

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Curso académico 2025-2026

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Facultad de Ciencias Experimentales

CARACTERIZACIÓN DE TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$ Y SU EFECTO EN LINEAS CELULARES DE GLIOBLASTOMA PARA TERAPIA FOTODINÁMICA

Autora

Sonia Irles Menaches

Tutor

Dr. Ricardo Mallavia Marín

Cotutores

Biol. Pedro Valentín Badía Hernández y Dra. Rocío Díaz Puertas

Departamento

Farmacología, Pediatría y Química orgánica

Área de conocimiento

Química inorgánica



Resumen

El glioblastoma es el tumor primario más frecuente y agresivo del sistema nervioso central, caracterizado por su elevada heterogeneidad y naturaleza infiltrante que limita la eficacia de los tratamientos convencionales. Ante la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas, este trabajo evalúa un sistema macromolecular basado en el polímero PMVEMA funcionalizado con la metaloporfirina TPP/NH₂-Zn para su aplicación en terapia fotodinámica. La caracterización fotofísica mediante espectroscopia UV-Vis y FTIR confirmó la unión covalente del TPP/NH₂-Zn al polímero, manteniendo sus propiedades tras la funcionalización. De forma complementaria, el análisis de fluorescencia mostró modificaciones en las propiedades ópticas, destacando un desplazamiento hipsocrómico en la emisión para el PMVEMA-TPP/NH₂-Zn. La evaluación de la viabilidad celular en la línea HGUE-GB-42 mediante ensayos WST-1 y MTT mostró la ausencia de toxicidad en condiciones de oscuridad. Por otra parte, los estudios de internalización celular a 30 min y 2 h demostraron una captación celular dependiente de la dosis y el tiempo, así como la persistencia intracelular del PMVEMA-TPP/NH₂-Zn tras 24, 48 y 72 h. Además, se confirmó su internalización en modelos 3D de esferoides. En conclusión, el PMVEMA-TPP/NH₂-Zn constituye una plataforma biocompatible y prometedora como fotosensibilizador para el tratamiento del glioblastoma.

Palabras clave: glioblastoma; terapia fotodinámica; metaloporfirinas; PMVEMA.

Abstract

Glioblastoma is the most frequent and aggressive primary tumor of the central nervous system, characterized by high heterogeneity and an infiltrative nature that limits the effectiveness of conventional treatments. Given the need for new therapeutic strategies, this work evaluates a macromolecular system based on the polymer PMVEMA functionalized with the metalloporphyrin TPP/NH₂-Zn for its application in photodynamic therapy. Photophysical characterization by UV-Vis and FTIR spectroscopy confirmed the covalent binding of TPP/NH₂-Zn to the polymer, preserving its properties after functionalization. Complementarily, fluorescence analysis revealed modifications in the optical properties, highlighting a hypsochromic shift in the emission of PMVEMA-TPP/NH₂-Zn. Cell viability evaluation in the HGUE-GB-42 cell line using WST-1 and MTT assays showed the absence of cytotoxicity under dark conditions. Furthermore, cellular internalization studies at 30 min and 2 h demonstrated dose and time-dependent uptake, as well as intracellular persistence of PMVEMA-TPP/NH₂-Zn after 24, 48, and 72 h. In addition, its internalization was confirmed in 3D spheroid models. In conclusion, PMVEMA-TPP/NH₂-Zn constitutes a biocompatible and promising platform as a photosensitizer for glioblastoma treatment.

Keywords: glioblastoma; photodynamic therapy; metalloporphyrins; PMVEMA.

ÍNDICE

Resumen.....	3
<i>Abstract</i>	3
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Glioblastoma	6
1.1.1. Tratamientos actuales contra glioblastoma	6
1.2. Terapia fotodinámica.....	7
1.3. Porphirinas como fotosensibilizadores	9
1.3.1.1. Bioconjugados basados en pirroles	10
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
2.1. Antecedentes	11
2.2. Objetivos	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Funcionalización del PMVEMA-Anhidro	13
3.2. Caracterización de la tetrafenilporfirina	13
3.2.1. Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis)	13
3.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	13
3.2.3. Espectroscopía de fluorescencia	14
3.3. Ensayos celulares	14
3.3.1. Ensayos de viabilidad celular	14
3.3.2. Internalización celular.....	15
3.3.3. Internalización en modelos tridimensionales	16
3.4. Análisis de datos	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Caracterización espectroscópica.....	17
4.1.1. Análisis de la absorbancia.....	17
4.1.2. Análisis por espectroscopía FTIR	17
4.1.3. Espectroscopía de fluorescencia	18
4.2. Ensayos celulares	19
4.2.1. Evaluación de la viabilidad celular	19
4.2.2. Internalización celular.....	20
4.2.2.1. Internalización en modelos tridimensionales	26

5.	DISCUSIÓN	28
6.	CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	31
7.	BIBLIOGRAFÍA	32



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Glioblastoma

El glioblastoma (GBM) es el tumor primario del sistema nervioso central (SNC) más frecuente y agresivo en la población adulta. Actualmente, representa el 13,7% de todos los tumores cerebrales y el 52,2% de los tumores malignos (1). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se define formalmente como Glioblastoma, IDH-*wildtype*, un glioma difuso de linaje astrocitario que se caracteriza por la ausencia de mutaciones en el gen de la isocitrato deshidrogenasa (IDH) (2). Esta clasificación describe el escenario clínico más desfavorable, al asociarse con un comportamiento tumoral más agresivo, una progresión acelerada y una mayor resistencia a las terapias convencionales en comparación con otros gliomas (3).

Debido a su agresividad biológica e infiltración en el tejido sano, el GBM se clasifica como un tumor de grado 4, correspondiente al mayor grado de malignidad según la clasificación de la OMS. En consecuencia, mantiene un pronóstico desfavorable, con una mediana de supervivencia global de aproximadamente 15 meses (2,4).

El mal pronóstico de este tumor se debe en gran medida a su heterogeneidad intratumoral y plasticidad celular. A nivel genético, el GBM presenta una gran complejidad caracterizada por alteraciones frecuentes en vías de señalización críticas para la proliferación, supervivencia e invasión tumoral. Entre las más comunes se encuentran las mutaciones en promotor TERT, la amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y alteraciones en la vía supresora tumoral de p53. Además, el tumor es altamente dinámico, ya que sus subpoblaciones celulares tienen la capacidad de reprogramarse, transitando de forma reversible entre distintos estadios fenotípicos y adaptándose así a las presiones del entorno y de los tratamientos (5).

Por otra parte, el desarrollo de un microambiente hipóxico es otro factor crítico que agrava el mal pronóstico del GBM. La acelerada proliferación tumoral supera la capacidad del suministro sanguíneo, generando regiones con niveles de oxígeno extremadamente bajos. Esta situación de hipoxia protege a las células tumorales al reducir la eficacia de las terapias basadas en daño oxidativo (6).

1.1.1. Tratamientos actuales contra glioblastoma

Para combatir este agresivo tumor, el tratamiento estándar comienza con una resección quirúrgica en la cual se elimina la mayor cantidad posible de masa tumoral (7). Sin embargo, el principal desafío del GBM no es solo su rápido crecimiento, sino su naturaleza infiltrante en el tejido nervioso sano. Como consecuencia, esta invasión es invisible a la cirugía

y es la responsable de que la recurrencia del tumor se dé en el 75-90 % de los casos, a tan solo 2-3 cm de los bordes de la cavidad quirúrgica inicial (8).

Debido a esta persistencia de células infiltrantes, tras la cirugía, el tratamiento se complementa con una combinación de radioterapia y quimioterapia (7). El fármaco más usado en quimioterapia es la temozolomida (TMZ), sin embargo, su eficacia se ve limitada por barreras tanto biológicas como moleculares. Por un lado, a pesar de la capacidad de penetración de la TMZ en el sistema nervioso central, la heterogeneidad de la barrera hematoencefálica limita la distribución heterogénea del fármaco en el sitio tumoral, protegiendo a las células tumorales residuales (9). Por otro lado, el efecto citotóxico de la TMZ se ve anulado en tumores con el promotor de la enzima O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) no metilado, ya que estas células reparan activamente el daño inducido en el ADN (10). Debido a esto, se suele recurrir en segunda línea al uso de otros fármacos adyuvantes como la carmustina (BCNU), un agente alquilante que interfiere con la replicación del ADN celular, o el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento endotelial vascular, cuyo objetivo es frenar la angiogénesis (8).

A pesar de los significativos avances en la comprensión de la biología del GBM durante las últimas décadas, este progreso aún no se ha traducido en mejoras reales en el pronóstico de los pacientes, manteniéndose como uno de los mayores desafíos terapéuticos de la oncología contemporánea. Por ello, resulta imprescindible establecer nuevas estrategias terapéuticas capaces de actuar con mayor precisión sobre el tumor, minimizando el daño al tejido cerebral sano y superando los mecanismos de resistencia que favorecen su recurrencia (8,11).

1.2. Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica (PDT) es una modalidad terapéutica basada en el uso de la luz que ha emergido como una alternativa innovadora y mínimamente invasiva. Esta permite una activación controlada en el tiempo y el espacio, reduciendo notablemente la toxicidad general. Se fundamenta en la interacción de tres componentes esenciales: un fotosensibilizador (PS), luz a una longitud de onda específica y oxígeno molecular (O₂), cuya combinación induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de inducir muerte celular (12,13).

El proceso se inicia con la administración del PS, un compuesto no tóxico que se acumula de forma preferencial en el tejido tumoral. Tras un intervalo de tiempo óptimo para permitir la internalización celular y el aclaramiento en los tejidos sanos, el tumor se irradia con una luz láser a una longitud de onda concreta. El PS absorbe estos fotones para transitar desde su estado fundamental (PS⁰) hacia un estado singlete excitado (PS¹) de vida corta.

Mediante un proceso de cruce de sistemas (*intersystem crossing*) el PS^1 evoluciona hacia un estado triplete excitado (PS^3), cuya vida media prolongada le permite interactuar eficientemente con el entorno. Entonces, mediante una reacción denominada de tipo II, el PS^3 transfiere su energía al oxígeno molecular triplete (3O_2), generando oxígeno singlete (1O_2), una especie altamente reactiva y el principal agente citotóxico de la terapia (14,15) (Figura 1).

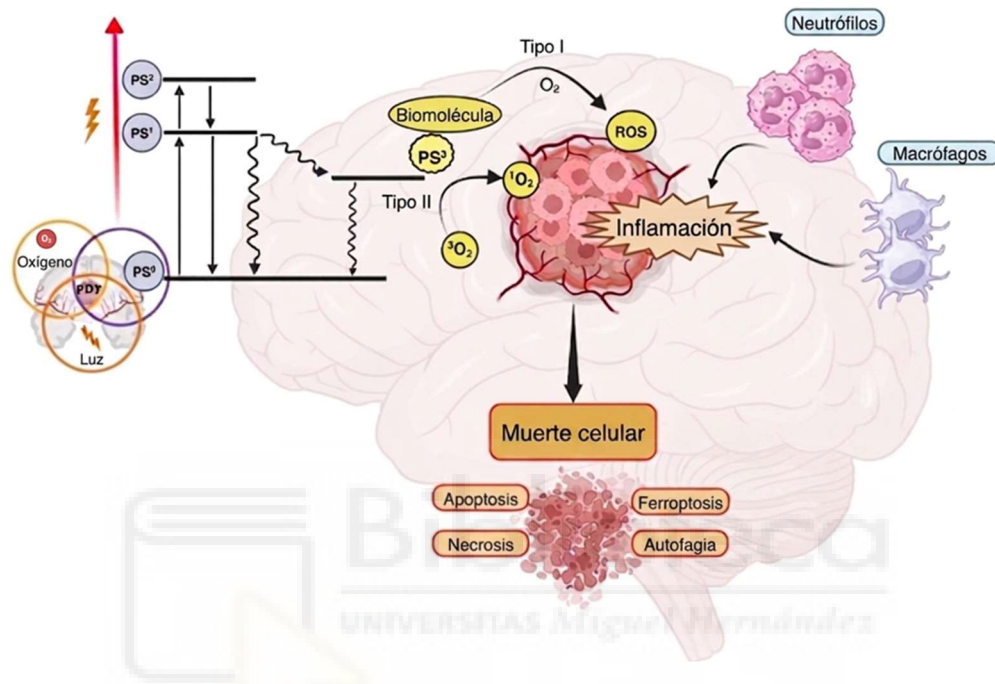


Figura 1. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica. Imagen adaptada de Cesca et. al 2025.

