 4.}$$

Donde $J(\lambda)$ se evaluó mediante la integral de la ecuación 5 entre el espectro de emisión del donante normalizado y el espectro de absorción del aceptor definido por:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} \epsilon_{TMZ}(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot IF_{HSA}(\lambda) d\lambda \quad \text{Ec. 5.}$$

En las ecuaciones 4 y 5, κ^2 es un factor de orientación entre el donador y el aceptor (2/3), n es el índice de refracción (1.4), ϕ es el rendimiento cuántico de fluorescencia del donante en ausencia del aceptor (0.1 para la HSA), ϵ_{TMZ} es el coeficiente de extinción del aceptor en unidades de $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, λ es la longitud de onda en nm y IF_{HSA} es el espectro de emisión de fluorescencia normalizado del donante dependiente de la longitud de onda [39-41].

De modo que el valor de $J(\lambda)$ es igual a $6.7 \cdot 10^{13} M^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$, que sustituido en la ecuación 4 da un valor de R_o de 21.6 Å.

Debido a que RET solo es significativo a distancias $r < 1.5R_o$, estos experimentos indican que la distancia promedio entre HTMA-PFP y el Trp-214 de la HSA es ≤ 32.4 Å. El hecho de que el diámetro de la HSA sea de 50 Å confirma que la TMZ está unida a la HSA y relativamente cerca del trp y que la desactivación de fluorescencia se debe a la transferencia de energía [24, 37].

Para el mecanismo de desactivación estático, suponiendo que la proteína presenta sitios de unión al TMZ similares e independientes, la constante de afinidad, K_a , y el número de sitios de unión, n , pueden ser calculados a distintas temperaturas de acuerdo con la ecuación 6. Representando $\log(I_o-I/I)$ frente a $\log [TMZ]$ se determina K_a y n , lo que se muestra en la figura 16 y tabla 1.

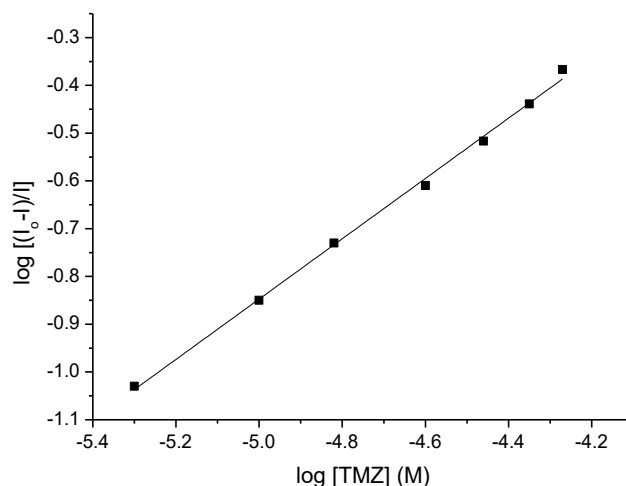


Figura 16. Gráfica doble logaritmo del complejo HSA 6.2 μM a concentraciones crecientes de TMZ de 5 μM hasta 50 μM ; $T = 308 \text{ K}$.

$$\log[(I_0 - I)/I] = \log K_a + n \log[\text{TMZ}] \quad \text{Ec. 6.}$$

El valor de K_a disminuye con la temperatura y nos da idea de la poca afinidad entre la TMZ y la HSA, al ser un valor tan bajo. Como n es aproximadamente 1, sugiere que hay un solo sitio de unión principal en la HSA para la TMZ [34,35 y 38].

2.1-3. Naturaleza de la interacción entre HSA y TMZ.

Mediante los cálculos de los parámetros termodinámicos se puede estimar el tipo de interacción predominante entre el fármaco y la proteína, pudiendo ser estas interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o fuerzas electrostáticas, entre otras.

Según la ecuación 7 y con la constante de afinidad, K_a , determinada anteriormente se obtienen los valores de energía libre de Gibbs (ΔG) que informa de la espontaneidad del proceso, recogidos en la tabla 2.

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad \text{Ec. 7.}$$

Donde R es la constante de los gases ideales ($8.314 \text{ J}/(\text{K}\cdot\text{mol})$) y T es la temperatura en kelvin.

Teniendo en cuenta la ecuación de Van't Hoff (ecuación 8), se puede determinar la entalpía, ΔH , y la entropía, ΔS , del proceso y conocer así si se trata de un proceso endotérmico o exotérmico y si aumenta o no el orden, respectivamente. Se determina representando el $\ln(K_a)$ frente al inverso de la temperatura en kelvin (figura 17) donde la pendiente corresponde con $-\Delta H/R$, y la intersección corresponde con $\Delta S/R$ (tabla 2).

$$\ln(K_a) = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Ec. 8.}$$

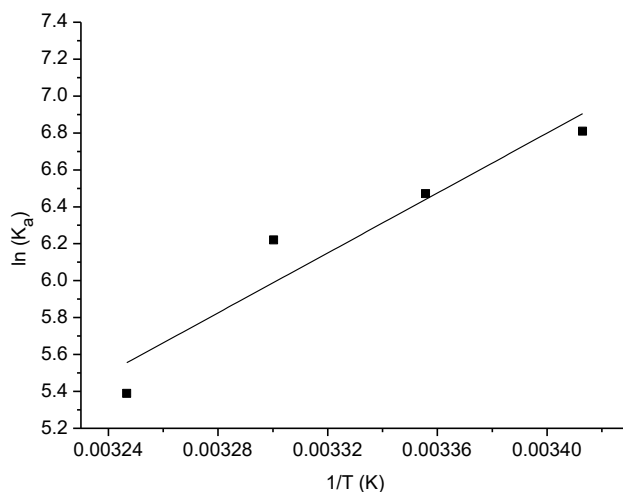


Figura 17. Gráfica Van't Hoff de HSA-TMZ.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos extraídos de la ecuación de Van't Hoff.

