

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
BIOTECNOLOGÍA
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO 2023-2024

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

Autor

Joan Moll Carrió

Tutor académico

Dr. Ricardo Mallavia Marín

Cotutores

Biol. Pedro Valentín Badía Hernández y Dra. María Fuentes Baile

Departamento

Farmacología, Pediatría y Química Orgánica

Área

Química inorgánica

Resumen

El glioblastoma es un tipo de tumor cerebral de baja incidencia y con un mal pronóstico debido a su alta mortalidad. Actualmente, su tratamiento consiste en la resección quirúrgica seguido de quimioterapia y/o radioterapia. La carmustina (BCNU) es uno de los principales agentes terapéuticos usados en quimioterapia, y su administración se basa en las obleas de GLIADEL. En este trabajo, se propone la encapsulación de BCNU en nanofibras poliméricas de PMVEMA-Es como nuevo sistema de liberación. Se sintetizaron nanofibras de PMVEMA-Es con BCNU al 2, 4 y 8 %, mediante electrohilatura, y se analizaron mediante microscopia electrónica de barrido, obteniendo diámetros de 910, 737 y 855 nm, respectivamente. Posteriormente, se caracterizó su composición mediante el método de Bratton-Marshall, obteniéndose una eficacia de encapsulación del 70 % y un tiempo de liberación máximo de una hora, observándose una disminución en la velocidad de degradación del fármaco a 37 °C. Respecto a sus efectos biológicos, analizados por MTT y ciclo celular, no se observaron diferencias entre las propiedades antiproliferativas y citostáticas de la BCNU libre y encapsulada sobre las líneas celulares HGUE-GB-37 y 42 de glioblastoma, proponiendo a las nanofibras poliméricas como sistema de liberación de BCNU en terapias contra glioblastoma.

Palabras clave: nanofibras poliméricas; carmustina; PMVEMA-Es; electrohilatura; glioblastoma.

Abstract

Glioblastoma is a type of brain tumour with a low incidence and a poor prognosis due to its high mortality. Currently, its treatment consists of surgical resection followed by chemotherapy and/or radiotherapy. Carmustine (BCNU) is one of the main therapeutic agents used in chemotherapy, and its administration is based on GLIADEL wafers. In this work, encapsulation of BCNU in PMVEMA-Es polymeric nanofibers is proposed as a new delivery system. PMVEMA-Es nanofibers containing BCNU at 2, 4 and 8 % were synthesised by electrospinning and analysed by scanning electron microscopy, obtaining diameters of 910, 737 and 855 nm, respectively. Subsequently, their composition was characterised using the Bratton-Marshall method, obtaining an encapsulation efficiency of 70 % and a maximum release time of one hour, with a decrease in the degradation rate of the drug at 37 °C. Regarding its biological effects, analysed by MTT and cell cycle, no differences were observed between the antiproliferative and cytostatic properties of free and encapsulated BCNU on HGUE-GB-37 and 42 glioblastoma cell lines, proposing polymeric nanofibers as a delivery system for BCNU in therapies against glioblastoma.

Keywords: polymeric nanofibers; carmustine; PMVEMA-Es; electrospinning; glioblastoma.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Cáncer	5
1.1.1. Glioblastoma	5
1.1.2. Tratamientos para el glioblastoma	6
1.1.3. Carmustina	7
1.2. Nanotecnología	7
1.2.1. Nanoformulaciones como sistemas de liberación de antineoplásicos	8
1.2.2. Nanofibras poliméricas	9
1.2.3. Poli (metil vinil éter- <i>alt</i> -maleico)	10
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Preparación de disoluciones	13
3.2. Electrohilatura de nanofibras	13
3.3. Caracterización de las nanofibras	14
3.3.1. Morfología	14
3.3.2. Composición	15
3.4. Ensayos de degradación y liberación	16
3.5. Ensayos celulares	17
3.5.1. Ensayo de proliferación celular	17
3.5.2. Ciclo celular	18
3.6. Análisis estadísticos	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Caracterización de las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU	20
4.1.1 Morfología de las nanofibras	20
4.1.2 Composición de las nanofibras	23
4.2 Ensayo de degradación nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU en diferentes medios	23
4.3 Ensayo de liberación de nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU en medio de cultivo	25
4.4 Efecto de las nanofibras de PMEVEEMA-Es/BCNU sobre la proliferación de células tumorales	26
4.4.1 Ensayos de proliferación de las líneas HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42 con nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU	27
4.4.2 Ensayos de ciclo celular de las líneas HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42 con nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU	28
5. DISCUSIÓN	30
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	33
7. BIBLIOGRAFÍA	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cáncer engloba un extenso grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Otros términos por los que se conoce a esta enfermedad podrían ser «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Las características que definen este tipo de enfermedades son la división anormalmente rápida de las células y su capacidad de propagarse e invadir otras partes del cuerpo, lo que se conoce como metástasis (1).

El cáncer surge cuando se produce una lesión precancerosa en las células normales. Esta lesión suele ser el resultado de una o varias mutaciones, que ocurren por la interacción entre los factores genéticos del individuo y la presencia de diferentes agentes externos, induciendo una mayor capacidad de proliferación y dando lugar a la formación de las células tumorales.

Esta enfermedad es una de las principales causas de mortalidad en el mundo y su incidencia aumenta en la población de mayor edad debido a la acumulación de diferentes factores de riesgo (1). En 2020, se detectaron aproximadamente 18,1 millones de casos nuevos y, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés: *International Agency for Research on Cancer*), se estima que esta cifra alcance los 28 millones en las dos próximas décadas. Los tipos de cáncer con mayor incidencia son los de mama, pulmón, colon y recto, próstata y estómago (2).

1.1.1. Glioblastoma

Los tumores malignos relacionados con el encéfalo y el sistema nervioso ocupan la posición número 17 en cuanto a incidencia, según la Red Española de Registros de Cáncer, con más de 4 mil nuevos casos diagnosticados anualmente (3). Concretamente, un 77 % de estos tumores son gliomas, destacando dentro de ellos los astrocitomas, que son los más comunes. La incidencia de estos tumores ha incrementado en las últimas tres décadas y, de todos los gliomas, el GBM es el de mayor prevalencia en adultos, representando el 67 % de todos los diagnósticos de gliomas y solo el 7 % en niños (**Figura 1**) (4).

El GBM es un tipo de astrocitoma heterogéneo difuso, clasificado como grado IV según la Organización Mundial de la Salud (OMS), basado en el índice de crecimiento del tumor y su agresividad. Esta clasificación sigue una escala del I al IV, por lo que el glioblastoma tiene el grado más alto, es decir, son los más agresivos y los que tienen un pronóstico menos favorable (5) (6).

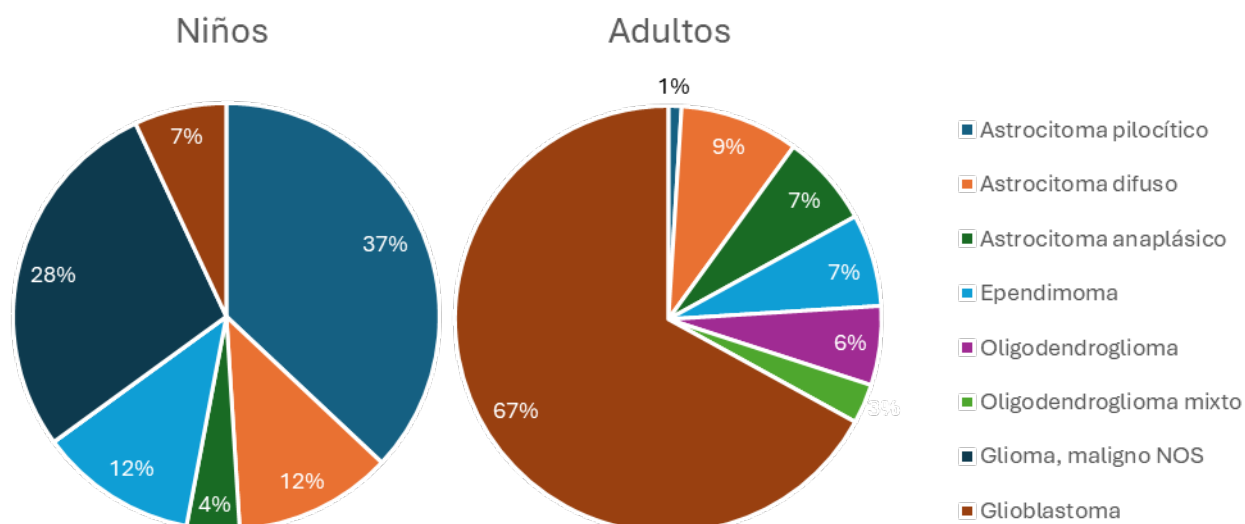


Figura 1 Porcentajes de incidencia de los diferentes tipos de gliomas en niños y en adultos adaptada de Walsh y colaboradores., 2016 (4) basada en los datos de Ostrom y colaboradores., 2014b, Tabla 19 (7).

En cuanto a la mortalidad, los pacientes con GBM tienen un mal pronóstico y suelen fallecer rápidamente si no reciben tratamiento. El tiempo medio que sobreviven los pacientes de GBM es de 12 meses, y solo un 21,3% de los pacientes sobreviven 2 años después del diagnóstico. Únicamente el 5 % de los pacientes logra sobrevivir 5 años (8) (9).

La sintomatología varía, pero suele incluir varios síntomas generales, como pueden ser convulsiones y dolores de cabeza, que pueden tener diferentes orígenes. Para un diagnóstico preciso, se realizan técnicas como la resonancia magnética de imagen (IRM), que identifican diversos marcadores de las células tumorales y permiten observar el área en la que el tumor ha sido capaz de infiltrarse (10).

1.1.2. Tratamientos para el glioblastoma

Actualmente, cualquier paciente con glioblastoma empieza el tratamiento con una extracción quirúrgica del tumor. A partir de este punto, el enfoque terapéutico se centra en el uso de quimioterapia, radioterapia o una combinación de ambos. Se ha demostrado que la implementación de terapias combinadas mejora la eficacia en comparación con las terapias utilizadas por separado (11) (12).

En los pacientes con GBM, los fármacos más utilizados en quimioterapia son la temozolomida (TMZ) y la carmustina (BCNU). Ambos alquilan las guaninas y las citosinas del ADN, interfiriendo en la división celular. Sin embargo, la resistencia a estos tratamientos surge por la presencia de la O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT o AGT), una proteína

reparadora del ADN con la capacidad de eliminar los grupos alquilo provenientes de estos fármacos (13) (14).

1.1.3. Carmustina

La carmustina, también conocida como BCNU o (1,3-bis (2-cloroetil)-1-nitrosourea, es un fármaco que forma parte de las nitrosoureas y tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Su administración puede ser local o sistémica, con una vida media en plasma de 15 a 30 minutos. Como consecuencia, se han desarrollado múltiples sistemas de encapsulación de BCNU para aumentar la duración del fármaco (15) (16).

Entre los distintos sistemas de encapsulación utilizados para administrar localmente la carmustina, se utilizan mayoritariamente las obleas de GLIADEL. Estas obleas encapsulan BCNU distribuida homogéneamente en un disco sólido de polifeprosán 20, un copolímero formado de 1,3-bis-(p-carboxifenoxi) propano y ácido sebácico. La cantidad de BCNU que contienen es del 3,85 % y su peso total es de 200 mg. En la **Figura 2** se ven representados los diferentes componentes de estas obleas.

Tras la extirpación del tumor, se deposita una oblea en la cavidad donde se encontraba el tumor, lo que permite la liberación controlada del fármaco durante 3 semanas. Se utiliza de forma local para disminuir los posibles efectos secundarios (náuseas, vómitos, dolor de cabeza y un descenso del número de plaquetas en sangre) y para que la exposición de las células sanas al fármaco sea menor y no genere efectos secundarios a largo plazo (17) (18).

