

**EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE NANOFIBRAS DE DIFERENTE ORIGEN EN
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA Y LINFOCITOS**

Tatiana Andrea Duarte Sandoval

Trabajo Dirigido

Directora de tesis: Sandra Rocío Ramírez Clavijo, PhD.

Codirector: Fredy Giovanni Mesa Rodríguez, PhD.



UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
Mayo 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primera instancia a Dios y a mis padres por su apoyo, esfuerzo, amor y confianza que depositaron en mi para poder alcanzar esta meta, por forjarme a ser la persona que soy, y por darme los recursos necesarios para poder estudiar.

A mi directora y codirector de tesis de la Universidad del Rosario; Sandra Rocío Ramírez y Fredy Giovanni Mesa, por su acompañamiento constante a lo largo del semestre, por los consejos, conocimientos y enseñanzas brindadas, y su motivación para realizar y culminar con gusto y pasión este proyecto de investigación. A los integrantes del grupo de investigación de ciencias básicas médicas (GCBM) y a los encargados de los laboratorios de ciencias naturales y bioquímica, por su constante disposición y colaboración, quienes hicieron muy ameno el trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a la Universidad Jorge Tadeo Lozano y a la profesora Alis Pataquiva por su apoyo en la elaboración de las nanofibras, y el aporte brindado en este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1. JUSTIFICACIÓN	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo general	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4. MARCO TEÓRICO	12
4.1. Cáncer.....	12
Cáncer de mama	12
4.2. Ciclo celular.....	13
4.2.1. Células sanas.	14
4.2.2. Células cancerígenas	14
4.3. Líneas tumorales de cáncer de mama.....	15
4.3.1. MCF-7.....	15
4.3.2. BT474.....	15
4.3.3. M8 (MDA-MB468).....	16
4.4. Linfocitos	16
4.5. Nanofibras.....	16
4.5.1. Electrospinning	17
4.5.2. PVA	19
4.5.3. PCL	19
4.5.4. NYLON	20
4.5.5. BNC.....	20
4.5.6. ARROZ.....	20
4.6. Liberación de fármacos	21
4.6.1. Nanofibras como sistema de liberación.....	21
4.6.2. Tamoxifén.....	21
4.7. Pruebas de viabilidad y citotoxicidad celular.....	22
Resazurin	22
5. METODOLOGÍA	23
5.1. Obtención de nanofibras.....	23
5.1.1. Preparación soluciones.....	23
5.1.2. Fabricación de nanofibras en el equipo de electrospinning.....	25
5.1.2.1. Montaje.....	25

