

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2022-2023
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOFIBRAS
POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERACIÓN DE
ANTINEOPLÁSICOS EN UN MODELO *IN VITRO* DE
GLIOBLASTOMA

Autor: Pedro Valentín Badía Hernández

Tutor académico: Dr. Ricardo Mallavia Marín

Cotutores: Dra. María del Pilar García Morales y Dr. Juan Alberto Falcó Graciá

Declaración de tutores

D. Ricardo Mallavia Marín, Doctor y Catedrático de Universidad del área de Química Orgánica del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica de la Universidad Miguel Hernández de Elche, **D. Juan Alberto Falcó Graciá**, Doctor e Investigador Senior en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y **Dña. María Del Pilar García Morales**, Doctora y Profesora Ayudante Doctora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche

DECLARAN

Que el presente trabajo titulado:

“Síntesis y caracterización de nanofibras poliméricas como sistema de liberación de antineoplásicos en un modelo *in vitro* de glioblastoma”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Biol. Pedro Valentín Badía Hernández

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto De Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, cumpliendo todos los requisitos necesarios. Y para que así conste, se expide y firma el presente documento en Elche a 21 de junio del 2023.

Fdo.: D. Ricardo Mallavia Marín

Fdo.: D. Juan Alberto Falcó Graciá

Fdo.: Dña. María Del Pilar García Morales

Resumen

El glioblastoma es un tipo de glioma de baja incidencia, pero de alta tasa de mortalidad debido a su malignidad. Los tratamientos actuales para el glioblastoma se centran en la cirugía seguida por quimioterapia; sin embargo, la administración sistémica de antineoplásicos daña tejidos y células sanas del resto del cuerpo, por lo que se investiga su aplicación local y su liberación controlada. Su encapsulación en nanofibras poliméricas puede permitir una liberación controlada y aumentar su biodisponibilidad. En este trabajo se sintetizaron nanofibras de poli(metil vinil éter-*alt*-ácido maleico) (PMVEMA) como sistema de liberación de temozolomida (TMZ), carmustina (BCNU) y doxorubicina (DOX). Su caracterización morfológica por microscopía electrónica (FESEM) mostró un diámetro variable entre los 300 y 400 nm al incorporar cada fármaco a una concentración 1:20 (% p/p) respecto al polímero. Además, se confirmó la encapsulación de TMZ y DOX en las nanofibras a través de espectroscopía de infrarrojo y microscopía confocal, respectivamente. Finalmente, se comprobó su efecto antineoplásico con el ensayo de viabilidad celular MTT en líneas celulares de glioblastoma, mostrando disminución en la viabilidad celular dependiente de la dosis a concentraciones crecientes del fármaco.

Palabras clave: PMVEMA-Ac; nanofibras poliméricas; antineoplásicos; electrohilatura; glioblastoma.

Abstract

*Glioblastoma is a type of glioma with low incidence but high mortality rate due to its malignancy. Current treatments for glioblastoma focus on surgery followed by chemotherapy; however, systemic administration of antineoplastics damages healthy tissues and cells in the rest of the body, so their local application and controlled release is being investigated. Their encapsulation in polymeric nanofibers may allow their controlled release and increase their bioavailability. In this work, poly(methyl vinyl ether-*alt*-maleic acid) (PMVEMA) nanofibers were synthesized as a delivery system for temozolomide (TMZ), carmustine (BCNU) and doxorubicin (DOX). Their morphological characterization by electron microscopy (FESEM) showed a variable diameter between 300 and 400 nm when incorporating each drug at a 1:20 concentration (% w/w) with respect to the polymer. In addition, the encapsulation of TMZ and DOX in the nanofibers was confirmed by infrared spectroscopy and confocal microscopy, respectively. Finally, their antineoplastic effect was assessed with the MTT cell proliferation assay in glioblastoma cell lines, showing a dose-dependent decrease in cell viability at increasing concentrations of the drug.*

Keywords: *PMVEMA-Ac; polymeric nanofibers; antineoplastics; electrospinning; glioblastoma.*

Índice

Introducción y antecedentes	1
Glioblastoma	1
Tratamientos para el glioblastoma	2
Nanoformulaciones como sistemas de liberación de antineoplásicos	5
Nanofibras poliméricas	6
Objetivo.....	9
Objetivos específicos	9
Procedimiento experimental	10
Preparación de disoluciones para la síntesis de nanofibras	10
Síntesis de nanofibras por electrohilado	10
Caracterización de las nanofibras electrohiladas	11
Morfología de las nanofibras	11
Composición de las nanofibras	11
Ensayos celulares	12
Cultivos celulares	12
Ensayo de viabilidad celular	12
Ensayo de acumulación intracelular de doxorubicina	13
Análisis estadístico	14
Resultados.....	15
Caracterización de las nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Ac/Antineoplásico	15
Morfología de las nanofibras sintetizadas	15
Análisis de la composición de las nanofibras.....	18
Efecto de las nanofibras PMVEMA-AC/Antineoplásico sobre la viabilidad de células tumorales.....	23
Ensayos preliminares de viabilidad de las células SW480 y M220 con nanofibras PMVEMA-Ac/DOX	23
Ensayos de viabilidad de las células GB-37 y GB-42 con nanofibras PMVEMA-Ac/TMZ y BCNU ..	25
Acumulación intracelular de DOX encapsulada	27

Discusión	30
Conclusiones	33
Bibliografía	34

Introducción y antecedentes

Glioblastoma

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, para el 2023 se estiman 20 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes. Se prevé que a lo largo de las siguientes 2 décadas su incidencia aumente un 60 %. Esta patología se caracteriza por una proliferación celular descontrolada que lentamente puede ir desplazando y afectando a las células cercanas, degenerando los tejidos y causando una mal función sistémica (1).

Los tumores pueden clasificarse según el tipo celular afectado: 1) aquellos originados por células epiteliales denominados carcinoma, son los que presentan una mayor incidencia (80-90 %); 2) los derivados de tejido conectivo denominados sarcomas; 3) los que provienen de células de la línea linfóide y mielóide denominados linfomas y leucemias, respectivamente, y 4) los que provienen de células del sistema nervioso, también denominados neuroectodérmicos (2).

En Europa, los tipos de cáncer neuroectodérmicos presentan una incidencia de alrededor de 600 000 personas por año, con una tasa de mortalidad del 80 % aproximadamente (Figura 1). Dentro de estos, los tumores más comunes son los gliomas que presentan una alta tasa de mortalidad, como consecuencia en parte de un diagnóstico en etapas avanzadas de la patología, presentando además una localización que dificulta su tratamiento. Dependiendo del tipo de célula que origine el glioma podemos encontrar, los oligodendrogliomas, los ependimomas y los astrocitomas, entre otros (3).

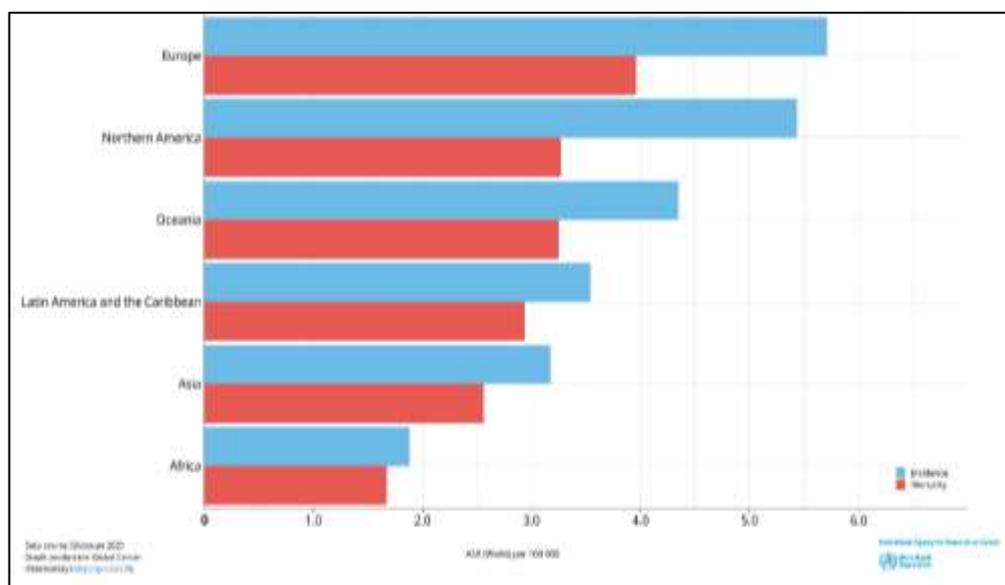


Figura 1. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en 2020 de cáncer en cerebro y sistema nervioso central, ambos sexos, todas las edades (4).

El glioblastoma o glioblastoma multiforme (GBM) es un tipo de astrocitoma heterogéneo difuso, de grado IV presente en adultos, que se caracteriza por su invasividad a áreas periféricas sanas y por su alta tasa proliferativa. Según la clasificación de tumores del SNC, el glioblastoma y sus subtipos se agrupan en función de la presencia del gen silvestre que codifica para la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH). Así mismo, presentan alteraciones en el promotor de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), cambios en los cromosomas 7 y 10, y alteraciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (3,5).

A nivel mundial, el glioblastoma tiene una alta tasa de mortalidad comparado con su baja incidencia; el 62,8 % de pacientes no superan el primer año y solo el 5 % sobrepasa los 5 años (6). El diagnóstico preliminar se apoya en síntomas tales como trastornos cognitivos, convulsiones, afasia o dolores de cabeza, síntomas que son multicausales, por lo que el diagnóstico preciso y prequirúrgico se realiza a través de la imagen de resonancia magnética (MRI) y de variantes de esta técnica como T2, 3D T1, así como espectroscopía MRI. Estas técnicas se enfocan en el reconocimiento de masas y en marcadores específicos de células con anormalidades metabólicas relacionadas con tumores, así se puede observar el área de infiltración del tumor a la periferia, más allá del tumor sólido (7,8).

Tratamientos para el glioblastoma

En la actualidad, el tratamiento inicial para el glioblastoma es la cirugía a través de laparoscopia, que consiste en la remoción total o parcial del tumor, seguido de quimioterapia y/o radioterapia. El tratamiento más adecuado se selecciona en función del análisis de marcadores específicos de las células tumorales (8,9).

De manera general, los fármacos más utilizados en la quimioterapia de GBM son la temozolomida (TMZ) y la carmustina (BCNU), los cuales inducen daño al ADN alquilando a las guaninas, interfiriendo en su replicación y en la división celular. La O⁶-metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT) participa en la supresión de estas alquilaciones y es una de las principales causas de quimio-resistencia en tumores (Figura 2) (10–12).

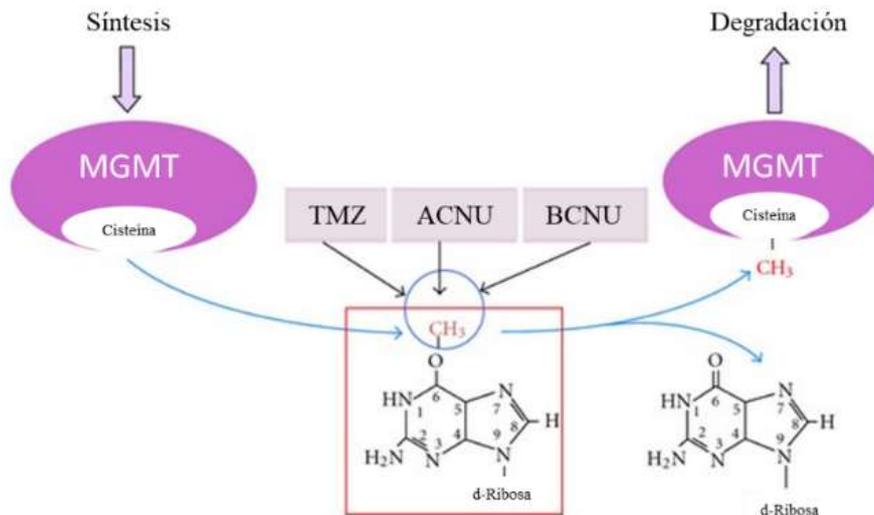


Figura 2. TMZ y BCNU alquilan la base Guanina, dañando al ADN y activando a MGMT que se alquila a sí misma para reparar el daño y restaurar la cadena de ADN. Adaptado de Martínez, Ramon, 2012 (10).

La TMZ es una prodroga que se administra por vía oral o sistémica a una concentración de 75 mg/m^2 por día, limitada por su hepatotoxicidad, durante 42 días, con un periodo de vida medio de 2 h en sangre. Una vez en el torrente sanguíneo, la prodroga, sensible a pH neutro y alcalino, se hidroliza y forma el compuesto 5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC), que se degrada a 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) y al ion metildiazonio siendo este el compuesto alquilante (Figura 3) (12,13).

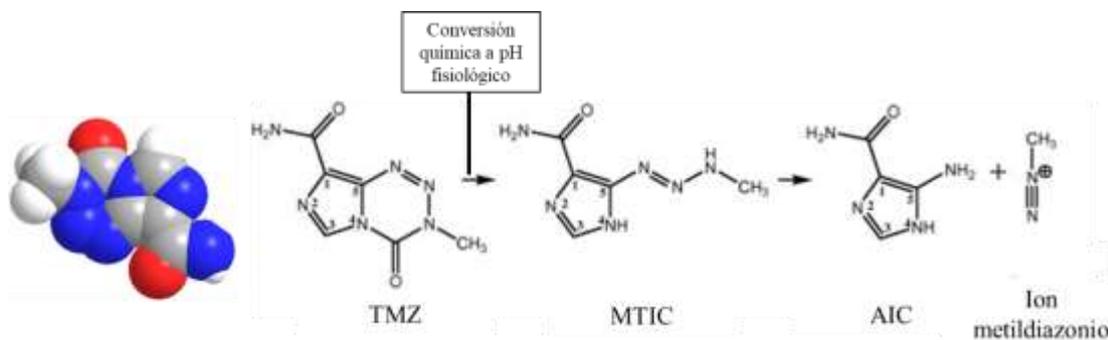


Figura 3. Hidrólisis del profármaco TMZ a los agentes alquilantes AIC y el ion metildiazonio. Adaptado de Lopes y col., 2013 (13).

Por otro lado, BCNU o (1,3-bis (2-cloroetil)-1-nitrosourea es un fármaco de la familia de las nitrosoureas también llamadas mostazas nitrogenadas (Figura 4), que se administra de manera sistémica o local. La concentración de la administración sistémica de BCNU es de

200 mg/m² cada 6 semanas con una vida media en sangre de 15 a 30 min. Dicha dosis está sujeta a los efectos tóxicos en la medula ósea y en pulmón que pueden desarrollar los pacientes (14).