A diferencia de la quimioterapia o la radioterapia convencionales, cuyo efecto se basa en la inducción de daño genético, la PDT ofrece una fotocitotoxicidad alternativa mediante el daño oxidativo irreversible a lípidos, proteínas y membranas de orgánulos vitales. Dependiendo de la localización subcelular del PS y del estrés oxidativo generado, pueden activarse diferentes vías de muerte celular, incluyendo la apoptosis, la necrosis o procesos autofágicos. Además, esta terapia también es capaz de activar el sistema inmune y destruir la red vascular tumoral, un efecto que facilita la apertura de la barrera hematoencefálica y aumenta la eficacia global del tratamiento (12).

Una de las principales ventajas de esta terapia reside en su elevada selectividad, ya que debido a la corta vida media y al reducido radio de difusión del oxígeno singlete, el daño biológico se da solo en regiones donde se acumule el PS y se aplique la irradiación luminosa (16). Además, al no depender directamente de la inducción de lesiones en el ADN, la PDT puede evitar mecanismos clásicos de resistencia asociados a quimioterapéuticos como la TMZ (13).

En GBM, el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) es el PS estándar de referencia, estando aprobado por la FDA para la cirugía guiada por fluorescencia. Este compuesto es un precursor metabólico que se convierte intracelularmente en protoporfirina IX (PpIX), la cual se acumula preferentemente en las células tumorales (13).

Actualmente, y a partir del éxito clínico del 5-ALA, la investigación en PDT se centra en gran medida en el desarrollo de nuevos PS con propiedades complementarias, con el objetivo de optimizar la selectividad tumoral y mejorar la eficacia terapéutica. Entre ellos, las porfirinas y sus derivados han despertado un gran interés debido a sus propiedades fotodinámicas (17).

1.3. Porphirinas como fotosensibilizadores

Las porfirinas constituyen una de las familias de fotosensibilizadores más utilizadas en el ámbito clínico y experimental debido a su versatilidad estructural y su capacidad para generar ROS tras la irradiación lumínica. El núcleo fundamental de estos macrociclos es una estructura plana constituida por cuatro subunidades pirrol enlazadas por puentes metino (Figura 2), una estructura química que les confiere una fuerte absorción en la región visible del espectro electromagnético (17,18).

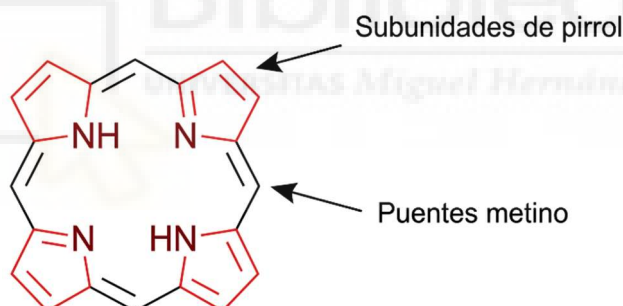


Figura 2. Estructura química de las porfirinas

Esta estructura es idónea para la síntesis dirigida, permitiendo una funcionalización precisa tanto en sus posiciones periféricas como mediante la coordinación de diferentes cationes metálicos en su cavidad central. Estas modificaciones químicas son críticas para modular el carácter anfífilo de la molécula, mejorar su solubilidad acuosa, potenciar su internalización celular y optimizar sus propiedades fotodinámicas. Además, estas variaciones permiten optimizar el rendimiento cuántico del estado triplete y la producción de ROS(18,19).

En el contexto del GBM, las porfirinas pueden presentar una acumulación diferencial en las células tumorales frente al tejido sano. Debido a su naturaleza hidrofóbica, las porfirinas presentan afinidad por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que puede favorecer su internalización por endocitosis en las células de glioma, aprovechando la sobreexpresión de receptores de LDL (20,21).

Desde el punto de vista clínico, estas moléculas presentan ventajas biológicas significativas, destacando su baja toxicidad en ausencia de luz y una elevada fototoxicidad a dosis reducidas. Además, su fluorescencia intrínseca y su afinidad tumoral permiten su uso en aplicaciones teranósticas que integran el diagnóstico por imagen y la terapia de forma simultánea (22).

1.3.1.1. Bioconjugados basados en pirroles

En los últimos años, la bioconjugación se ha convertido en una estrategia clave para el desarrollo de fármacos más específicos. A través de la unión covalente de moléculas sintéticas con agentes de origen biológico, se generan plataformas moleculares únicas que combinan de forma sinérgica los beneficios de ambos materiales, preservando las propiedades originales de cada componente mientras se maximiza su potencial clínico (23). En el caso de los macrociclos tetrapirrólicos, la bioconjugación mejora su eficiencia clínica al optimizar su solubilidad acuosa, su estabilidad, prolongar su tiempo de vida media y disminuir su agregación, preservando así sus propiedades fotoquímicas (24,25).

Entre los distintos derivados de porfirinas, las tetrafenilporfirinas (TPP) constituyen uno de los andamios sintéticos más versátiles y utilizados en la bioconjugación debido a su estabilidad química y facilidad de funcionalización con grupos reactivos (19). Por ejemplo, se funcionalizan con polímeros como el poli(metil vinil éter-alt-anhídrido maleico) (PMVEMA), un polímero sintético muy valorado en biomedicina por su biocompatibilidad y baja toxicidad. La clave de este polímero radica en sus grupos reactivos anhídrido, los cuales permiten un enlace covalente altamente estable con los derivados pirrólicos (Figura 3) (26).

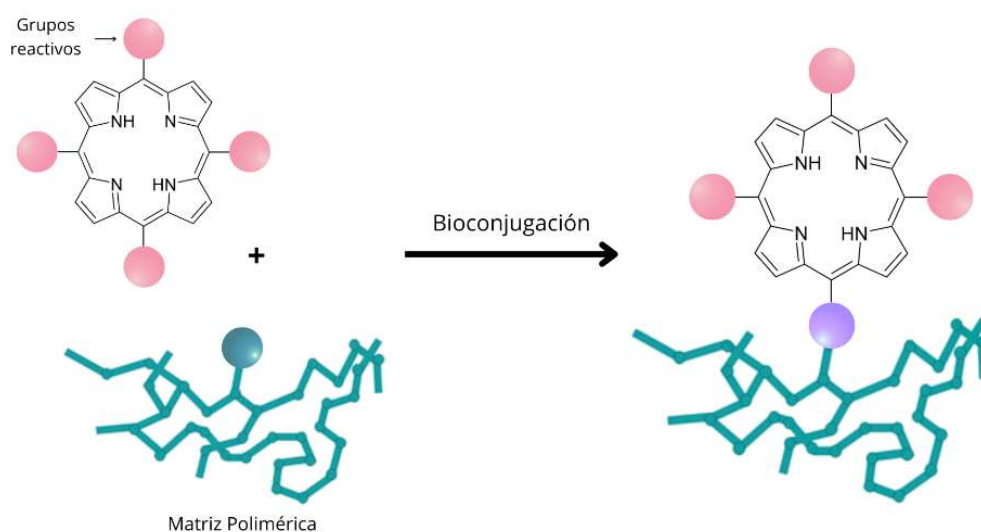


Figura 3. Bioconjugación de TPP con matrices poliméricas en la posición meso.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1. Antecedentes

Diversos estudios previos han explorado el uso de PMVEMA y sus derivados como plataformas poliméricas para la incorporación de moléculas fotoactivas. En este contexto, Mira y colaboradores (27), dentro del Grupo de Diseño y Validación de Nanobiomateriales, donde se ha desarrollado el presente trabajo, utilizaron los derivados ácido y éster del PMVEMA (PMVEMA-Ac y PMVEMA-Es, respectivamente) para la encapsulación de 5-ALA y polielectrolitos conjugados fluorescentes. El trabajo permitió evaluar el comportamiento de estos derivados de PMVEMA como sistemas de encapsulación de moléculas bioactivas, observándose que los compuestos fluorescentes mantenían sus propiedades tras la encapsulación y que el 5-ALA lograba internalizarse en células de cáncer colorrectal y queratinocitos.

En un estudio posterior, Badía-Hernández y colaboradores (28) desarrollaron nanofibras electrohiladas basadas en derivados de PMVEMA como sistema de liberación local para los agentes antineoplásicos doxorubicina (DOX), BCNU y TMZ. Este sistema fue evaluado en cultivos primarios de GBM, observándose que la incorporación de los fármacos en las nanofibras mantenía sus propiedades antitumorales, reducía su degradación en entornos fisiológicos y permitía su liberación pasiva hasta 24h.

En relación con la optimización de fotosensibilizadores para PDT, Pucelik y colaboradores (18), del grupo de *Catalysis & Fine Chemistry* de la Universidad de Coimbra, investigaron porfirinas anfifílicas fluoradas modificadas con grupos sulfoéster con el objetivo de evaluar el efecto de estas modificaciones estructurales sobre su comportamiento fotofísico y actividad fotodinámica. El estudio analizó su capacidad de internalización celular y la generación de ROS tras la irradiación, observándose una mejora del efecto fotodinámico asociada tanto a un aumento de la captación celular como a una elevada producción de oxígeno singlete, en comparación con porfirinas no modificadas.

En la misma línea, Nishida y colaboradores (20) evaluaron la relación entre la acumulación intracelular de TPP funcionalizadas en células tumorales y la posición de sus sustituyentes. Los autores observaron que modificaciones estructurales concretas en la posición meso se asocian con una mayor acumulación intracelular y una localización en vesículas intracelulares.

Finalmente, Kiew y colaboradores (29) desarrollaron un conjugado macromolecular basado en una ftalocianina, otro macrociclo pirrólico estructuralmente relacionado con las porfirinas, unida covalentemente a ácido poli-L-glutámico. El sistema presentó absorción en la región del infrarrojo cercano, elevada generación de oxígeno singlete y un aumento de la

captación en células de cáncer de mama mediado por endocitosis, acompañado de un aumento en su fototoxicidad.

2.2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es desarrollar y caracterizar un nuevo sistema macromolecular basado en el polímero PMVEMA funcionalizado con la metaloporfirina TPP/NH₂-Zn para su uso como fotosensibilizador en terapia fotodinámica contra el glioblastoma.

Con el fin de cumplir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar las propiedades fotofísicas del sistema macromolecular PMVEMA-TPP/NH₂-Zn.
- Determinar el efecto sobre la viabilidad celular en oscuridad del TPP/NH₂-Zn y del PMVEMA-TPP/NH₂-Zn en modelos celulares de glioblastoma.
- Evaluar la capacidad de internalización y acumulación intracelular de ambos compuestos en modelos celulares 2D y 3D de glioblastoma.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

El TPP/NH₂-Zn y el PMVEMA-TPP/NH₂-Zn fueron sintetizados y facilitados por el grupo de *Catalysis & Fine Chemistry* de la Universidad de Coimbra.

3.1. Funcionalización del PMVEMA-Anhidro

El TPP/NH₂-Zn se sintetizó mediante el método *one-pot* utilizando nitrobencono como oxidante y disolvente. La funcionalización del PMVEMA-Anh fue una reacción guiada por microondas en DMF a 175°C durante 20 minutos. Durante la reacción, los grupos amino del TPP/NH₂-Zn interaccionan con los anillos anhídrido del polímero, dando lugar a la formación de enlaces amida o imida (Figura 4).