5.1.2.2. Desmontaje y limpieza.....	26
5.1.3. Corte y desinfección	27
5.2. Cultivo celular.....	27
5.2.1. Limpieza y desinfección de la cabina.....	27
5.2.2. Cambio de medio.....	27
5.2.3. Cambio de pase.....	28
5.2.4. Descongelamiento	28
5.2.5. Congelamiento.....	28
5.2.6. Conteo celular.....	29
5.3. Curva de proliferación	30
M8 (MDA-MB468).....	30
5.4. Pruebas de citotoxicidad.....	31
5.4.1. Líneas celulares cancerígenas	31
5.4.2. Linfocitos	32
Obtención de linfocitos mediante ficoll.....	33
5.5. Medición fluorescencia para viabilidad celular	33
5.6. Tinción de Wright	34
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	35
6.1. Elaboración nanofibras.....	35
6.2. Curva de proliferación M8.....	36
6.3. Pruebas citotoxicidad	37
6.3.1. Líneas celulares cancerígenas	38
6.3.2. Linfocitos	53
7. DISCUSION.....	57
8. CONCLUSIONES.....	58
9. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS.....	59
REFERENCIAS	60
ANEXOS	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las líneas celulares cancerígenas empleadas en el proyecto.....	16
Tabla 2. Parámetros y características de las nanofibras	18
Tabla 3. Parámetros empleados en la elaboración de las nanofibras	26
Tabla 4. Resumen de los tratamientos para medición de la citotoxicidad en las líneas cancerígenas	31
Tabla 5. Resumen tratamientos empleados en la medición de citotoxicidad para linfocitos	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases del ciclo celular.....	14
Figura 2. Configuración vertical para la técnica de electrospinning.....	17
Figura 3. Configuración horizontal para la técnica de electrospinning.....	18
Figura 4. Nanofibra de arroz proporcionada por la Profesora Alis Pataquiva de la Universidad Jorge Tadeo Lozano	23
Figura 5. Proceso de preparación de la solución de PVA (11%).....	24
Figura 6. Hojas secas de romero	24
Figura 7. Romero molido en mortero	24
Figura 8. Filtro empleado para la obtención del extracto de romero.....	24
Figura 9. Equipo de electrospinning de la Universidad Jorge Tadeo Lozano	25
Figura 10. Fabricación de una nanofibra de PVA por electrospinning en el equipo NANO FIB100 de la marca QUBITexp.....	26
Figura 11. Desecador donde se guardan las nanofibras una vez se retiran el equipo.....	27
Figura 12. Cooler donde se conservan las células en nevera de -80°C. Congelamiento de células M8	28
Figura 13. Cámara de Neubauer, con la preparación con azul tripán y células, lista para efectuar el conteo celular.....	29
Figura 14. Cuadrícula de la cámara de Neubauer donde se realiza el conteo	29
Figura 15. Imagen que muestra las células M8 (MDA-MB468), en uno de los cuadrantes de la cámara de Neubauer, que se usaron para contarlas.....	30
Figura 16. Montaje de la placa de cultivo con la curva de proliferación de M8	31
Figura 17. Montaje citotoxicidad con nanofibras en pozos de la placa de cultivo con BT474 durante el segundo experimento.....	32
Figura 18. Montaje citotoxicidad con nanofibras en pozos de la placa de cultivo con linfocitos durante el primer experimento	33
Figura 19. Medición de una placa en equipo Cytation 3.....	34
Figura 20. Tinción de Wright de la placa de la curva de proliferación de M8 (MDA-MB468).	34
Figura 21. Imagen que muestra un pozo de la placa con una concentración de 65.000 células M8 (MDA-MB468), luego de la tinción.....	34
Figura 22. Nanofibra de PVA finalizada	35
Figura 23. Nanofibra de Nylon finalizada	35
Figura 24. Gráfica primera curva de proliferación M8 (MDA-MB468).....	36

Figura 25. Gráfica segunda curva de proliferación M8 (MDA-MB468)	37
Figura 26. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	38
Figura 27. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	39
Figura 28. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	39
Figura 29. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	40
Figura 30. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	40
Figura 31. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	41
Figura 32. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	41
Figura 33. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	42
Figura 34. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	42
Figura 35. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas BT474 primer experimento de citotoxicidad.....	43
Figura 36. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas MCF-7 primer experimento de citotoxicidad.....	43
Figura 37. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas M8 (MDA-MB468) primer experimento de citotoxicidad.....	44

Figura 38. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	44
Figura 39. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	45
Figura 40. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	45
Figura 41. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	46
Figura 42. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	46
Figura 43. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	47
Figura 44. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	47
Figura 45. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	48
Figura 46. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	48
Figura 47. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas BT474 segundo experimento de citotoxicidad.....	49
Figura 48. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas MCF-7 segundo experimento de citotoxicidad.....	49
Figura 49. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas M8 (MDA-MB468) segundo experimento de citotoxicidad.....	50

Figura 50. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	50
Figura 51. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	51
Figura 52. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	51
Figura 53. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas M8 (MDA-MB468) tercer experimento de citotoxicidad	52
Figura 54. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	53
Figura 55. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	53
Figura 56. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	54
Figura 57. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	54
Figura 58. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	55
Figura 59. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días	55
Figura 60. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas linfocitos segundo experimento de citotoxicidad	56

1. JUSTIFICACIÓN.

Una de las áreas más importantes de aplicación de la nanotecnología es la nanomedicina, y uno de los enfoques consiste en el diseño de nanosistemas de liberación de medicamentos con el fin de revolucionar las terapias convencionales, en especial las dirigidas al tratamiento del cáncer. [1]

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), reporta en sus publicaciones, al cáncer de mama como uno de los más diagnosticados a nivel mundial, siendo la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres. [2]

La cirugía para extirpación de los tumores puede ser útil en casos donde aún no se haya presentado metástasis, sin embargo, los tratamientos actuales y convencionales como la radioterapia y quimioterapia, son técnicas que, aunque suelen ser efectivas; también afectan en su proceso a células no cancerígenas, incluso llegando a perjudicar el sistema inmunológico de los pacientes.