Figura 4. Estructura química de BCNU.

En 1996 se implementó la administración local de BCNU con el uso de las obleas de carmustina Gliadel, formadas por una matriz copolimérica de 1,3-bis-(p-carboxifenoxi) propano y ácido sebácico, cargadas con 7,7 mg de BCNU, pudiendo poner hasta 8 obleas postcirugía (61,6 mg), con un tiempo de degradación de 3 semanas. Su aplicación local disminuye significativamente la exposición de tejido sano al fármaco y sus efectos secundarios a largo plazo (14,15).

Entre los fármacos de relevancia clínica para el tratamiento de diversos tipos de tumores (cáncer gástrico, de mama, pancreático, colorrectal, entre muchos otros), se encuentra la doxorubicina (DOX) (Figura 5). Este es un antibiótico de la familia de las antraciclinas cuyo principal efecto se da a nivel de la topoisomerasa II, inhibiendo el proceso de transcripción y replicación, promoviendo además la liberación de especies reactivas de oxígeno que inducen daño celular. Un aspecto importante que destacar es su propiedad fluorescente con una longitud de onda de excitación a 475 nm y una de emisión a 590 nm lo que facilita su monitorización durante la investigación (16–18).

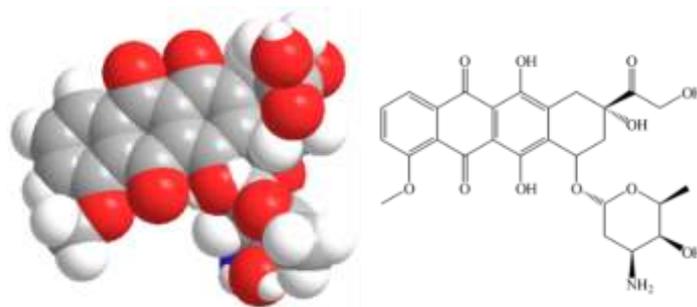


Figura 5. Estructura química de doxorubicina, DOX.

Actualmente la doxorubicina se administra por vía sistémica a una concentración de 60-75 mg/m² cada tres semanas y tiene una vida media en sangre de 12 min. Aunque su uso se ve limitado por sus efectos secundarios como la cardiotoxicidad y por su poca permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica. Por ese motivo, se utiliza para el tratamiento de neuroblastomas y se encuentra en investigación por su potencial uso local para gliomas y glioblastoma (19–21).

Nanoformulaciones como sistemas de liberación de antineoplásicos

La vía de administración es determinante para mejorar el efecto terapéutico del fármaco seleccionado para el tratamiento del GBM. Por otro lado, la implementación de sistemas de liberación controlada, aumentan la biodisponibilidad y la velocidad de absorción y disminuyen sus efectos citotóxicos tanto sobre las células tumorales como en tejidos sanos. Actualmente, la nanotecnología es el punto focal de la investigación para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos antineoplásicos. Esta área se centra en el diseño, síntesis y caracterización de materiales y estructuras, controlando el tamaño y la forma a escala nanométrica, que puede ir de 1nm hasta 1000 nm (22,23).

Existen una gran variedad de nanomateriales, por ejemplo, las nanopartículas, los dendrímeros, los liposomas, las micelas, los “quantum dots”, las nanofibras, etc. Estos nanomateriales pueden ser formados por polímeros naturales o sintéticos, metales o compuestos derivados del carbono. Se pueden clasificar en función de sus dimensiones, distinguiendo tres tipos: 1) los materiales cero-dimensionales, que tienen todas sus dimensiones en la escala nanométrica, como las nanopartículas y los liposomas; 2) los unidimensionales que presentan dos de sus dimensiones dentro la escala nanométrica como las nanofibras o los nanotubos y 3) los de dimensiones superiores, que incluyen a todos los materiales nanoestructurados, que mantienen al menos una dimensión nanométrica, como el grafeno (23–25).

Estos nanomateriales poseen características únicas relacionadas con sus dimensiones, ya que responden ante las leyes de la física cuántica y no de la física convencional. Debido a esto, un mismo material puede tener diferentes propiedades químicas, ópticas, mecánicas, eléctricas, etc. según sea su escala de diseño. Una de las propiedades que se destaca es el aumento del área superficial específica, que incrementa el número de átomos superficiales y optimiza la interacción con otras moléculas, aumentando así la eficiencia de encapsulación de los fármacos (24).

La elección del tipo de nanomaterial y su composición se basan en el fármaco a encapsular, en la vía de administración y en el tipo de terapia a implementar, dando lugar a

una amplia variedad de nanoformulaciones terapéuticas para el tratamiento de GBM. Las nanopartículas metálicas, magnéticas y los liposomas han sido explorados ampliamente, en combinación. Akilo y colaboradores (26) sintetizaron nanopartículas de magnetita recubiertas con un complejo de alcohol polivinílico/polietilenimina/isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Polyplex) cargadas con BCNU. Sus resultados mostraron que por sí solas tienen mayor efecto sobre la viabilidad celular que BCNU libre, además, al aplicar un campo magnético aumentaba la internalización de las nanopartículas en un modelo celular de glioblastoma. Otros grupos de investigación han usado FITC para realizar imagenología de fluorescencia de nanopartículas *in vivo*, Wei y colaboradores (27) evaluaron la encapsulación de BCNU en nanopartículas basadas en Albumina de Suero Bovino (BSA) junto con FITC, mostrando un efecto dependiente de dosis a la concentración de BCNU, en la línea celular MBR261-2 de glioblastoma y observando por fluorescencia la internalización de las nanopartículas.

Por otro lado, se ha reportado la encapsulación de DOX en nanopartículas de carbonato de calcio y ferritina humana, para tratar cáncer de mama y cáncer de pulmón, respectivamente (28,29). Sin embargo, destaca la investigación de Ghaferi y colaboradores (30), quienes encapsularon DOX y carboplatino (CB) en liposomas con polietilenglicol (PEG) como tratamiento de GBM en un modelo celular de glioma. Sus resultados demuestran que hay una liberación controlada y un aumento en el efecto antitumoral comparado con DOX/CB libres. Así mismo, el análisis histopatológico en tejidos de ratas post tratamiento con las nanopartículas lisosomales, mostró una disminución en la pérdida de peso, en la necrosis tubular aguda y en la necrosis de células hepáticas.

De igual manera la encapsulación de TMZ se ha evaluado en diversas nanoestructuras, por ejemplo, Araujo-Abad y colaboradores (31) evaluaron el efecto de TMZ encapsulada en pequeñas vesículas extracelulares, pertenecientes a células de GBM de pacientes, demostrando que se requiere una menor cantidad de fármaco encapsulado, para lograr el mismo efecto que en su estado libre.

Nanofibras poliméricas

Dentro de la síntesis y caracterización de nanoformulaciones como sistemas de liberación de fármacos como TMZ, BCNU y DOX, destacamos a las nanofibras por sus aplicaciones tanto local como sistémica, en sinergia con otros nanomateriales. Las nanofibras, en concreto, las nanofibras poliméricas, son biodegradables, biocompatibles, flexibles y presentan una gran relación superficial área/volumen. Además, pueden formar andamios que se comportan como una matriz extracelular, con una porosidad relativa que permite el paso de nutrientes, iones y dependiendo del material, pueden inducir la proliferación y migración celular, lo cual las hace candidatas ideales para su aplicación local en el cerebro (32,33).

La técnica más utilizada para la síntesis de nanofibras poliméricas es la electrohilatura, por su bajo coste, sencillez y alto rendimiento de producción. Esta técnica consiste en la aplicación de un campo eléctrico que rompe las fuerzas de tensión superficial de una disolución polimérica, que es expulsada a un flujo constante desde un inyector, hasta un colector donde las fibras se depositan haciendo que el solvente se evapore en el proceso. Durante este proceso, parámetros como el voltaje aplicado, la distancia entre el inyector y el colector, la viscosidad de la disolución, la humedad y la temperatura ambiental, entre otros, pueden afectar la síntesis de las nanofibras (34,35).

En resumen, las nanofibras poliméricas son sencillas de sintetizar por la técnica de electrohilatura y dependiendo de la forma de encapsulación de fármacos, pueden responder a diferentes estímulos para su liberación, por ejemplo, a la temperatura, a los campos eléctricos, al pH, etc. Además, su maleabilidad y portabilidad los convierte en excelentes sistemas de liberación de fármacos, tanto para su implantación, como por administración oral o aplicación tópica (Figura 6) (32).

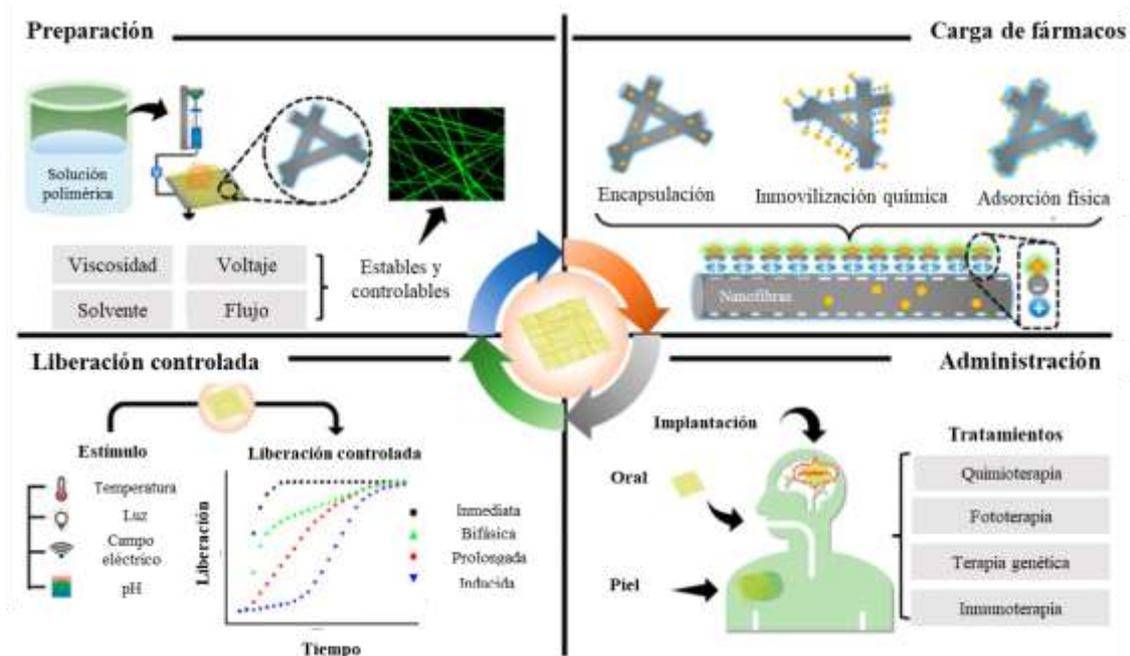


Figura 6. Esquema de la síntesis, caracterización y aplicación de las nanofibras poliméricas. Imagen recuperada de Singh y col., 2021 (32).

Se han desarrollado nanofibras electrohiladas con poli [(D, L)-láctico-co-glicólico] (PLGA), que han sido cargadas con los agentes alquilantes TMZ y BCNU para el tratamiento de GBM. Su implantación intracraneal junto con un adyuvante, en ratas GBM, disminuyó significativamente el tamaño del tumor comparándolo con los resultados obtenidos con TMZ encapsulada por vía oral y con BCNU en Gliadel, observando un menor desarrollo de efectos secundarios

(36,37). Por otro lado, Liu y colaboradores (38) utilizaron las nanofibras electrohiladas de PLGA para encapsular DOX junto con un inhibidor de Bcl-2 en cáncer de próstata, observando la eliminación de células tumorales resistentes a quimioterapia desarrollando una terapia sinérgica para tumores farmacorresistentes.

Es importante destacar el uso de polímeros sintéticos para la síntesis de nanofibras ya que son baratos y fáciles de producir en grandes cantidades. Polímeros biocompatibles y biodegradables como el poli(metil vinil éter-*alt*-ácido maleico) (PMVEMA) también llamado PMVEMA-Anhidro (PMVEMA-An) y sus derivados como el PMVEMA-Éster (PMVEMA-ES) y el PMVEMA-Ácido (PMVEMA-Ac) han sido caracterizados y estudiados ampliamente en nuestro grupo de investigación para la síntesis de nanofibras. Martínez-Ortega y colaboradores (33) encapsularon capsaicina, salicilato de metilo y ácido salicílico en nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Es como tratamiento de psoriasis, logrando activar el canal receptor de potencial transitorio vanilloide 1 (TRPV1) asociado a las lesiones de esta patología. De igual manera, Mira y colaboradores (39) utilizaron PMVEMA-An para encapsular L-mentol, manteniendo la estructura y la actividad del agente activo sin mostrar efectos citotóxicos. Así mismo, observaron la activación de su receptor específico el miembro 8 de la subfamilia M del canal catiónico receptor de potencial transitorio (TRPM8) de membrana en células embrionarias de riñón humano HEK293-hTRPM8.

Por otro lado, se han encapsulado antibióticos como la neomicina, la amikacina, la ciprofloxacina y la cefotaxima en nanopartículas y nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Es y Ac, manteniendo sus propiedades antimicrobianas (40). Mira y colaboradores (41) han encapsulado polielectrolitos conjugados fluorescentes y ácido 5- aminolevulínico (5-ALA), un aminoácido utilizado en investigación y en clínica para la terapia fotodinámica como marcador fluorescente en cirugías guiadas para extirpar tumores, como los GBM (7). Los resultados de la investigación mostraron que se mantuvieron las propiedades fluorescentes intactas de los compuestos en las nanofibras. Asimismo, observaron la internalización del 5-ALA en células SW480 de cáncer colorrectal y en células HaCaT de queratinocitos.

Sin embargo, las nanofibras electrohiladas de PMVEMA como sistema de liberación de fármacos antineoplásicos aún no se han caracterizado y se espera que, las propiedades ácidas del polímero constituyan un buen candidato para la preservación de fármacos sensibles a pH altos, como la TMZ, DOX e incluso BCNU.

Objetivo

El objetivo general de este trabajo es: **Sintetizar y caracterizar nanofibras poliméricas de PMVEMA-Ac, como sistema de liberación de los antineoplásicos Doxorrubicina, Carmustina y Temozolomida en un modelo *in vitro* de glioblastoma.**

Objetivos específicos

Para la consecución de este objetivo general se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las concentraciones de solubilidad de los antineoplásicos TMZ, DOX o BCNU en una disolución acuosa de PMVEMA-Ac a 20 %.
- Sintetizar y caracterizar (diámetro, morfología y composición) nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Ac/Antineoplásico.
- Determinar los efectos sobre la viabilidad celular de las nanofibras de PMVEMA-Ac/Antineoplásico en líneas celulares de cáncer.