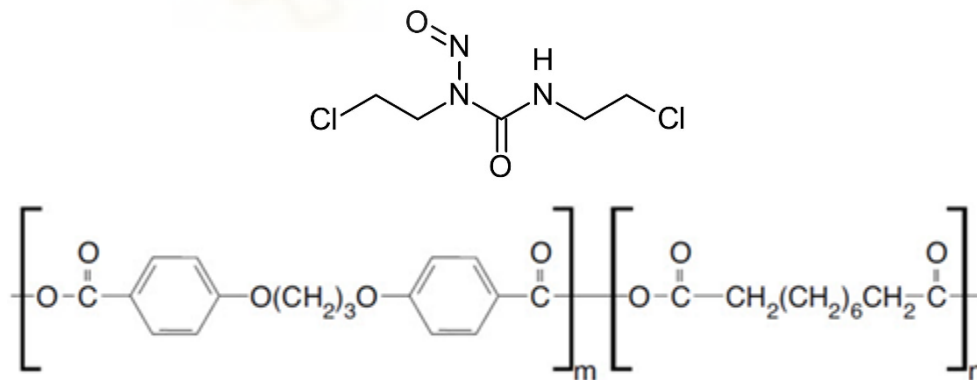


Figura 2 Formulas estructurales de los componentes de las obleas de GLIADEL. Arriba: Estructura de la carmustina. Abajo: Estructura del polifeprosán ($m:n = 80:20$; random) (15).

1.2. Nanotecnología

La nanotecnología engloba el uso de materiales en la escala nanométrica, es decir, estructuras entre 1 nm y 1000 nm. Los nanomateriales presentan propiedades fisicoquímicas

diferentes a las que se encuentran en sus formas macroscópicas, como pueden ser sus propiedades estructurales, térmicas, electromagnéticas, ópticas y mecánicas. Esta diferencia se debe a que los nanomateriales responden ante las leyes de la física cuántica y no ante las leyes de la física convencional. La mayor ventaja de los nanomateriales frente a los materiales convencionales es el aumento del área superficial, generando así una mejor interacción con otras moléculas (19).

En el último medio siglo, la nanotecnología ha adquirido gran importancia en diversos campos biológicos. Los nanomateriales presentan una gran variedad de morfologías diferentes, que incluyen las nanoplacas, las nanofibras y las nanopartículas, entre otras. Otra forma de clasificar los nanomateriales es en función de sus dimensiones, dando lugar a cuatro tipos diferentes: los materiales cero-dimensionales, los unidimensionales, los bidimensionales y los tridimensionales (**Figura 3**) (19) (20).

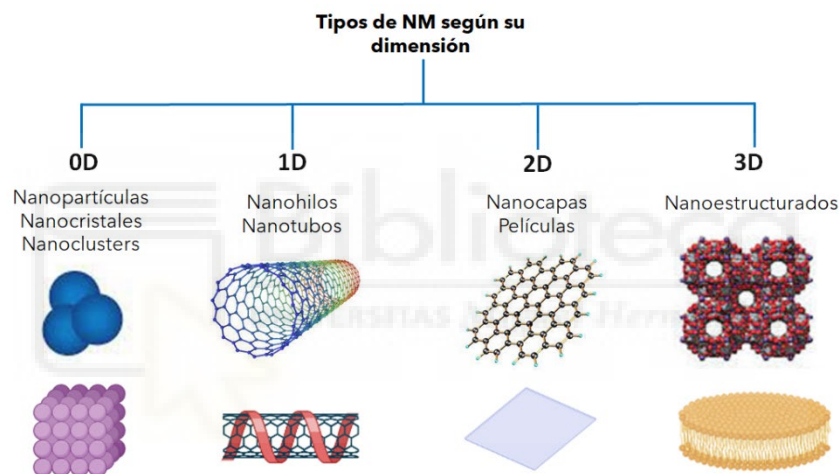


Figura 3 Esquema sobre los diferentes tipos de nanomateriales según su dimensión (21).

1.2.1. Nanomateriales como sistemas de liberación de antineoplásicos

La vía de administración es un factor importante para mejorar el efecto de un determinado fármaco en el tratamiento del glioblastoma. Los nanomateriales permiten que se implementen sistemas de liberación controlada, reduciendo la cantidad de fármaco necesaria para que sea efectiva y aumentando la biodisponibilidad. Estos procesos hacen que la toxicidad sistémica se vea ampliamente reducida, al dirigir el tratamiento directamente sobre las células tumorales, evitando dañar las células sanas (22) (23).

Algunos ejemplos de encapsulaciones observadas en tratamientos antineoplásicos son los liposomas, las nanopartículas y las nanofibras, que pueden estar formadas por diferentes materiales como lípidos, polímeros y metales, entre otros. Concretamente, Das y colaboradores (24) utilizaron un sistema inyectable de nanopartículas-gel para poder penetrar

en el cerebro. Este sistema estaba formado por nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) cargadas con BCNU y cubiertas por una capa de polietilenglicol (PEG). Se demostró que al liberarse la carmustina del PLGA se formaban nanocomplejos de 33 nm de PEG-BCNU, capaces de infiltrarse 4 centímetros más en el tejido cerebral en comparación con el fármaco libre.

Por otra parte, Kuo y colaboradores (25) utilizaron nanopartículas de metoxipoli(etilenglicol) - poli(ϵ -caprolactona) conjugadas con aglutinina de germen de trigo y ácido fólico. Estas nanopartículas estaban cargadas con etopósido (ETO), carmustina y doxorubicina (DOX), mostrando un enfoque prometedor para inhibir el crecimiento del GBM en el cerebro.

1.2.2. Nanofibras poliméricas

Dentro de las diferentes nanoformulaciones como sistema de liberación de fármacos, destacan las nanofibras por su fácil preparación, su capacidad de ajustar su humectabilidad y elasticidad y sus propiedades de superficie. Concretamente, las nanofibras poliméricas utilizadas en biomedicina tienen que estar compuestas por polímeros biodegradables y biocompatibles. Una de las propiedades más importantes de las nanofibras es que tienen una relación superficial área/volumen muy grande. Además de estas propiedades, las nanofibras tienen una porosidad relativa que permite el paso de nutrientes y de iones (26) (27).

La electrohilatura es la técnica más utilizada para sintetizar nanofibras poliméricas, ofreciendo un amplio rango de posibilidades de producción a un bajo coste y a un elevado rendimiento. Esta técnica, patentada en 1934 por Formhals y utilizada desde 1990, permite crear nanofibras a partir de una disolución polimérica situada en una jeringa conectada a una aguja metálica. La disolución se bombea a una velocidad baja y se somete a un campo eléctrico para romper las fuerzas de tensión superficial. En este proceso el solvente se evapora, depositándose las nanofibras en un colector (28).

Liu y colaboradores (29) (30) desarrollaron membranas nanofibrosas de poli (ácido láctico-co-glicólico) que permitían la liberación de O^6 -bencilguanina (O^6 -BG), para eliminar la resistencia producida por la MGMT. Además, este sistema también liberaba BCNU y TMZ, lo que resultó en una reducción significativa del crecimiento del tumor y un aumento en la supervivencia media respecto a los resultados obtenidos con los fármacos libres.

1.2.3. Poli (metil vinil éter-*alt*-anhídrido maleico)

Los polímeros que se emplean en la electrohilatura son mayoritariamente biopolímeros naturales, como la quitina, el quitosano, la celulosa o el colágeno, o polímeros sintéticos biocompatibles, como por ejemplo los poliésteres, los poliéteres y los polianhídridos.

Uno de los polímeros sintéticos utilizados en la síntesis de nanofibras para la liberación de fármacos es el poli (metil vinil éter-*alt*-anhídrido maleico), conocido también como PMVEM-Anhidro (PMVEMA), cuya fórmula se puede observar en la **Figura 4**. También existen derivados como el PMVEMA-Ácido (PMVEMA-Ac) y el PMVEMA-monoetil éster (PMVEMA-Es) (**Figura 4**). Todos estos derivados han sido caracterizados y son polímeros prometedores para desarrollar sistemas de encapsulación de fármacos (31).

Mira y colaboradores (32) utilizaron el PMVEMA para sintetizar nanofibras cargadas con L-Mentol mediante la técnica de electrohilatura. Consiguieron mantener la estructura del L-Mentol y no observaron efectos citotóxicos después de la síntesis de las nanofibras.

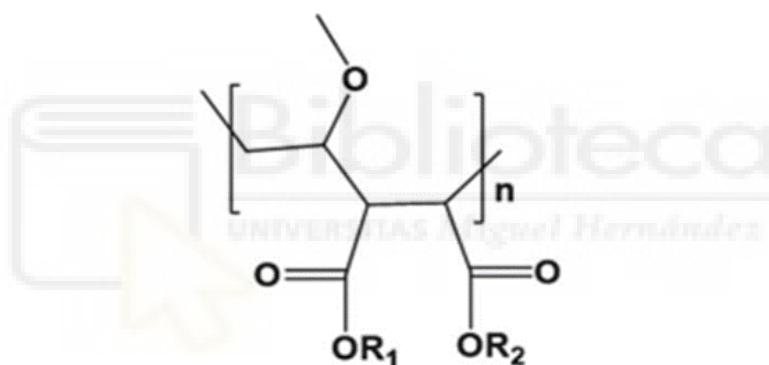


Figura 4 Formulas estructurales del PMVEMA. En el caso en que $R_1=R_2= - H$ encontramos el PMVEMA-Ac. En el caso en que R_1 o $R_2= - H$ y R_2 o $R_1= - Et$ encontramos el PMVEMA-Es

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1. Antecedentes

Anteriormente, ya se han realizado investigaciones sobre la incorporación de BCNU en nanofibras. Tseng y colaboradores (33) buscaron mejorar el actual tratamiento del GBM con obleas de Gliadel, ya que este tratamiento solo proporciona una liberación de BCNU eficaz durante 5 días. Con este fin, desarrollaron nanofibras biodegradables de poli (ácido láctico-co-glicólico) mediante electrohilatura. Los resultados obtenidos demostraron que la liberación de BCNU mediante nanofibras consiguió mantener una liberación suficiente como para que las concentraciones de BCNU fueran efectivas durante 6 semanas.

En el grupo de Diseño y Validación de Nanobiomateriales, donde se ha desarrollado el presente trabajo, se han utilizado diferentes polímeros para sintetizar nanofibras con el fin de encapsular fármacos. Concretamente, Mira y colaboradores (31) utilizaron tanto el PMVEMA-Ac como el PMVEMA-Es para encapsular ácido 5- aminolevulínico (5-ALA), un profármaco utilizado para realizar cirugía guiada por fluorescencia, y polielectrolitos conjugados fluorescentes, como el bromuro de poli{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)hexil]-2,7-(fluoreno)-alt-1,4-fenileno} (HTMA-PFP) y el bromuro de poli-{[9,9-bis(6'-N,N,N-trimetilamonio)-hexil]-2,7-(fluoreno)-alt-1,4-(nafto[2,3c]-1,2,5-tiadiazol)} (HTMA-PFNT). El objetivo de estas nanofibras era utilizarlas como vehículos de fármacos con aplicaciones en terapias fotodinámicas. Los resultados mostraron que las propiedades fluorescentes de los compuestos se mantuvieron intactas y el 5-ALA se logró internalizar en células de cáncer colorrectal y en queratinocitos.

Por otra parte, Martínez-Ortega y colaboradores (34) desarrollaron un sistema de liberación de fármacos basado en nanofibras electrohiladas para tratar la psoriasis. Para ello, utilizaron nanofibras de PMVEMA-Es como sistema de encapsulación de tres agentes terapéuticos con propiedades paliativas para esta enfermedad, que fueron ácido salicílico, salicilato de metilo y capsaicina. Pasados 15 días desde la encapsulación, su estabilidad no se vio afectada, excepto en el caso del salicilato de metilo. Además, se demostró que estos compuestos conservaban e incluso aumentaban su capacidad de activar TRPV1, asociado a la formación de lesiones psoriásicas.

Recientemente, en un Trabajo de Fin de Máster (35) se encapsularon diferentes fármacos antineoplásicos como la DOX, la TMZ y la BCNU en PMVEMA-Ac. Las conclusiones de este trabajo fueron que la DOX encapsulada tenía un efecto significativamente mayor que los otros fármacos encapsulados en este polímero, por lo que se propuso el PMVEMA-Es como candidato para la síntesis de nanofibras con BCNU.