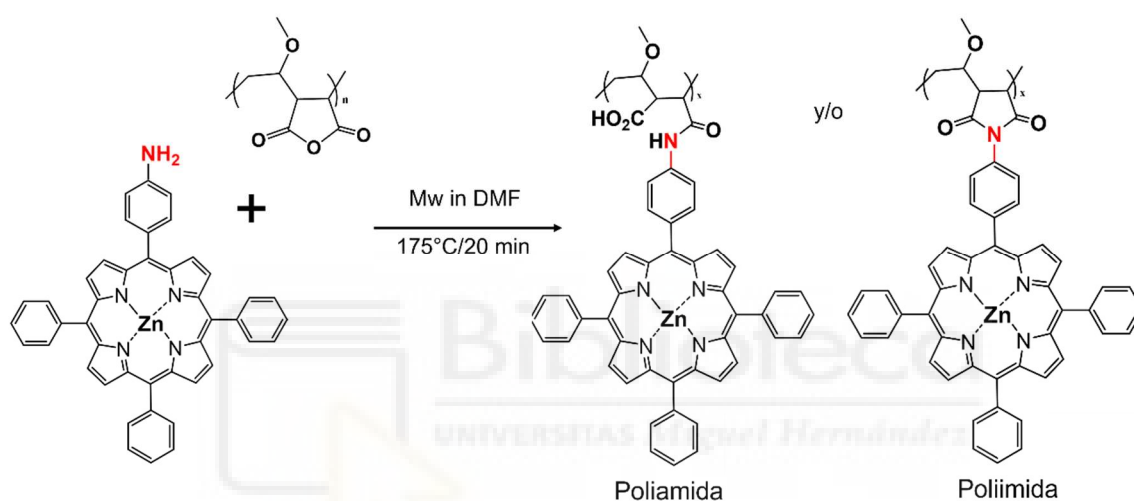


Figura 4. Reacción general de funcionalización del PMVEMA-Anh con TPP/NH₂-Zn.

3.2. Caracterización de la tetrafenilporfirina

3.2.1. Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis)

La identificación de los productos y el estudio de su pureza se llevaron a cabo mediante espectroscopía UV-Vis. Para ello, se preparó una disolución de la muestra a una concentración de 0,0025 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Las medidas de absorbancia se realizaron entre los 250 y los 800 nm, empleando cubetas de cuarzo de 10x10 mm y un espectrofotómetro UV-2700 (Shimadzu, Tokio, Japón).

3.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para la identificación de los grupos funcionales se empleó la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La muestra se preparó mediante la formación de pastillas de bromuro de potasio (KBr, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), homogeneizando el producto junto con el KBr con la ayuda de un mortero. La mezcla se transfirió a un molde de 13 mm

(SPECAC, Orpington, Reino Unido) y se introdujo en una prensa hidráulica manual (SPECAC, Orpington, Reino Unido) donde se sometió a una presión equivalente a 9 toneladas durante 10 minutos.

El comprimido obtenido se analizó en un espectrómetro infrarrojo SpectrumTwo™ (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). Los espectros se registraron en modo transmisión de 32 barridos en un rango de frecuencias de 4000 a 400 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} .

3.2.3. Espectroscopía de fluorescencia

La caracterización fluorescente de los compuestos se realizó mediante espectroscopía de fluorescencia. Para ello, se empleó un espectrofluorímetro de estado estacionario PTI (Photon Technology International) QuantaMaster (Model QM-6/2003) (Horiba, Kioto, Japón), equipado con una lámpara de Xenón como fuente de excitación continua.

Las muestras se prepararon disolviendo los compuestos en DMSO a una concentración tal que el máximo de absorbancia determinado previamente mediante espectroscopía UV-Vis fuese inferior a 0,10 u.a.. Las medidas se realizaron utilizando cubetas de cuarzo para fluorescencia de 10 × 10 mm.

3.3. Ensayos celulares

Para los estudios *in vitro* se usó la línea celular de glioblastoma multiforme HGUE-GB-42, derivada de cultivos primarios procedentes del Hospital General Universitario de Elche (HGUE) y caracterizada por el grupo de Oncología Molecular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE).

Las células se cultivaron en medio DMEM-F12 (Dubelcco's Modified Eagle's Medium; Nutrient Mixture F12 (Biowest, Riverside, CA, USA) rico en glucosa, con glutamina estable 2 mM, Hepes 25 mM, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Biowest) y 1 % de antibiótico (penicilina y estreptomicina). Las condiciones de cultivo se mantuvieron en una atmósfera humificada a 37 °C con un 5% de CO₂ en un incubador (ESCO Lifesciences GmbH, Friedberg, Alemania).

3.3.1. Ensayos de viabilidad celular

El efecto citotóxico de las porfirinas se determinó primeramente mediante un ensayo colorimétrico de WST-1. El reactivo Water-Soluble Tetrazolium 1 ó 5-(2,4-disulfofenil)-2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio (Sigma Aldrich) experimenta un cambio de color al ser reducido a formazán soluble por las deshidrogenasas mitocondriales. La intensidad de la señal colorimétrica que se obtiene depende de la actividad metabólica de las células y es proporcional al número de células viables en el pocillo.

Este ensayo se realizó a 24, 48 y 72 horas de incubación. Para ello se sembraron tres placas de 96 pocillos con densidades de 9000, 6000 y 3000 células por pocillo, respectivamente. Tras 24 horas de incubación para permitir la adherencia de las células, se añadieron los tratamientos, que consistían en concentraciones decrecientes de TPP/NH₂-Zn y de PMVEMA-TPP/NH₂-Zn de 100 y 80 µM, seguidas de diluciones seriadas a partir de esta última, hasta 0,625 µM, realizadas por sextuplicado. Pasado el tiempo de incubación correspondiente, se lavaron las células con tampón fosfato salino (DPBS, Sigma Aldrich) y se añadieron 10 µL de reactivo WST-1 por cada 100 µL de medio de cultivo en cada pocillo. Las placas se incubaron durante dos horas y posteriormente, se midió la absorbancia a 450 nm.

Para complementar la evaluación de viabilidad obtenida mediante el ensayo WST-1, se realizaron ensayos de MTT con 24 horas de incubación de los tratamientos anteriores.

El MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) experimenta un cambio de color cuando es reducido a sales de formazán ((E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-1,3-difenilformazán) moradas, por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Al igual que en el ensayo WST-1, la señal colorimétrica obtenida puede ser cuantificada y es proporcional al número de células viables en cultivo.

Para este ensayo se incubaron las células con los tratamientos durante 24 horas y pasado el tiempo de incubación, se añadió reactivo MTT (Sigma Aldrich) a una concentración final de 0,25 mg/mL. Se incubó durante 3 horas, después de las cuales se retiró el medio y se disolvieron los cristales de formazán en 100 µL de DMSO, manteniendo las placas en agitación durante 20 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm y 630 nm.

Todos los ensayos de viabilidad comentados se realizaron por triplicado y la absorbancia se midió usando el lector de placas multipocillo multimodo Cytation 1 (BioTek, Winooski EE. UU.).

3.3.2. Internalización celular

Para determinar la capacidad de penetración celular del TPP/NH₂-Zn y del PMVEMA-TPP/NH₂-Zn, se realizaron ensayos de internalización. Para ello, se sembraron placas de 96 pocillos a una densidad de 9000 células por pocillo. Tras 24 horas de incubación para permitir la adherencia de las células, se aplicaron por sextuplicado los siguientes tratamientos: medio de cultivo (control), Hoechst (control para la tinción de núcleos) y TPP/NH₂-Zn y PMVEMA-TPP/NH₂-Zn a concentraciones de 80, 40, 20 y 10 µM. Para cada concentración se prepararon dos condiciones en la misma placa, una con tiempo de incubación de 2 horas y otra de 30 minutos.

A continuación, se hicieron dos lavados con DPBS para eliminar el exceso de compuesto no internalizado. Posteriormente, se tiñeron los núcleos celulares mediante la adición de Hoechst (Thermofisher, Waltham, MA, EE. UU.) a una concentración de 0,002 mg/mL durante 30 minutos. Tras un lavado final con DPBS, se añadieron 100 μ L de este tampón a cada pocillo. Finalmente, se usó el lector de microplacas multimodo Cytation 1 para medir la intensidad de fluorescencia, la absorbancia y para realizar fotografías usando diferentes filtros. Este ensayo se realizó por triplicado.

Del mismo modo, el ensayo se repitió con incubaciones de 24 horas para ambos productos y de 48 y 72 horas solo para el producto PMVEMA/TPP-NH₂-Zn.

3.3.3. Internalización en modelos tridimensionales

Por otro lado, se evaluó la capacidad de penetración del TPP/NH₂-Zn en modelos de cultivo tridimensionales más complejos, mediante la formación de esferoides de la misma línea celular. Para ello, se usó una densidad de siembra de 20000 células por pocillo en placas de ultra-baja adherencia de fondo redondo (Costar, Kennebunk, EE. UU.), permitiendo la formación de los esferoides durante 9 días previos al inicio del ensayo. Durante este periodo, los cultivos se mantuvieron bajo condiciones normales de incubación y se renovó el medio cada 48 horas. El crecimiento de los esferoides fue registrado mediante fotografías periódicas usando el lector de placas multimodo Cytation 1. Una vez establecidos estos modelos 3D, se realizó el ensayo de internalización, en el cual se incubó usando los siguientes tratamientos: medio de cultivo (control), Hoechst (control para la tinción de núcleos) y TPP/NH₂-Zn a concentraciones de 80, 40, 20 y 10 μ M. Se incubaron durante 2 horas y 30 min siguiendo el mismo protocolo escalonado descrito en el apartado anterior. Posteriormente se tiñeron con Hoechst a una concentración de 0,002 mg/mL durante 30 minutos y tras un lavado con DPBS, se midió la absorbancia, fluorescencia y se realizaron fotografías a las 24 horas usando diferentes filtros.

Finalmente, se utilizó el programa ImageJ, desarrollado por el Instituto Nacional de la Salud (Bethesda, MD, EE. UU.), para medir el diámetro de los esferoides.

3.4. Análisis de datos

Los datos obtenidos se expresan como la media $\pm$ desviación estándar. Para los ensayos en placas de 96 pocillos se utilizó una n mayor o igual a 6 ($n \geq 6$). 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 una vía. Las diferencias estadísticamente significativas se representan marcadas con **** si el p-valor $< 0,0001$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización espectroscópica

4.1.1. Análisis de la absorbancia

Para confirmar la estructura química del TPP/NH₂-Zn y del producto de funcionalización PMVEMA-TPP/NH₂-Zn, se evaluaron las propiedades ópticas de las muestras mediante espectroscopía UV-Vis.

En la Figura 5 se muestran los espectros de absorción UV-Vis normalizados y obtenidos para las dos muestras. Ambos espectros presentan un pico intenso, la característica banda Soret, a 430 nm de los anillos tetrapirrólicos, la cual se estrecha en el polímero funcionalizado. Además, se identifican otras tres bandas características, las bandas Q, a 525, 560 nm y 605 nm, señaladas con flechas rojas en la figura.

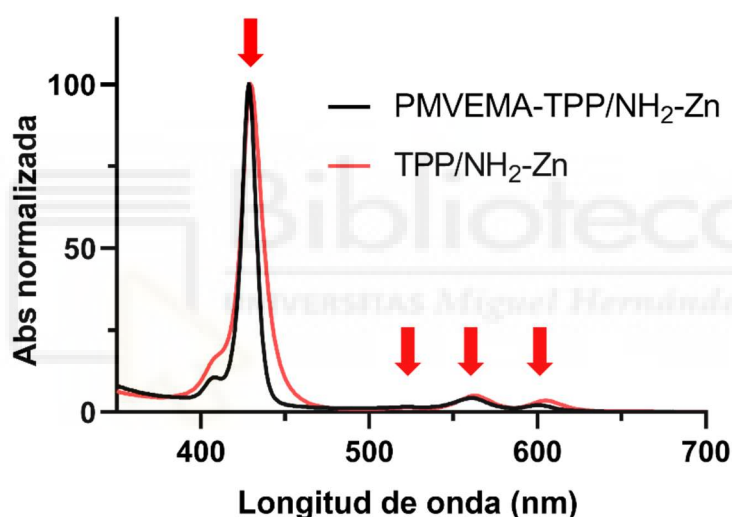


Figura 5. Espectros normalizados de absorción UV-Vis del TPP/NH₂-Zn y PMVEMA-TPP/NH₂-Zn. (Rojo) TPP/NH₂-Zn, (Negro) PMVEMA-TPP/NH₂-Zn. Las flechas señalizan las bandas a destacar de los compuestos.