Procedimiento experimental

Preparación de disoluciones para la síntesis de nanofibras

Para las disoluciones empleadas en la preparación de nanofibras se utilizó el polímero PMVEMA-Ac con una masa molecular promedio en peso (M_w) de 1 980 000 g/mol y un índice de polidispersidad (PDI) de 2,07 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.). La concentración óptima para su electrohilado fue determinada en estudios previos de nuestro grupo, siendo de 20 % (p/p), en disolución acuosa (41). La disolución se dejó en agitación constante y a temperatura ambiente toda la noche.

Una vez homogénea, a la disolución polimérica se le añadió TMZ o DOX (TCI Europe N.V., Amberes, Bélgica) a las siguientes concentraciones 0,25, 0,5 y 1 % (p/p), respecto al PMVEMA-Ac. Las disoluciones se dejaron agitando a temperatura ambiente hasta su homogenización.

En el que caso específico de BCNU (TCI Europe N.V., Amberes, Bélgica), se disolvió en una solución polimérica al 20 % con etanol al 10 % (p/p).

Síntesis de nanofibras por electrohilado

Tras la completa homogenización de las soluciones, estas se cargaron en una jeringa de plástico BD Discardit II dos piezas de 2 mL, con una aguja de acero inoxidable 316, calibre 18 y punta roma con un ángulo de 90° (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.). La jeringa se colocó sobre una bomba de infusión KDScientific-100-CE (KD Scientific, Holliston, EE. UU.) a un flujo constante de eyección, en dirección hacia un portaobjetos colocado sobre una base colectora de aluminio situada a una distancia determinada de la punta de la aguja. Por motivos de seguridad, todo este sistema se encuentra en el interior de una caja de metacrilato dentro de una campana extractora.

A continuación, se generó un campo electroestático entre la aguja y el colector mediante la aplicación de un voltaje determinado usando una fuente de alto voltaje Glassman High Voltage FC60P2 (Glassman High Voltage Inc., Nueva Jersey, EE. UU.). Las condiciones ambientales a las que se realizó este procedimiento fueron entre 20 y 30 °C de temperatura ambiente y una humedad relativa de 35-50 %. De esta manera, las nanofibras generadas eran depositadas en el cubre ubicado sobre el colector descrito. Las nanofibras se separaron del colector y almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

Caracterización de las nanofibras electrohiladas

Morfología de las nanofibras

La caracterización morfológica preliminar de las nanofibras se realizó mediante un microscopio óptico Mycosystems DMI3000B con una fuente de luz LEICA EL6000 y una cámara digital LEICA DFC 3000G (LEICA, Bensheim, Alemania), pudiendo observar la presencia o ausencia de defectos morfológicos visibles como la formación de cintas, cuentas o “beads”, dobles fibras, etc., en campo claro con un aumento 40x. Tras esta evaluación preliminar de las nanofibras, estas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) con un aparato modelo SIGMA 300 VP de emisión de campo de cátodo caliente Schottky (ZEISS; Oberkochen, Alemania).

Las fotografías obtenidas mediante FESEM se analizaron con el programa ImageJ, midiendo el diámetro de 100 nanofibras para obtener una media de sus tamaños, con el ajuste de escala requerido.

Composición de las nanofibras

Espectroscopía de infrarrojo y UV

Una primera caracterización de la composición de las nanofibras PMVEMA-Ac con DOX, TMZ o BCNU se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo. Para su procesamiento se homogeneizaron con un mortero junto con bromuro de potasio (KBr). Posteriormente, el homogenizado se colocó en un molde de 13 mm (SPECAC, Orpington, Reino Unido) y se introdujo en una prensa hidráulica manual (SPECAC, Orpington, Reino Unido); tras 10 min a una presión equivalente a 9 toneladas se obtuvo un comprimido, que se colocó en un espectrómetro infrarrojo Spectrum Two™ (PerkinElmer, Waltham, EE. UU.) para su análisis.

En el caso de TMZ libre en solución acuosa, se liofilizó para su análisis espectroscópico de infrarrojo. Por otro lado, para conocer la estabilidad de TMZ en disolución acuosa, se midió su absorbancia (Abs) entre los 190 y los 500 nm usando cubetas de cuarzo de 10x10 mm y un espectrofotómetro UV-2700 (Shimadzu, Tokio, Japón).

Microscopia confocal

Las propiedades fluorescentes de DOX permitieron la caracterización de la composición de las nanofibras PMVMEA-Ac/DOX 1 % mediante microscopia de fluorescencia. Para ello se utilizaron el microscopio confocal LSM900 con Airyscan 2 (ZEISS, Oberkochen, Alemania). La

intensidad de fluorescencia se registró a la longitud de onda de emisión de 590 nm, con una longitud de excitación de 480 nm.

Ensayos celulares

Cultivos celulares

Para el estudio *in vitro* preliminar de las propiedades antineoplásicas de las nanofibras de PMVEMA-Ac con DOX o TMZ se utilizaron las líneas celulares IMIM-PC-2 (M220) de adenocarcinoma de páncreas exocrino y SW480 de cáncer colorrectal cedidas por el Grupo de Oncología Molecular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE). Una vez establecido el protocolo se utilizaron las líneas celulares de glioblastoma multiforme HGUE-GB-37 (GB-37) y HGUE-GB-42 (GB-42) procedentes de cultivos primarios establecidos en el mismo grupo de investigación.

Las líneas M220 y SW480 se cultivaron en medio de cultivo DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) rico en glucosa, con glutamina estable 2 mM, Hepes 25 mM (Biowest®, Riverside, EE. UU.), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Biowest®, Riverside, EE. UU.) y 1 % de antibiótico (penicilina y estreptomina) (Biowest®, Riverside, EE. UU.). Las condiciones de cultivo fueron 37 °C con CO₂ al 5 % y atmósfera humidificada en incubador (ESCO Lifesciences GmbH, Friedberg, Alemania).

Por otro lado, las líneas de glioblastoma se cultivaron con medio DMEM-F12 (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium; Nutrient Mixture F12*) rico en glucosa, con glutamina estable 2 mM, Hepes 25 mM, igualmente suplementado con 10 % de FBS y 1 % de antibiótico en las mismas condiciones de incubación que las líneas celulares M220 y SW480.

Ensayo de viabilidad celular

Los efectos sobre la viabilidad celular de las nanofibras de PMVEMA-Ac 20 % con DOX, TMZ o BCNU al 1 % se analizaron con el ensayo colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este ensayo se basa en el viraje de color que experimenta el MTT (amarillo) cuando es reducido, por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, y transformado en una sal de formazán ((E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazán) de color morado. La cantidad de compuesto final, y por tanto de su señal colorimétrica, es proporcional a las células viables en cultivo.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 3 000-4 000 células por pocillo. Tras 24 h añadieron los tratamientos por sextuplicado. Tras 72 h de incubación con los tratamientos adecuados, se añadió el reactivo MTT (Sigma Aldrich®, St. Louis, EE. UU.) a una concentración final de 0,25 mg/mL por un periodo de 3 h. A continuación,

el contenido de los pocillos fue sustituido por 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) y se agitó durante 30 min para disolver los cristales de formazán. Finalmente, la absorbancia fue medida a 570 nm en un lector de placas Gen5™ (BioTeK®, Winooski, VT, EE. UU.). Cada tratamiento se realizó por sextuplicado.

Ensayo de acumulación intracelular de doxorubicina

Para determinar la capacidad de DOX para penetrar hasta el núcleo celular, tras haber sido encapsulada en las nanofibras de PMVMEA-Ac, se realizó un ensayo de acumulación de DOX en núcleo en las líneas celulares de glioblastoma HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 8000-9000 células por pocillo. Tras 24 h se les añadió DOX libre y encapsulada a diferentes concentraciones y se incubaron durante 10, 20, 30 y 60 min, para determinar el tiempo mínimo de saturación de la DOX dentro de las células. A continuación, las células fueron tratadas con Hoechst 33342 (ThermoFisher, Waltham, EE. UU.) a 0,002 mg/mL durante 20 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino (PBS) y se inocularon con 100 μ L de PBS. Finalmente, se midió la intensidad de fluorescencia de DOX (λ excitación de 475 nm y λ emisión de 590 nm, Figura 7) y Hoechst 33342 (λ excitación de 352 nm y λ emisión 454 nm, Figura 7). Espectros de fluorescencia de Hoechst 33342 (izquierda) y DOX (derecha) Figura 7) con el uso del lector de microplacas multimodo Cytation (BioTek, Winooski EE. UU.). Cada tratamiento se realizó por triplicado.

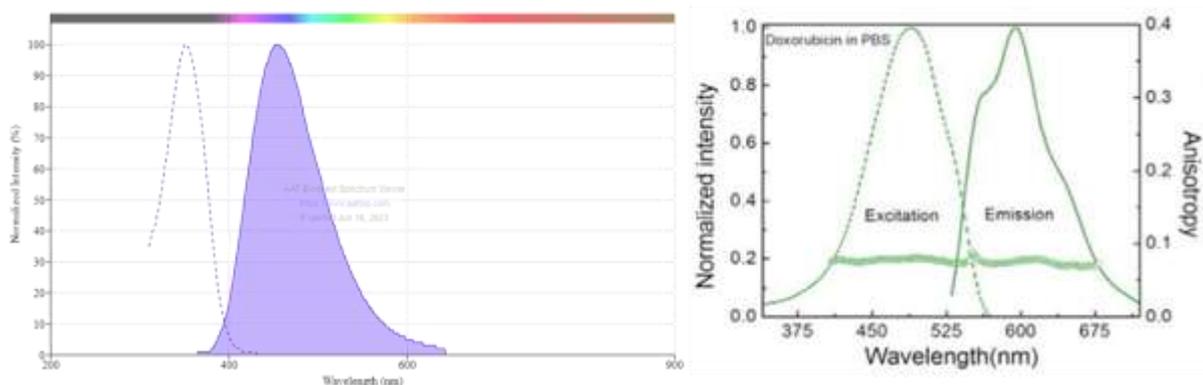


Figura 7. Espectros de fluorescencia de Hoechst 33342 (izquierda) y DOX (derecha). Imagen recuperada de Shah y col., 2017 (17).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante las pruebas estadísticas ANOVA de dos vías, regresión no lineal o una función Gaussiana según sea el caso. Para ello y el graficado de resultados se utilizó el software GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, California, EE. UU). Los resultados se representan como la media y la desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales se muestran como: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$).

Resultados

Caracterización de las nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Ac/Antineoplásico

Morfología de las nanofibras sintetizadas

Respecto a la síntesis de nanofibras poliméricas, se utilizó PMVEMA-Ac al 20 % (p/p) y se electrohiló con los siguientes parámetros: 16 kV, 10 cm y 0,25 mL/h, modificados de Mira y colaboradores (41). Las nanofibras sintetizadas fueron homogéneas y presentaron un diámetro medio de 340 ± 34 nm sin defectos visibles (Figura 8).

Se determinó igualmente el coeficiente de variación (CV), el cual, es una medida de la consistencia de una característica medida. Normalmente, un CV por encima del 30 % indica una alta variabilidad y, por lo tanto, problemas en el experimento. En este caso, se obtuvo un CV del 10,1 %, lo que indica una gran similitud en los diámetros dentro de la muestra.

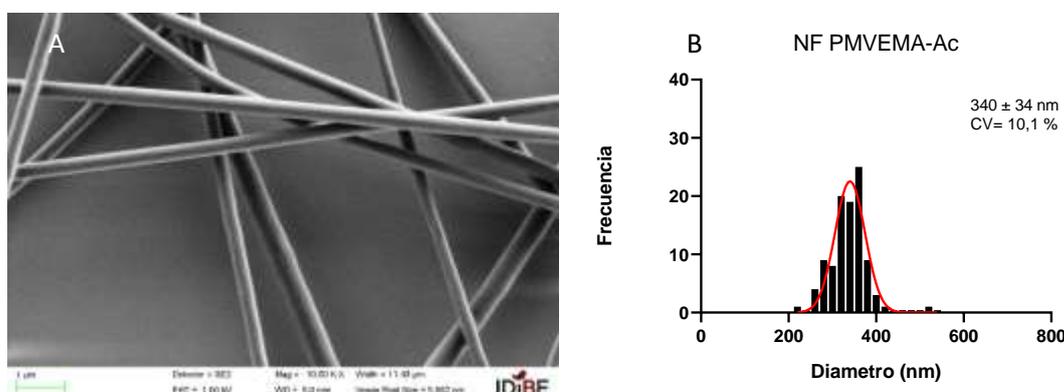


Figura 8. Análisis por FESEM de nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Ac. (A) Fotografías de FESEM (Escala. 1μm). (B) Histogramas de frecuencia de diámetros de nanofibras.

En cuanto a la morfología de las nanofibras PMVEMA-Ac/DOX, estas presentaron una estructura uniforme, sin defectos ni deformidades visibles a través de los diferentes porcentajes de DOX, salvo a la concentración del 0,5 % en la que se observó la presencia de nanofibras dobles (Figura 8B). A pesar de esto, el CV de la muestra fue del 8,17 %, lo que sugiere que la presencia de dobles fibras no afectó a la homogeneidad de la muestra (Figura 9B). Es importante destacar que no se encontró relación entre el diámetro de las nanofibras y el aumento progresivo en la concentración de DOX.