2.2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es: **Sintetizar y caracterizar nanofibras poliméricas de PMVEMA-Es como sistema de liberación del antineoplásico carmustina en un modelo *in vitro* de glioblastoma.**

Para poder completar el objetivo general se estudiarán los siguientes objetivos específicos:

- Establecer los parámetros de electrohilatura para la síntesis de nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU
- Caracterizar el diámetro, la morfología y la composición de las nanofibras electrohiladas de PMVEMA-Es/BCNU.
- Caracterizar la eficacia de encapsulación y el tiempo de liberación de este sistema de liberación.
- Determinar el efecto de las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU sobre la proliferación de líneas celulares de glioblastoma.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación de disoluciones

El primer paso de la síntesis de nanofibras es la preparación de las disoluciones. En este caso, se utilizó el polímero PMVEMA-Es con una masa molecular en peso de 130000 g/mol. Mira y colaboradores (31) realizaron estudios previos en nuestro grupo con este polímero y se determinó que la concentración óptima para electrohilar nanofibras con este polímero es del 25 % (p/p) en disolución con etanol. El producto comercial proporcionado por Sigma-Aldrich Chemistry (St. Louis, MO, EE. UU.) se encontraba al 50 % en etanol, por lo que se pesaron 2 g de este producto y se añadieron 2 g de etanol, consiguiendo así el 25% (p/p). La mezcla se dejó agitando durante toda la noche para conseguir una disolución homogénea.

Al día siguiente, se añadió BCNU (TCI Europa N.V., Amberes, Bélgica) a las disoluciones a diferentes concentraciones. Se empezó electrohilando al 2 % (p/p), respecto al PMVEMA-Es y finalmente se alcanzó una concentración de 4 y 8 % (p/p). Para conseguir estas concentraciones se añadieron a las disoluciones poliméricas 2, 4 y 8 mg de BCNU respectivamente, respecto a 1 g de polímero puro final. Estas disoluciones se agitaron a temperatura ambiente hasta su homogenización.

3.2. Electrohilatura de nanofibras

La electrohilatura fue la técnica elegida para elaborar las nanofibras. El equipo lo forman una fuente de voltaje modelo FC60P2 (Glassman High Voltage Inc., High Bridge, NJ, EE. UU.) y una bomba de infusión modelo KdScientific-100-CE (KD Scientific, Holliston, MA, EE. UU.).

El procedimiento consiste en introducir la disolución polimérica en una jeringuilla de 2 mL, procedente de Becton Dickinson Discardit (Huesca, España). En el extremo se colocó una aguja de acero inoxidable 316 de 10,16 cm de longitud, con un diámetro interno de 0,838 mm y externo de 1,27 mm (Sigma Aldrich).

Una vez cargada la disolución en la jeringa, con la aguja se colocó en la bomba de infusión, que aplica un flujo constante de eyección en dirección a un colector de aluminio con un portaobjetos, proporcionado por Deltalab (Barcelona, España). El flujo de eyección y la distancia de la aguja al colector son dos de los parámetros que se pueden modificar, cambiando de esta forma el diámetro de las nanofibras que se obtienen.

Cuando la jeringa ya se encontraba en su lugar, se encendió la fuente de voltaje, la cual aplicaba un campo electrostático entre la aguja y el colector gracias a la aplicación de un voltaje determinado, siendo este el último parámetro que podemos modificar. Las condiciones

ambientales, como la temperatura y la humedad, también influyeron en este procedimiento, estando entre 20-30 °C y 35-50 %, respectivamente.

De esta forma, las nanofibras se depositaron en el portaobjetos que se encontraba en el colector y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Por motivos de seguridad, todo el procedimiento de electrohilatura se realiza dentro de una caja de metacrilato situada en una campana extractora. En la **Figura 5** se puede observar un resumen de este procedimiento.

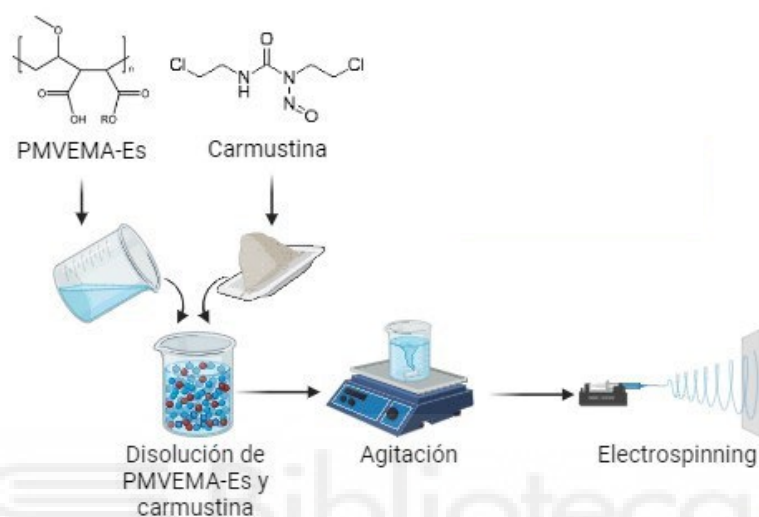


Figura 5 Esquema sobre la síntesis de nanofibras poliméricas de PMVEMA-Es/BCNU.

3.3. Caracterización de las nanofibras

3.3.1. Morfología

El primer paso de la caracterización de las nanofibras fue estudiar la forma que presentaban. Para ello, se utilizaron los portaobjetos mencionados en el apartado anterior y se observaron por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.

3.3.1.1. Microscopía óptica

La caracterización morfológica se inició justo después de la síntesis de las nanofibras, utilizando un microscopio óptico. El objetivo de esta caracterización es comprobar los resultados cualitativamente y evaluar si los parámetros utilizados para electrohilar eran los adecuados, además de comprobar la presencia o ausencia de defectos morfológicos visibles. Con este fin, se utilizó el microscopio óptico Mycosystems DMI 3000B (LEICA, Bensheim, Alemania), provisto con una cámara digital LEICA DFC 3000G y una fuente de luz compacta EL6000. El programa informático que se utilizó fue el Leica Application Suite AF 6000 Module Systems, y las imágenes se realizaron a 40x en contraste de fases.

3.3.1.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

El siguiente paso fue emplear el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, *Field Emission Scanning Electron Microscopy*) para analizar las nanofibras con más detalle. Este equipo utiliza un haz de electrones de alta energía sobre una superficie sólida, lo que genera una señal en forma de imagen. El equipo que se utilizó fue el modelo Sigma 300 VP de ZEISS de emisión de campo de cátodo caliente Schottky (ZEISS, Oberkochen, Alemania).

La calidad de las imágenes obtenidas por este microscopio permitió examinar con mayor precisión las nanofibras y obtener datos exactos sobre su diámetro. Para ello, se utilizó el programa informático ImageJ, desarrollado por el Instituto Nacional de la Salud (Bethesda, MD, EE. UU.). Se midieron 100 nanofibras a partir de diferentes imágenes del FESEM, ajustando la escala adecuadamente entre imágenes y utilizando el programa informático Microsoft Excel 2021 (Redmond, WA, EE. UU.) para almacenar los datos.

3.3.2. Composición

3.3.2.1. Ensayo Bratton-Marshall

Para evaluar la eficacia de encapsulación en las nanofibras poliméricas de PMVEMA-Es, se realizó un método colorimétrico específico para detectar la presencia de BCNU. En este método, la BCNU se descompone en ácido nítrico y en 1,3-bis(2-cloroetil) urea en presencia de ácido clorhídrico (HCl). Este procedimiento fue adaptado del método usado por Li Loo y colaboradores (36), que consiguieron cuantificar la cantidad de BCNU midiendo la liberación del ácido nítrico y del método utilizado por Lei Han y colaboradores, los cuales cuantificaron la cantidad de BCNU encapsulada en nanopartículas (37).

El método se basa en el reactivo Bratton-Marshall, que puede utilizarse en cualquier compuesto capaz de liberar ácido nítrico después del tratamiento con HCl. Se empezó preparando 100 mL de las dos disoluciones que se añaden a la muestra: una disolución de sulfanilamida y otra de Bratton-Marshall. La disolución de sulfanilamida se preparó añadiendo 0,5 gramos de sulfanilamida en 100 mL de 2 N HCl. Por otra parte, se disolvieron 0,3 gramos de diclorhidrato de N-(1-Naftil) etilendiamina (Reactivo Bratton-Marshall) en 100 mL de agua ultrapura. Posteriormente, se preparó la curva de estandarización con BCNU libre, partiendo de un blanco con etanol y llegando hasta una concentración de 12,5 µg/mL de BCNU en etanol.

Las muestras fueron obtenidas a partir de las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU al 4 y al 8 % (p/p) en adelante se da por supuesta esta relación, pesando 0,025 g de cada una de

ellas, disolviéndolas en 1 mL de etanol y realizando las disoluciones pertinentes para llegar teóricamente a 5 µg/mL en las nanofibras al 4 % y a 10 µg/mL en las del 8 %.

El primer paso de la reacción fue añadir 1 mL de la muestra y 0,5 mL de la disolución de sulfanilamida en un vial de cristal y dejarlo en un baño a 50 °C durante 45 minutos con agitación ocasional. Al finalizar este tiempo, se introdujeron los viales en hielo durante 5 minutos y se añadió 0,1 mL de la disolución de Bratton-Marshall. El último paso previo a medir la absorbancia fue dejar 10 minutos a temperatura ambiente. La lectura de la absorbancia se realizó en un lector de microplacas multimodo Cytation (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.) a 540 nm.

3.4. Ensayos de degradación y liberación

3.4.1. Ensayo de degradación

El objetivo del ensayo de degradación fue determinar el tiempo aproximado en el que las nanofibras de PMVEMA-Es son capaces de disolverse en varios medios, como son el DMEM-F12 (Dubelcco's Modified Eagle's Medium; Nutrient Mixture F12) con glutamina estable 2 mM, Hepes 25 mM (Biowest®, Riverside, CA, EE. UU.) no suplementado, el tampón fosfato salino (PBS) y el agua ultrapura. Para ello, se pesaron 0,015 g de nanofibras y se colocaron en una placa de 24 pocillos, donde posteriormente se añadieron 2 mL del medio correspondiente. Se mantuvo la placa a 37 °C durante todo el ensayo. Cada condición se realizó por duplicado y se realizaron fotografías a tiempo 0, a 30 min y a 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas. A su vez, se realizó el mismo ensayo con nanofibras de PMVEMA-Ac y con nanofibras con ambos polímeros, para poder comparar el tiempo de degradación entre ellos.

3.4.2. Ensayo de liberación

Para conocer la cantidad de BCNU que las nanofibras liberan al medio a diferentes tiempos, se realizó un ensayo de liberación en medio de cultivo DMEM-F12 utilizado en el ensayo de degradación. En una placa de 24 pocillos se puso 1 mL de medio de cultivo en 6 pocillos diferentes y se trató con nanofibras de PMVEMA-Es sin BCNU, con 800 µg de BCNU libre y con nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU 8 % (n=3). El peso de nanofibras introducido fue de 10 mg en todos los casos, para que de esta forma la concentración total después de disolverse fuera la misma que la de la BCNU libre.

Se sacaron 20 µl de cada pocillo a diferentes tiempos, siempre devolviendo este mismo volumen en forma de medio de cultivo. Los 20 µl se disolvieron en 1,98 mL de etanol en viales de cristal, consiguiendo de esta forma una concentración teórica de BCNU de 8 µg/mL, concentración que se encuentra dentro de la curva de calibración realizada anteriormente. La

placa se dejó durante 4 horas a 37 °C y los tiempos en los que se obtuvieron las muestras fueron a los 30 minutos, 1, 2 y 4 horas.

Para determinar la concentración de BCNU se realizó un ensayo Bratton-Marshall en el que se añadió 1 mL de la disolución de sulfanilamida a los 2 mL de cada muestra. Los viales se dejaron en un baño a 50 °C durante 45 minutos con agitación ocasional y posteriormente, se depositaron en hielo durante 5 minutos, como se realizó en el procedimiento anteriormente explicado. Finalmente, se añadieron 0,2 mL de disolución de Bratton-Marshall y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en un lector de microplacas multimodo Cytation a 540 nm.

3.5. Ensayos celulares

En el último apartado de este trabajo, se realizaron diferentes ensayos para comprobar como afectaban las diferentes nanofibras anteriormente caracterizadas a las líneas celulares de GBM procedentes del Hospital General Universitario de Elche (HGUE) y caracterizadas por el grupo de Oncología Molecular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIIBE). Las líneas celulares utilizadas fueron HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42.