T (K)	$\Delta G (\cdot 10^4 \text{ J/mol})$	$\Delta S (\text{J/mol/K})$	$\Delta H (\cdot 10^4 \text{ J/mol})$
293	-17.35 ± 0.14		
298	-16.14 ± 0.05		
303	-14.94 ± 0.04	-240.7 ± 17.7	-8.8 ± 0.5
308	-13.73 ± 0.13		

En la tabla 2 se recogen los parámetros termodinámicos del complejo HSA-TMZ, donde se concluye una interacción espontánea por los valores negativos de ΔG° y un proceso exotérmico por los valores negativos de ΔH° . Además, predominan las fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno, puesto que $\Delta H^\circ < 0$ y $\Delta S^\circ < 0$ [37, 42-44].

Por tanto, no parecen existir fuerzas hidrofóbicas entre la TMZ y la HSA, por lo que el fármaco no se inserta en el bolsillo hidrofóbico de la proteína, sino que se queda interaccionando en la superficie.

2.1-4. Comportamiento de la HSA en presencia de la TMZ en tampón.

Como se comprobó que en agua la HSA y la TMZ apenas tienen afinidad, posteriormente se realizaron los mismos experimentos de desactivación de la fluorescencia de la HSA en presencia de la TMZ, pero en disolución en tampón (figura 18). Aunque los resultados mostraron que tampoco aumentaba la afinidad.

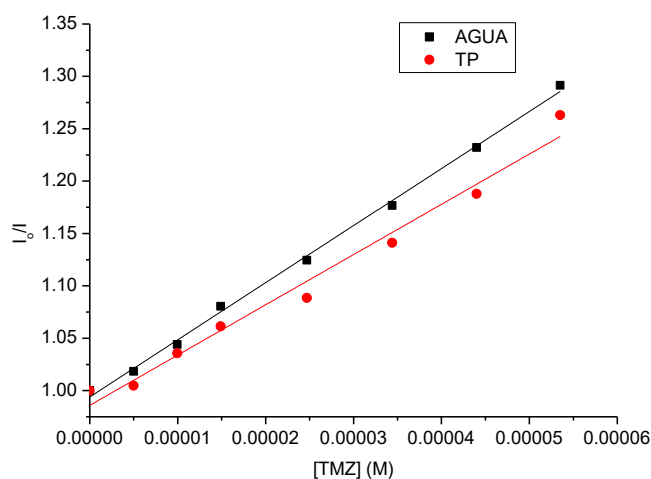


Figura 18. Gráfica de Stern-Volmer representando la desactivación de la fluorescencia de la HSA por la TMZ en agua y Tampón. $\lambda_{em}=280\text{ nm}$ y $\lambda_{ex}=290 - 500\text{ nm}$.

En conclusión, los datos obtenidos tanto en agua como en tampón confirmarían los resultados del ensayo de dicroísmo circular, donde no se mostraba respuesta de la HSA en presencia de la TMZ, y esto se debe a la baja afinidad entre el fármaco y la proteína. Se concluye en principio, que la HSA en las condiciones utilizadas no es un buen candidato para el transporte de la TMZ.

2.2- Estudio del polímero PMVEMA con TMZ.

2.2-1. Caracterización de NPs de PMVEMA.

La siguiente alternativa de vehiculización es la utilización del polímero PMVEMA. Para conocer el tamaño de las NPs de PMVEMA realizadas con el protocolo explicado en Materiales y Métodos y

si permanecen estables en el tiempo, se realizan medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) que permiten estimar el diámetro de las NPs (tabla 3).

Tabla 3. Tamaño hidrodinámico y estabilidad de las NPs de PMVEMA con el tiempo.

	Día 1	Día 2	Día 3
Diámetro			
hidrodinámico	137 ± 2	112 ± 3	121 ± 2
(nm)			

Los resultados de la tabla 3 muestran la estabilidad de las NPs de PMVEMA al observar sólo una pequeña variación de los valores de diámetro con el tiempo.

2.2-2. Estabilidad de la TMZ en NPs de PMVEMA.

Una vez comprobada la formación de las NPs se procede a encapsular en ellas la TMZ, como se describe en Materiales y Métodos.

Para estudiar la estabilidad de la TMZ en NPs de PMVEMA, primero se debe comprobar que el PMVEMA no afecta al espectro de absorción de la TMZ. Para ello, se realiza un espectro de absorbancia de TMZ 0.2 mM y otro espectro de NPs de PMVEMA con TMZ 0.2 mM (figura 19).

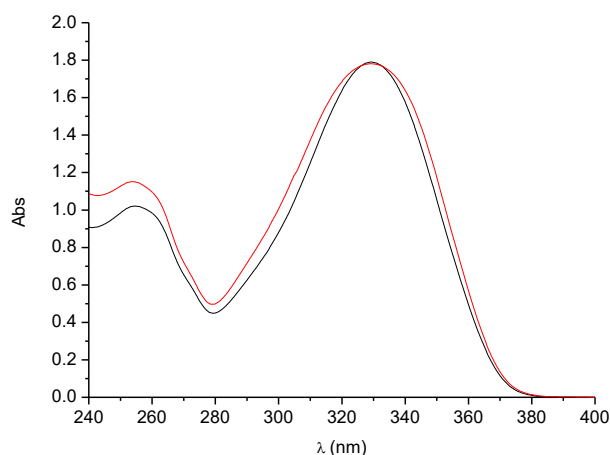


Figura 19. Espectro de absorción de la TMZ (negro) y del PMVEMA-TMZ (rojo).