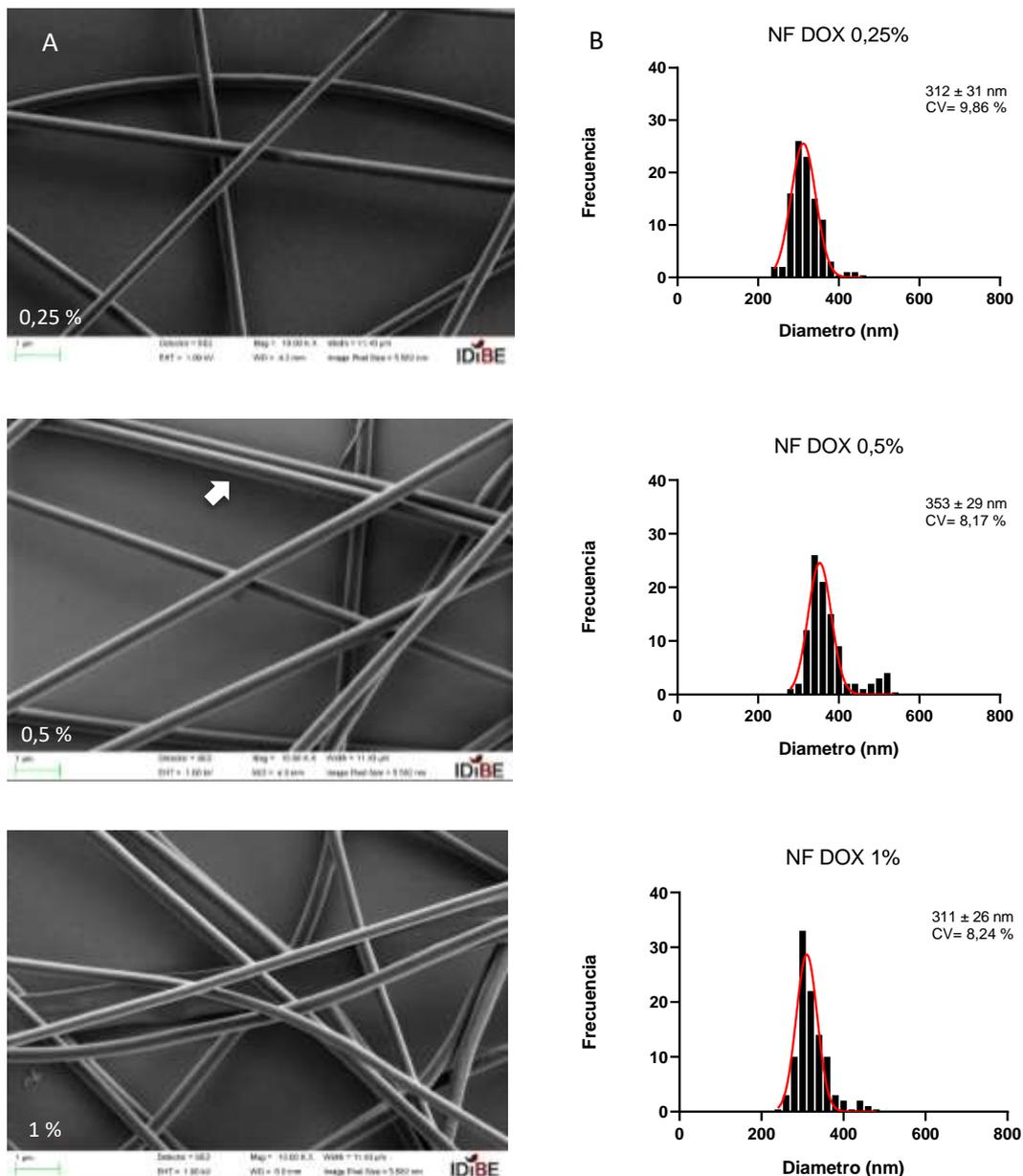


Figura 9. Análisis por FESEM de nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Ac/DOX. (A) Fotografías de FESEM (Escala. 1µm). (B) Histogramas de frecuencia de diámetros de nanofibras. La flecha señala dobles nanofibras.

Por otro lado, las nanofibras de PMVEMA-Ac/TMZ fueron homogéneas, sin deformidades visibles y presentaron un diámetro de 356 ± 40 nm (Figura 10), similar al de las nanofibras control sin fármaco. Estos resultados indican que la TMZ no afectó a las características de la disolución polimérica para su electrohilado.

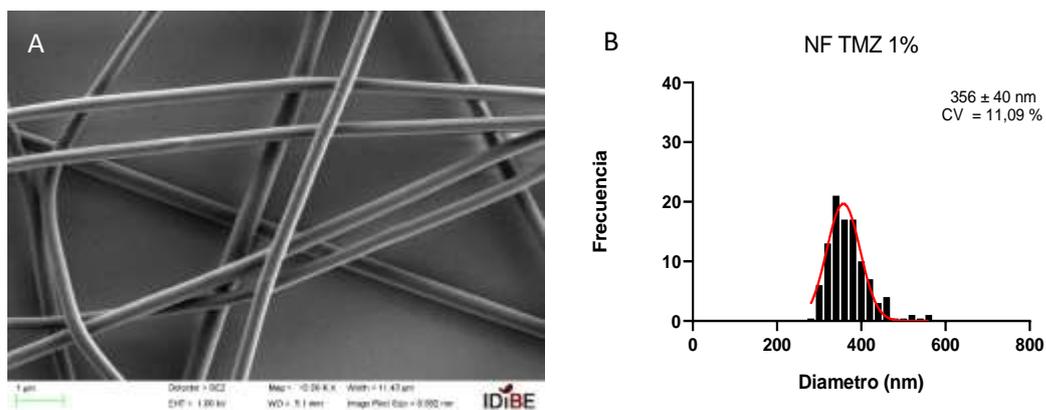


Figura 10. Análisis por FESEM de nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Ac/TMZ. (A) Fotografías de FESEM (Escala. 1μm). (B) Histogramas de frecuencia de diámetros de nanofibras.

Así mismo, el diámetro de las nanofibras de PMVEMA-Ac/BCNU 1 % aumentó a 381 ± 30 nm (Figura 11B) comparado con el tamaño de las nanofibras de PMVEMA-Ac de 340 nm, esto se puede deber a la formación de cintas tal y como se observa en la Figura 11A. Sin embargo, esto no afectó la homogeneidad de la muestra. Por otro lado, es importante destacar que el etanol al 10 % de la disolución no afectó a la síntesis de la nanofibras.

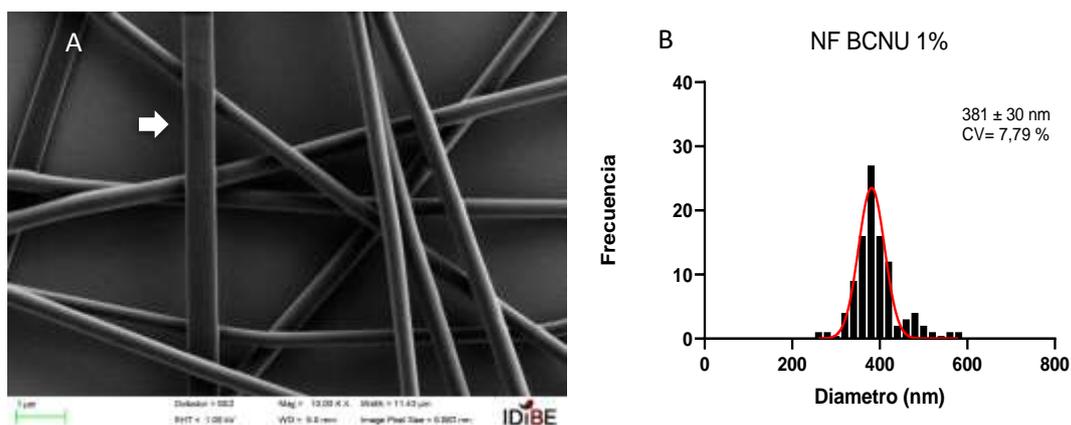


Figura 11. Análisis por FESEM de nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Ac/BCNU. (A) Fotografías de FESEM (Escala. 1μm). (B) Histogramas de frecuencia de diámetros de nanofibras. La flecha señala una cinta.

En cuanto al análisis de los diámetros entre las nanofibras con antineoplásico, estas se mantuvieron con un tamaño por encima de los 300 y hasta los 400 nm. A pesar de encapsular el mismo porcentaje de fármaco se observaron diferencias entre los diámetros de las nanofibras, lo que podría asociarse directamente al fármaco encapsulado (Figura 12).

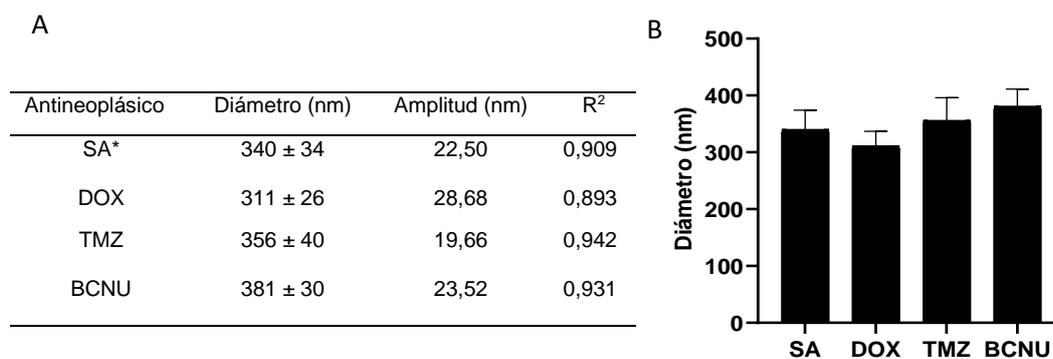


Figura 12. Análisis de los diámetros de nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Ac con DOX, TMZ o BCNU 1 % (p/p). (A) Tabla de diámetros de nanofibras analizadas por FESEM. (B) Histograma de medias de diámetros de NF con antineoplásico. *SA, sin antineoplásico.

Análisis de la composición de las nanofibras

Espectroscopía de infrarrojo de las nanofibras

La composición de las nanofibras se analizó por espectroscopía de infrarrojo en un rango de 4000 a 450 cm^{-1} , destacando la región de la huella digital (2000-450 cm^{-1}) en la que se observaron las bandas representativas de todos los compuestos excepto para BCNU.

En la Figura 13A se observa la sobreposición de los espectros de infrarrojo del PMVEMA-Ac, de DOX y de PMVEMA-Ac/DOX. La intensidad del espectro de infrarrojo del polímero base, en la región de grupos funcionales entre los 4000 y los 2000 cm^{-1} , se superpuso a la frecuencia de DOX. Sin embargo, en la región de la huella digital pudimos observar bandas representativas de DOX como la banda a 1729 cm^{-1} de la tensión del enlace C=O, las correspondientes a la tensión de los enlaces C=C de los anillos 1617, 1582 y 1414 cm^{-1} , las bandas de la tensión del enlace C–O–C a 1115 y 1073 cm^{-1} , y 805 y 688 cm^{-1} las bandas de flexión de los enlaces C=H y del anillo C=C (Figura 13B). Estas frecuencias de las bandas indicadas son representativas de DOX, lo que confirmó la presencia del antineoplásico en la muestra (42).

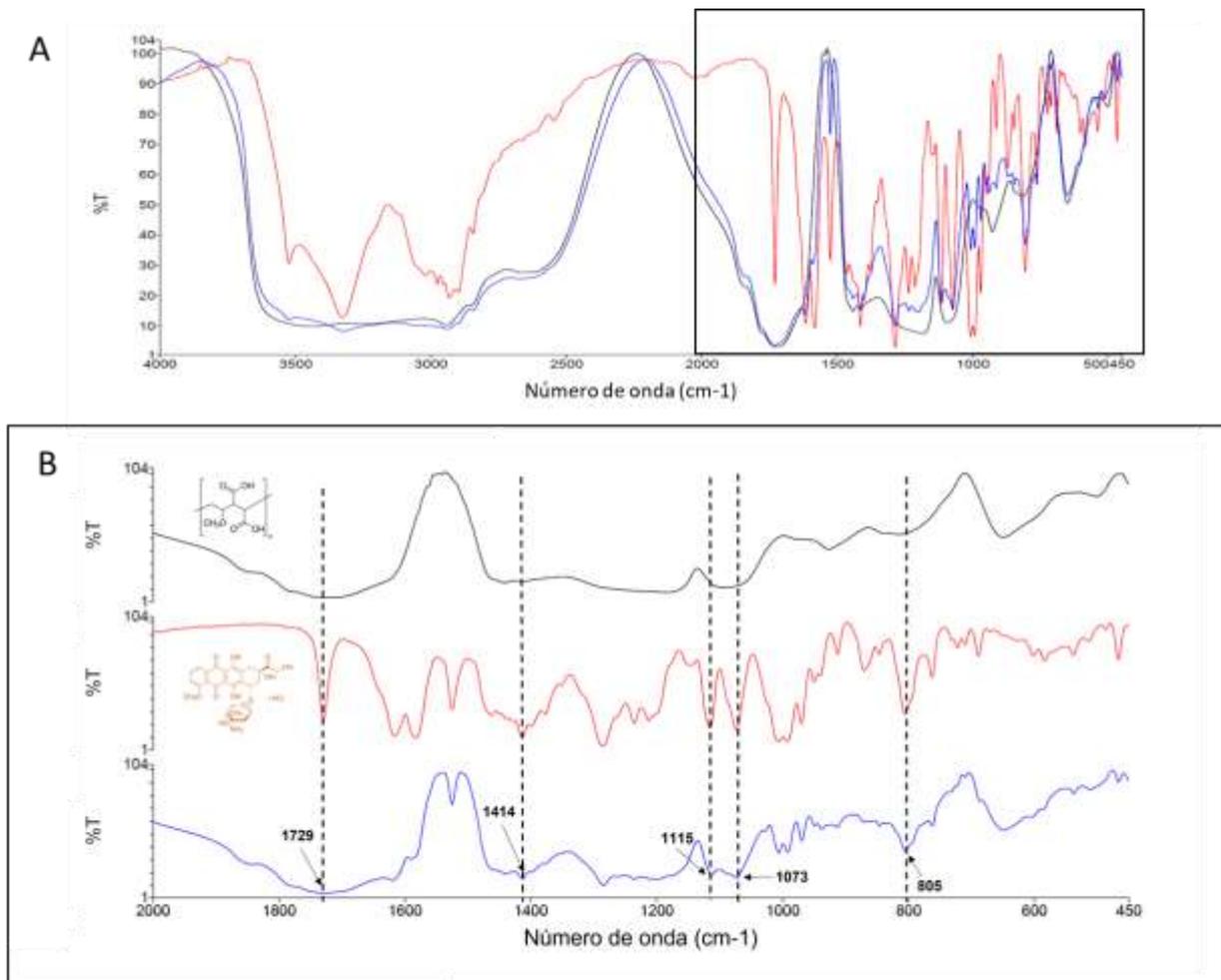


Figura 13. Espectros de Infrarrojo de PMVEMA-Ac/DOX. A) Sobreposición de los espectros de infrarrojo de PMVEMA-Ac (negro), Doxorubicina (rojo) y PMVEMA-Ac con Doxorubicina (azul). B) Huella digital del espectro de infrarrojo, se identifican las frecuencias con líneas punteadas (cm^{-1}).

Por otro lado, en la Figura 14A se observa la sobreposición de los espectros de infrarrojo del PMVEMA-Ac, de TMZ y de PMVEMA-Ac/TMZ. En cuanto al espectro de PMVEMA-Ac/TMZ se logró identificar la banda a 1678 cm^{-1} proveniente de la vibración de flexión de los enlaces N-H, así como de la tensión del enlace C=N y de C=C, a 1402 cm^{-1} la frecuencia de tensión del enlace C-N y las correspondientes frecuencias a 952 , 730 y 710 cm^{-1} representativas de la huella digital de TMZ (Figura 14B), todas las bandas indicadas se marcan en línea discontinua. De nuevo se confirmó la presencia del fármaco encapsulado en las nanofibras poliméricas (43).