Las células se mantuvieron en frascos de cultivo de 25 cm², con medio DMEM-F12 con glutamina estable 2 mM, Hepes 25 mM y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Biowest®) y 1 % de antibiótico (penicilina y estreptomina) (Biowest®). Se incubaron a 37 °C en un incubador (ESCO Lifesciences GmbH, Friedberg, Alemania), con CO₂ al 5 % en atmósfera humidificada.

3.5.1. Ensayo de proliferación celular

Para analizar la eficacia de las nanofibras de PMVEMA-Es en las líneas celulares de GBM se realizaron ensayos colorimétricos de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este ensayo se basa en la variación colorimétrica producida por este compuesto cuando la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa lo reduce y lo convierte en sales de formazán ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazán), pasando de color amarillo a morado. Esta reacción permite determinar la cantidad de células viables que hay en los cultivos, ya que son proporcionales a la cantidad de compuesto final.

Este procedimiento empezó sembrando 3000-4000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y dejándolas 24 horas en el incubador a 37 °C. Al día siguiente, se realizaron los tratamientos por sextuplicado y se mantuvieron durante 72 horas en las condiciones anteriormente mencionadas. Pasado este tiempo, se añadió el reactivo MTT (Sigma Aldrich®) a 0,25 mg/mL y se incubaron durante 3 horas. A continuación, se retiró el contenido de los

pocillos y se añadieron 100 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich®) por pocillo. Las placas se mantuvieron en agitación constante durante 20 minutos para disolver las sales de formazán y posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Gen5™. En la **Figura 6** se puede observar un resumen del ensayo MTT utilizando células de glioblastoma.

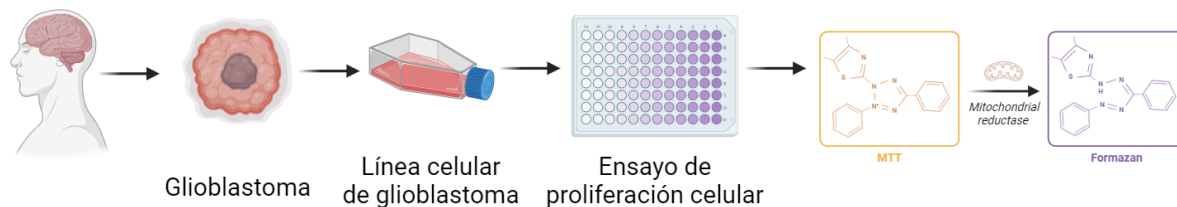


Figura 6 Esquema sobre el ensayo de proliferación celular MTT.

3.5.2. Ciclo celular

Para determinar si el efecto de las nanofibras de PMVEMA-Es con BCNU era citotóxico o citostático, se analizó el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. Con este fin, se utiliza el marcaje con yoduro de propidio, un compuesto fluorescente capaz de intercalarse en el ADN de las células.

En la fase G_1 se produce el crecimiento de las células junto con la formación de orgánulos y proteínas, en la fase S se produce la replicación del ADN y en la fase G_2 continúa el crecimiento celular y la formación de proteínas necesarias para la mitosis (Fase M).

La intensidad de fluorescencia emitida por el yoduro de propidio es proporcional a la cantidad de ADN, de modo que las células que se encuentren en las fases G_2 y M, emitirán el doble de fluorescencia que las que se encuentren en la fase G_1 . Del mismo modo, se puede identificar la presencia de células muertas, cuyo ADN ha sido fragmentado. Esta fase es conocida como fase sub G_1 y la intensidad de fluorescencia será inferior a la observada en las células que estén en fase G_1 .

Este ensayo empieza con el sembrado de las células en una placa de 6 pocillos, a una densidad de 250.000-350.000 células por pocillo. Tras 24 horas, se aplicó el tratamiento y se mantuvo durante 24 horas más en incubación. El siguiente paso fue tripsinizar las células y centrifugarlas a 400 x g durante 5 minutos, para posteriormente resuspenderlas en 1 mL de etanol al 75 %. Finalmente, se mantuvieron a -20 °C, para fijar las células hasta el momento en el que iban a ser analizadas por el citómetro.

Previo a su análisis, se realizó una centrifugación a 400 x g durante 5 minutos para eliminar el etanol y las células se resuspendieron en una disolución compuesta por PBS con Tritón X-100 al 0,5 % (v/v) (Sigma Aldrich®) para permeabilizar la membrana plasmática, 25

$\mu\text{g/mL}$ de RNasa A (Sigma Aldrich®) para eliminar el ARN, y $25 \mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio (Promocell®, Heidelberg, Alemania) para marcar el ADN. Se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente, se hizo el análisis mediante el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos).

3.6. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se muestran como la media \pm desviación estándar. Para los ensayos en placas de 96 pocillos se utilizó una n mayor o igual a 6 ($n \geq 6$), mientras que en las placas de 6 pocillos la n fue igual o mayor a 3 ($n \geq 3$). Para todos estos análisis y sus respectivas representaciones se utilizó GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, CA, EE. UU). Las comparaciones estadísticas se calcularon empleando un ANOVA de dos vías y el método de Tukey para comparaciones múltiples. Las diferencias estadísticamente significativas se representan marcadas con * si el p -valor $< 0,05$, ** si el p -valor $< 0,01$, *** si el p -valor $< 0,001$ y **** si el p -valor $< 0,0001$.



4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU

4.1.1 Morfología de las nanofibras

Para conseguir obtener nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU con el menor diámetro posible, se fueron variando las condiciones de electrohilatura. Además de calcular la media, se calculó el coeficiente de variación (CV), que es una medida de la variabilidad de los diámetros de las nanofibras, que se obtiene dividiendo la desviación típica entre la media.

En primer lugar, las nanofibras se electrohilaron con los siguientes parámetros modificados de Mira y colaboradores: 6,8 kV, 10 cm y 0,5 mL/h. El resultado mostró defectos visibles en las nanofibras, conocidos como *beads* (**Figura 7**). Los *beads* son engrosamientos que se forman en las nanofibras cuando el voltaje no es suficiente para evaporar todo el etanol. El diámetro medio de las nanofibras fue de 972 ± 247 nm y su CV de 25 %.

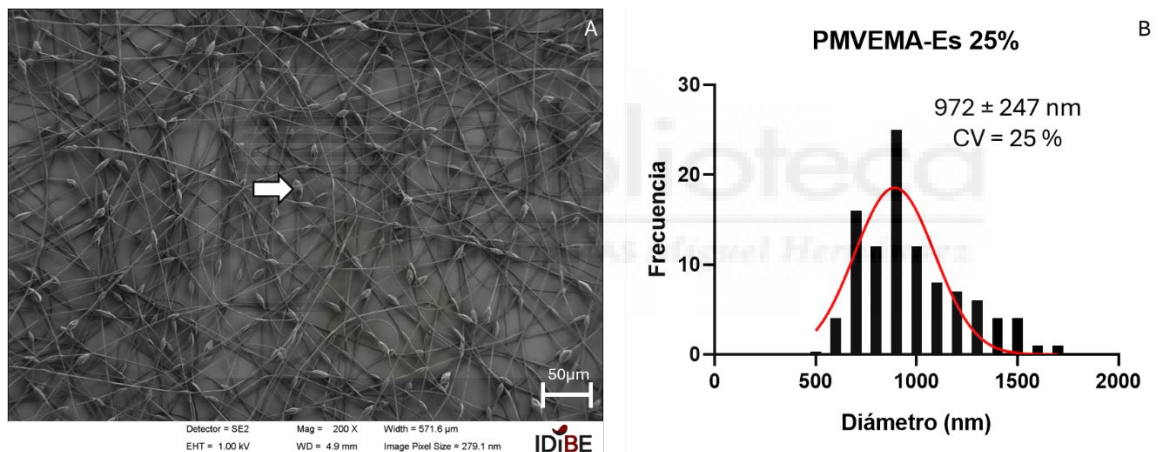


Figura 7 Análisis de las nanofibras obtenidas con PMVEMA-Es 25 % (A) Imagen del FESEM (Escala 50 μm) con presencia de “beads” (Flecha blanca). (B) Histograma de frecuencia de diámetros.

Las nanofibras electrohiladas con los mismos parámetros que las anteriores, pero con BCNU al 2 %, presentaron una estructura uniforme, sin la presencia de defectos ni deformidades visibles. La media del diámetro obtenido fue de 1180 ± 244 nm y su CV fue del 21 %, encontrando nanofibras con escasa variabilidad (**Figura 8**).

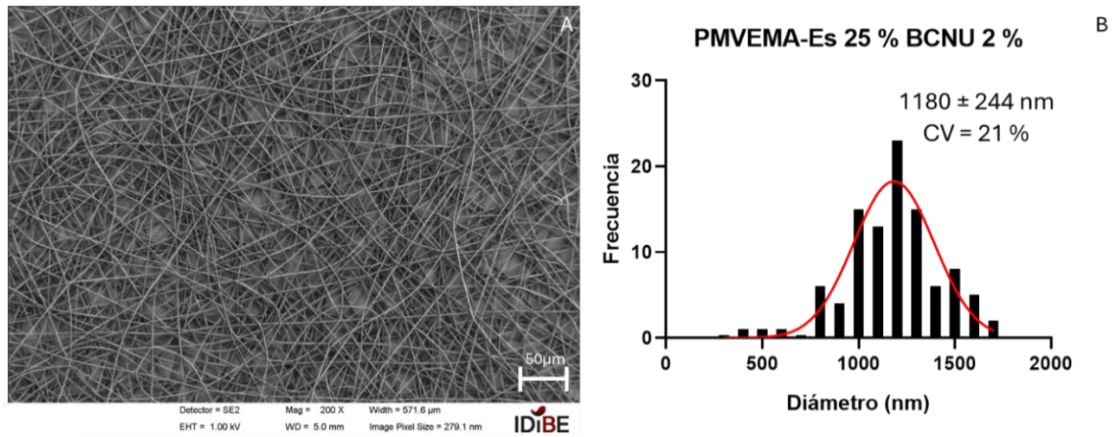


Figura 8 Análisis de las nanofibras obtenidas con PMVEMA-Es 25 %/BCNU 2 % (A) Imagen del FESEM (Escala 50 μm). (B) Histograma de frecuencia de diámetros.

Para determinar si el flujo de 0,5 mL/h es adecuado, se electrohilaron nanofibras utilizando 0,35 mL/h y 0,25 mL/h. Se observó que la media de diámetro más baja fue obtenida con 0,25 mL/h, y concretamente fue de 910 ± 154 nm con un CV de 17 % (Figura 9).