En la figura 19 se confirma que ambos espectros son similares, de modo que, el PMVEMA no afecta al espectro de absorción de la TMZ. Así, su estabilidad puede ser estudiada a lo largo del tiempo por espectrofotometría.

A continuación, para comprobar la interacción entre la TMZ y el PMVEMA y su estabilidad se realizan los espectros de absorbancia de una muestra que contiene únicamente TMZ y de otra muestra con NPs de PMVEMA con TMZ, ambas en agua. Los espectros se recogen en función del tiempo a 37°C y se representa cómo evoluciona el máximo de absorbancia, con objeto de explorar si el PMVEMA estabiliza la TMZ (figura 20).

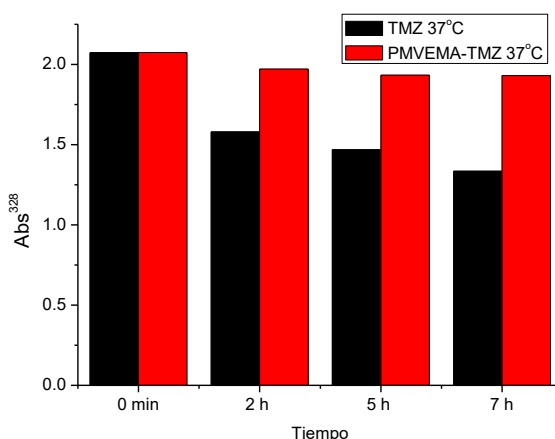


Figura 20. Estabilidad de la TMZ (negro) y de NPs de PMVEMA-TMZ (rojo) en agua a 37°C.

En la figura 20 se muestra en barras negras la absorbancia de la TMZ a 37°C recogida a 328 nm en función del tiempo. Se puede observar una disminución de la absorbancia que se corresponde con la degradación de la TMZ a sus productos MTIC y AIC. Por otro lado, las barras rojas reflejan la estabilidad de la TMZ en NPs, donde se observa que la absorbancia del fármaco se mantiene prácticamente estable con el tiempo.

Se deduce así, que el PMVEMA es capaz de mantener la TMZ estable sin ser degradado a sus productos MTIC y AIC, posiblemente gracias a que las cadenas del polímero de PMVEMA interactúan con la TMZ.

2.2-3. Estudio de la eficiencia de encapsulación.

El experimento anterior nos confirma que la TMZ interacciona con el PMVEMA, pero no informa de la naturaleza ni del grado de la unión. Con objeto de separar el posible fármaco libre del unido a las NPs de PMVEMA se realiza una centrifugación con las condiciones que se especifican en Materiales y Métodos, de modo que se compara el espectro de absorción de TMZ sólo en agua, con el sobrenadante tras la centrifugación (figura 21).

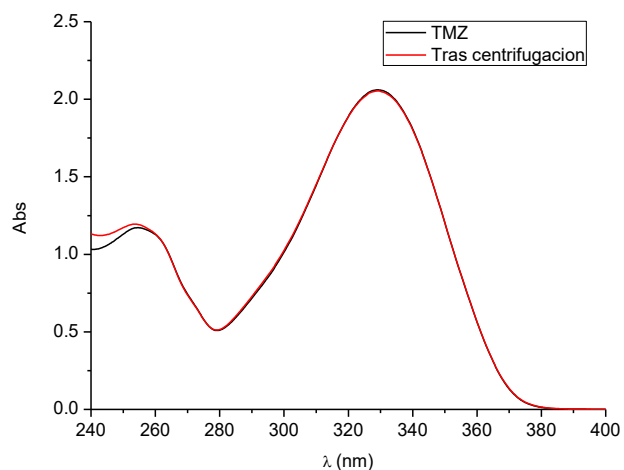
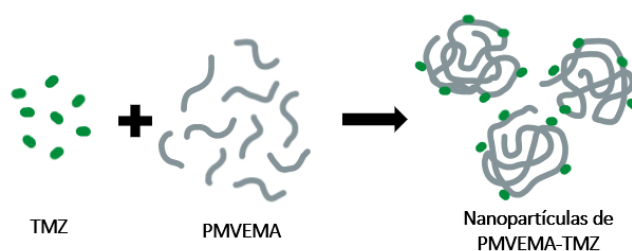


Figura 21. Espectro de la TMZ en agua (negro) y del sobrenadante tras la centrifugación de las NPs de PMVEMA-TMZ (rojo), recogidos a las mismas condiciones.

En la figura 21 se muestra como el espectro de la TMZ en agua y el espectro del sobrenadante son prácticamente iguales, lo que quiere decir que, tras la centrifugación, la TMZ que anteriormente estaba unida a las NPs de PMVEMA se queda en el sobrenadante. Este resultado nos sorprendió porque sugiere que la TMZ, más que encapsulada está interaccionando con la superficie de las NPs de PMVEMA (esquema 1) mediante uniones débiles (probablemente enlaces de hidrógeno), dichas interacciones parecen romperse durante el proceso de centrifugación por lo que no podemos tener una información cuantitativa de cuanto TMZ se une al PMVEMA.



Esquema 1. Esquema hipotético que representa las NPs de PMVEMA-TMZ.

2.2-4. Cinética en condiciones de ensayo celular.