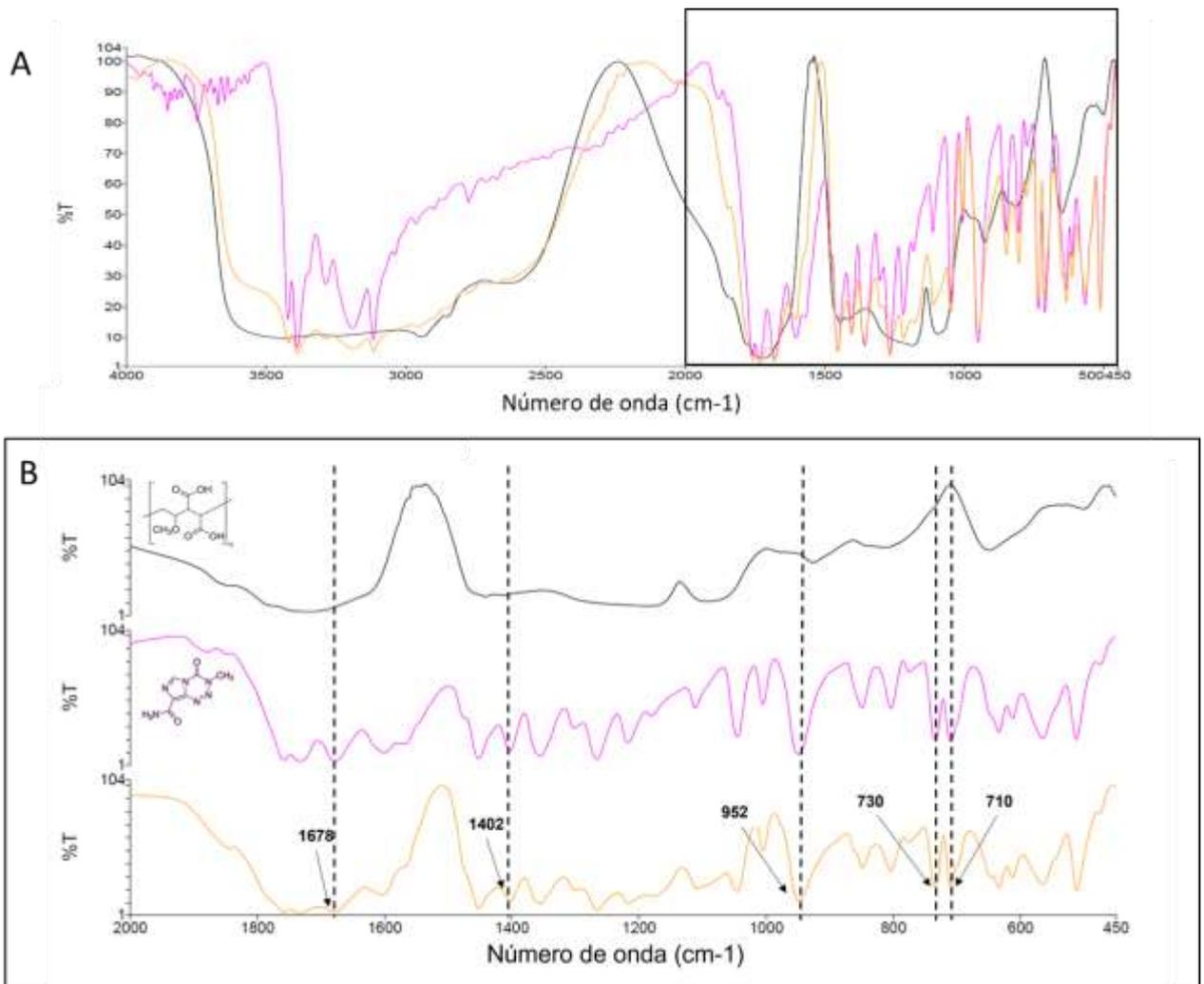


Figura 14. Espectros de Infrarrojo de PMVMEA-Ac/TMZ. A) Sobreposición de los espectros de infrarrojo de PMVMEA-Ac (negro), TMZ (rosa) y PMVMEA-Ac con TMZ (amarillo). B) Huella digital del espectro de infrarrojo, se identifican las frecuencias con líneas punteadas (cm^{-1}).

Cabe destacar que se observaron diferencias en la huella digital de los espectros de infrarrojo de la TMZ libre en solución acuosa y TMZ encapsulada en la solución polimérica, destacando la pérdida de las frecuencias diferenciadas 1758 y 1732 cm^{-1} representativas de grupos amida de la molécula (Figura 15B).

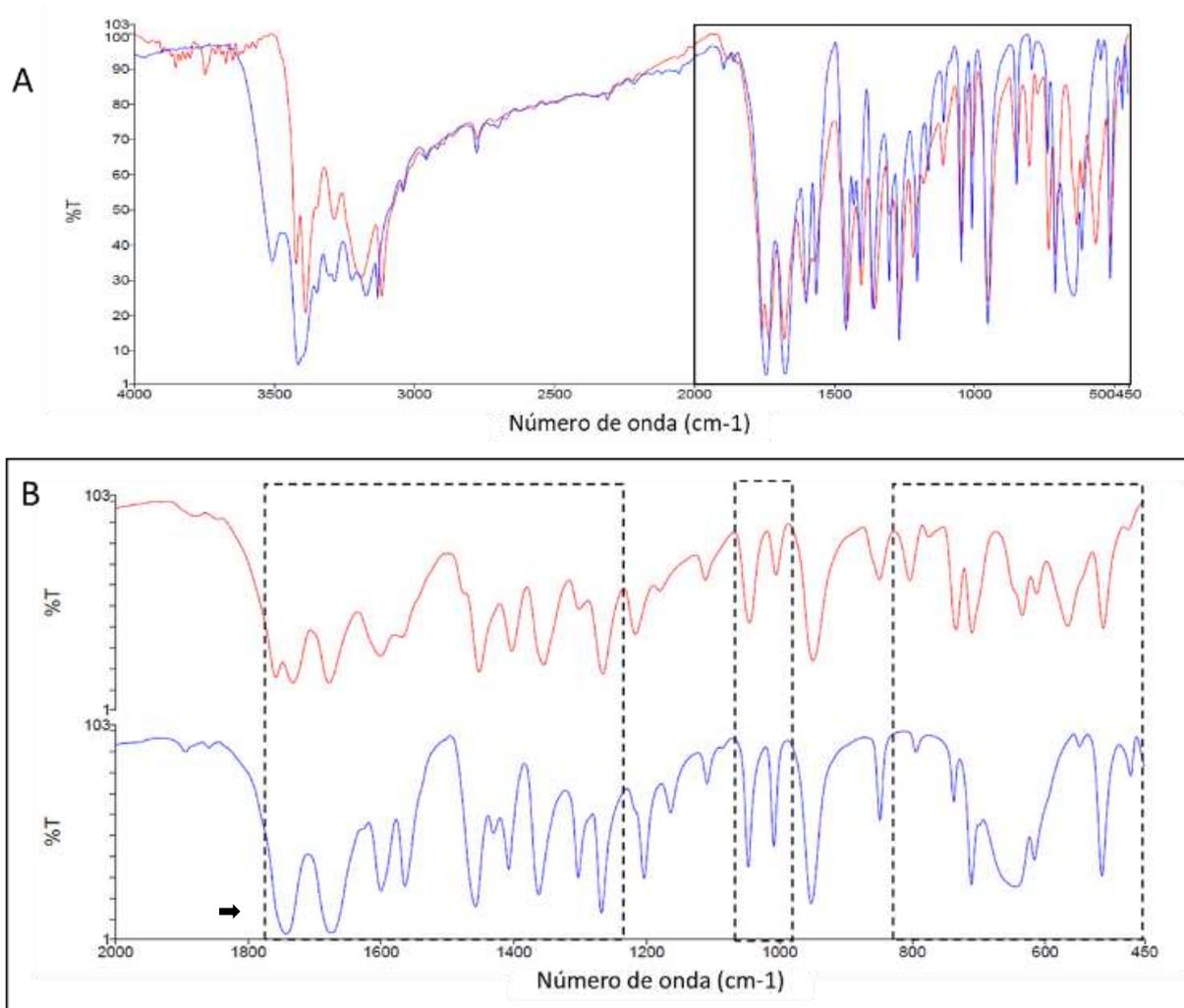


Figura 15. Espectro de infrarrojo de TMZ. Sobreposición de los espectros de infrarrojo de TMZ (rojo) y TMZ liofilizada (azul). B) Huella digital del espectro de infrarrojo, con líneas punteadas se marcan las regiones entre las que hay diferencias; Flecha negra destaca la pérdida de la amida.

Sin embargo, cuando la muestra se analizó por espectroscopía de UV-visible, se observó que longitudes de onda representativas de TMZ 330, 260 y 210 nm prevalecieron en la muestra de partida (*stock*) usada para los tratamientos, así como en la muestra liofilizada. Así mismo, se realizó una prueba añadiendo 100 μ L de hidróxido de sodio (NaOH) 0,2 M, tras 15 min se observó la pérdida de las bandas de TMZ y la formación del compuesto MTIC (Figura 16).

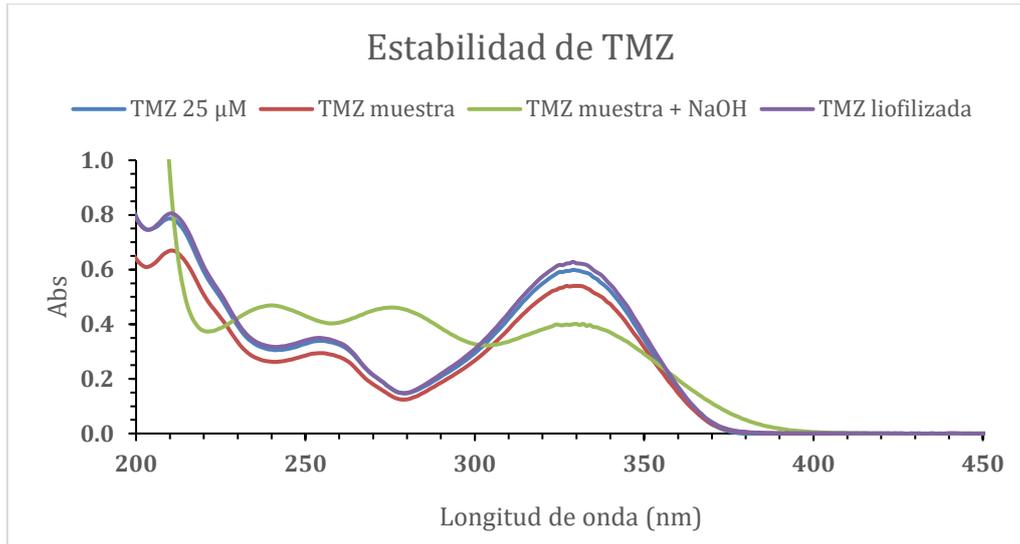


Figura 16. Espectro UV de TMZ. Se observan los espectros de absorbancia de TMZ patrón recién preparado 25 μM (azul), TMZ muestra a 22 μM (rojo), TMZ muestra + 0,1mL NaOH 0,2 M y TMZ liofilizada, $t=15$ min (verde).

Análisis de la fluorescencia de nanofibras PMVEMA-Ac/DOX

En cuanto al análisis de fluorescencia de las nanofibras de PMVEMA-Ac, no mostraron fluorescencia cuando fueron excitadas a la longitud de onda de 470 nm (Figura 17). Sin embargo, cuando la DOX fue encapsulada en las nanofibras poliméricas se observó fluorescencia en su longitud de emisión de 590 nm (Figura 17), por lo que se pudo confirmar la presencia de DOX en las nanofibras y su distribución homogénea.

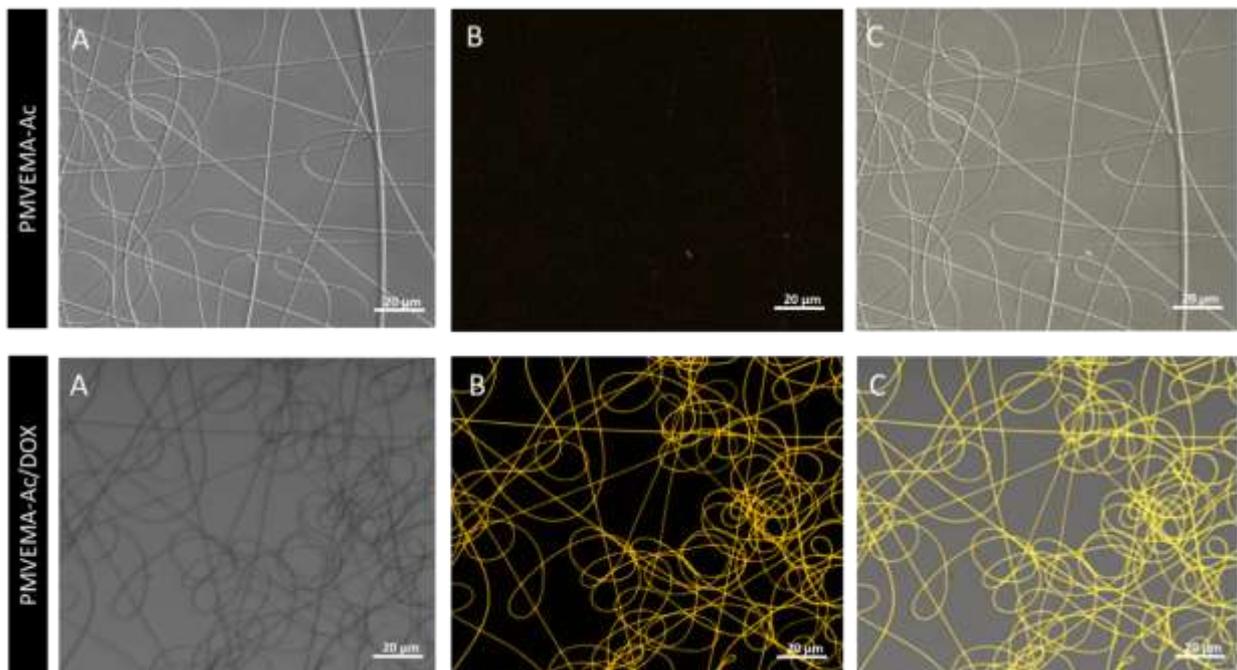


Figura 17. Fotografías tomadas por microscopía confocal de nanofibras PMVEMA-Ac/DOX 1 %. A) Campo claro B) Fluorescencia C) Sobreposición de A y B. $\lambda_{exc}= 475$ nm, $\lambda_{em}= 590$ nm.