4.1.2. Análisis por espectroscopía FTIR

Con el objetivo de confirmar la unión covalente entre la matriz polimérica y el complejo de coordinación TPP/NH₂-Zn, se llevó a cabo un análisis mediante espectroscopía FTIR de los precursores y el producto final de la reacción.

En la Figura 6 se muestra la superposición de los espectros de infrarrojo de TPP/NH₂-Zn, PMVEMA-TPP/NH₂-Zn y del polímero PMVEMA-Anh, ampliados en la región de 2000 a 1400 cm⁻¹.

Al analizar el espectro del polímero, se identifican varias bandas características. En primer lugar, en la región entre 1900 y 1700 cm^{-1} destacan tres señales intensas a 1860, 1780 y 1720 cm^{-1} . Estas bandas se encuentran también en el espectro del PMVEMA-TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$, desplazadas ligeramente a 1849, 1767 y 1704 cm^{-1} , respectivamente. No obstante, en la primera de las bandas, se observa una marcada reducción de la intensidad (Figura 6). Adicionalmente, en la región comprendida entre 1550 y 1400 cm^{-1} se distinguen tres bandas características del complejo TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$, las cuales se mantienen tras la funcionalización, pero se encuentran ausentes en el espectro del polímero puro.

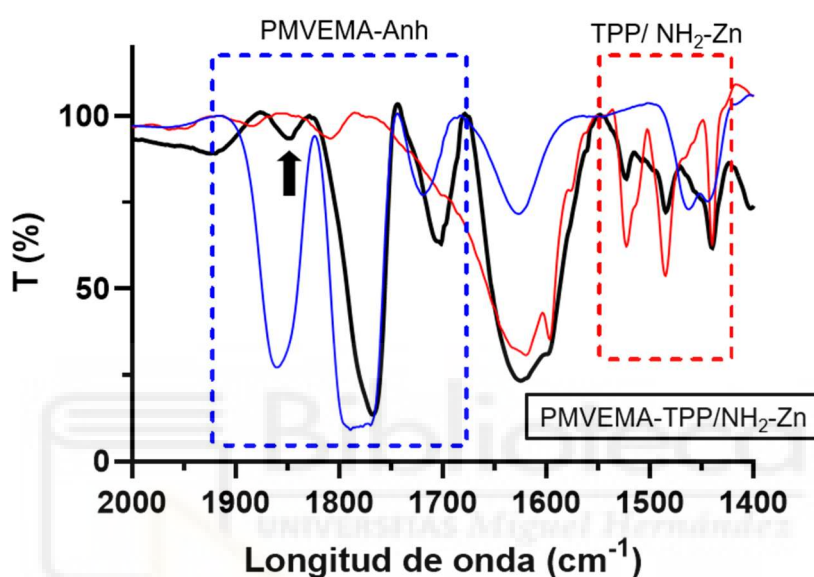


Figura 6. Espectros de infrarrojo (FTIR) de PMVEMA-TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$ de 2000 a 1400 cm^{-1} . (Rojo) TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$, (Azul) PMVEMA-Anh, (Negro) PMVEMA-TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$. La flecha negra indica la reducción de la banda anhidro. Los datos fueron normalizados tomando como referencia el pico máximo de transmitancia.

4.1.3. Espectroscopía de fluorescencia

Para completar la caracterización espectroscópica, se evaluaron las propiedades fluorescentes de los productos mediante espectroscopía de fluorescencia. Para ello, las muestras fueron excitadas utilizando la longitud de onda correspondiente a los máximos de absorción determinados previamente por espectroscopía UV-Vis.

El compuesto TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$ presentó un máximo de excitación a 430 nm, valor que se conserva tras la funcionalización. Sin embargo, el perfil de emisión mostró diferencias entre ambas muestras. Mientras que el TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$ exhibe un máximo de emisión a 617 nm, el PMVEMA-TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$ presenta un desplazamiento hipsocrómico de la banda, situando su máximo de emisión a 604 nm (Figura 7).

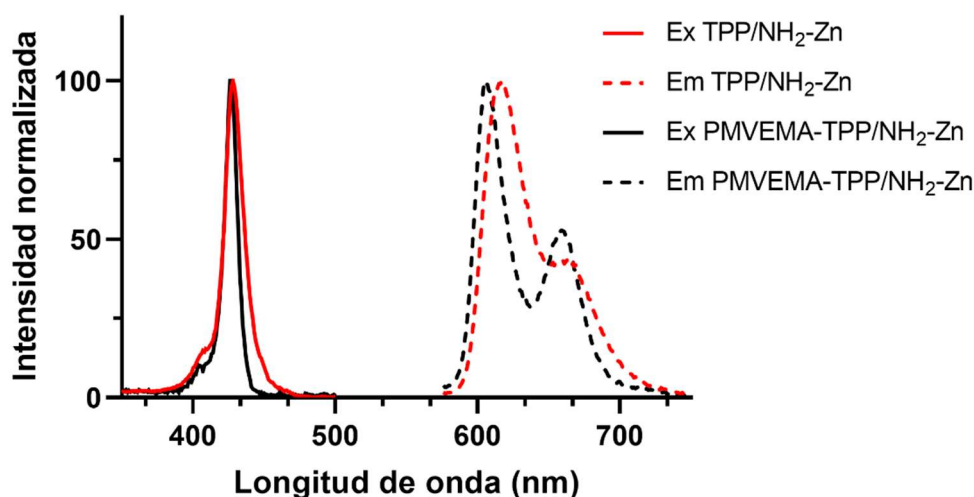


Figura 7. Espectros de fluorescencia de TPP/NH₂-Zn y PMVEMA-TPP/NH₂-Zn. Se representa en rojo la excitación (línea continua) y emisión (línea discontinua) del TPP/NH₂-Zn y en negro la excitación (línea continua) y emisión (línea discontinua) del PMVEMA-TPP/NH₂-Zn.

4.2. Ensayos celulares

4.2.1. Evaluación de la viabilidad celular

En primer lugar, se evaluó el efecto del compuesto TPP/NH₂-Zn sobre la viabilidad celular tras 24 horas de incubación mediante el ensayo WST-1.

Se observó que la concentración más baja ensayada (0,625 μ M) no alteró la viabilidad celular, manteniéndose alrededor del 100 % respecto al control. Sin embargo, a concentraciones superiores (a partir de 1,25 μ M), se observó un aumento dosis-dependiente de la viabilidad celular hasta alcanzar los 20 μ M, con porcentajes significativamente superiores al 100 %. A partir de esta concentración, tuvo lugar una disminución progresiva de la viabilidad hasta los 100 μ M, aunque los valores continuaron siendo significativamente superiores a los del control. (Figura 8A).

Ante estos resultados, se validaron los datos mediante un segundo ensayo de viabilidad, el ensayo MTT. Mediante esta técnica se observó que la viabilidad se mantuvo estable alrededor del 100%, sin mostrar diferencias significativas respecto al control (Figura 8A).

Del mismo modo, se repitieron ambos ensayos para evaluar la viabilidad celular del PMVEMA-TPP/NH₂-Zn. Los resultados del WST-1 mostraron que la viabilidad se mantuvo estable a partir de 1,25 μ M, tras un ligero incremento respecto al control. Sin embargo, con el MTT los valores se mantuvieron estables para todas las concentraciones probadas (Figura 8B).

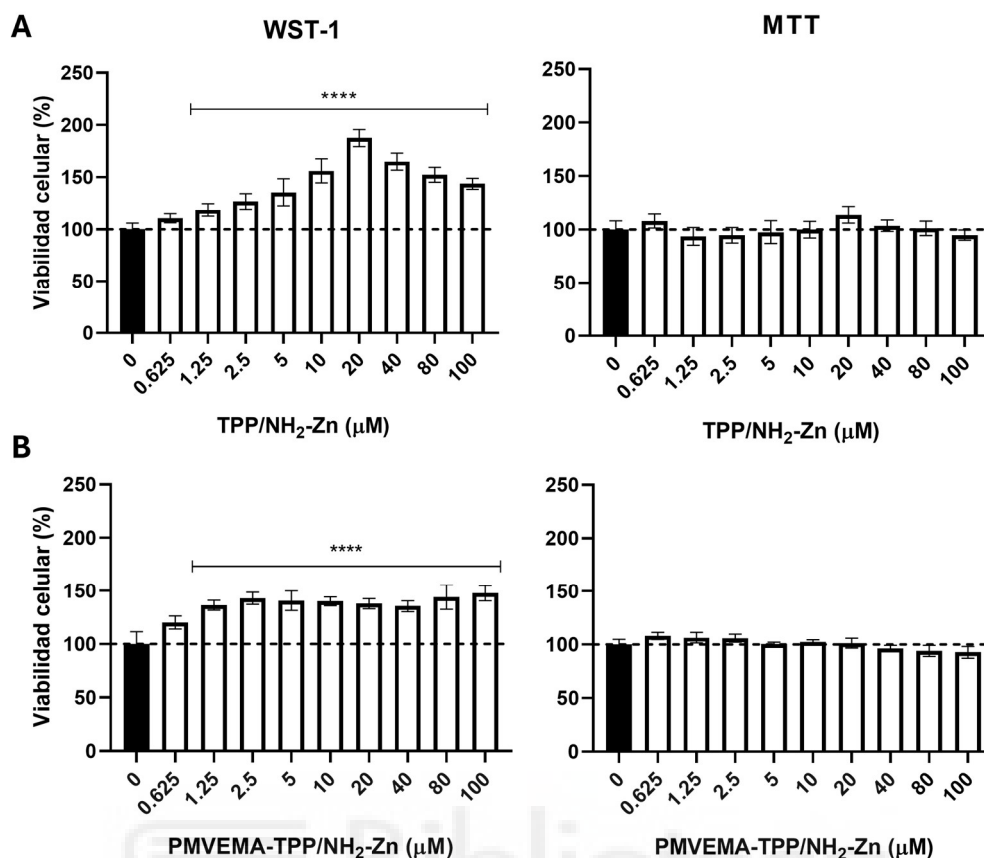


Figura 8. Ensayos de viabilidad celular tras 24h de incubación. (A) Viabilidad de TPP/NH₂-Zn con WST-1 y MTT. (B) Viabilidad de PMVEMA-TPP/NH₂-Zn con WST-1 y MTT. La concentración más baja en WST-1 y todas las concentraciones MTT no mostraron cambios estadísticamente significativos, en comparación con las concentraciones más altas de WST-1 con un p-valor < 0,0001.

4.2.2. Internalización celular

Para evaluar la internalización y localización intracelular de los compuestos, se analizaron los diferentes canales de fluorescencia en un mismo pocillo (Figura 9). El filtro de contraste de campo claro permitió visualizar la morfología celular, mientras que la tinción de los núcleos celulares con Hoechst se observó en el filtro DAPI.

Por otro lado, la fluorescencia emitida por el compuesto TPP/NH₂-Zn puede detectarse mediante los filtros 585/40 nm (naranja) y 647/57 nm (rojo). Finalmente, se presentan las imágenes resultantes de la superposición de todos los filtros, tanto en fondo negro para facilitar la visualización de la fluorescencia como con fondo claro para observar conjuntamente la morfología celular y la fluorescencia, permitiendo evaluar la localización intracelular e internalización del compuesto.