Todos los experimentos anteriores se han realizado en agua. Con el objetivo de determinar la capacidad de interacción de la TMZ y de las NPs de PMVEMA-TMZ con diferentes líneas celulares tumorales, se hace un estudio previo del comportamiento de dichas muestras en las condiciones del ensayo celular a 37°C. Para ello la TMZ y las NPs de PMVEMA-TMZ se incuban en TP 50 mM NaCl 100 mM y se recogen los espectros de absorción de cada muestra en función del tiempo, representando la evolución del máximo de absorbancia en la figura 22.

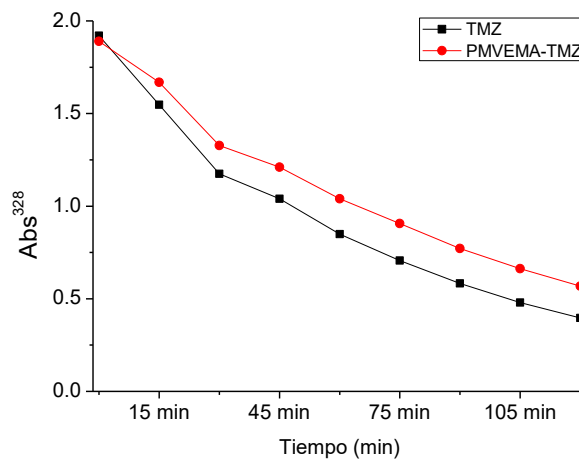


Figura 22. Estabilidad en el tiempo de TMZ (negro) y de NPs de PMVEMA-TMZ (rojo) en condiciones del ensayo celular.

Los resultados revelan que, en condiciones del ensayo celular, la TMZ se degrada como era de esperar, siendo esta degradación ligeramente más lenta cuando el fármaco está unido al PMVEMA.

2.2-5. Ensayos celulares

Una vez caracterizadas y optimizadas las NPs de PMVEMA con TMZ, y para comprobar el efecto citotóxico de la vehiculización de la TMZ en estas NPs, se procede en colaboración con el equipo del Dr. Miguel Saceda, a la incubación de distintas muestras en dos líneas celulares tumorales, una procedente de un paciente con glioblastoma (HGUE-GB-37) y otra de un paciente con la misma patología, pero que presenta resistencia al tratamiento (HGUE-GB-16). En concreto, se probaron muestras de PMVEMA, TMZ en agua, NPs de PMVEMA con TMZ 0.2 mM (1x), NPs de PMVEMA con TMZ 0.4 mM (2x), sobrenadante de la centrifugación de las NPs de PMVEMA-TMZ 0.2 mM y carmustina (BCNU). Este último es un agente antineoplásico que actúa como control positivo (figura 23).

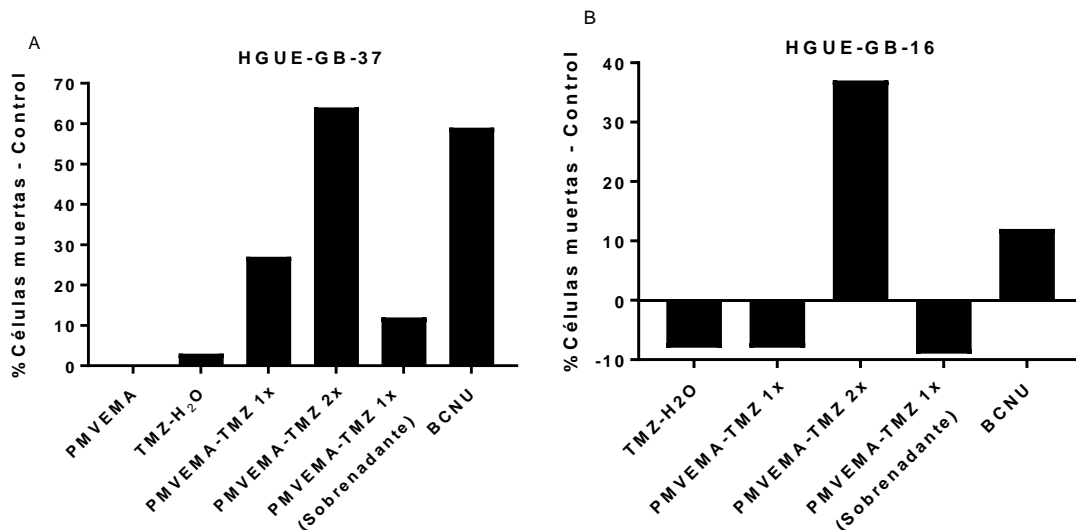


Figura 23. Ensayos celulares en línea tumoral (A) HGUE-GB-37 y (B) HGUE-GB-16 de diferentes muestras de TMZ y BCNU como control positivo.

Los resultados de esta primera línea (figura 23A) muestran que el polímero PMVEMA carece de actividad citotóxica, que la TMZ disuelta en agua prácticamente no es capaz de matar a las células tumorales, pero que las NPs de PMVEMA con TMZ sí consiguen generar muerte celular, siendo mayor el efecto cuanto mayor es la concentración de TMZ. Este resultado demuestra que la vehiculización del fármaco en NPs es un buen sistema para generar citotoxicidad en células tumorales. Con respecto a la línea celular resistente, HGUE-GB-16 (figura 23B), los resultados preliminares muestran que la TMZ podría tener más efecto sobre estos pacientes que el BCNU.

2.2-6. Incorporación del polielectrolito HTMA-PFP en las NPs de PMVEMA.