Efecto de las nanofibras PMVEMA-AC/Antineoplásico sobre la viabilidad de células tumorales

Se exploraron las propiedades farmacológicas de los antineoplásicos encapsulados, estudiando inicialmente el efecto de las nanofibras poliméricas sin fármaco a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular de la línea GB-37. Observamos que el polímero a bajas concentraciones no afectó la viabilidad celular (Figura 18), lo cual es consistente con los estudios de PMVEMA realizados previamente, para la línea celular SW480 utilizada en este trabajo y para línea HaCaT de queratinocitos humanos (41).

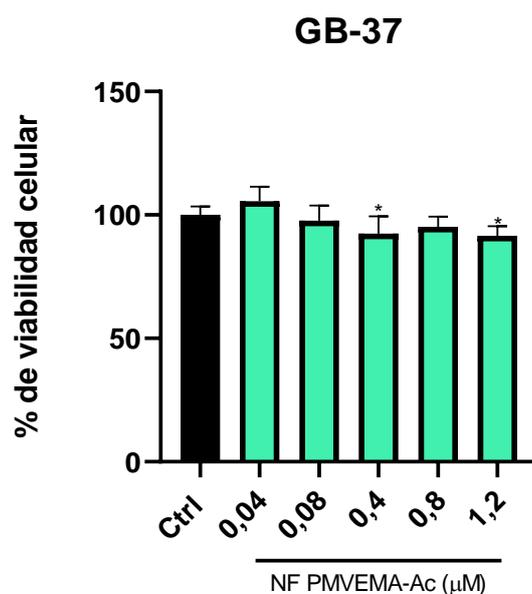


Figura 18. Viabilidad de las células GB-37 tratadas con diferentes concentraciones de nanofibras PMVEMA-Ac (verde). La viabilidad celular se muestra en porcentaje en relación con el control sin tratamiento ($*p < 0,05$). $n=6$ (media \pm SD).

Ensayos preliminares de viabilidad de las células SW480 y M220 con nanofibras PMVEMA-Ac/DOX

De igual manera, se realizó un estudio preliminar del efecto de las nanofibras de PMVEMA-Ac/DOX sobre la viabilidad de células SW480 y M220, debido a los antecedentes establecidos del uso clínico de las antraciclinas en cáncer de páncreas, gástrico y colorrectal (18,21). Los resultados del ensayo MTT realizado a las 24 h postratamiento mostraron un bajo efecto sobre la viabilidad de ambas líneas celulares. Sin embargo, fue más pronunciado a las 72 h postratamiento, mostrando un efecto dependiente de dosis a la DOX encapsulada, siendo

1,4 μM la concentración mínima a la cual se observó un efecto con 0,04 μM de PMVEMA-Ac, respecto al Mw. Por otro lado, se observó que a partir de 0,9 y hasta 8,5 μM de PMVEMA-Ac, respecto al Mw, hubo una disminución significativa sobre la viabilidad celular de la línea M220 (Figura 19).

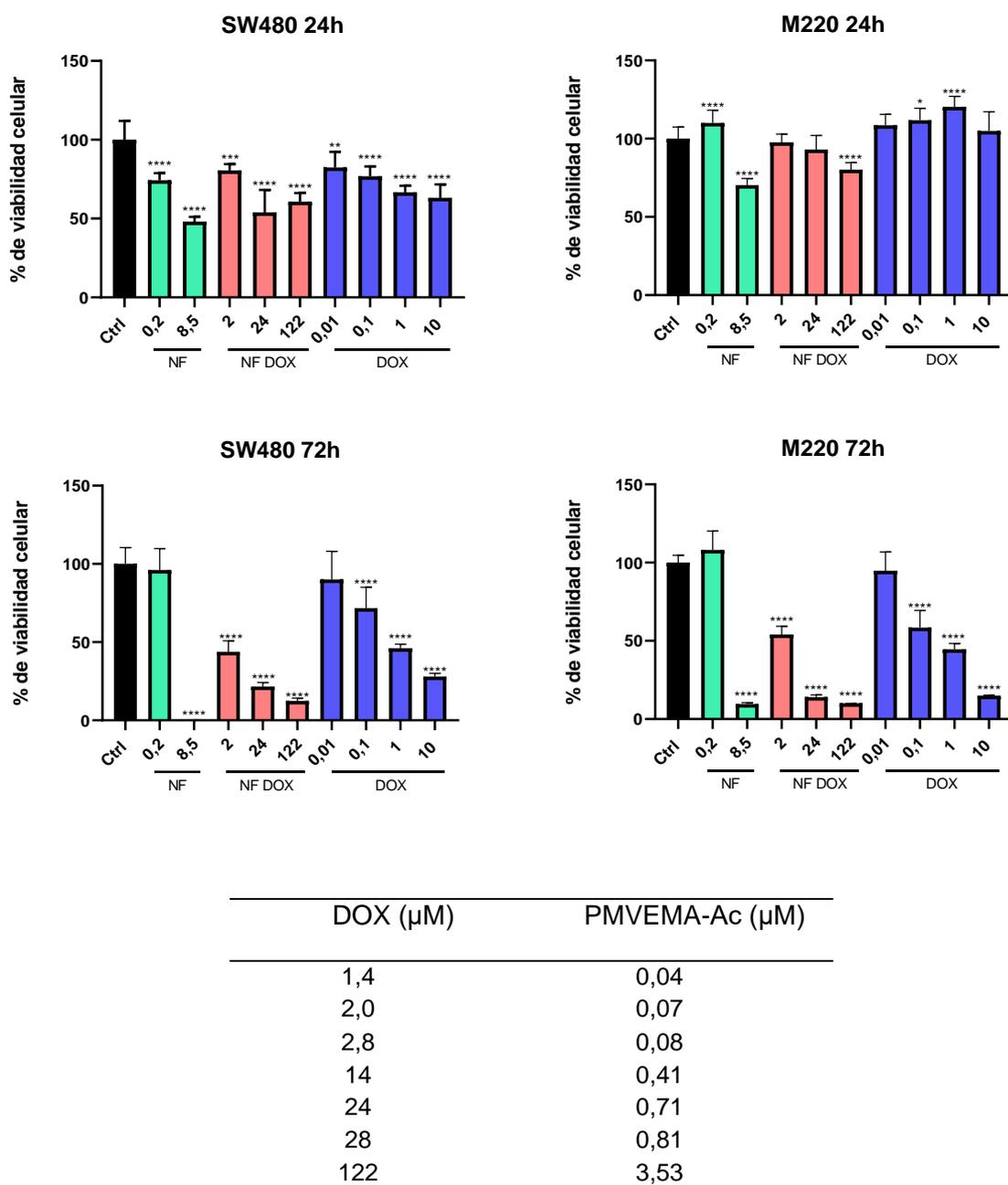


Figura 19. Viabilidad de células SW480 y M220 tratadas con diferentes concentraciones (μM) de nanofibras poliméricas cargadas con (rojo) y sin DOX (verde), así como DOX libre (azul) a 24 h y 72 h postratamiento. Tabla de concentraciones de las nanofibras por pocillo. La viabilidad celular se muestra en porcentaje en relación con el control sin tratamiento (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). $n=6$ (media \pm SD).

Ensayos de viabilidad de las células GB-37 y GB-42 con nanofibras PMVEMA-Ac/TMZ y BCNU

Una vez estandarizados los ensayos celulares se procedió a estudiar la viabilidad de las células GB-37 y GB-42 (72 h). Los resultados de viabilidad celular mostraron un efecto dependiente de dosis similar al observado en las líneas celulares SW480 y M220, siendo 1,4 μM la concentración mínima a la cual se observó un efecto junto con 0,04 μM de PMVEMA-Ac, respecto al Mw (Figura 20).

De igual manera, en la Figura 20 observamos que las concentraciones encapsuladas de DOX disminuyeron la viabilidad celular al igual que lo hizo en su estado libre. De esta forma se determinó que el proceso de síntesis de nanofibras poliméricas no afectó la capacidad del fármaco de disminuir la viabilidad de células tumorales.

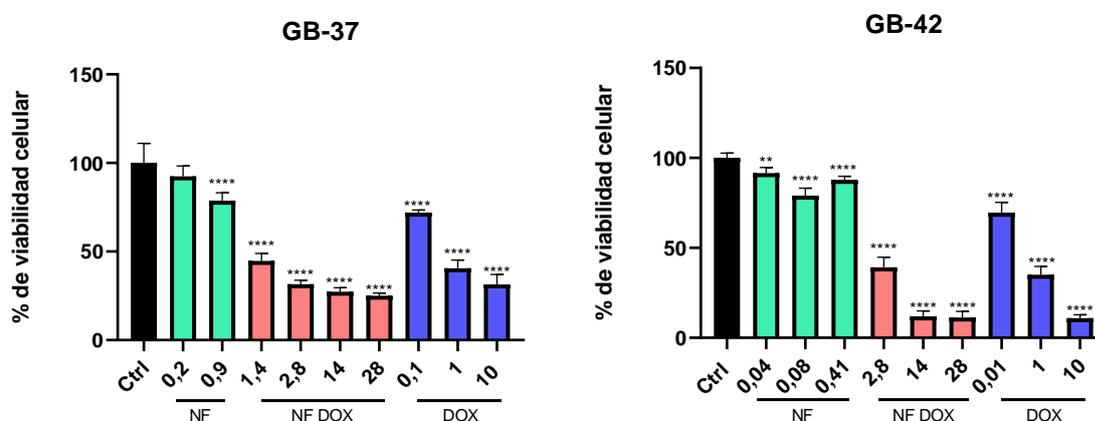


Figura 20. Viabilidad de células GB-37 y GB-42 tratadas con diferentes concentraciones (μM) de nanofibras sin DOX (verde), con DOX (rojo) y DOX libre (azul) a 72 h posttratamiento. La viabilidad celular se muestra en porcentaje en relación con el control sin tratamiento (** $p = 0,0003$; **** $p < 0,0001$. $n=6$ (media \pm SD).

Por otro lado, las nanofibras PMVEMA-Ac/TMZ indujeron una disminución significativa en la viabilidad celular de las líneas GB-37 y GB-42 alcanzado el mayor efecto a 78 μM de DOX junto con 0,76 μM de polímero, respecto al Mw (Figura 21). Aunque el efecto dependiente de dosis fue claro, la viabilidad se redujo menos de un 50 %.

TMZ (μM)	PMVEMA-Ac (μM)
8	0,08
39	0,38
78	0,76

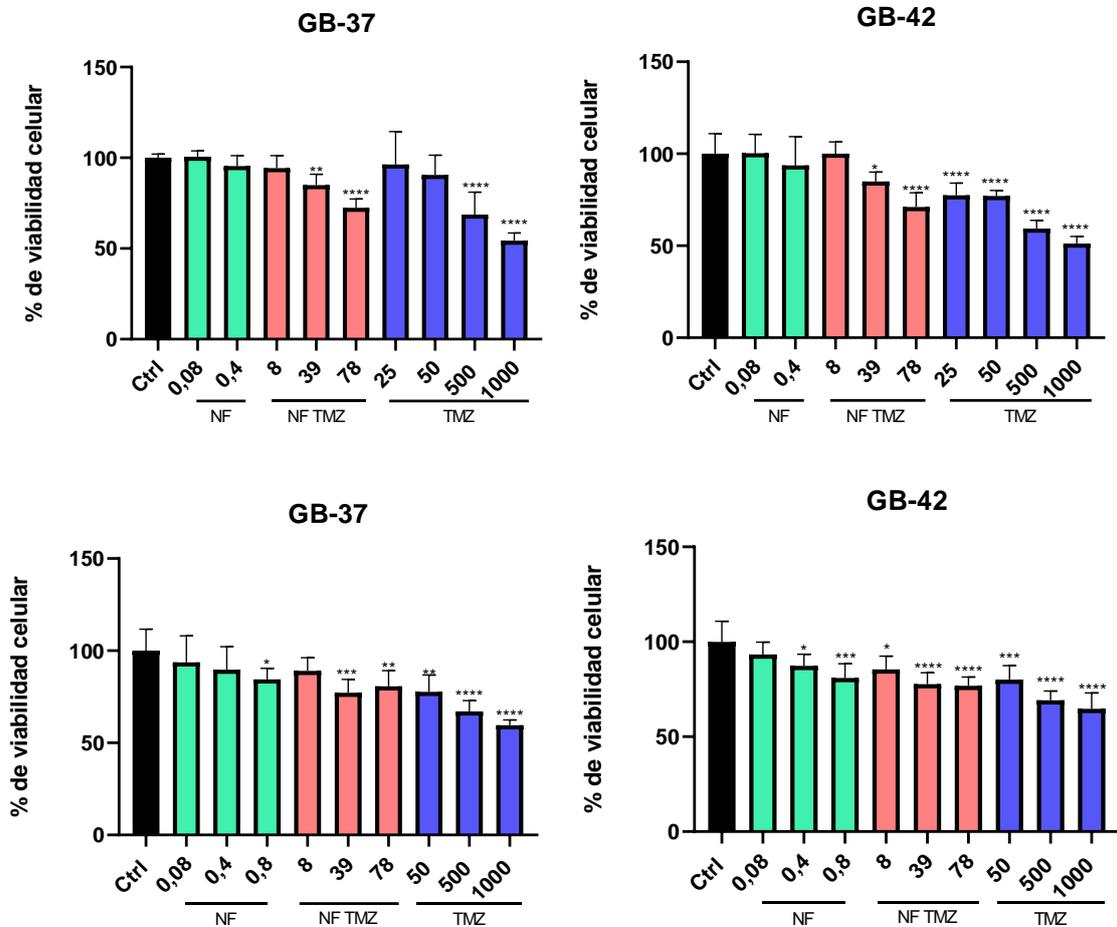


Figura 21. Viabilidad de células GB-37 y GB-42 tratadas con diferentes concentraciones (μM) de nanofibras sin TMZ (verde), con TMZ (rojo) y TMZ libre (azul) a 72 h postratamiento. Tabla de concentraciones de las nanofibras por pocillo. La viabilidad celular se muestra en porcentaje en relación con el control sin tratamiento (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). $n=6$ (media \pm SD).

Cuando se evaluó el efecto sobre la viabilidad celular de las nanofibras poliméricas cargadas con BCNU, se observó que la disminución en la viabilidad es dependiente de dosis y significativa a su concentración. Sin embargo, la viabilidad se redujo menos de un 50 %; el caso contrario ocurre cuando se encuentra en estado libre, observando que una concentración de 50 μM indujo una disminución en la viabilidad celular igual o mayor que 75 μM de BCNU encapsulada (Figura 22).