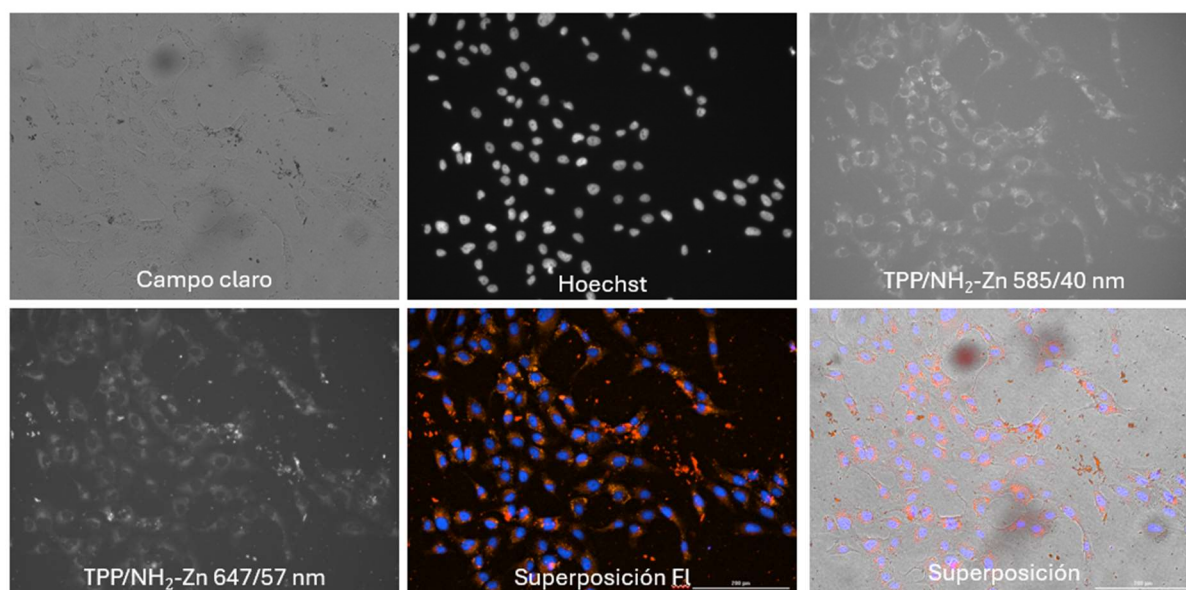


Figura 9. Filtros seleccionados para el análisis de la internalización del compuesto.

La evaluación de la internalización celular del compuesto TPP/NH₂-Zn tuvo lugar en función de la concentración y del tiempo de incubación. Para ello se adquirieron imágenes con todos los filtros tras 30 minutos y 2 horas de tratamiento, a un rango de concentraciones de 10, 20, 40 y 80 μ M (Figura 10). Las imágenes se presentan con fondo claro para facilitar el análisis de la morfología celular.

Para todas las condiciones, se observó una densidad celular y una morfología característica uniforme. Sin embargo, se observan algunas células con morfologías que podrían estar relacionadas con procesos apoptóticos. En cuanto a la internalización del compuesto, se observó una acumulación progresiva de la señal en estructuras redondeadas o agregados en el interior celular.

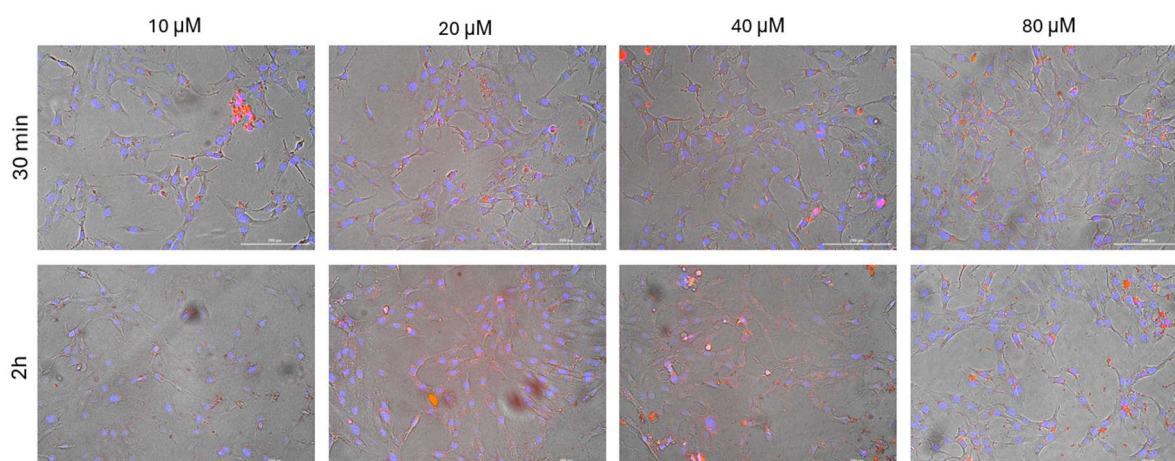


Figura 10. Internalización de TPP/NH₂-Zn tras 30 min y 2h de incubación a diferentes concentraciones (10-80 μ M).

En la Figura 11 se representan las absorbancias y fluorescencias obtenidas durante el ensayo de internalización del TPP/NH₂-Zn. Respecto a los valores de absorbancia, se observa un incremento dosis-dependiente al aumentar la concentración del compuesto. Además, a la concentración más baja (10 μ M), existe una diferencia notable en la absorbancia entre ambos tiempos de incubación. Esta diferencia temporal se reduce de forma progresiva a 20 μ M y desaparece a las concentraciones más elevadas (40 y 80 μ M). Por otro lado, la intensidad de fluorescencia también aumenta al elevar la concentración, mostrando diferencias entre los tiempos de incubación a 10 y 20 μ M que se reducen a concentraciones más altas. Cabe destacar que a la concentración de 80 μ M y 2 h de incubación, se aprecia un ligero descenso en la señal de fluorescencia.

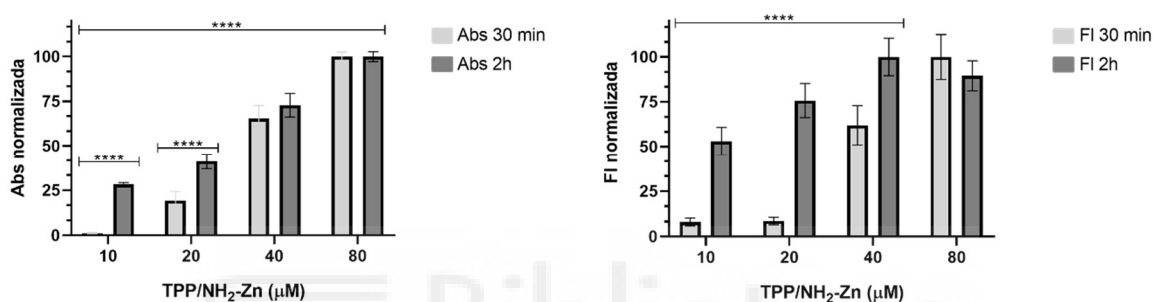


Figura 11. Absorbancia y fluorescencia medidas durante el ensayo de internalización del TPP/NH₂-Zn. Para la absorbancia, a 10 y 20 μ M se observan diferencias significativas entre tiempos a p-valor < 0,0001. Entre concentraciones, todos los resultados son estadísticamente significativos. Para la fluorescencia, entre 10 y 40 μ M se observan diferencias significativas entre tiempos y concentraciones a p-valor < 0,0001.

El mismo ensayo de internalización se llevó a cabo para el PMVEMA-TPP/NH₂-Zn, empleando idénticas condiciones experimentales y de captura de imágenes. Con el fin de simplificar la visualización, en la Figura 12 se representa la concentración más elevada (80 μ M) para ambos tiempos de incubación en comparación con el producto libre. Cabe señalar que las diferencias observadas en el contraste y coloración entre experimentos se debe exclusivamente al procesamiento de la imagen.

En el caso del PMVEMA-TPP/NH₂-Zn, se observó el mismo patrón de localización del producto, caracterizado por su agregación en el interior celular. Además, se identifican de manera aislada algunas células con morfología apoptótica. La intensidad de la señal fluorescente del polímero derivatizado es más débil que la del TPP/NH₂-Zn (Figura 12).

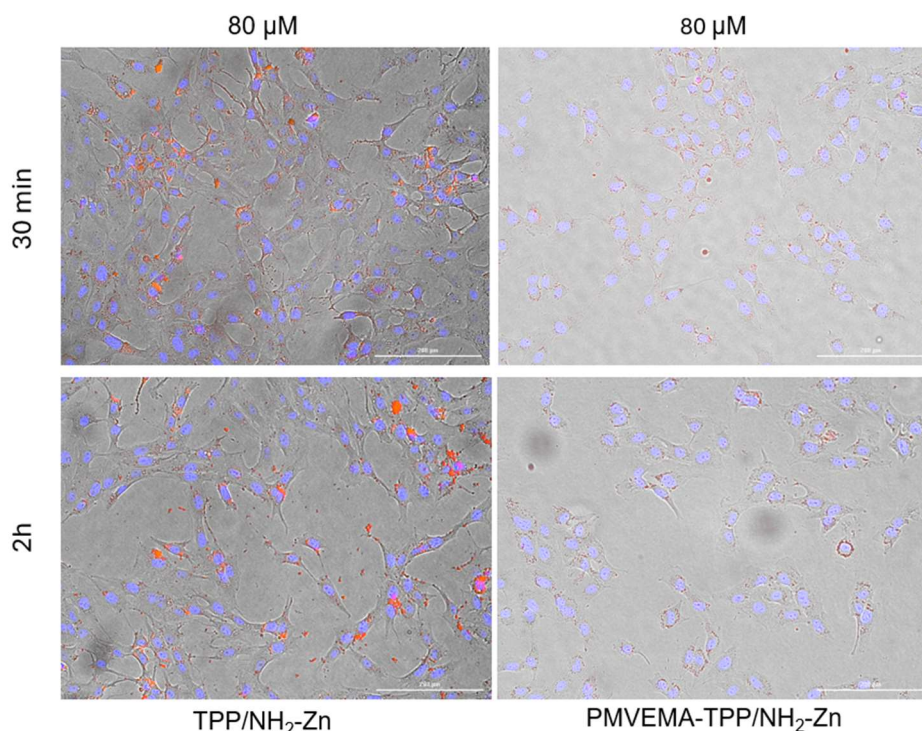


Figura 12. Comparación de la internalización celular de TPP/NH₂-Zn y PMVEMA-TPP/NH₂-Zn con la misma concentración a 30 minutos y 2 horas.

Para la evaluación de la internalización celular de ambos compuestos en un periodo más prolongado y el estudio del efecto de viabilidad observado anteriormente mediante WST-1, se extendió el ensayo hasta un tiempo de incubación de 24 h. Para su representación, se generaron imágenes con fondo negro para destacar la fluorescencia de los compuestos. (Figura 13).

En primer lugar, se observó un incremento progresivo en la intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo para ambos tratamientos. No obstante, al comparar la internalización entre ambos compuestos se observaron notables diferencias en su comportamiento. A tiempos cortos de exposición (30 min y 2 h), el PMVEMA-TPP/NH₂-Zn mostró una intensidad inferior en comparación con el compuesto libre. Esta diferencia se reduce a las 24 h, donde los niveles de fluorescencia de ambos tratamientos tienden a igualarse.