Los resultados anteriores indican que la unión de TMZ y PMVEMA permite la vehiculización y la penetración del fármaco en las células tumorales para ejercer su función citotóxica. Con objeto de dotar esta nanopartícula de una mayor funcionalidad se exploró la posibilidad de hacerla fluorescente, lo que permitiría su seguimiento. Para ello se utilizó el polielectrolito, HTMA-PFP que emite en el azul.

Este polielectrolito tiende a agregar en medio acuoso debido a su baja solubilidad, lo que se traduce en una drástica disminución de su fluorescencia.

Para incorporar el polielectrolito en las NPs de PMVEMA se modifica el protocolo como se describe en Materiales y Métodos. Para confirmar la incorporación se recogen los espectros de fluorescencia tanto del polielectrolito en agua como del polielectrolito en PMVEMA en función del tiempo (figura 24).

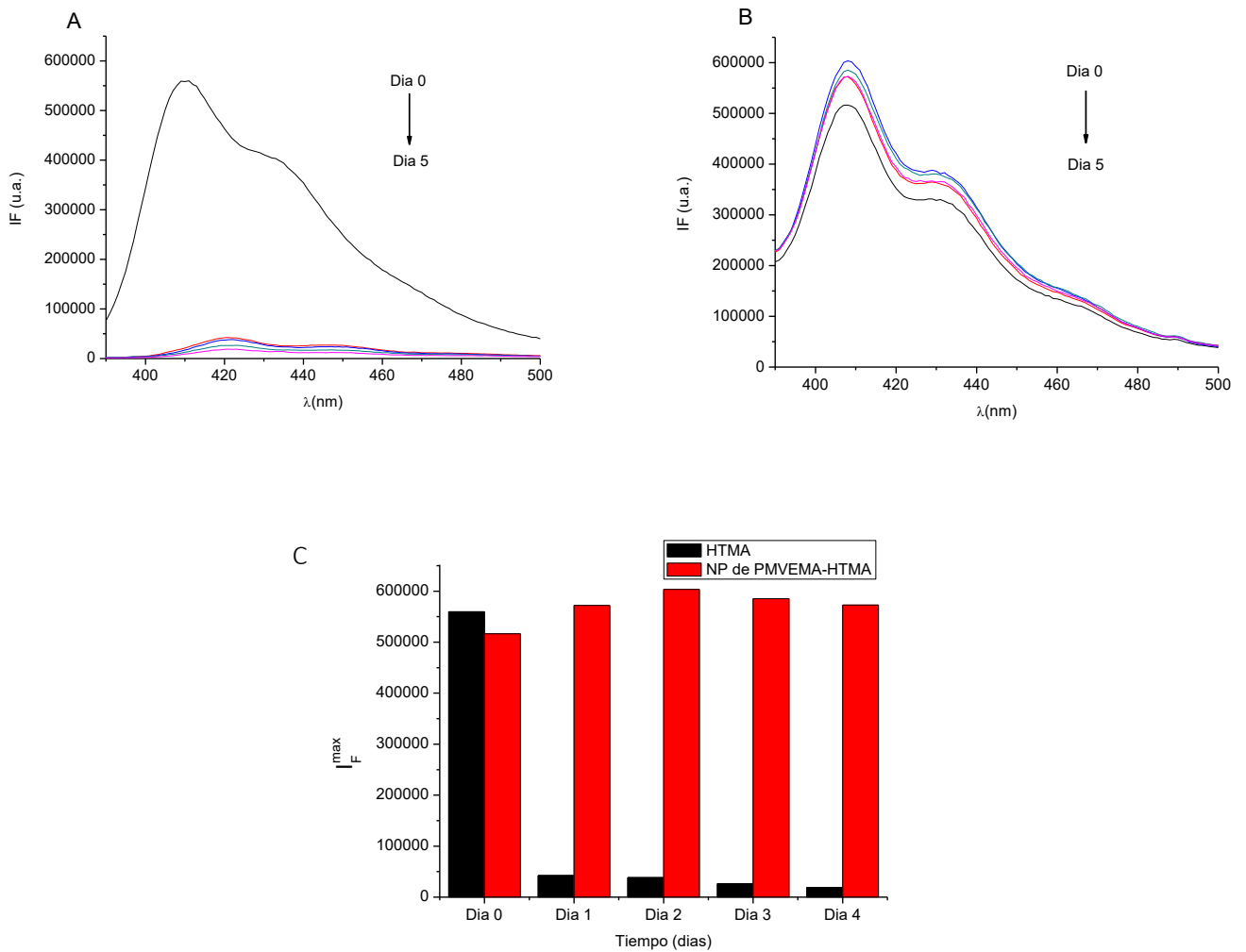


Figura 24. (A) Espectro de emisión de fluorescencia del polímero HTMA-PFP 1.5 μM, y de (B) NPs de PMVEMA-HTMA-PFP 1.5 μM en agua a lo largo de 5 días. (C) Máximos de intensidad de fluorescencia de HTMA-PFP (negro) y de NPs de PMVEMA-HTMA-PFP (rojo) en función del tiempo. λ_{ex} : 380 nm; λ_{em} : 390-500 nm.

Las figuras 24 A y B muestran los espectros de emisión del polímero azul HTMA-PFP con un pico de emisión principal a 408 nm y otro secundario a 423 nm. Comparando ambas figuras, se obtiene la figura C que revela la fuerte disminución de señal de fluorescencia del polímero azul HTMA-PFP en agua, mientras que la señal permanece estable en el caso del HTMA-PFP en NPs de PMVEMA.

Este resultado confirma la interacción entre el polielectrolito HTMA-PFP y la NPs de PMVEMA.