Por este motivo es de suma importancia encontrar un mecanismo adecuado que logre transportar fármacos al interior del cuerpo humano el cual centre la liberación de estos, en el sitio donde se localizan las células cancerígenas.

En la actualidad se estudia el suministro de medicamentos a través de nanofibras debido a las propiedades que posee, como la alta superficie por unidad de área y la posibilidad de controlar el perfil de liberación modificando la morfología de las fibras, la porosidad y la composición; lo que convierte a las nanofibras en potenciales vehículos para la entrega de fármacos y además cuando se hacen en materiales biocompatibles se van degradando de tal manera que la eliminación de sus componentes se haría por los sistemas normalmente usados en el cuerpo para la eliminación de desechos, por ejemplo la vía urinaria. [3]

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las estimaciones según IARC, para Colombia en 2012 fueron 8.686 casos nuevos y 2.649 muertes por cáncer de mama. En Colombia se diagnostican cada año 7.627 mujeres y mueren aproximadamente 2.226. [2]

Según cifras de Breast Cancer Research Foundation, Organización Mundial para la Salud y Liga Colombiana contra el Cáncer; en 2015 un total de 570.000 mujeres murieron en el mundo como consecuencia de este tipo de cáncer, 2.055 de ellas en Colombia. Cada 30 segundos en alguna parte del mundo fallece una mujer por cáncer de mama. [4]

Recientemente se ha incrementado el interés de usar nanofibras poliméricas y de origen natural como posible sistema de liberación de medicamentos, para el tratamiento del cáncer. En particular, dada la alta incidencia que tiene el cáncer de mama en Colombia y en el mundo, y la promisoriosa aplicación de las nanofibras en su tratamiento; es muy pertinente evaluar el efecto de nanofibras de diferente origen, sobre la viabilidad celular de líneas tumorales de cáncer de mama, y de linfocitos normales obtenidos a partir de muestras de sangre. Las líneas tumorales evaluadas en el presente proyecto representan tres perfiles moleculares, relacionados con los tipos tumorales de mama más frecuentes. Con el modelo de estudio se desea aportar información para avanzar en el desarrollo de métodos más efectivos y económicos, para el tratamiento contra el cáncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

- Evaluar el impacto sobre la sobrevivencia celular, de nanofibras de diverso origen, en líneas tumorales de mama y linfocitos.

3.2. Objetivos específicos.

- Fabricar nanofibras de alcohol de polivinilo (PVA) y nylon.
- Evaluar la citotoxicidad de las nanofibras fabricadas y otras disponibles (BNC y Arroz), sobre líneas tumorales de mama y linfocitos.
- Determinar el porcentaje de sobrevivencia de las diferentes líneas tumorales de cáncer de mama y linfocitos, tras exponerlas a las nanofibras.

4. MARCO TEÓRICO

En esta sección se presenta una revisión de los conceptos teóricos necesarios para el desarrollo y entendimiento de este proyecto. Inicialmente se abarcan las generalidades del cáncer y del cáncer de mama en el que se enfocó la tesis, después se habla brevemente de las diferencias entre el ciclo celular de células sanas y cancerígenas; y se presentan las líneas celulares tumorales y no tumorales que fueron estudiadas. Luego se introduce el tema de nanofibras y la técnica implementada para su elaboración, se da una breve descripción de los materiales utilizados en las nanofibras. Se menciona la aplicación de estas estructuras como sistemas de liberación de medicamentos y se resalta uno de los medicamentos para el cáncer de seno más usado. Finalmente, se explica la técnica empleada para la realización de las pruebas de viabilidad celular.

4.1. Cáncer.

El cáncer comienza en las células, normalmente las células del cuerpo crecen y se dividen para crear nuevas células y reemplazar a las células envejecidas o a las dañadas que mueren. Pero algunas veces, este proceso se altera. Crecen células nuevas que no son necesarias y las células envejecidas no mueren cuando deberían. Estas células extra pueden formar masas llamadas tumores. Los tumores pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Las células de los tumores malignos pueden invadir los tejidos cercanos, porque se desprenden y movilizan hacia otras partes del cuerpo, por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y cuando forman nuevos tumores lejos de la lesión inicial se establece lo que se denomina metástasis. Existen más de 100 tipos de cáncer y la mayoría de éstos se nombran teniendo en cuenta el lugar de origen [5].

Los tratamientos más comunes para el cáncer se dividen en tres categorías: cirugía, quimioterapia y radioterapia. El más antiguo, es la extirpación quirúrgica de los tumores. Este método puede llegar a ser muy exitoso si se realiza en una etapa temprana, antes de que haya metástasis [6].