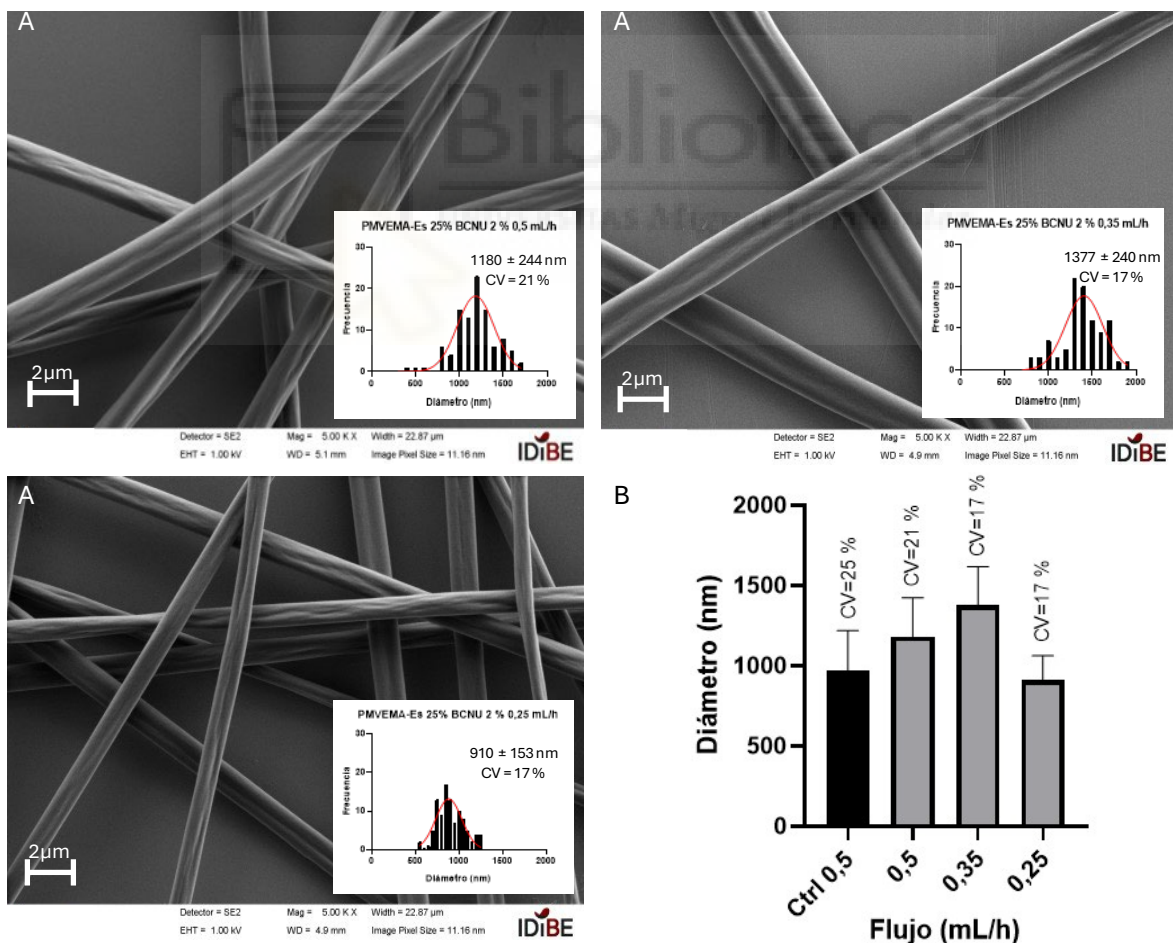


Figura 9 Comparación del tamaño de las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU 2 % a diferentes flujos (mL/h). A) Imágenes del FESEM (Escala 2 μm). (B) Histograma de medias de diámetros de nanofibras de PMVEMA-Es (negro) y nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU 2 % (gris).

El siguiente paso fue comprobar si el voltaje utilizado hasta el momento para sintetizar las nanofibras era el correcto. Para ello, se sintetizaron nanofibras de PMVEMA-Es al 25 % con BCNU al 4 % a 8, 10 y 15 kV, además de los 6,8 kV usados anteriormente. El resultado demostró que, tanto a 6,8 kV como a 15 kV, la media del diámetro era la más baja, teniendo las nanofibras a 15 kV una mayor variabilidad en los diámetros (**Figura 10**).

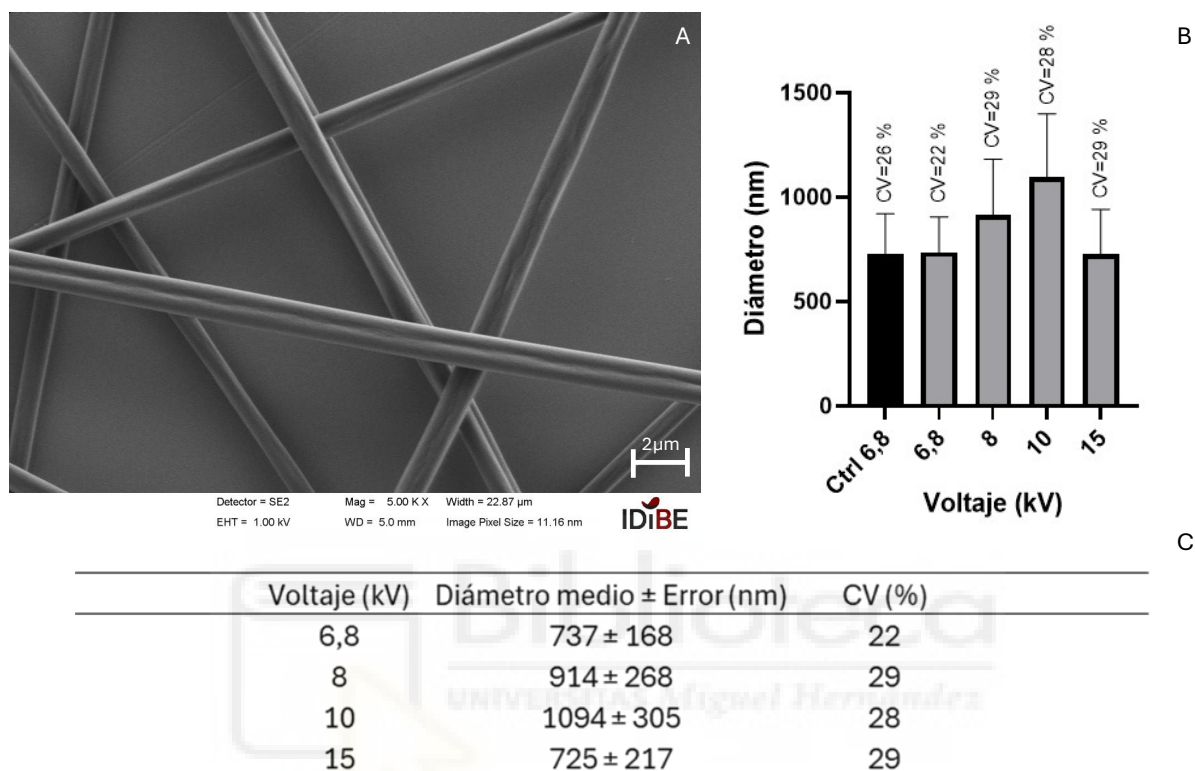


Figura 10 Comparación de las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU 4 % a diferentes voltajes. (A) Imagen del FESEM de nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU 4 % (Escala 2 μm) (B) Histograma de medias de diámetros de PMVEMA-Es (negro) y nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU 4 % (gris). (C) Tabla de diámetros de nanofibras analizadas por FESEM

Finalmente, se caracterizaron las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU al 8 %, el porcentaje de BCNU más alto encapsulado en este trabajo. Estas nanofibras tuvieron un diámetro medio de 855 ± 99 nm y un CV de 12 % sin presentar defectos morfológicos visibles (**Figura 11**). Siguiendo la optimización de los parámetros de electrohilatura realizada anteriormente, estas nanofibras se electrohilieron a 6,8 kV, 10 cm y 0,25 mL/h. Estos parámetros fueron los que proporcionaron nanofibras con menor diámetro y CV, siendo elegidos para sintetizar las nanofibras posteriormente utilizadas en este trabajo.

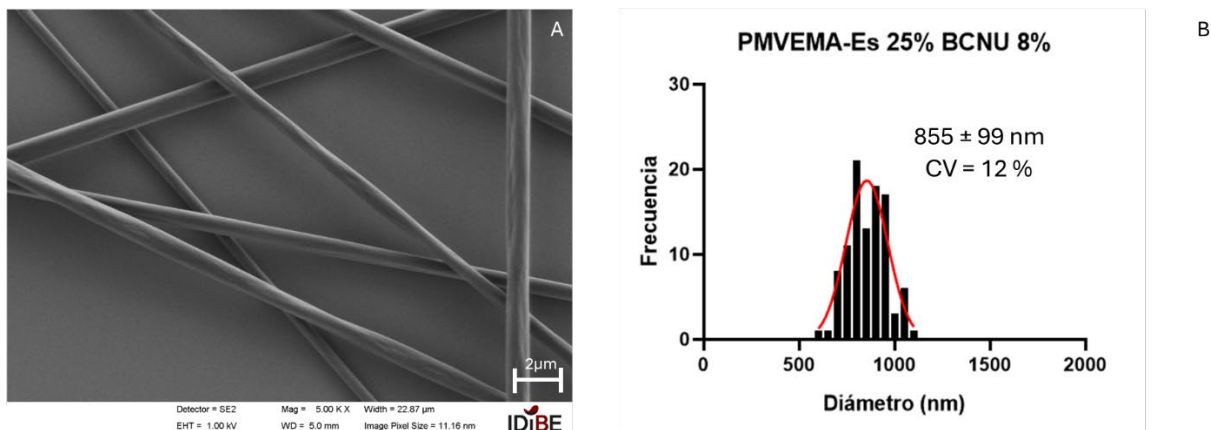


Figura 11 Análisis de las nanofibras obtenidas de PMVEMA-Es/BCNU 8 %. (A) Imagen del FESEM (Escala 2 μm). (B) Histograma de frecuencia de diámetros.

4.1.2 Composición de las nanofibras

4.1.2.1 Eficacia de encapsulación de BCNU en nanofibras de PMVEMA-Es

Para determinar la eficacia de encapsulación de las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU al 8 % (p/p) respecto al polímero, se utilizó la técnica colorimétrica de Bratton-Marshall (B-M). Para ello, se realizó una curva de calibración de BCNU libre que tuvo como resultado la siguiente ecuación:

$$Y = 0,0687X$$

En base a esta curva de calibración, se determinó la concentración real de BCNU en las nanofibras al 8 %, obteniendo una media de absorbancia de 0,477 (n=6). Para ello, se integró la absorbancia de la muestra en la ecuación de la recta en la cual $X = \text{Abs}$, obteniendo una concentración de BCNU de 6,94 μg/mL. La concentración teórica era de 10 μg/mL, lo que indica que la eficacia de encapsulación ha sido del $69,4 \pm 0,8$ % para las nanofibras al 8 %.

4.2 Ensayo de degradación nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU en diferentes medios

Para determinar el tiempo de degradación de las nanofibras de PMVEMA-Es, se realizó un ensayo de degradación en diferentes medios. Se observó que las nanofibras de PMVEMA-Es tuvieron un tiempo de degradación menor en el medio de cultivo DMEM-F12 que en el PBS o el agua ultrapura. A tiempo 0, las nanofibras ya se había disuelto (**Figura 12**).

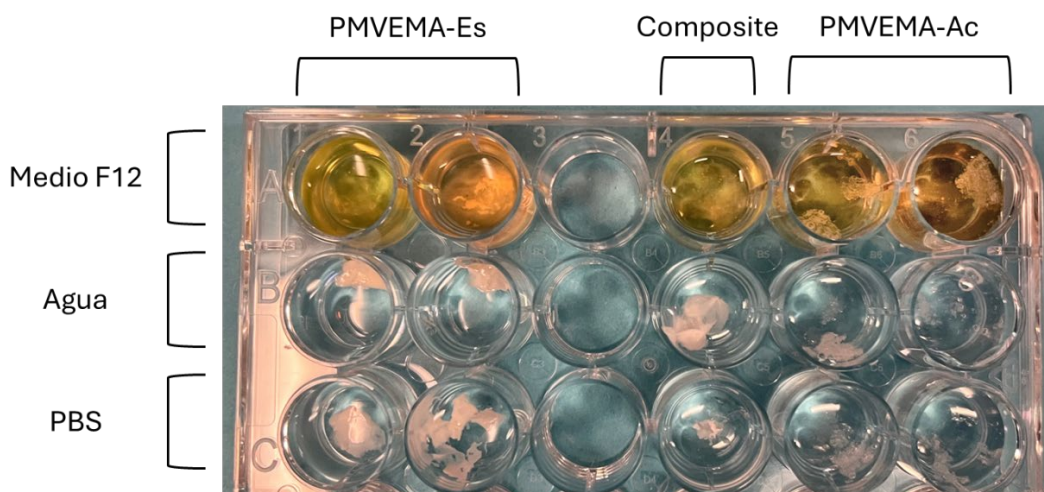


Figura 12 Ensayo de degradación de nanofibras de PMVEMA-Es, PMVEMA-Ac y de composite en medio de cultivo DMEM-F12 no suplementado, agua ultrapura y PBS. Imagen tomada a tiempo 0.

A las 2 horas todavía quedaban nanofibras de PMVEMA-Es en el medio de cultivo, pero a partir de las 4 horas ya se habían disuelto completamente. En este momento, las nanofibras de PMVEMA-Es en agua y en PBS aún no se habían disuelto (**Figura 13**).