2.2-7. Optimización de NPs de PMVEMA con HTMA-PFP

Una vez confirmada la interacción entre el HTMA-PFP y la NPs, se estudia la concentración de polielectrolito ideal que se debe incluir en las NPs de PMVEMA para su seguimiento en fluorescencia (figura 25).

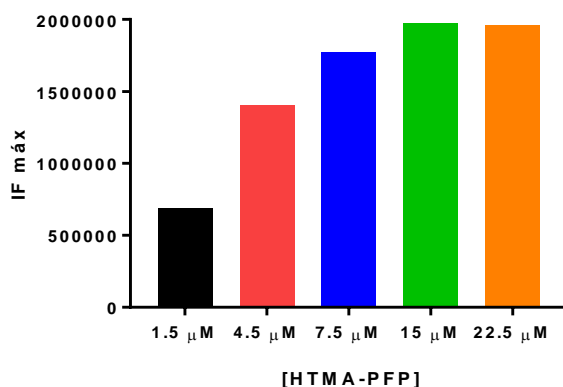


Figura 25. Intensidades de emisión de fluorescencia para diferentes concentraciones de polímero azul HTMA-PFP incorporado al PMVEMA.

La figura 25 muestra como a mayor concentración de HTMA-PFP, las NPs exhibe mayor intensidad de fluorescencia, que se satura una vez llegado a 15 μM.

A su vez, se realizan en paralelo medidas de DLS para cada una de las NPs anteriores y se determina su estabilidad con el tiempo.

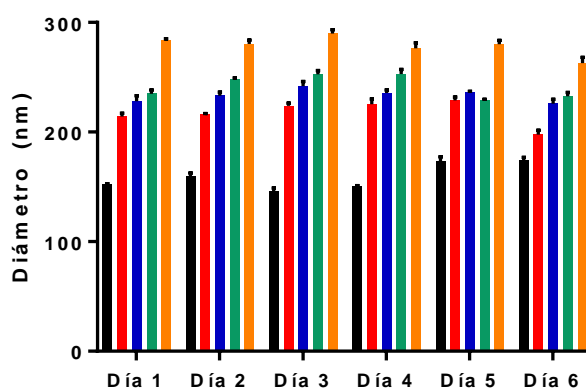
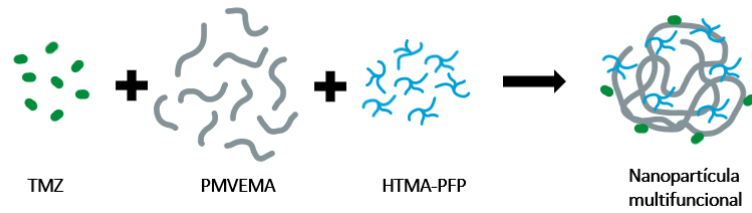


Figura 26. Tamaño y estabilidad de las NPs de PMVEMA a diferentes concentraciones de HTMA-PFP 1.5 μM (negro), 4.5 μM (rojo), 7.5 μM (azul), 15 μM (verde) y 22.5 μM (naranja), respectivamente, con el tiempo.

Con los resultados de las figuras 25 y 26 se concluye que la concentración de 7.5 μM es la más apropiada dada la alta señal de fluorescencia y la estabilidad de su tamaño con el tiempo. En el siguiente esquema se muestra una posible representación de cómo sería la NP multifuncional diseñada.



Esquema 2. Esquema hipotético que representa las NPs multifuncionales.

2.2-8. Marcaje celular.

Una vez optimizada la NP fluorescente se probó si se podía visualizar mediante un microscopio de fluorescencia tras su adición a un cultivo de células. Este experimento preliminar se ha llevado a cabo por el grupo del Dr. Saceda y el resultado se muestra en la figura 27. La línea celular tratada es la HGUE-GB-37, la misma utilizada en los ensayos de citotoxicidad. Las NPs se incubaron durante 2 horas y a continuación se eliminó el medio de cultivo y se añadió tampón fosfato, para eliminar posibles interferencias. Los resultados son prometedores ya que sugieren que las NPs penetran en el interior de la célula, marcándolas en color azul.

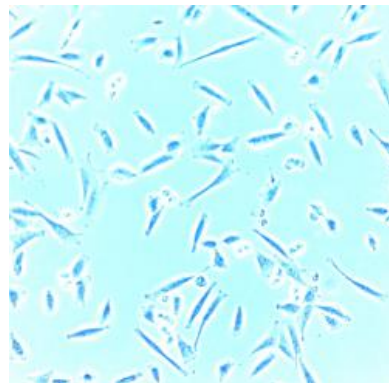


Figura 27. Marcaje celular de la línea celular HGUE-GB-37 vista mediante microscopía de fluorescencia.

Conclusiones y perspectivas futuras.