El segundo tipo más común es la radioterapia. Se aplican rayos X, esta radiación actúa sobre el ADN, produciendo pequeñas roturas, y la célula al no poder reparar dichas alteraciones, activa el proceso de muerte. Sin embargo, tiene como inconveniente que las células no cancerígenas que son alcanzadas por la radiación también se pueden afectar [6].

Si un paciente ha presentado metástasis los tratamientos anteriores no son útiles. El tratamiento que puede llegar a cualquier parte del cuerpo es la quimioterapia. Técnica en la que los pacientes son tratados con sustancias químicas que evitan que las células se dupliquen. No obstante, al igual que con la radioterapia las células no cancerígenas también se ven afectadas por los mismos medicamentos que detienen el crecimiento de las células cancerígenas. El problema más serio que se llegan a generar con estos tratamientos es afectar el sistema inmunológico [6].

Cáncer de mama.

El cáncer de mama se origina cuando las células en alguna región de la glándula mamaria comienzan a crecer en forma descontrolada. Estas células pueden formar un tumor que a menudo se detecta en una radiografía, una ultrasonografía o se puede palpar

como una protuberancia o bulto. Se ha establecido que “el cáncer de mama es el tipo cáncer más frecuente en mujeres, uno de cada cuatro nuevos casos de cáncer diagnosticados en mujeres en todo el mundo, son cáncer de mama (24.2%) y este cáncer es el más común en 154 de los 185 países que integran el planeta [4]. Además, es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (15%), seguido por cáncer de pulmón (13.8%) y cáncer colorrectal (9.5%), que son el tercer y segundo tipo de cáncer más común, respectivamente” [7].

El tejido mamario está formado por tejido graso y el tejido funcional de la mama: los lóbulos y conductos que intervienen en la producción y secreción de leche. El crecimiento y desarrollo del tejido mamario está controlado por las hormonas y comienza en la pubertad. Las hormonas sexuales progesterona y estrógeno, producidas por los ovarios, son responsables en gran parte del desarrollo del tejido mamario. Muchos cánceres responden a las hormonas, es decir que el crecimiento del tejido anormal se estimula por la presencia de hormonas sexuales femeninas [8].

Se han desarrollado nuevos tratamientos para el cáncer de mama, gracias al aumento en la comprensión de los fundamentos biológicos de este. Por ejemplo, un porcentaje significativo de cánceres de mama ha demostrado ser hormonalmente sensibles, lo que significa que su crecimiento es estimulado por el estrógeno o la progesterona. Estos tumores se clasifican como receptores de estrógeno (ER) positivos o receptores de progesterona (PR) positivos. Una clase de medicamentos dirigidos al receptor de estrógeno en los cánceres de mama ER-positivos, son llamados moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM, por sus siglas en inglés) [8].

4.2. Ciclo celular.

Todas las células poseen mecanismos para mantener la integridad genómica, la cual es vital para la supervivencia celular y la proliferación. Las células se dividen a tasas normales durante su tiempo de vida, sin embargo, cuando esta tasa sobrepasa los límites normales ocurren alteraciones a nivel genético que afectan el control del ciclo celular haciendo que estas células crezcan y se dividan sin control y ya no respondan a señalización extracelular para la detención del ciclo. Por otro lado, tampoco responden a los mecanismos inductores de la muerte celular. Ambos, mecanismos proliferación y muerte celular, están estrictamente controlados y previenen el cáncer. La regulación se lleva a cabo por grupos de proteínas que interactúan entre sí de forma específica. En la figura 1 se muestra la división del ciclo celular, en la fase M (mitótica) y la interfase que a su vez se divide en tres fases distintas: G1 (gap 1), S (síntesis de ADN) y G2 (Gap2) [9].