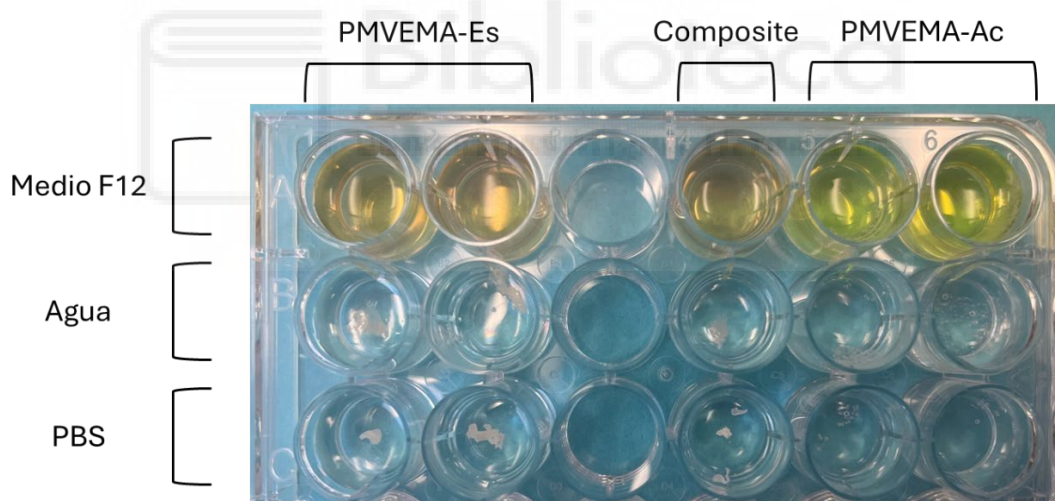


Figura 13 Ensayo de degradación de nanofibras de PMVEMA-Es, PMVEMA-Ac y de composite en medio de cultivo DMEM-F12 no suplementado, agua ultrapura y PBS. Imagen tomada a las 4 horas de empezar el ensayo.

Para la degradación del PMVEMA-Es en agua y en PBS se tuvo que esperar hasta las 48 horas, consiguiendo de esta forma que se degradara completamente en agua, pero no en su totalidad en PBS (**Figura 14**).

En cuanto al PMVEMA-Ac, se pudo observar que se disolvió igual de rápido en el medio de cultivo, pero mucho más rápido en agua y en PBS en comparación con el PMVEMA-Es. Por otra parte, las nanofibras compuestas por PMVEMA-Es y PMVEMA-Ac (composite)

se disolvieron a la misma velocidad en el medio de cultivo, pero a menos velocidad que el PMVEMA-Ac en agua y en PBS.

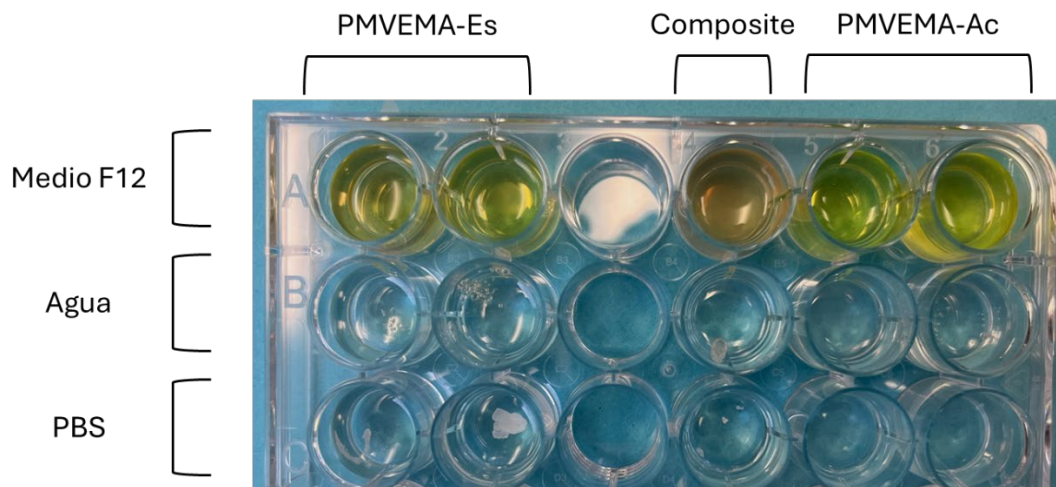


Figura 14 Ensayo de degradación de nanofibras de PMVEMA-Es, PMVEMA-Ac y de composite en medio de cultivo DMEM-F12 no suplementado, agua ultrapura y PBS. Imagen tomada a las 48 horas de empezar el ensayo.

4.3 Ensayo de liberación de nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU en medio de cultivo

Para determinar la liberación de BCNU encapsulada en las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU 8 % en el tiempo se realizó un ensayo de liberación. Los resultados de las absorbancias obtenidas a partir de la reacción de Bratton-Marshall se interpolaron en la ecuación usada en el ensayo de encapsulación.

De esta forma, se obtuvieron las concentraciones utilizadas para calcular la cantidad de fármaco liberado mediante la siguiente fórmula, en la que se tiene en cuenta el volumen extraído a los diferentes tiempos:

$$Q_n = C_n * V_c + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i * V_s)$$

Los resultados se dividieron entre la masa inicial añadida, considerando la eficacia de encapsulación del $69,4 \pm 0,8$ %, y se obtuvo el valor final en porcentaje (**Figura 15**). Por parte de la BCNU libre, a tiempo 0 se observó un 34 ± 2 % de fármaco y a las 2 horas se produjo un descenso aproximándose al 0 %. En cuanto a las nanofibras, el pico más elevado se produjo a la hora de haber empezado la liberación, llegando al $26,5 \pm 1,1$ % y a las 4 horas se obtuvo un $14,2 \pm 0,6$ %.

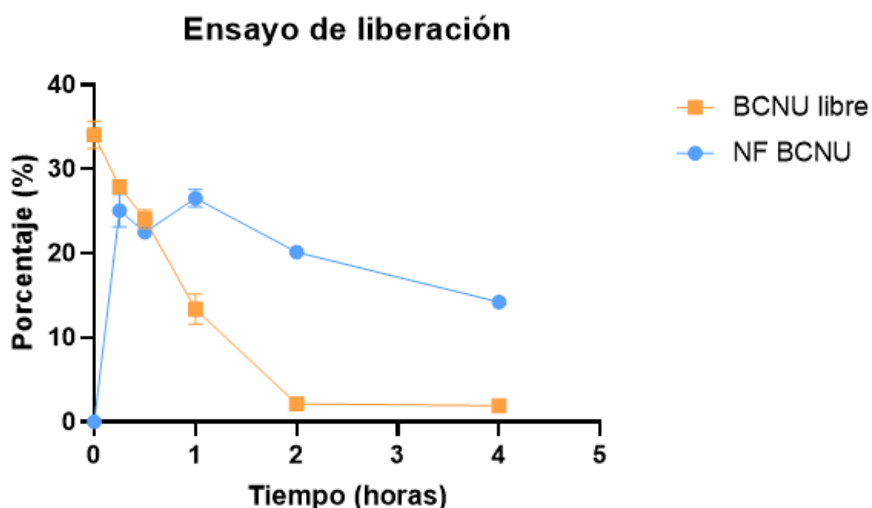


Figura 15 Comparación entre el porcentaje de BCNU libre y BCNU liberada de las nanofibras de PMVEMA-Es 8 % a diferentes tiempos. El porcentaje se muestra en relación con la BCNU teórica añadida. $n=3$ (media \pm SD).

4.4 Efecto de las nanofibras de PMEVEMA-Es/BCNU sobre la proliferación de células tumorales

Inicialmente, se realizaron ensayos de MTT con las nanofibras poliméricas de PMVEMA-Es sin BCNU sobre las líneas celulares que se usarían posteriormente. Para ello, se utilizó el peso de nanofibras sin BCNU correspondiente al peso utilizado de nanofibras al 8 % para las diferentes concentraciones de BCNU que se iban a utilizar. Estas concentraciones fueron 10, 25 y 50 μM . Esta relación entre las nanofibras sin BCNU utilizadas se mantuvo en los siguientes experimentos. (**Tabla 1**)

Tabla 1 Equivalencia entre la concentración añadida de BCNU con respecto a la de PMVEMA-Es (calculado con el peso molecular de la unidad del monómero).

[BCNU] (μM)	[PMVEMA-Es] (μM)
10	116,2
25	290,5
50	581

Estas concentraciones se consiguieron disolviendo las nanofibras en etanol y posteriormente en medio de cultivo. No se observó ningún efecto significativo sobre la proliferación de ambas líneas celulares (**Figura 16**).

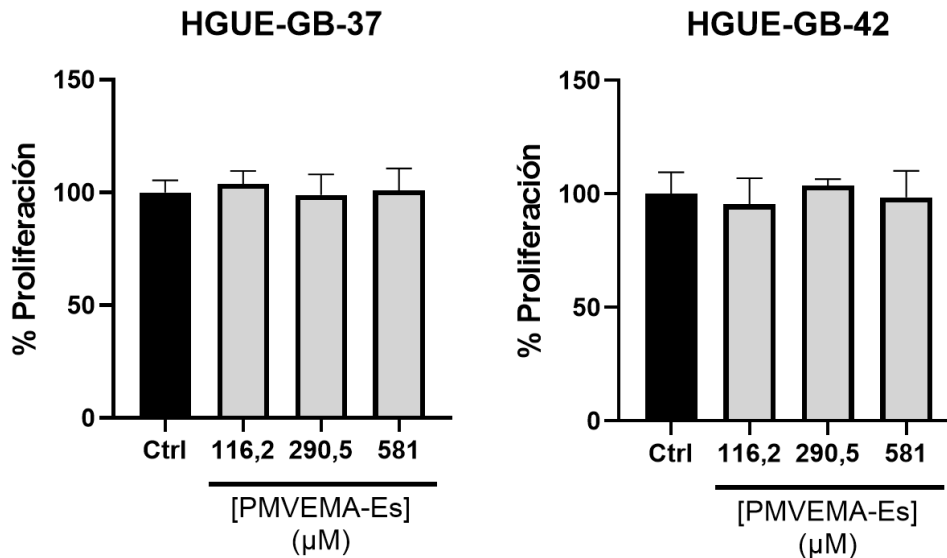


Figura 16 Efecto de las nanofibras de PMVEMA-Es 25 % a diferentes concentraciones (μM) sobre las líneas celulares HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42. El porcentaje de proliferación celular se muestra en relación con el control sin tratamiento. $n=6$ (media \pm SD).

4.4.1 Ensayos de proliferación de las líneas HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42 con nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU

Posteriormente, se realizaron ensayos de MTT con las mismas líneas celulares para comparar el efecto en la proliferación celular de las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU al 8 % (p/p) respecto al polímero. Las nanofibras fueron disueltas en etanol y se realizaron las disoluciones necesarias para conseguir unas concentraciones de BCNU de 10, 25 y 50 μM .

En ambas líneas celulares, se observó un efecto dosis dependiente con las nanofibras con BCNU, siendo 25 μM la concentración mínima a la que se observó un efecto significativo en HGUE-GB-37 y 10 μM la mínima significativamente eficaz para HGUE-GB-42. No se apreciaron diferencias significativas entre el efecto antiproliferativo provocado por la BCNU libre y la BCNU encapsulada en HGUE-GB-37.

Por otra parte, en HGUE-GB-42 se ve un ligero descenso de la proliferación a la concentración más elevada de BCNU encapsulada con respecto a la libre, pero sin llegar a ser significativo. Por todo esto, se determinó que la encapsulación en las nanofibras poliméricas no afectó a la capacidad antiproliferativa de la BCNU (**Figura 17**).