BCNU (μM)	PMVEMA-Ac (μM)
8	0,08
38	0,40
75	0,80

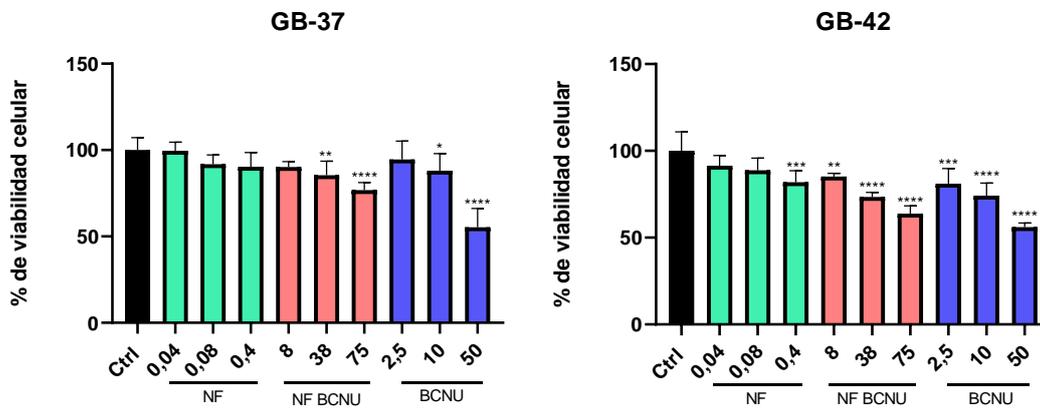


Figura 22. Viabilidad de células GB-37 y GB-42 tratadas con diferentes concentraciones (μM) de nanofibras cargadas con (rojo) y sin BCNU (verde) y BCNU libre (azul) a 72 h postratamiento. Tabla de concentraciones de las nanofibras por pocillo. La viabilidad celular se muestra en porcentaje en relación con el control sin tratamiento (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). $n=6$ (media \pm SD).

Acumulación intracelular de DOX encapsulada

Continuando con la investigación de las nanofibras de PMVEMA-Ac/DOX se estudió la intensidad de fluorescencia de la internalización de DOX encapsulada y libre, en las células GB-37 y GB42, a las longitudes de onda utilizadas anteriormente. Se observó que a partir de los 10 min se alcanzó el punto de saturación intracelular de DOX libre y encapsulada, siendo 10 y 14 μM las concentraciones a las cuales se observaba la mayor intensidad de fluorescencia, respectivamente. Por otro lado, no se observaron diferencias entre los tiempos de tratamientos 10, 30 y 60 min en las dos líneas celulares (Figura 23).

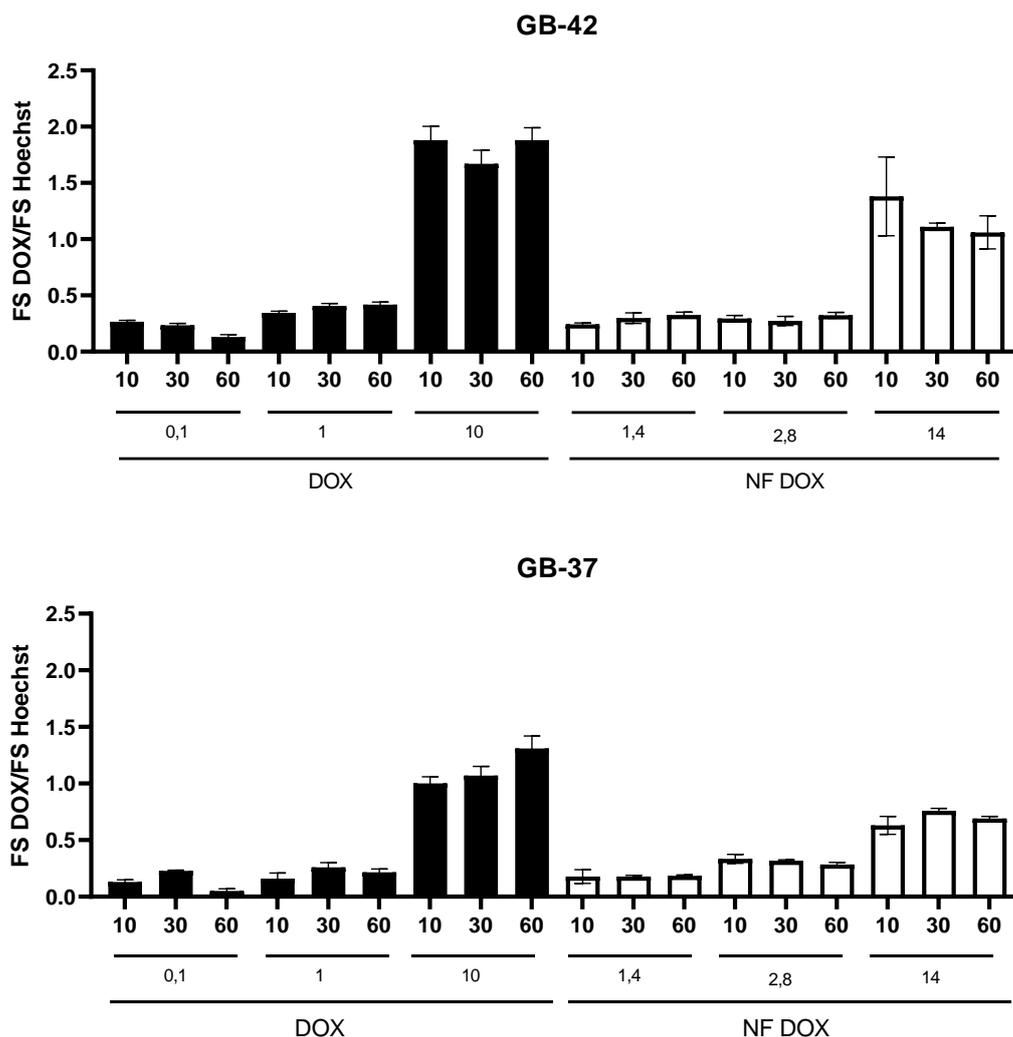


Figura 23. Acumulación intracelular en las líneas GB-42 y GB-37 de DOX encapsulada. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones (μM) de DOX libre (negro) y encapsulada (blanco) a 10, 30 y 60 min. La intensidad de fluorescencia de DOX se normalizó con respecto a la de Hoechst (Eje Y). $n=3$ (media \pm SD).

Finalmente, se realizó el ensayo de acumulación a 20 min de las concentraciones estudiadas, en el cual se observó un aumento en la acumulación intracelular dependiente de la concentración de tratamiento, siendo 10 y 14 μM de DOX libre y encapsulada respectivamente, las concentraciones a las cuales se observó la mayor intensidad de fluorescencia (Figura 24).

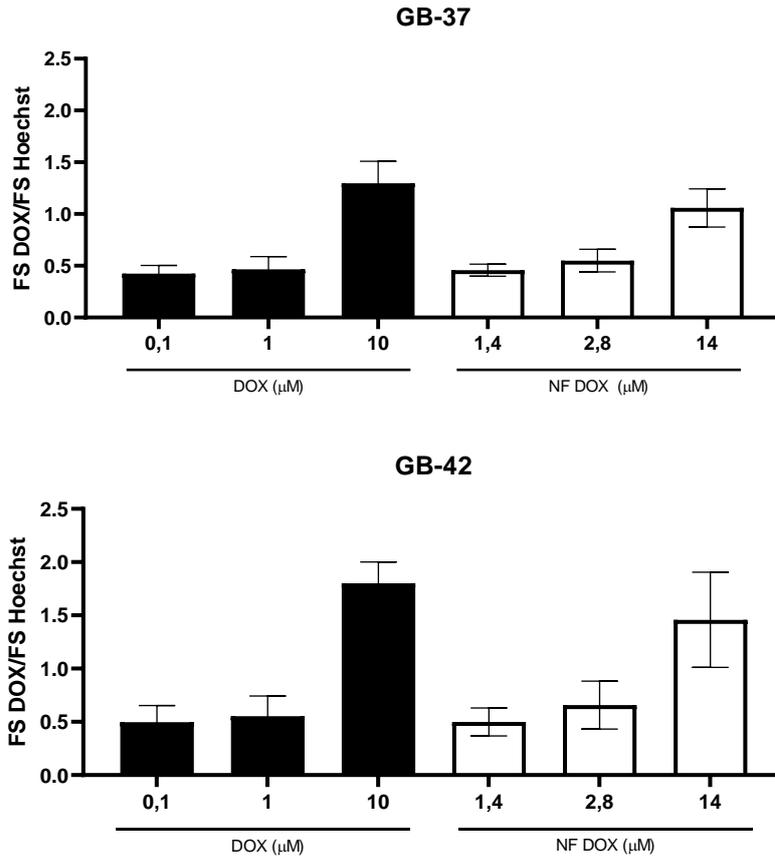


Figura 24. Acumulación intracelular en las líneas GB-37 y GB-42 de DOX encapsulada. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones (μM) de DOX libre (negro) y encapsulada (blanco) a 20 min. La intensidad de fluorescencia de DOX se normalizó con respecto a la de Hoechst (Eje Y). $n=3$ (media \pm SD).

Discusión

En la actualidad existen diversas estrategias de encapsulación y liberación de fármacos para tratar tipos de cáncer como el glioblastoma. Sin embargo, tienen una alta incidencia de efectos secundarios, por lo que la búsqueda de nuevos sistemas de liberación de fármacos antineoplásicos es de suma importancia.

Este trabajo tiene como objetivo estandarizar la síntesis y caracterización de nanofibras de PMVEMA-Ac como sistema de liberación de DOX, TMZ y BCNU para el tratamiento del glioblastoma. Trabajos previos en nuestro grupo de investigación han establecido el uso de PMVEMA para sintetizar nanofibras poliméricas, y su implementación para la encapsulación de compuestos activos como el L-mentol, 5-ALA, antibióticos, entre otros (39–41). Sin embargo, aunque los parámetros de síntesis de nanofibras del polímero base haya sido establecida con anterioridad, la estandarización para su uso en la encapsulación de fármacos antineoplásicos aún no se ha ensayado.

A partir de los antecedentes de trabajo con PMVEMA-Ac 20 % (p/p), conociendo la viscosidad del polímero de 1748 centipoise (cP), encontrándose, por tanto, entre los 1000-2000 cP que es el rango de viscosidad ideal de una solución para la síntesis de nanofibras (44).

Cuando analizamos los diámetros de las nanofibras poliméricas vemos que todos se encuentran entre 300 y 400 nm, aunque el estrechamiento y ensanchamiento del diámetro puede deberse a una alteración en las propiedades conductivas de la solución por la incorporación del fármaco y/o a las condiciones ambientales de experimentación, ya que los valores oscilan entorno a un 10 %. La proporción 1:20 (% p/p) fármaco/PMVEMA-Ac no afectó a la síntesis de nanofibras por electrohilado (Figura 12) (34), lo que es consistente con lo reportado para su encapsulación en nanofibras poliméricas. Cabe destacar que el aumento en el diámetro de las nanofibras poliméricas con BCNU (Figura 11), se puede asociar a las propiedades hidrofóbicas del fármaco (34,36,38).

Por otro lado, la caracterización por espectroscopía de infrarrojo de las nanofibras nos muestra una clara diferencia entre los espectros del PMVEMA-Ac y de los antineoplásicos encapsulados. Sin embargo, debido al porcentaje de encapsulación, el espectro del polímero se sobrepone por encima del de DOX, TMZ y BCNU, en el caso de este último enmascarando las bandas del fármaco. Aun así, la técnica de microscopia confocal nos permite confirmar la encapsulación de DOX en las nanofibras a su longitud de onda de emisión (Figura 17). Esto es un indicador de que el proceso de síntesis de nanofibras no afecta a las propiedades fluorescentes del fármaco, como se ha reportado para su encapsulación en otras nanoestructuras poliméricas (38,41,45). En el caso de la eficiencia de encapsulación en los

fármacos no fluorescentes se deberán emplear otras técnicas basadas en métodos de separación e identificación de los mismos. De igual manera, es importante destacar la desaparición de las frecuencias a 1758 y 1732 cm^{-1} asociados a grupos amida (Figura 15), ya que podría indicar la posible degradación de TMZ en medio acuoso, fenómeno que se puede atribuir a la hidrólisis del profármaco de TMZ a MTIC. Sin embargo, cuando observamos su espectro de UV-visible no se distinguen cambios en su pico representativo (330 nm) hasta que se le añade NaOH (Figura 16). A pesar de esto, el pH ácido de la disolución polimérica podría afectar la conversión química del profármaco y estabilizarlo en disolución hasta por más 7 días, según lo publicado por otros autores (43,45). Estudios sobre la estabilidad de TMZ a altas concentraciones en medio acuoso se llevarán a cabo para discernir entre estas dos versiones.

En cuanto a la evaluación del efecto de los fármacos encapsulados sobre la viabilidad de las células GB-37 y GB-43, podemos observar resultados diferentes dependiendo del fármaco. En cuanto a la aplicación de DOX, observamos una clara disminución en la viabilidad celular dependiente de dosis a la concentración libre y encapsulada (Figura 20). Este resultado es comparable con otros estudios de encapsulación del fármaco en nanoestructuras poliméricas para tratar glioblastoma, los cuales indican de manera indirecta un posible efecto antiproliferativo (28,46,47). Es importante destacar la relevancia de caracterizar el efecto de DOX sobre el glioblastoma, ya que su administración sistémica en clínica limita su implementación para glioblastoma y tiene alto riesgos de cardiotoxicidad, por lo que su administración local podría ampliar su uso y disminuir sus efectos secundarios (30,48).

Resaltando la relevancia de continuar la caracterización de DOX en glioblastoma, se realizaron los ensayos de acumulación intracelular en las líneas GB-37 y GB-42. Es importante destacar que el tiempo de acumulación mínimo para DOX en otros ensayos es de 1 h (29) y como se observa en la Figura 23, la saturación intracelular se alcanza a los 10 min, por lo que a los 20 min se observa el valor más alto de fluorescencia a 10 y 14 μM (DOX libre y PMVEMA-Ac/DOX). Señalando que en la línea GB-42 hubo mayor intensidad de fluorescencia lo cual implica mayor concentración intracelular de DOX, tanto libre como encapsulada (Figura 24). Esto puede estar relacionado con la posible resistencia de la línea de GB-37 a DOX, ya que hay una amplia gama de transportadores de membranas asociados a la quimioresistencia, tales como los transportadores dependientes de ATP (ABC) B1, B5, C2 y G2. Dichos transportadores están involucrados en la expulsión de DOX al medio extracelular, por lo que su expresión en células GB-37 podría significar una menor acumulación intracelular del fármaco (9,16,49).