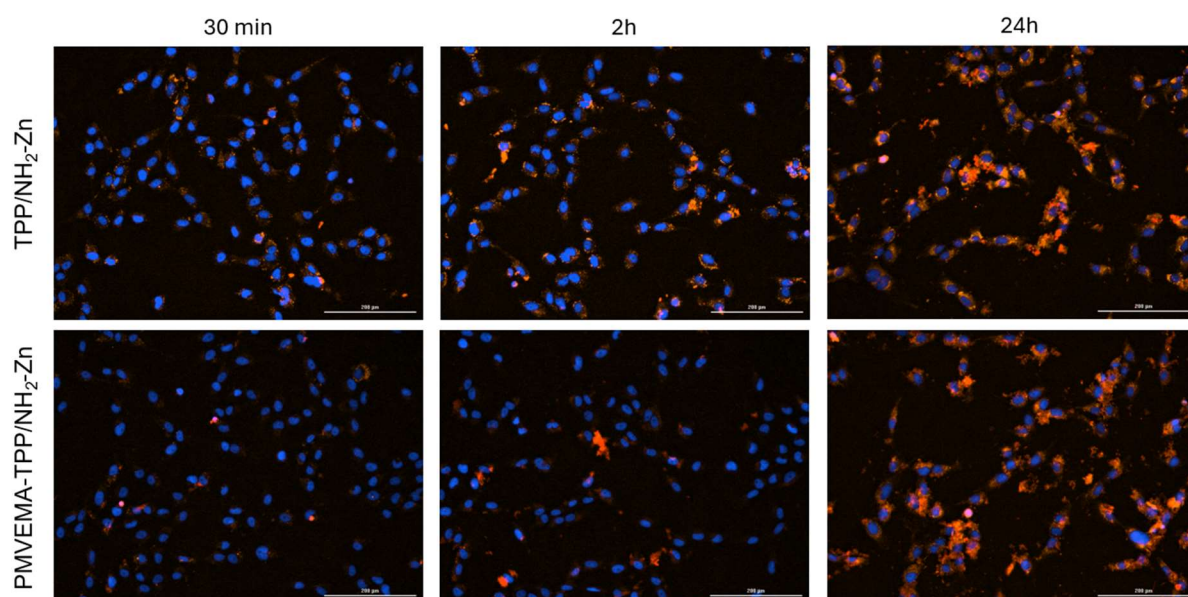


Figura 13. Internalización celular de TPP/NH₂-Zn y PMVEMA-TPP/NH₂-Zn tras 30 min, 2h y 24 h de incubación a 80 μ M.

Una vez establecido que el tiempo de exposición es determinante para la internalización de los compuestos se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (20, 40 y 80 μ M) al tiempo máximo evaluado de 24h. A este tiempo de incubación se observó un aumento dosis-dependiente notable de la señal fluorescente para ambos compuestos (Figura 14).

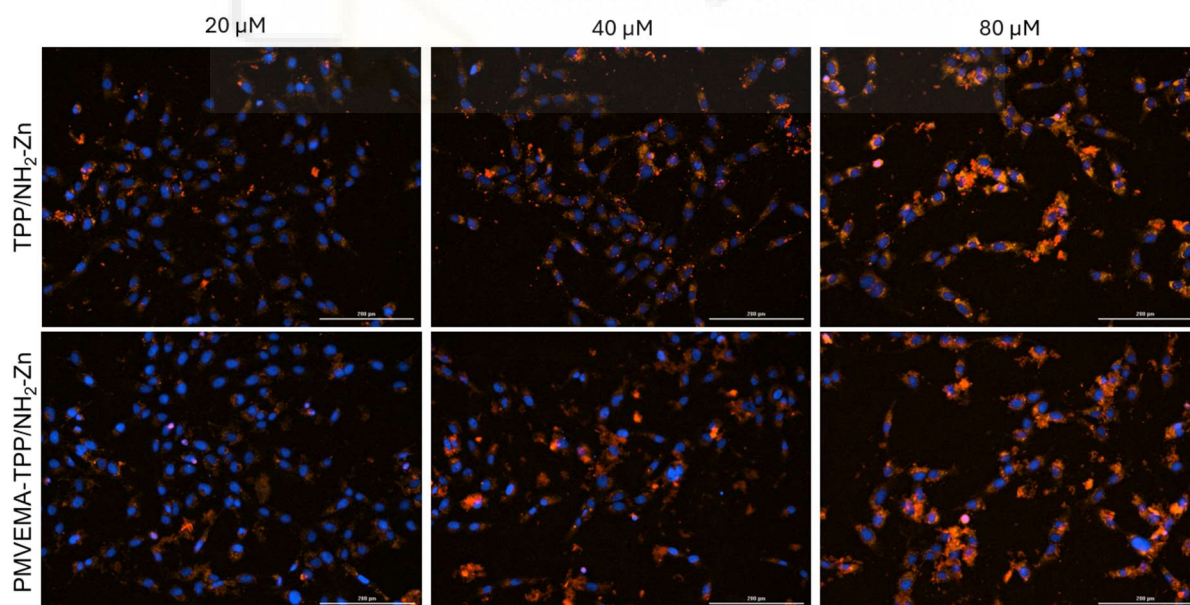


Figura 14. Internalización de TPP/NH₂-Zn y PMVEMA-TPP/NH₂-Zn a concentraciones de 20, 40 y 80 μ M tras 24 horas de incubación.

Durante este ensayo se observó una diferencia en el comportamiento fluorescente de ambos compuestos. En el caso del TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$, la señal de fluorescencia se detectó mayoritariamente en el filtro 585/40 nm (naranja), mientras que en el filtro 647/57 nm (rojo) se observó señal solo en puntos localizados. Por el contrario, en el PMVEMA-TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$, la señal fluorescente fue más intensa en el filtro rojo y mostró una distribución espacial que coincidía completamente con la observada en el naranja. Esta colocalización se aprecia en la imagen de superposición, donde la contribución del color rojo es predominante (Figura 15).

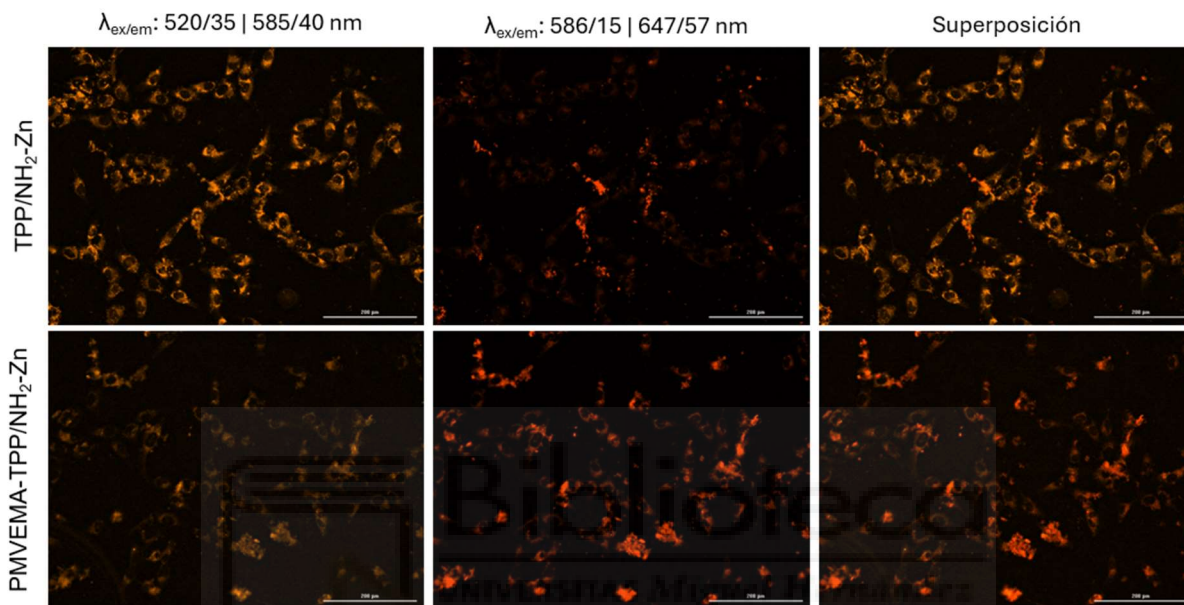


Figura 15. Comparación de fluorescencia de TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$ y PMVEMA-TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$. Imágenes tomadas a 24 horas de incubación y concentración 80 μM con los filtros RFP ($\lambda_{\text{ex/em}}$: 520/35 | 585/40 nm) y Texas Red ($\lambda_{\text{ex/em}}$: 586/15 | 647/57 nm).

A continuación, para evaluar el efecto a largo plazo, se extendieron los tiempos de incubación para el PMVEMA-TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$ hasta las 48 y 72 horas (Figura 16). Los ensayos de viabilidad celular no revelaron diferencias significativas respecto al control (Figura 16A). Paralelamente, se analizó la persistencia e internalización del producto tras estos tiempos de incubación. La Figura 16B muestra las imágenes tomadas a las concentraciones de 20 y 80 μM , donde se muestra el mantenimiento de la señal fluorescente intracelular para todos los tiempos, aunque se aprecia una sutil atenuación de la intensidad en los tiempos más elevados. Se observa también una dependencia de la dosis, pues la señal es más intensa y definida a 80 μM .

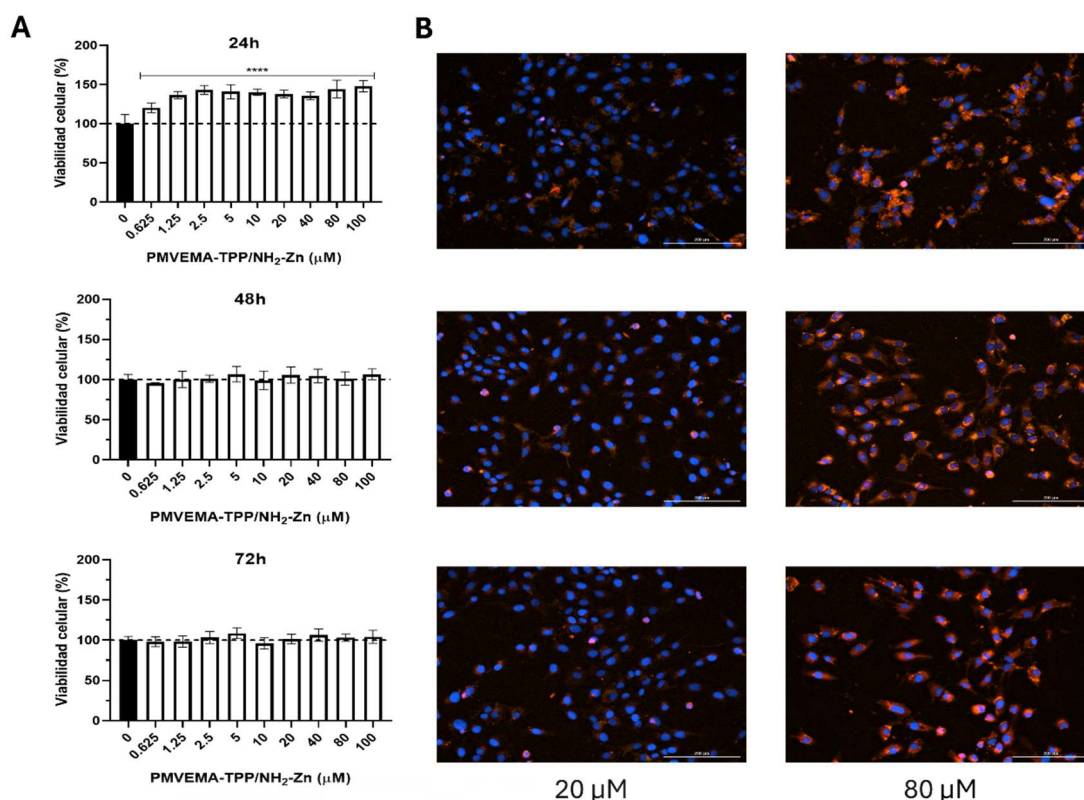


Figura 16. Efecto de los tiempos de incubación prolongada en la viabilidad e internalización celular. (A) Viabilidad e internalización celular tras 24, 48 y 72h de incubación con TPP/NH₂-Zn. (B) Viabilidad e internalización celular tras 24, 48 y 72h de incubación con PMVEMA-TPP/NH₂-Zn.

4.2.2.1. Internalización en modelos tridimensionales

Una vez caracterizada la internalización celular del TPP/NH₂-Zn y PMVEMA-TPP/NH₂-Zn en modelos monocapa, se procedió a evaluar de manera preliminar la internalización del TPP/NH₂-Zn libre en modelos tridimensionales. Como paso previo al estudio, se estableció y caracterizó la morfología y el crecimiento de los esferoides durante 10 días.