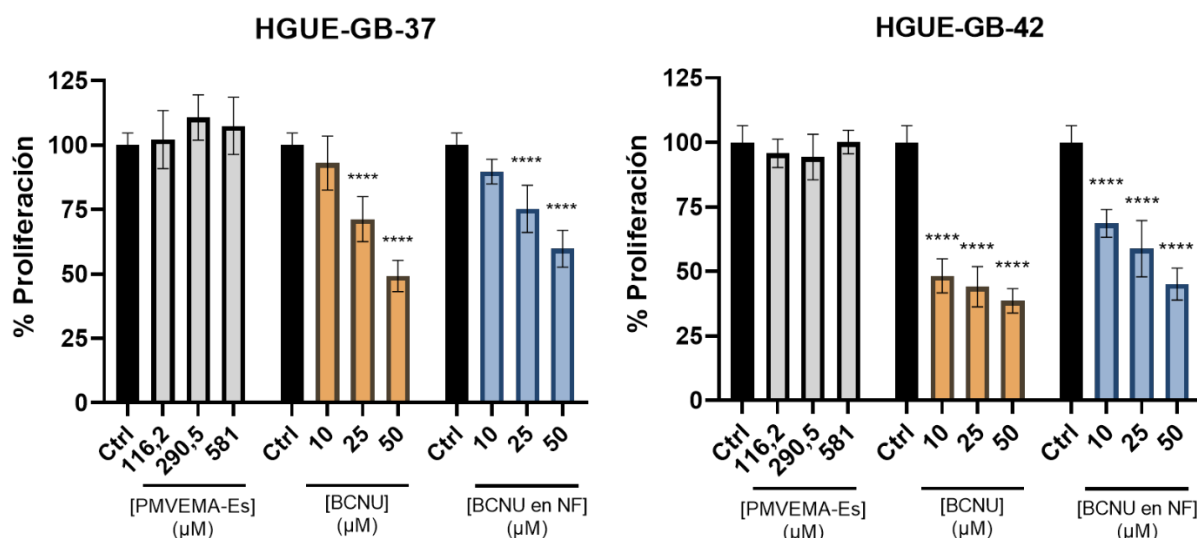


Figura 17 Proliferación de las líneas celulares HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42 tratadas con diferentes concentraciones (μM) de nanofibras sin BCNU (Gris), de BCNU libre (Naranja) y de nanofibras con BCNU (Azul). El porcentaje de proliferación celular se muestra en relación con el control sin tratamiento (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). $n=6$ (media \pm SD).

4.4.2 Ensayos de ciclo celular de las líneas HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42 con nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU

Se realizó un ensayo de ciclo celular para comprobar si la BCNU encapsulada en las nanofibras tenía el mismo efecto en el ciclo celular que la BCNU libre. Para ello, se probó la BCNU libre a 25 y 50 μM y las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU 8 % aplicadas directamente en el medio de cultivo con las mismas concentraciones que la BCNU libre. Además, se realizó un control con nanofibras de PMVEMA-Es sin BCNU.

Las nanofibras sin BCNU no tuvieron ningún efecto significativo sobre las diferentes fases del ciclo celular en comparación con el control. Por otra parte, tanto las nanofibras con BCNU al 8 % como la BCNU libre tuvieron efecto con las dos concentraciones utilizadas, 25 y 50 μM . En la línea celular HGUE-GB-37 no se vio un efecto significativo en la fase SubG₁ con ninguno de los tratamientos, pero en HGUE-GB-42 los tratamientos con mayor concentración de BCNU si llegaron a aumentar significativamente esta fase en un 20 %.

Respecto a las otras fases del ciclo celular, se observa una disminución en la fase G₁ con ambos tratamientos, llegando a tener aproximadamente entre un 20 y un 30 % menos en la línea HGUE-GB-37 y entre un 30 y un 45 % menos en la línea HGUE-GB-42. Hay un efecto significativamente mayor con 25 μM de BCNU libre en comparación con las nanofibras con BCNU en HGUE-GB-42. Sin embargo, esta diferencia no se encuentra a la concentración más elevada.

En HGUE-GB-37, este descenso sobre la fase G₁ corresponde mayoritariamente con el aumento de la fase S que encontramos en todos los tratamientos, siendo aproximadamente de un 20 % a 25 μ M y de un 30 % a 50 μ M. Por parte de HGUE-GB-42, el aumento no corresponde directamente con el descenso de G₁ ya que hay más porcentaje de muerte celular (subG₁), siendo este aumento de S de un 20 y 30 % respectivamente (**Figura 18**).

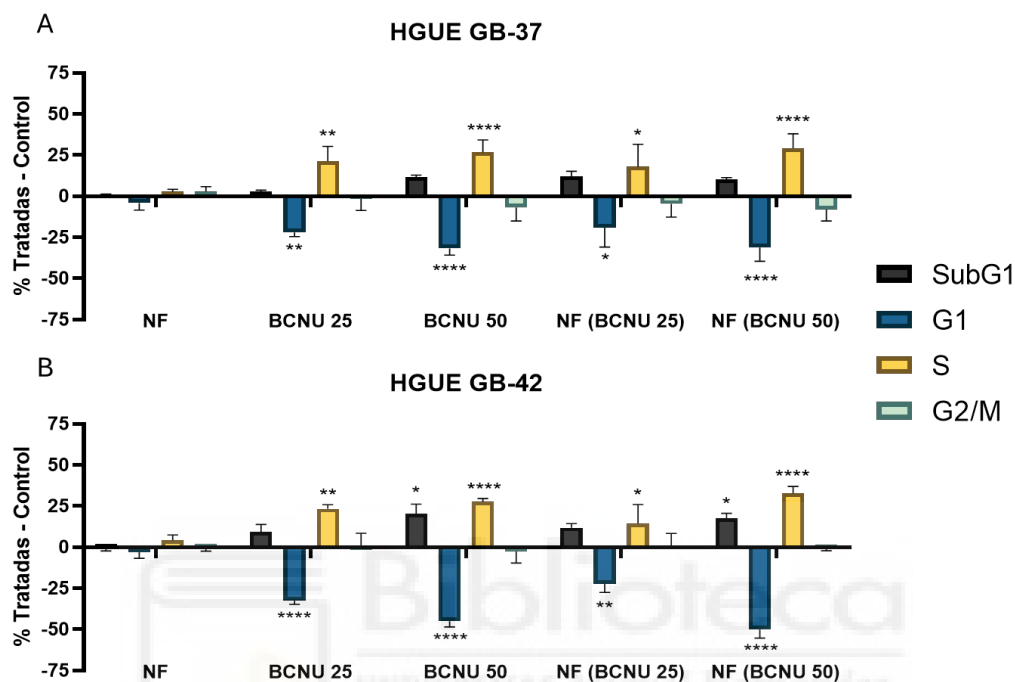


Figura 18 Efecto de las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU 8 % sobre el ciclo celular de HGUE-GB-37 (A) y HGUE-GB-42 (B). Se utilizaron nanofibras de PMVEMA-Es sin BCNU (NF), BCNU libre a 25 y 50 μ M (BCNU 25 y 50) y nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU a 25 y 50 μ M (NF (BCNU 25 y 50)). Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras haberle restado el porcentaje de células en el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). $n=3$ (media \pm SD).

5. DISCUSIÓN

El desarrollo de nuevos sistemas de encapsulación y liberación de fármacos es una de las prioridades en la búsqueda de tratamientos para diferentes tipos de cáncer, como el glioblastoma. En el presente trabajo, se sintetizaron y caracterizaron nanofibras poliméricas de PMVEMA-Es como sistema de liberación de BCNU para tratar el glioblastoma.

En anteriores trabajos, se utilizaron el PMVEMA-Es y el PMVEMA-Ac como matrices poliméricas en la síntesis de nanofibras como sistema de liberación de profármacos como el 5-ALA y de agentes terapéuticos como tratamiento para la psoriasis (31,34). En estos casos, los parámetros de electrohilatura del PMVEMA-Es fueron 15 kV, 0,5 mL/h y 10 cm y 17 kV, 0,25 mL/h y 8 cm, respectivamente. En un trabajo previo, la BCNU se incorporó en nanofibras de poli (ácido láctico-co-glicólico) con unos parámetros de 17 kV, 1,8 mL/h y 12 cm de distancia (33). Sin embargo, los parámetros de electrohilatura se adaptaron a la encapsulación de BCNU en nanofibras de PMVEMA-Es resultando en cambios en los valores de distancia, voltaje y flujo, debido a las propiedades intrínsecas del polímero, como son la viscosidad, la conductividad y la tensión superficial, entre otras (38). El CV muestra la variabilidad que hay en un experimento, siendo esta alta si es mayor al 30 % (39). Todas las muestras de nanofibras utilizadas en este trabajo presentaron un CV entre 10 y 25 %, lo que demuestra que no hay alta variabilidad entre los diferentes diámetros.

De esta forma, se establecieron los parámetros utilizados en el resto del trabajo: 6,8 kV, 0,25 mL/h y 10 cm de distancia. Los diámetros obtenidos variaron dependiendo del porcentaje de BCNU utilizado en las nanofibras, siendo de 910 ± 154 nm en el caso de las nanofibras al 2 % de BCNU (**Figura 9**), de 737 ± 168 nm en las nanofibras al 4 % de BCNU (**Figura 10**) y de 855 ± 99 nm en las del 8 % de BCNU (**Figura 11**). Estos diámetros se corresponden con los obtenidos en otros trabajos en la síntesis de nanofibras de PMVEMA-Es (34) y la variabilidad observada entre ellos no se relaciona con la concentración de BCNU, pudiendo deberse a las condiciones ambientales (temperatura y humedad) de electrohilatura (40).

Para analizar la composición de las nanofibras y determinar el porcentaje de BCNU encapsulado, se realizó un ensayo Bratton Marshal. Se obtuvo una recta de calibración basada en las concentraciones utilizadas por Li Loo y colaboradores (36). El resultado mostró que en las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU al 8 % se logró encapsular el 70 % de la BCNU añadida inicialmente en la disolución. Respecto al trabajo realizado por Lei Han y colaboradores (37), se consiguió una eficacia de encapsulación del 3,9 % en sus nanopartículas de PLGA que se encapsula según su capacidad de carga mientras que en las nanofibras se utiliza toda la disolución (27).

En el ensayo de degradación, se observó que las nanofibras de PMVEMA-Es se disolvieron completamente en menos de 4 horas en el medio de cultivo, por los que estos datos se utilizaron como tiempo máximo en el ensayo de liberación. En la **Figura 15**, se puede observar un descenso en el porcentaje de BCNU libre con el tiempo a 37 °C, posiblemente debido a la sensibilidad de la molécula a temperaturas superiores a -20 °C (41). Después de 2 horas, el descenso fue superior al 30 % de la BCNU, llegando prácticamente a su descomposición total. La BCNU encapsulada en las nanofibras mostró una rápida liberación, alcanzando su máximo pico a la hora de empezar el experimento con un 25 % aproximadamente, seguido de un descenso, correspondiente a la degradación de la BCNU, llegando a descender aproximadamente hasta el 15 % a las 4 horas. Estos resultados indican que la encapsulación de la BCNU en las nanofibras ralentizan su degradación, de forma similar a lo obtenido en otro estudio, en el cual las nanofibras retrasan la degradación de compuestos termolábiles (42).

Se realizaron diversos ensayos sobre las líneas celulares HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42 para conocer el efecto de las diferentes concentraciones de BCNU sobre su proliferación. Las nanofibras de PMVEMA-Es no disminuyeron significativamente la proliferación celular (**Figura 15**), en concordancia con los resultados obtenidos por Mira y colaboradores (31) en la línea celular SW480. Esto indica que los efectos observados con las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU corresponden a la BCNU.

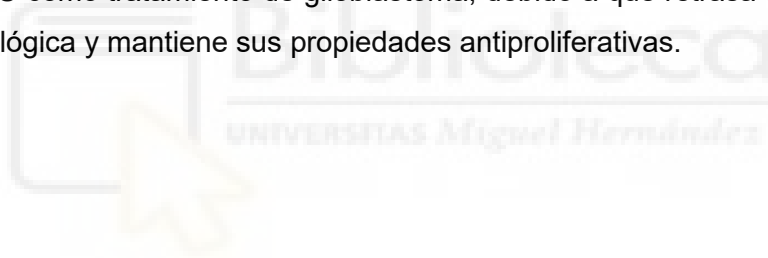
Con esta información, se realizaron ensayos de proliferación para comparar el efecto de la BCNU libre y la BCNU encapsulada en nanofibras de PMVEMA-Es. Como se muestra en la **Figura 17**, la BCNU tuvo un mayor efecto en la línea HGUE-GB-42 que en la línea HGUE-GB-37. Esto concuerda con lo observado en anteriores trabajos, que concluyeron que HGUE-GB-37 es parcialmente sensible a la BCNU y HGUE-GB-42 es completamente sensible a este fármaco (43). Además, se determinó que la resistencia a los alquilantes en estas líneas celulares está regulada por mecanismos independientes a MGMT, así como por la presencia de células madre tumorales, capaces de sustituir las células muertas y resistir el tratamiento.