1. En este trabajo se ha estudiado el fármaco temozolamida y se han explorado diferentes estrategias de vehiculización, con objeto de obtener nanopartículas estables que mantengan su actividad citotóxica.
2. Se ha caracterizado la TMZ en disolventes acuosos bajo diferentes condiciones, utilizando espectroscopía de absorción. Los resultados muestran la degradación del compuesto a los productos MTIC y AIC, que se ve acelerada a pHs básicos y altas temperaturas. Por tanto, para su almacenamiento y posterior utilización se seleccionó como disolvente el agua (pH 6.0) y la temperatura de 4°C.
3. Se ha utilizado la proteína HSA como primera alternativa de vehiculización del fármaco. Los resultados, llevados a cabo mediante técnicas de fluorescencia y dicróismo circular muestran que se forma un complejo entre la TMZ y la HSA. El estudio de fluorescencia se ha podido realizar gracias a que la fluorescencia de la proteína es desactivada por el fármaco, debido a un mecanismo de transferencia de energía entre ambos, que confirma la interacción de los dos compuestos y permite estimar una distancia entre ellos ≤ 32.4 Å.
4. Los estudios llevados a cabo en función de la temperatura demuestran que, a pesar de dicha interacción, la afinidad entre la TMZ y la HSA es muy baja, formándose el complejo de forma espontánea ($\Delta G^\circ < 0$), donde predominan fundamentalmente los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals ($\Delta H^\circ < 0$ y $\Delta S^\circ < 0$), más que interacciones hidrofóbicas.
5. La baja afinidad encontrada descarta la HSA como posible vehículo para el transporte de TMZ, al menos en las condiciones estudiadas.
6. Como segunda alternativa de vehiculización, se ha incorporado el TMZ en NPs de PMVEMA. La unión entre ambos se ha confirmado mediante experimentos de absorción que muestran cómo se incrementa considerablemente la estabilidad del fármaco, una vez incorporado en la nanopartícula.
7. Estudios de centrifugación sugieren que la TMZ, más que encapsulada está interaccionando con la superficie de las NPs de PMVEMA, mediante uniones débiles (probablemente enlaces de hidrógeno). Dichas interacciones parecen romperse durante el proceso de centrifugación por lo que no podemos tener una información cuantitativa de cuanto TMZ se une al PMVEMA.

8. Estudios preliminares de citotoxicidad sugieren que las NPs de PMVEMA-TMZ, a diferencia de la TMZ en agua, son capaces de generar muerte celular en líneas celulares de glioblastoma, incluso en pacientes que muestran resistencia al tratamiento.
9. La incorporación del polímero conjugado HTMA-PFP a las NPs de PMVEMA aumenta su funcionalidad, haciéndolas fluorescentes y permitiendo su seguimiento. Se ha optimizado la composición de estas NPs, siendo la concentración de 7,5 μM la que maximiza la señal de fluorescencia sin que la NP por ello pierda estabilidad.
10. Experimentos preliminares de microscopía de fluorescencia evidencian la capacidad de las NPs fluorescentes de penetrar en las células, marcándolas en color azul.
11. Los interesantes resultados encontrados con las NPs de PMVEMA-TMZ indican que estamos ante una buena alternativa de vehiculización, aunque los resultados son todavía muy preliminares y es necesario completar el estudio con nuevos experimentos, tanto a nivel de caracterización como en los estudios celulares.
12. Otras alternativas, como el uso de lípidos, otros polímeros conjugados o la inclusión de nanopartículas de oro van a ser también ensayadas, con objeto de encontrar la nanoformulación más adecuada para el tratamiento/seguimiento e incluso posible diagnóstico del glioblastoma.

Bibliografia

1. Omuro, A., & DeAngelis, L. M. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 310(17), 1842–1850.
2. Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., ... Janzer, R. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma, 1, 19–28.
3. Newlands, E. S., Stevens, M. F. G., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T., & Brock, C. (1997). Temozolomide: A review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews*, 23(1), 35–61.
4. Stevens, M. F. G., Hickman, J. A., Stone, R., Gibson, N. W., Baig, G. U., Lunt, E., & Newton, C. G. (1984). Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 27(2), 196–201.
5. Baker, S. D., Wirth, M., Statkevich, P., Reidenberg, P., Alton, K., Sartorius, S. E., ... Rowinsky, E. K. (1999). Absorption, Metabolism, and Excretion of 14 C-Temozolomide following Oral Administration to Patients with Advanced Cancer 1, 5(February), 309–317.
6. Schoener, D., Ji, Q. C., Garner, D., Stouffer, B., Iacono, L., Arnold, M. E., ... Co, B. S. (2003). Analysis and Stabilization of MTIC, the Biologically Active Hydrolysis Product of the Antitumor Pro-Drug Temozolomide, in Plasma and Whole Blood, 2003.
7. Denny, B. J., Wheelhouse, R. T., Stevens, M. F. G., Tsang, L. L. H., & Slack, J. A. (1994). NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA. *Biochemistry*, 33(31), 9045–9051.
8. Andrasi, M., Bustos, R., Gaspar, A., Gomez, F. A., & Klekner, A. (2010). Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(21), 1801–1808.
9. Ramalho, M. J., Coelho, M. A. N., & Pereira, M. C. (2018). Chapter 18. Nanocarriers for the delivery of temozolomide in the treatment of glioblastoma: A review. *Design and Development of New Nanocarriers*. Elsevier Inc.
10. Wesolowski, J. R., Rajdev, P., & Mukherji, S. K. (2010). Temozolomide (Temodar). *American Journal of Neuroradiology*, 31(8), 1383–1384.
11. Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E., & Ljubimova, J. Y. (2013). Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14), 1866–1879.
12. Zhang, J., F.G. Stevens, M., & D. Bradshaw, T. (2012). Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 5(1), 102–114.
13. Gouws, C., & Pretorius, P. J. (2011). O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): Can function explain a suicidal mechanism? *Medical Hypotheses*, 77(5), 857–860.
14. Sharma, S., Salehi, F., Scheithauer, B. W., Rotondo, F., Syro, L. V., & Kovacs, K. (2009). Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Research*, 29(10), 3759–3768.
15. Kitange, G. J., Carlson, B. L., Schroeder, M. A., Grogan, P. T., Lamont, J. D., Decker, P. A., ... Sarkaria, J. N. (2009). Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro-Oncology*, 11(3), 281–291.
16. Sweeney, A. E. (2015). Nanomedicine concepts in the general medical curriculum: Initiating a discussion. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 7319–7331.