De manera simultánea al estudio del efecto farmacológico de DOX, se evaluó el efecto de TMZ sobre las células GB-37 y GB-42. El efecto observado fue menor del que cabía esperar

para un fármaco con efectos directos sobre glioblastoma (Figura 21). Aunque, estudios previos muestran que las líneas celulares estudiadas son sensibles a altas concentraciones de TMZ, por lo que incrementar su concentración encapsulada a más de 1 mM por pocillo podría disminuir la viabilidad celular, al igual que lo hace en su estado libre (31).

Igualmente, debido a las diferencias en los espectros de infrarrojo de la TMZ libre y encapsulada, podemos asumir que TMZ libre en disolución acuosa, se encuentra en un proceso de hidrólisis de su estado de profármaco a fármaco, mientras que la TMZ en disolución con PMVEMA-Ac mantiene su estructura inicial debido al pH ácido de la muestra. Por lo tanto, el tiempo de hidrólisis del fármaco a su estado de agente alquilante podría estar alterado. Debido a esto, analizar el cambio de pH de los tratamientos puede ser determinante para establecer su intervalo de tiempo de acción sobre la viabilidad celular (13,43).

Por otro lado, es importante señalar el bajo efecto de BCNU encapsulada sobre la viabilidad celular de GB-37 y GB-42 (Figura 22) en comparación con el efecto en su estado libre. Aunque GB-42 sea más sensible al fármaco que las células GB-37 (50), se observa menos de un 50 % de reducción en la viabilidad con los tratamientos, por lo que el proceso de síntesis de nanofibras podría afectar a su estructura y actividad antiproliferativa.

A pesar de que el efecto farmacológico de TMZ y de BCNU encapsulada no es claro, aumentar su concentración en las nanofibras manteniendo la concentración del polímero podría mejorar su rendimiento. De igual manera, se explorarán técnicas de caracterización de la eficiencia de encapsulación de fármacos más sensibles, así como el uso de derivados del PMVEMA más hidrofóbicos como el PMVEMA-Es, que, por su naturaleza, podría ser un mejor candidato para la síntesis de nanofibras con BCNU (33,44).

Finalmente, el análisis del efecto de las nanofibras PMVEMA-Ac/DOX mostró efectos significativos sobre la viabilidad de GB-73 y GB-42 además sus propiedades fluorescentes lo hacen un excelente candidato para su monitoreo en ensayos celulares y durante la caracterización de nanofibras.

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- Se determinó una concentración de encapsulación promedio para los fármacos de 1:20 en disolución acuosa (% p/p) respecto al PMVEMA-Ac, sin afectar a la capacidad de la disolución polimérica de formar nanofibras.
- Las nanofibras presentaron diferentes diámetros entre los 300 y los 400 nm, según el fármaco encapsulado, para la DOX se obtuvo un diámetro de 311 ± 26 nm, para la TMZ de 356 ± 40 nm y para BCNU de 381 ± 30 nm.
- La caracterización por espectroscopía de infrarrojo de las nanofibras poliméricas cargadas con antineoplásico mostró algunas limitaciones debido a la baja concentración de encapsulación con respecto al polímero.
- La encapsulación de DOX en las nanofibras de PMVEMA-Ac no afecta a sus propiedades fluorescentes, lo que la vuelve un candidato excelente para su monitorización durante los tratamientos.
- Se estableció el tiempo de tratamiento para el ensayo de MTT de 72 h y las concentraciones óptimas superiores a $1 \mu\text{M}$ para el estudio con DOX encapsulada en las líneas SW480 y M220, resultados que fueron equiparables con las líneas GB-37 y GB-42 en los cuales se observó su internalización celular a los 10 min.
- Los efectos de la TMZ y del BCNU encapsulada sobre la viabilidad celular de las líneas de GBM fueron muy bajos con respecto al efecto de DOX.

En resumen, la síntesis de nanofibras de PMVEMA-Ac mediante electrohilatura, permitió la encapsulación de fármacos antineoplásicos, destacando a las nanofibras de PMVEMA-Ac/DOX, por lo que se continuará trabajando en su caracterización como tratamiento de GBM. Por otro lado, se continuarán estudiando los efectos físicos y químicos del PMVEMA-Ac sobre estos fármacos, como el efecto del pH y se explorarán técnicas de caracterización molecular más sensibles a bajas concentraciones de fármacos y se estudiará la encapsulación de antineoplásicos en nanofibras con derivados hidrofóbicos del PMVEMA.

Bibliografía

1. Cancer - PAHO/WHO | Pan American Health Organization [Internet]. [citado 18 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/en/topics/cancer>
2. Pelengaris S, Khan M. *The Molecular Biology of Cancer: A Bridge from Bench to Bedside*. John Wiley & Sons; 2013. 632 p.
3. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol*. 2 de agosto de 2021;23(8):1231-51.
4. Cancer today [Internet]. [citado 18 de junio de 2023]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
5. Melhem JM, Detsky J, Lim-Fat MJ, Perry JR. Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma. *Neurotherapeutics*. octubre de 2022;19(6):1705-23.
6. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults. *The Lancet*. agosto de 2018;392(10145):432-46.
7. Cordova JS, Shu HKG, Liang Z, Gurbani SS, Cooper LAD, Holder CA, et al. Whole-brain spectroscopic MRI biomarkers identify infiltrating margins in glioblastoma patients. *Neuro-Oncol*. agosto de 2016;18(8):1180-9.
8. Posti JP, Bori M, Kauko T, Sankinen M, Nordberg J, Rahi M, et al. Presenting symptoms of glioma in adults. *Acta Neurol Scand*. 2015;131(2):88-93.
9. Martínez-Lacaci I, García Morales P, Soto JL, Saceda M. Tumour cells resistance in cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. enero de 2007;9(1):13-20.
10. Martínez R. Beyond Genetics in Glioma Pathways: The Ever-Increasing Crosstalk between Epigenomic and Genomic Events. *J Signal Transduct*. 18 de junio de 2012;2012:1-9.
11. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research* julio de 2000; 6, 2585–2597.
12. Wesolowski JR, Rajdev P, Mukherji SK. Temozolomide (Temodar). *Am J Neuroradiol*. septiembre de 2010;31(8):1383-4.
13. Lopes IC, De Oliveira SCB, Oliveira-Brett AM. Temozolomide chemical degradation to 5-aminoimidazole-4-carboxamide – Electrochemical study. *J Electroanal Chem*. septiembre de 2013;704:183-9.
14. Lin SH, Kleinberg LR. Carmustine wafers: localized delivery of chemotherapeutic agents in CNS malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther*. marzo de 2008;8(3):343-59.
15. Fleming AB, Saltzman WM. Pharmacokinetics of the Carmustine Implant: *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(6):403-19.
16. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(4):853.

17. Shah S, Chandra A, Kaur A, Sabnis N, Lacko A, Gryczynski Z, et al. Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *J Photochem Photobiol B*. mayo de 2017;170:65-9.
18. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. junio de 2004;56(2):185-229.
19. Lesniak MS, Upadhyay U, Goodwin R, Tyler B, Brem H. Local Delivery of Doxorubicin for the Treatment of Malignant Brain Tumors in Rats. *ANTICANCER Res*. 2005;
20. Von Hoff DD. Risk Factors for Doxorubicin-Induced Congestive Heart Failure. *Ann Intern Med*. 1 de noviembre de 1979;91(5):710.
21. Ros M, Iorio A, Lucchesi M, Stival A, Martino M, Sardi I. The Use of Anthracyclines for Therapy of CNS Tumors. *Anticancer Agents Med Chem*. 10 de junio de 2015;15(6):721-7.
22. Anderson AR, Segura T. Injectable Biomaterials for Treatment of Glioblastoma. *Adv Mater Interfaces*. octubre de 2020;7(20):2001055.
23. Mabrouk M, Das DB, Salem ZA, Beherei HH. Nanomaterials for Biomedical Applications: Production, Characterisations, Recent Trends and Difficulties. *Molecules*. 18 de febrero de 2021;26(4):1077.
24. Melchor-Martínez EM, Torres Castillo NE, Macias-Garbett R, Lucero-Saucedo SL, Parra-Saldívar R, Sosa-Hernández JE. Modern World Applications for Nano-Bio Materials: Tissue Engineering and COVID-19. *Front Bioeng Biotechnol*. 14 de mayo de 2021;9:597958.
25. Tiwari JN, Tiwari RN, Kim KS. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Prog Mater Sci*. mayo de 2012;57(4):724-803.
26. Akilo OD, Choonara YE, Strydom AM, Du Toit LC, Kumar P, Modi G, et al. AN in vitro evaluation of a carmustine-loaded Nano-co-Plex for potential magnetic-targeted intranasal delivery to the brain. *Int J Pharm*. marzo de 2016;500(1-2):196-209.
27. Yang HW, Wei KC, Lin FW, Huang CY, Ma CCM, Chen JY, et al. 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-loaded bovine serum albumin nanoparticles with dual magnetic resonance–fluorescence imaging for tracking of chemotherapeutic agents. *Int J Nanomedicine*. agosto de 2016;Volume 11:4065-75.
28. Yu J, Wang L, Xie X, Zhu W, Lei Z, Lv L, et al. Multifunctional Nanoparticles Codelivering Doxorubicin and Amorphous Calcium Carbonate Preloaded with Indocyanine Green for Enhanced Chemo-Photothermal Cancer Therapy. *Int J Nanomedicine*. enero de 2023;Volume 18:323-37.
29. Wang C, Zhang C, Li Z, Yin S, Wang Q, Guo F, et al. Extending Half Life of H-Ferritin Nanoparticle by Fusing Albumin Binding Domain for Doxorubicin Encapsulation. *Biomacromolecules*. 12 de marzo de 2018;19(3):773-81.
30. Ghaferi M, Raza A, Koochi M, Zahra W, Akbarzadeh A, Ebrahimi Shahmabadi H, et al. Impact of PEGylated Liposomal Doxorubicin and Carboplatin Combination on Glioblastoma. *Pharmaceutics*. 13 de octubre de 2022;14(10):2183.

31. Araujo-Abad S, Manresa-Manresa A, Rodríguez-Cañas E, Fuentes-Baile M, García-Morales P, Mallavia R, et al. Glioblastoma-Derived Small Extracellular Vesicles: Nanoparticles for Glioma Treatment. *Int J Mol Sci.* 21 de marzo de 2023;24(6):5910.
32. Singh B, Kim K, Park MH. On-Demand Drug Delivery Systems Using Nanofibers. *Nanomaterials.* 16 de diciembre de 2021;11(12):3411.
33. Martínez-Ortega L, Mira A, Fernandez-Carvajal A, Mateo CR, Mallavia R, Falco A. Development of A New Delivery System Based on Drug-Loadable Electrospun Nanofibers for Psoriasis Treatment. *Pharmaceutics.* 4 de enero de 2019;11(1):14.
34. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv.* mayo de 2010;28(3):325-47.
35. Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chem Rev.* 24 de abril de 2019;119(8):5298-415.
36. Liu SJ, Yang ST, Chen SM, Huang YC, Lee WH, Ho J, et al. Novel multi-drugs incorporating hybrid-structured nanofibers enhance alkylating agent activity in malignant gliomas. *Ther Adv Med Oncol.* 26 de septiembre de 2019;11:1758835919875555.
37. Liu SJ, Yang TC, Yang ST, Chen YC, Tseng YY. Biodegradable hybrid-structured nanofibrous membrane supported chemoprotective gene therapy enhances chemotherapy tolerance and efficacy in malignant glioma rats. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 5 de noviembre de 2018;46(sup2):515-26.
38. Liu Z, Luo X, Mo Y, Zhao P, Wang H, Fang Y, et al. Enzyme-Enhanced Codelivery of Doxorubicin and Bcl-2 Inhibitor by Electrospun Nanofibers for Synergistic Inhibition of Prostate Cancer Recurrence. *Pharmaceutics.* 10 de octubre de 2022;15(10):1244.
39. Mira A, Rubio-Camacho M, Alarcón D, Rodríguez-Cañas E, Fernández-Carvajal A, Falco A, et al. L-Menthol-Loadable Electrospun Fibers of PMVEMA Anhydride for Topical Administration. *Pharmaceutics.* 3 de noviembre de 2021;13(11):1845.
40. Mira A, Sainz-Urruela C, Codina H, Jenkins SI, Rodriguez-Diaz JC, Mallavia R, et al. Physico-Chemically Distinct Nanomaterials Synthesized from Derivates of a Poly(Anhydride) Diversify the Spectrum of Loadable Antibiotics. *Nanomaterials.* 8 de marzo de 2020;10(3):486.
41. Mira A, Mateo CR, Mallavia R, Falco A. Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) and ethyl monoester as building polymers for drug-loadable electrospun nanofibers. *Sci Rep.* 8 de diciembre de 2017;7(1):17205.
42. Bansal R, Singh R, Kaur K. Quantitative analysis of doxorubicin hydrochloride and arterolane maleate by mid IR spectroscopy using transmission and reflectance modes. *BMC Chem.* diciembre de 2021;15(1):27.
43. Łaszcz M, Kubiszewski M, Jedynek Ł, Kaczmarska M, Kaczmarek Ł, Łuniewski W, et al. Identification and Physicochemical Characteristics of Temozolomide Process-Related Impurities. *Molecules.* 11 de diciembre de 2013;18(12):15344-56.
44. Amariei N, Manea LR, Berteza AP, Berteza A, Popa A. The Influence of Polymer Solution on the Properties of Electrospun 3D Nanostructures. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* junio de 2017;209:012092.

45. Rubio-Camacho M, Martínez-Tomé MJ, Mira A, Mallavia R, Mateo CR. Formation of Multicolor Nanogels Based on Cationic Polyfluorenes and Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic monoethyl ester): Potential Use as pH-Responsive Fluorescent Drug Carriers. *Int J Mol Sci.* 4 de septiembre de 2021;22(17):9607.
46. Liu Z, Ji X, He D, Zhang R, Liu Q, Xin T. Nanoscale Drug Delivery Systems in Glioblastoma. *Nanoscale Res Lett.* 16 de febrero de 2022;17(1):27.
47. Zhang Q, Li Y, Lin ZY (William), Wong KKY, Lin M, Yildirimer L, et al. Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications. *Drug Discov Today.* septiembre de 2017;22(9):1351-66.
48. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of Chemotherapeutic Agents: Incidence, Treatment and Prevention. *Drug Saf.* 2000;22(4):263-302.
49. Huang Y, Sadée W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett.* agosto de 2006;239(2):168-82.
50. Ventero MP, Fuentes-Baile M, Quereda C, Perez-Valeciano E, Alenda C, Garcia-Morales P, et al. Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3. Calvo GF, editor. *PLOS ONE.* 27 de febrero de 2019;14(2):e0212581.