Los resultados, recogidos en la Figura 17, muestran la morfología y diámetro de los esferoides en los días 4, 6, 8 y 10 en la misma línea celular (HGUE-GB-42). En ellos se observa un diámetro promedio constante de unos 400 μm. Desde el punto de vista morfológico, las imágenes revelan la formación de esferoides compactos, esféricos y con bordes definidos.

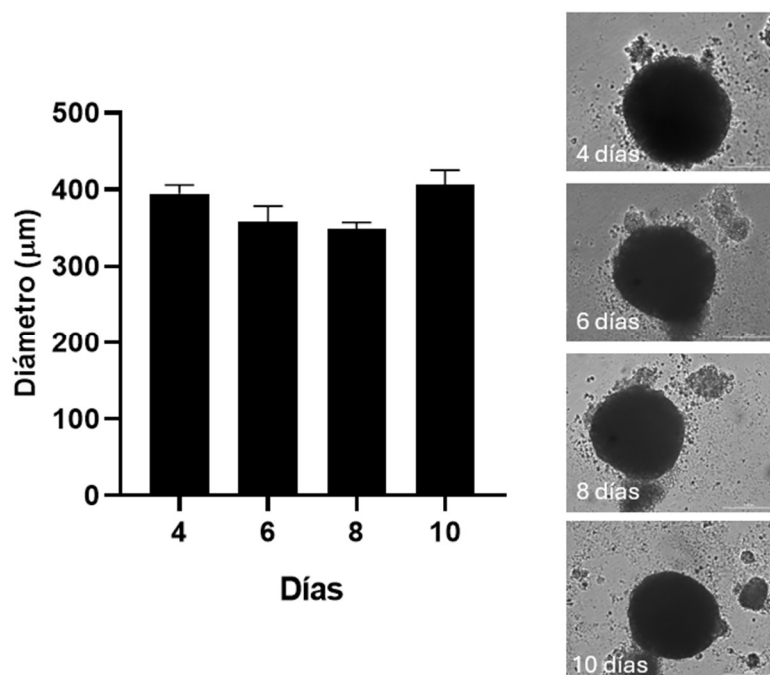


Figura 17. Morfología y crecimiento del esferoide de GB-42 a lo largo de 10 días. Todas las fotos fueron realizadas con el mismo número de aumento.

Como se muestra en la Figura 18, se observó la internalización y colocación del TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$ con el Hoechst tras 24 horas de incubación, a las concentraciones de 20, 40 y 80 μM .

No obstante, debido a la complejidad temporal que requiere el mantenimiento estable de estos modelos tridimensionales, este ensayo se planteó como un estudio preliminar. Por tanto, se requerirán estudios adicionales en el futuro para completar la caracterización de la cinética de internalización de estos compuestos en esferoides.

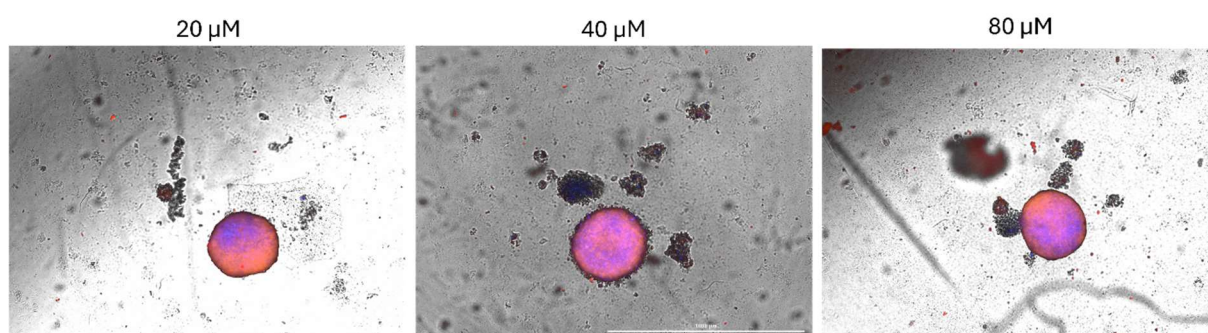


Figura 18. Internalización y colocación del TPP/ $\text{NH}_2\text{-Zn}$ en modelos tridimensionales de HGUE-GB-42 tras diez días de crecimiento.

5. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo era el desarrollo y caracterización del sistema macromolecular basado en el polímero PMVEMA funcionalizado con la metaloporfirina TPP/NH₂-Zn, con el fin de evaluar su potencial como fotosensibilizador avanzado en terapia fotodinámica contra el GBM. Para alcanzar este objetivo se llevó a cabo la síntesis, caracterización y evaluación *in vitro* de la metaloporfirina libre (TPP/NH₂-Zn) y el producto funcionalizado (PMVEMA-TPP/NH₂-Zn), estableciendo una comparación entre ambos sistemas.

Para confirmar la funcionalización del PMVEMA-anhidro con el TPP/NH₂-Zn y evaluar el comportamiento fotofísico del producto final, se registraron los espectros de absorción UV-Vis de ambos compuestos. Como se muestra en la Figura 5, el polímero funcionalizado conserva las bandas características del TPP/NH₂-Zn, incluyendo la banda Soret a 430 nm y tres bandas Q a 525, 560 y 605 nm aproximadamente. La presencia de estas bandas en el producto final, sin cambios apreciables en su posición o forma, indica que la funcionalización no altera la integridad de la metaloporfirina y confirma la incorporación del TPP/NH₂-Zn al polímero (30).

Por otra parte, se compararon los espectros FTIR del PMVEMA-Anh, TPP/NH₂-Zn y PMVEMA-TPP/NH₂-Zn. En el espectro del polímero funcionalizado se identificaron claramente tres bandas características del TPP/NH₂-Zn en la región aromática, entre 1550 y 1400 cm⁻¹, correspondientes a los modos de vibración del anillo de fenilo, lo que confirma que el núcleo de la porfirina permanece estructuralmente intacto (30). Adicionalmente se analizó la región comprendida entre 1900-1700 cm⁻¹, donde se observan tres bandas, que en el polímero PMVEMA-Anh corresponden a las vibraciones del carbonilo del anhídrido (31). Se observó que, tras la funcionalización, estas bandas se mantienen en el espectro, aunque experimentan ligeros desplazamientos debidos a cambios en el entorno químico (Figura 6). Entre ellas, destaca la reducción de la primera banda a 1860 cm⁻¹, lo que evidencia que parte de los anillos anhídridos se han abierto y transformado en enlaces amida al reaccionar con los grupos amino de la porfirina (Figura 4) (31). Por tanto, esta disminución de la banda confirma la formación del nuevo producto, mientras que la persistencia de una señal residual indica que parte de los grupos anhidro permanecen sin reaccionar.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis mediante espectroscopia de fluorescencia. Al comparar los espectros, se observa que el perfil de excitación se mantiene inalterado para ambos productos, sin embargo, para el polímero funcionalizado se observa un desplazamiento hipsocrómico del máximo de la banda de emisión, el cual se traslada de 617 nm a 604 nm (Figura 7). Este desplazamiento coincide con el observado experimentalmente por Amiri *et al.* tras la polimerización de su producto (32) y puede justificarse por los hallazgos

de Shi *et al.*, quienes explicaron que el acoplamiento de metaloporfirinas de zinc a una matriz cambia el entorno molecular, lo que afecta a las propiedades fluorescentes del compuesto (33).

Una vez caracterizados los productos, se realizaron estudios de viabilidad celular. Mediante el ensayo de WST-1 se observó un aumento de la viabilidad celular hasta valores mayores del 100%. Sin embargo, estos resultados no corresponden a una proliferación celular real, sino a una posible interferencia por solapamiento de los espectros de absorción. La banda Soret del TPP/NH₂-Zn se encuentra a 430 nm, coincidiendo con la región de lectura del formazán en el WST-1 (450 nm) (34). La posterior disminución de esta señal a partir de 20 µM se podría atribuir a una agregación de las porfirinas a las altas concentraciones (25) (Figura 8A). Esta hipótesis de interferencia entre los productos se confirmó al validar los datos con el ensayo de MTT, el cual se mide a 570 nm, una región del espectro alejada de la banda de absorción mayoritaria del producto (35). Los valores obtenidos mediante MTT se mantuvieron estables y cercanos al control, confirmando que el compuesto no disminuye la viabilidad celular de la línea HGUE-GB-42 de glioblastoma (Figura 8B).

Tras la validación de la viabilidad, se evaluó internalización celular a 30 minutos y 2 horas (29) y a diferentes concentraciones, comparando la porfirina libre frente al polímero derivatizado. Al evaluar la morfología celular, se observó que la mayor parte de las células incubadas con el TPP/NH₂-Zn y el PMVEMA-TPP/NH₂-Zn mantuvieron una estructura y densidad celular estables para todas las condiciones. No obstante, a pesar de que en los MTT no se observó un efecto en la viabilidad celular, en ambos tratamientos se detectó de forma aislada la presencia de células con indicios de morfología apoptótica (Figuras 10 y 12). Este efecto no se considera representativo de la toxicidad del sistema, sino que se atribuye a la heterogeneidad de este tipo de líneas tumorales, donde ciertas células presentan mayor sensibilidad a la internalización de estos compuestos (5). En cuanto a la internalización celular, ambos compuestos fueron internalizados y compartieron un patrón de localización similar, caracterizado por la acumulación del producto en forma de agregados en el interior celular. Esta compartimentación sugiere que los productos podrían ser internalizados mediante vías de endocitosis, quedando confinados en vesículas endosómicas. En la literatura se ha visto que las tetrafenilporfirinas se internalizan mediante dos mecanismos principales: endocitosis y difusión pasiva y la capacidad de internalización celular depende del tipo y la posición de las modificaciones estructurales introducidas. Específicamente, las modificaciones en la posición meso, como la del compuesto TPP/NH₂-Zn, se asocian con una mayor acumulación intracelular y una colocación con vesículas celulares (20). Por otro lado, esta agregación asociada con vesículas intracelulares podría estar vinculada con el fenómeno de autofagia, otro proceso común en células de glioblastoma tras la captación de porfirinas(17).

En cuanto al proceso de internalización, se observó que la captación intracelular de ambos compuestos depende tanto del tiempo de incubación como de la concentración administrada. Por un lado, el incremento de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo refleja una acumulación progresiva de los compuestos en el espacio intracelular (Figuras 13). No obstante, el PMVEMA-TPP/NH₂-Zn mostró una menor intensidad a tiempos cortos en comparación con el TPP/NH₂-Zn, lo que refleja una cinética de internalización más lenta. Este comportamiento puede atribuirse a que las modificaciones estructurales modulan su interacción con sistemas biológicos, afectando su captación celular y la velocidad de internalización(20). A pesar de esto, las señales de fluorescencia se igualan a las 24 horas, demostrando que a tiempos prolongados el polímero alcanza una eficiencia de internalización equivalente a la del compuesto libre. Por otra parte, el análisis de las diferentes concentraciones a las 24 horas mostró un comportamiento dosis-dependiente notable para ambos tratamientos (Figura 14). Este incremento sugiere que las vías de transporte celular implicadas en la internalización no se saturan en el rango evaluado, permitiendo una captación continua de ambos productos.

Durante este experimento, se observó una marcada diferencia en el comportamiento óptico intracelular de ambos compuestos. Para el monómero libre, la señal predominó en el canal naranja con emisiones rojas solo en puntos localizados, lo que sugiere fenómenos de agregación. Por el contrario, el polímero conjugado mostró una señal intensa y homogénea en el espectro rojo que colocalizó con el naranja (Figura 15). Estas discrepancias en el perfil de emisión podrían ser atribuibles a las modificaciones ópticas inducidas tras la unión covalente a la matriz polimérica (33), así como a la mayor estabilidad del producto funcionalizado frente a la tendencia agregativa del compuesto libre (25).