17. Tong, S., Fine, E. J., Lin, Y., Cradick, T. J., & Bao, G. (2014). Nanomedicine: Tiny particles and machines give huge gains. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(2), 243–259.
18. Carter, D. C., He, X., Munson, S. H., Twigg, P. D., Gernert, K. M., Broom, M. B., & Miller, T. Y. (1989). Three-Dimensional Structure of Human Serum Albumin. *Science*, 244, 1195–1198.
19. Wang, Z., Ho, J. X., Ruble, J. R., Rose, J., Rüker, F., Ellenburg, M., ... Carter, D. C. (2013). Structural studies of several clinically important oncology drugs in complex with human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(12), 5356–5374.
20. He, X. M., & Carter, D. C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358(6383), 209–215.
21. Karimi, M., Bahrami, S., Ravari, S. B., Zangabad, P. S., Mirshekari, H., Bozorgomid, M., ... Hamblin, M. R. (2016). Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(11), 1609–1623.
22. Pu, K. Y., & Liu, B. (2011). Fluorescent conjugated polyelectrolytes for bioimaging. *Advanced Functional Materials*, 21(18), 3408–3423.
23. Martínez Tomé, M. J., Mallavia Esquembre, R., & Mateo, C. R. (2010). Formation of Complexes between the Conjugated Polyelectrolyte Poly{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimethylammonium) hexyl]fluorene-phenylene} Bromide (HTMA-PFP) and Human Serum Albumin. *Biomacromolecules*, 11, 1494–1501.
24. Amalia M. C (2017). Diseño de sistemas poliméricos nanoestructurados transportadores para aplicaciones biomédicas (tesis doctoral). Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España.
25. Bao, G., Mitragotri, S., & Tong, S. (2013). Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15(1), 253–282.
26. Zheng, Y. R., Suntharalingam, K., Johnstone, T. C., Yoo, H., Lin, W., Brooks, J. G., & Lippard, S. J. (2014). Pt(IV) prodrugs designed to bind non-covalently to human serum albumin for drug delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 136(24), 8790–8798.
27. Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 157(2),
28. Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier : Design of prodrugs , drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3), 171–183.
29. Hartung, G., Stehle, G., Sinn, H., Wunder, a, Schrenk, H. H., Heeger, S., ... Queisser, W. (1999). Phase I trial of methotrexate-albumin in a weekly intravenous bolus regimen in cancer patients. Phase I Study Group of the Association for Medical Oncology of the German Cancer Society. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(4), 753–759.
30. Chhabra, H., Gupta, P., Verma, P. J., Jadhav, S., & Bellare, J. R. (2014). Gelatin – PMVE / MA composite scaffold promotes expansion of embryonic stem cells. *Materials Science & Engineering C*, 37, 184–194.
31. Iglesias, T., Dusinska, M., Yamani, N. El, Irache, J. M., Azqueta, A., & Cerain, A. L. De. (2017). nanoparticles designed for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*.
32. Zabaleta, V., Ponchel, G., Salman, H., Agüeros, M., Vauthier, C., & Irache, J. M. (2012). European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Oral administration of paclitaxel with pegylated poly (anhydride) nanoparticles : Permeability and pharmacokinetic study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(3), 514–523.

33. Srikar, R., Upendran, A., & Kannan, R. (2014). Polymeric nanoparticles for molecular imaging. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 6(3), 245–267.
34. Bao, G., Mitragotri, S., & Tong, S. (2013). Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15(1), 253–282.
35. Pu, K. Y., & Liu, B. (2011). Fluorescent conjugated polyelectrolytes for bioimaging. *Advanced Functional Materials*, 21(18), 3408–3423.
36. Guo, X., Yao, J., Liu, X., Wang, H., Zhang, L., Xu, L., & Hao, A. (2018). LaPO₄:Eu fluorescent nanorods, synthesis, characterization and spectroscopic studies on interaction with human serum albumin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 198(2017), 248–256.
37. Guo, M., Wang, X., Lu, X., Wang, H., & Brodelius, P. E. (2016). α -Mangostin extraction from the native mangosteen (*Garcinia mangostana* L) and the binding mechanisms of α -mangostin to HSAorTRF. *PLoS ONE*, 11(9), 1–22.
38. Fluorescencia, Q. D. E. (1983). Capítulo 6, 60–67.
39. Prevo, B., & Peterman, E. J. G. (2014). Förster resonance energy transfer and kinesin motor proteins. *Chem. Soc. Rev.*, 43(4), 1144–1155.
40. Zadran, S., Standley, S., Wong, K., Otiniano, E., Amighi, A., & Baudry, M. (2012). Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: Visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(4), 895–902.
41. Shaikh, S. A. M., Singh, B. G., Barik, A., Ramani, M. V., Balaji, N. V., Subbaraju, G. V., ... Indira Priyadarsini, K. (2018). Diketo modification of curcumin affects its interaction with human serum albumin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 199, 394–402.
42. Kumari, M., Maurya, J. K., Tasleem, M., Singh, P., & Patel, R. (2014). Probing HSA-ionic liquid interactions by spectroscopic and molecular docking methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 138, 27–35.
43. Xiao, Q., Huang, S., Su, W., Li, P., Ma, J., Luo, F., ... Liu, Y. (2013). Systematically investigations of conformation and thermodynamics of HSA adsorbed to different sizes of CdTe quantum dots. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 76–82.
44. Yasseen, Z. J., Hammad, J. H., & Altalla, H. A. (2014). Thermodynamic analysis of thymoquinone binding to human serum albumin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 124, 677–681.