No se observaron diferencias significativas entre el efecto dosis-respuesta de la BCNU libre y la BCNU encapsulada en ninguna de las concentraciones probadas en la línea HGUE-GB-37. Por parte de la línea HGUE-GB-42, las concentraciones más bajas de BCNU encapsulada mostraron un efecto ligeramente inferior al de la BCNU libre, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones más altas (**Figura 17**). Esto coincide con estudios anteriores que demostraron que la encapsulación de diferentes fármacos en nanofibras no alteran su efecto biológico (32).

En cuanto al análisis del ciclo celular, se observó mayoritariamente un efecto citostático, con un bloqueo en la fase S del ciclo celular, que se corresponde con un descenso en el porcentaje de células en la fase G₁. También se determinó un efecto citotóxico en la mayoría de las concentraciones de BCNU, siendo más significativo en la línea HGUE-GB-42 debido a su sensibilidad a este fármaco, alcanzando un 20 ± 6 % de muerte celular con respecto al control en la concentración más elevada de BCNU libre (**Figura 18**). Este efecto es consistente con los observados en anteriores trabajos sobre el efecto de BCNU en las líneas celulares HGUE-GB (44).

Los ensayos MTT mostraron que la encapsulación de BCNU en las nanofibras de PMVEMA-Es no altera sus propiedades antiproliferativas. De la misma manera, su efecto sobre el ciclo celular tampoco fue diferente al de la BCNU libre en la concentración más elevada. Sin embargo, se observó un efecto inferior con la BCNU encapsulada a 25 µM con respecto al de la BCNU libre, siendo menos significativo en la reducción del porcentaje de células en G₁ y en el incremento de la fase S.

Finalmente, el material constituido por las nanofibras poliméricas es un buen candidato para administrar BCNU como tratamiento de glioblastoma, debido a que retrasa su degradación a temperatura fisiológica y mantiene sus propiedades antiproliferativas.



6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

- Se determinaron los parámetros de electrohilatura para la síntesis de nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU, siendo estos 6,8 kV, 10 cm y 0,25 mL/h.
- Se sintetizaron nanofibras de PMVEMA-Es con BCNU al 2, 4 y 8 %, teniendo 910 ± 154 , 737 ± 168 y 855 ± 99 nm de diámetro respectivamente. En todos los casos se obtuvieron nanofibras homogéneas y sin defectos visibles.
- Las nanofibras de PMVEMA-Es/BCNU al 8 % tuvieron una eficacia de encapsulación del fármaco del $69,9 \pm 0,8$ %.
- Las nanofibras de PMVEMA-Es se disolvieron en su totalidad en medio de cultivo DMEM F12 en menos de 4 horas, en agua en menos de 48 horas y en PBS el tiempo fue mayor a las 48 horas.
- El tiempo máximo de liberación de BCNU encapsulada en nanofibras de PMVEMA-Es es de 1 hora.
- Se produce un descenso en la velocidad de degradación de la BCNU encapsulada en comparación con la BCNU libre a 37 °C en medio celular.
- Las nanofibras de PMVEMA-Es sin BCNU no disminuyen la proliferación de las líneas celulares HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42.
- No se observaron diferencias entre los efectos antiproliferativos de la BCNU libre y los efectos de la BCNU encapsulada sobre las líneas HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42.
- Los efectos citostáticos de la BCNU libre son consistentes con la BCNU encapsulada sobre los ciclos celulares de HGUE-GB-37 y HGUE-GB-42.

En conclusión, la síntesis de nanofibras de PMVEMA-Es permitió la encapsulación de BCNU en un 70 % sin modificar sus propiedades sobre la proliferación celular, por lo que se continuará trabajando en su caracterización para su posterior uso como tratamiento de GBM. Se pretende aumentar el tiempo de liberación de BCNU encapsulada y su estudio sobre otros modelos celulares de GBM, como podrían ser modelos celulares en tres dimensiones. Posteriormente, se estudiará el impacto de encapsular BCNU con compuestos que puedan contribuir al efecto terapéutico del fármaco, como pueden ser adyuvantes inmunológicos, inhibidores de vías de señalización intrínsecas, inhibidores de MGMT, entre otros.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cáncer [Internet]. [citado 5 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. LAS_CIFRAS_2024.pdf [Internet]. [citado 5 de marzo de 2024]. Disponible en: https://seom.org/images/publicaciones/informes-seom-de-evaluacion-de-farmacos/LAS_CIFRAS_2024.pdf
3. Estimación de la incidencia de cáncer en España. 2022;
4. Walsh KM, Ohgaki H, Wrensch MR. Chapter 1 - Epidemiology. En: Berger MS, Weller M, editores. Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 5 de marzo de 2024]. p. 3-18. (Gliomas; vol. 134). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128029978000013>
5. Perry A, Wesseling P. Chapter 5 - Histologic classification of gliomas. En: Berger MS, Weller M, editores. Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 12 de marzo de 2024]. p. 71-95. (Gliomas; vol. 134). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128029978000050>
6. Masui K, Mischel PS, Reifenberger G. Chapter 6 - Molecular classification of gliomas. En: Berger MS, Weller M, editores. Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 12 de marzo de 2024]. p. 97-120. (Gliomas; vol. 134). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128029978000062>
7. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncol.* octubre de 2014;16 Suppl 4(Suppl 4):iv1-63.
8. Witthayanuwat S, Pesee M, Supaadirek C, Supakalin N, Thamronganantasakul K, Krusun S. Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2018;19(9):2613-7.
9. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults. *The Lancet.* 4 de agosto de 2018;392(10145):432-46.
10. Posti JP, Bori M, Kauko T, Sankinen M, Nordberg J, Rahi M, et al. Presenting symptoms of glioma in adults. *Acta Neurol Scand.* febrero de 2015;131(2):88-93.
11. Snider JW, Mehta M. Chapter 8 - Principles of radiation therapy. En: Berger MS, Weller M, editores. Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 23 de marzo de 2024]. p. 131-47. (Gliomas; vol. 134). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128029978000086>
12. Jackson C, Westphal M, Quiñones-Hinojosa A. Chapter 12 - Complications of glioma surgery. En: Berger MS, Weller M, editores. Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 13 de marzo de 2024]. p. 201-18. (Gliomas; vol. 134). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128029978000128>
13. Martínez R. Beyond Genetics in Glioma Pathways: The Ever-Increasing Crosstalk between Epigenomic and Genomic Events. *J Signal Transduct.* 2012;2012:519807.

14. Fang Q. The Versatile Attributes of MGMT: Its Repair Mechanism, Crosstalk with Other DNA Repair Pathways, and Its Role in Cancer. *Cancers*. 11 de enero de 2024;16(2):331.
15. Wu W, Klockow JL, Zhang M, Lafortune F, Chang E, Jin L, et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacol Res*. 1 de septiembre de 2021;171:105780.
16. Nagpal S. The Role of BCNU Polymer Wafers (Gliadel) in the Treatment of Malignant Glioma. *Neurosurg Clin N Am*. 1 de abril de 2012;23(2):289-95.
17. Fleming AB, Saltzman WM. Pharmacokinetics of the Carmustine Implant. *Clin Pharmacokinet*. 1 de mayo de 2002;41(6):403-19.
18. De Bonis P, Anile C, Pompucci A, Fiorentino A, Balducci M, Chiesa S, et al. Safety and efficacy of Gliadel wafers for newly diagnosed and recurrent glioblastoma. *Acta Neurochir (Wien)*. 1 de agosto de 2012;154(8):1371-8.
19. Lee SH, Rho WY, Chang H, Lee JH, Kim J, Lee SH, et al. Carbon Nanomaterials for Biomedical Application. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1309:257-76.
20. Tiwari J, Tiwari R, Kim K. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Prog Mater Sci*. 1 de mayo de 2012;57:724-803.
21. Petrerá E. Química viva vol. 22 N° 01. Quím Viva [Internet]. abril de 2023 [citado 1 de mayo de 2024];22(01). Disponible en: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/quimicaviva/document/quimicaviva_v22_n_01
22. Mabrouk M, Das DB, Salem ZA, Beherei HH. Nanomaterials for Biomedical Applications: Production, Characterisations, Recent Trends and Difficulties. *Mol Basel Switz*. 18 de febrero de 2021;26(4):1077.
23. Anderson AR, Segura T. Injectable biomaterials for treatment of glioblastoma. *Adv Mater Interfaces*. 22 de octubre de 2020;7(20):2001055.
24. Das D, Narayanan D, Ramachandran R, Gowd GS, Manohar M, Arumugam T, et al. Intracranial nanomedicine-gel with deep brain-penetration for glioblastoma therapy. *J Control Release Off J Control Release Soc*. marzo de 2023;355:474-88.
25. Kuo YC, Chang YH, Rajesh R. Targeted delivery of etoposide, carmustine and doxorubicin to human glioblastoma cells using methoxy poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin and folic acid. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. marzo de 2019;96:114-28.
26. Duan X, Chen HL, Guo C. Polymeric Nanofibers for Drug Delivery Applications: A Recent Review. *J Mater Sci Mater Med*. 3 de diciembre de 2022;33(12):78.
27. Singh B, Kim K, Park MH. On-Demand Drug Delivery Systems Using Nanofibers. *Nanomater Basel Switz*. 16 de diciembre de 2021;11(12):3411.

28. Geyik F, Kaya S, Yılmaz DE, Demirci H, Akmayan İ, Özbek T, et al. Propolis-Loaded Poly(lactic-co-glycolic Acid) Nanofibers: An In Vitro Study. *ACS Omega*. 26 de marzo de 2024;9(12):14054-62.
29. 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*. 2018;46(sup2):515-26.
30. 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*. 2019;11:1758835919875555.
31. 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.
32. 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.
33. Tseng YY, Liao JY, Chen WA, Kao YC, Liu SJ. Sustainable release of carmustine from biodegradable poly(((D,L))-lactide-co-glycolide) nanofibrous membranes in the cerebral cavity: in vitro and in vivo studies. *Expert Opin Drug Deliv*. julio de 2013;10(7):879-88.
34. 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.
35. Badía Hernández PV. Síntesis y caracterización de nanofibras poliméricas como sistema de liberación de antineoplásicos en un modelo in vitro de glioblastoma. junio de 2023 [citado 9 de abril de 2024]; Disponible en: <http://dspace.umh.es/handle/11000/29371>
36. Loo TL, Dion RL. Colorimetric method for the determination of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *J Pharm Sci*. mayo de 1965;54(5):809-10.
37. Han L, Ren Y, Long L, Zhong Y, Shen C, Pu P, et al. Inhibition of C6 glioma in vivo by combination chemotherapy of implantation of polymer wafer and intracarotid perfusion of transferrin-decorated nanoparticles. *Oncol Rep*. enero de 2012;27(1):121-8.
38. (3) (PDF) The Influence of Polymer Solution on the Properties of Electrospun 3D Nanostructures [Internet]. [citado 7 de junio de 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/317963180_The_Influence_of_Polymer_Solution_on_the_Properties_of_Electrospun_3D_Nanostructures
39. Vargas Franco V. Estadística descriptiva para ingeniería ambiental con SPSS [Internet]. Editora Viviana Vargas Franco; 2007 [citado 12 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/52004>
40. Chinnappan BA, Krishnaswamy M, Xu H, Hoque ME. Electrospinning of Biomedical Nanofibers/Nanomembranes: Effects of Process Parameters. *Polymers*. 6 de septiembre de 2022;14(18):3719.

41. Laskar PA, Ayres JW. Degradation of carmustine in aqueous media. *J Pharm Sci.* agosto de 1977;66(8):1073-6.
42. Gough CR, Hu X. Air-Spun Silk-Based Micro-/Nanofibers and Thin Films for Drug Delivery. *Int J Mol Sci.* 3 de septiembre de 2021;22(17):9588.
43. 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.
44. Bahojb Mahdavi SZ, Pouladi N, Amini M, Baradaran B, Najafi S, Vaghef Mehrabani S, et al. Let-7a-3p overexpression increases chemosensitivity to carmustine and synergistically promotes autophagy and suppresses cell survival in U87MG glioblastoma cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 8 de abril de 2024;