Con el propósito de evaluar los efectos a largo plazo del sistema conjugado, el estudio se extendió hacia tiempos de incubación prolongados de 48 y 72 horas, empleando exclusivamente el compuesto PMVEMA-TPP/NH₂-Zn. Para ello, se evaluó la viabilidad celular y se observó que incluso a tiempos prolongados, el compuesto no disminuye la viabilidad celular de la línea HGUE-GB-42 de glioblastoma (Figura 16A). No obstante, al igual que en los ensayos de 24 horas, durante los ensayos de internalización se observó la presencia de células con indicios de morfología apoptótica, las cuales no son representativas de la toxicidad del sistema. Por otra parte, los ensayos confirmaron que el proceso de internalización celular es sostenido en el tiempo, evidenciando que el conjugado polimérico permanece retenido en el espacio intracelular incluso tras 72 horas de incubación (Figura 16B).

Finalmente, con el objetivo de evaluar la internalización en un modelo más complejo y similar a un tumor sólido, se desarrollaron modelos de esferoides celulares con la misma

línea celular de HGUE-GB-42. El ensayo se planteó como un estudio preliminar por lo que se realizó solo con el TPP/NH₂-Zn durante un periodo de 24h. Se observó internalización celular del producto para todas las concentraciones, así como colocalización con el marcador molecular Hoechst (Figura 18) (36).

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Las conclusiones extraídas de este trabajo son las siguientes:

- La funcionalización no alteró la longitud de onda de la absorbancia de las bandas Q y Soret del TPP/NH₂-Zn, sin embargo, se observó un desplazamiento hipsocrómico de la emisión de fluorescencia en el polímero funcionalizado.
- Se confirmó la funcionalización del polímero mediante la reducción de la banda anhídrido y la presencia de picos característicos del TPP/NH₂-Zn en el espectro FTIR.
- No se observó una disminución en la viabilidad celular a 24h con los compuestos TPP/NH₂-Zn y PMVEMA-TPP/NH₂-Zn en la línea HGUE-GB-42 en ausencia de luz.
- Ambos productos se internalizaron en la línea celular HGUE-GB-42, observándose un incremento dependiente de la dosis y el tiempo.
- El PMVEMA-TPP/NH₂-Zn no disminuyó la viabilidad celular y se internalizó hasta 48 y 72 h tras su tratamiento.
- Se confirmó la capacidad de internalización del TPP/NH₂-Zn en modelos tridimensionales de la línea HGUE-GB-42.

Los resultados obtenidos respaldan el potencial del producto PMVEMA-TPP/NH₂-Zn como fotosensibilizador prometedor para terapia fotodinámica frente al GBM. Como proyección futura, se plantea completar los ensayos de internalización en modelos tridimensionales y realizar ensayos de eficacia fotodinámica mediante irradiación lumínica, con el fin de cuantificar la generación de ROS y su efecto citotóxico. Adicionalmente, este polímero funcionalizado se podría emplear en la creación de nuevos materiales como nanopartículas o nanofibras aportando sus propiedades para diferentes aplicaciones biomédicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Price M, Ballard CAP, Benedetti JR, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS, Ostrom QT. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2018–2022. *Neuro Oncol.* 2025 Oct 1;27(Supplement_4):iv1–66. doi:10.1093/neuonc/noaf194 PubMed PMID: 41092086.
2. 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.* 2021 Aug 1;23(8):1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106 PubMed PMID: 34185076.
3. Sipos D, Raposa BL, Freihat O, Simon M, Mekis N, Cornacchione P, et al. Glioblastoma: Clinical Presentation, Multidisciplinary Management, and Long-Term Outcomes. *Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI);* 2025. doi:10.3390/cancers17010146
4. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, et al. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers. MDPI;* 2022. doi:10.3390/cancers14102412 PubMed PMID: 35626018.
5. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell.* 2019 Aug 8;178(4):835–849.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.06.024 PubMed PMID: 31327527.
6. Shi T, Zhu J, Zhang X, Mao X. The Role of Hypoxia and Cancer Stem Cells in Development of Glioblastoma. *Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI);* 2023. doi:10.3390/cancers15092613
7. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma [Internet]. Available from: www.nejm.org
8. Khabibov M, Garifullin A, Boumber Y, Khaddour K, Fernandez M, Khamitov F, et al. Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). *Int J Oncol.* 2022 Jun 1;60(6). doi:10.3892/IJO.2022.5359 PubMed PMID: 35445737.
9. Rahman MA, Yadab MK, Ali MM. A modern approach to glioblastoma using temozolomide and nanoparticles carrier drug: a standard care of combination therapy and treatment. *Biochemical Pharmacology. Elsevier Inc.;* 2025. doi:10.1016/j.bcp.2025.117276
10. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, De Tribolet N, Weller M, et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma [Internet]. Available from: www.nejm.org
11. Wen PY, Weller M, Lee EQ, Touat M, Khasraw M, Rahman R, et al. Glioblastoma in Adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) Consensus Review on Current Management and Future Directions. *Neuro Oncol.* 2025 Nov 1. doi:10.1093/neuonc/noaf177 PubMed PMID: 40827022.
12. Cesca BA, Pellicer San Martin K, Caverzan MD, Oliveda PM, Ibarra LE. State-of-the-art photodynamic therapy for malignant gliomas: innovations in photosensitizers and

- combined therapeutic approaches. *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*. Open Exploration Publishing Inc; 2025. doi:10.37349/etat.2025.1002303
13. Bhanja D, Wilding H, Baroz A, Trifoi M, Shenoy G, Slagle-Webb B, et al. Photodynamic Therapy for Glioblastoma: Illuminating the Path toward Clinical Applicability. *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023. doi:10.3390/cancers15133427
 14. Aldhubiab B, Almuqbil RM. Polymeric Nanoparticle-Mediated Photodynamic Therapy: A Synergistic Approach for Glioblastoma Treatment. *Pharmaceuticals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025. doi:10.3390/ph18071057
 15. Maharjan PS, Bhattarai HK. Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death. *Journal of Oncology*. Hindawi Limited; 2022. doi:10.1155/2022/7211485
 16. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A.; 2021. doi:10.3389/fchem.2021.691697 PubMed PMID: 34178948.
 17. Akbar A, Khan S, Chatterjee T, Ghosh M. Unleashing the power of porphyrin photosensitizers: Illuminating breakthroughs in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier B.V.; 2023. doi:10.1016/j.jphotobiol.2023.112796 PubMed PMID: 37804542.
 18. Pucelik B, Sulek A, Drozd A, Stochel G, Pereira MM, Pinto SMA, et al. Enhanced cellular uptake and photodynamic effect with amphiphilic fluorinated porphyrins: The role of sulfoester groups and the nature of reactive oxygen species. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 2;21(8). doi:10.3390/ijms21082786 PubMed PMID: 32316355.
 19. Dąbrowski JM, Pucelik B, Regiel-Futyra A, Brindell M, Mazuryk O, Kyzioł A, et al. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier B.V.; 2016. p. 67–101. doi:10.1016/j.ccr.2016.06.007
 20. Nishida K, Tojo T, Kondo T, Yuasa M. Evaluation of the correlation between porphyrin accumulation in cancer cells and functional positions for application as a drug carrier. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1). doi:10.1038/s41598-021-81725-3 PubMed PMID: 33479459.
 21. Rocha LB, Rocha LG, Pereira MM, Almeida L, Almeida S. Terapia fotodinâmica para tratamento do cancro. In: *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados*. Imprensa da Universidade de Coimbra; 2015. p. 637–74. doi:10.14195/978-989-26-0881-5_16
 22. Yang F, Xu M, Chen X, Luo Y. Spotlight on porphyrins: Classifications, mechanisms and medical applications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2023. doi:10.1016/j.biopha.2023.114933 PubMed PMID: 37236030.
 23. Pereira MM, Pinto SM, Dias LD. Synthesis of Pyrrol-based Bioconjugates; Perspectives and Applications.

24. Tabrizi L, McGarry R, Turzanska K, Varvarezos L, Fallon M, Brannigan R, et al. Porphyrin-Polymer as a Photosensitizer Prodrug for Antimicrobial Photodynamic Therapy and Biomolecule Binding Ability. *Biomacromolecules*. 2024 Dec 9;25(12):7736–49. doi:10.1021/acs.biomac.4c01011 PubMed PMID: 39514700.
25. Wang J, Zhu X, Zhang Y, Pang Z, Zhao C, Zhang F. Structural design of porous organic polymers to mitigate π -stacking-induced quenching in porphyrin/phthalocyanine photosensitizers for enhanced antibacterial activity. *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry; 2025. p. 48604–27. doi:10.1039/d5ra08102e
26. Burnett CL, Bergfeld WF, Belsito D V., Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, et al. Final Report of the Amended Safety Assessment of PVM/MA Copolymer and Its Related Salts and Esters as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol*. 2011 Oct 1;30(5_suppl):128S-144S. doi:10.1177/1091581811407934 PubMed PMID: 22068629.
27. 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*. 2017 Dec 1;7(1). doi:10.1038/s41598-017-17542-4 PubMed PMID: 29222482.
28. Pedro Valentín Badía-Hernández, Joan Moll Carrió, María Fuentes-Baile, María Losada-Echeberría, Rocío Díaz-Puertas, Mira A, et al. Electrospun PMVEMA Nanofibers Developed as a Fast-Release Platform for Antineoplastic Drugs Tested in Glioblastoma Primary Cultures. 2025. doi:10.3390/pharmaceutics17091172 PubMed PMID: 41012508.
29. Kiew LV, Cheah HY, Voon SH, Gallon E, Movellan J, Ng KH, et al. Near-infrared activatable phthalocyanine-poly-L-glutamic acid conjugate: increased cellular uptake and light–dark toxicity ratio toward an effective photodynamic cancer therapy. *Nanomedicine*. 2017 May 1;13(4):1447–58. doi:10.1016/j.nano.2017.02.002 PubMed PMID: 28214608.
30. Şen P, Hirel C, Andraud C, Aronica C, Bretonnière Y, Mohammed A, et al. Fluorescence and FTIR spectra analysis of trans-A2B2-substituted di- and tetra-phenyl porphyrins. *Materials*. 2010;3(8):4446–75. doi:10.3390/ma3084446
31. Jin Z, Du L, Zhang C, Sugiyama Y, Wang W, Palui G, et al. Modification of Poly(maleic anhydride)-Based Polymers with H₂N-R Nucleophiles: Addition or Substitution Reaction? *Bioconj Chem*. 2019 Mar 20;30(3):871–80. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00008 PubMed PMID: 30759981.
32. Amiri N, Hajji M, Roisnel T, Simonneaux G, Nasri H. Synthesis, molecular structure, photophysical properties and spectroscopic characterization of new 1D-magnesium(II) porphyrin-based coordination polymer. *Research on Chemical Intermediates*. 2018 Sep 1;44(9):5583–95. doi:10.1007/s11164-018-3442-9
33. Shi S, Liu Q, Zhang X, Hall R. Fabrication and spectroscopic properties of a metalloporphyrin-intercalated zirconium phosphate assembly. *RSC Adv*. 2013;3(22):8254–60. doi:10.1039/c3ra23241g
34. Stapelfeldt K, Ehrke E, Steinmeier J, Rastedt W, Dringen R. Menadione-mediated WST1 reduction assay for the determination of metabolic activity of cultured neural cells.

Anal Biochem. 2017 Dec 1;538:42–52. doi:10.1016/j.ab.2017.09.011 PubMed PMID: 28939007.

35. Cubas JM, Guadalupe R, Pimentel C, Enrique I, Merlín M, San E, et al. La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama I. INTRODUCCIÓN. Am J Phys Educ [Internet]. 2018;12(2). Available from: <http://www.lajpe.org>
36. Morimoto N, Yamamoto M. Effective Permeation of Anticancer Drugs into Glioblastoma Spheroids via Conjugation with a Sulfobetaine Copolymer. Biomacromolecules. 2020 Dec 14;21(12):5044–52. doi:10.1021/acs.biomac.0c01200 PubMed PMID: 33095564.