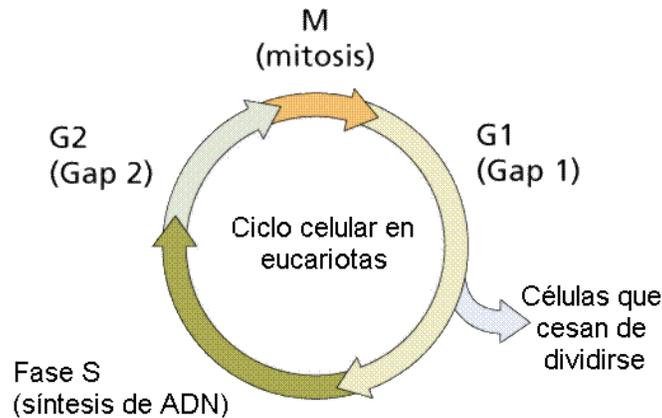


Figura 1. Fases del ciclo celular. Tomado de González et al 2001 [10]

4.2.1. Células sanas.

En la fase de síntesis del ADN (S), ocurre la replicación del material genético, con el fin de que cuando las células se dividan, cada una de las hijas tenga la misma cantidad de ADN. Las fases G1 (gap o intervalo 1) y G2 (gap o intervalo 2) son etapas dedicadas a generar más organelas para repartir entre las células hijas (producto de la división celular) y a sintetizar enzimas y proteínas requeridas para la fase S y la mitosis. Los estados S, G1 y G2 son etapas de la interfase, período comprendido entre dos divisiones celulares sucesivas, es el período en el que las células pasan la mayor parte del tiempo durante el ciclo celular. El estado M representa "mitosis", y es cuando ocurre la división nuclear (los cromosomas se separan) y posteriormente se divide el contenido citoplasmático (citocinesis) [11].

A continuación, se nombran algunos elementos que son importantes en la regulación y lugares donde los errores pueden conducir al cáncer. Las CDKs (kinasa dependiente de ciclinas, agrega fosfato a una proteína), junto con ciclinas son las mayores llaves de control para el ciclo celular, causando que la célula se mueva de G1 a S o G2 a M. FPM (Factor Promotor de la Maduración) incluye la CDK y ciclinas que desencadenan la progresión del ciclo celular. p53 es una proteína que funciona bloqueando el ciclo celular si el ADN está dañado. Si el daño es severo esta proteína puede causar apoptosis. p27 es una proteína que se une a ciclinas y CDK bloqueando la entrada en fase S. [11]

4.2.2. Células cancerígenas.

El primer paso que realiza una célula normal o no cancerígena, para convertirse en una célula tumoral es proliferar excesivamente y evitar los mecanismos de control del ciclo celular que actúan fisiológicamente para impedir esto. Durante dicha transformación, se activan los oncogenes (genes que en su versión normal son denominados protooncogenes, y que sufren alguna alteración y su función se concentra en promover la proliferación celular). Por otro lado, otro grupo de genes denominados oncosupresores o supresores tumorales, pierden la actividad fisiológica de freno de la proliferación [12].

La acumulación de mutaciones en diferentes tipos de genes conduce a la inactivación de genes supresores de tumores como p53 y pRb, a el mal funcionamiento de las proteínas que normalmente inhiben la progresión del ciclo celular y a la activación de los oncogenes, todo junto conlleva a la desregulación del ciclo celular, para favorecer la

proliferación sin control y la evasión de la muerte celular. En los tumores, se ha observado mutaciones en genes que codifican ciclinas, CDK (quinasas dependientes de ciclinas), enzimas de activación de CDK, CKI (inhibidores de CDK), sustratos de CDK, y otras proteínas de control. [9]. Varias de estas proteínas, actúan en los puntos de control del ciclo celular del paso de la fase G1 a la fase S, y cuando hay daño en el ADN, su acción para frenar el ciclo depende de p53, mientras que otros puntos de control, dependen de pRb. Otras como por ejemplo el grupo de CDKs, cuando pierden su función inducen la proliferación no programada, así como la inestabilidad genómica y cromosómica [9].

Existen células, que se cultivan en el laboratorio, que han sido obtenidas a partir de lesiones tumorales y/o modificadas para expandir su población, estas se denominan líneas celulares y se utilizan como modelo de la enfermedad para diferentes propósitos. En el presente estudio, utilizamos algunas de ellas, cuyo perfil molecular recuerda a los principales tipos de cáncer de mama.

4.3. Líneas tumorales de cáncer de mama.

Células obtenidas de lesiones tumorales o tejidos normales, se pueden establecer como líneas, que puedan ser cultivadas bajo condiciones de laboratorio y ser usadas como modelos para muchos proyectos de investigación. A continuación, se describen las líneas que representan tres perfiles moleculares de las lesiones más frecuentes en cáncer de mama.

4.3.1. MCF-7.

“MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama aislada en 1970 de una mujer caucásica de 69 años que padecía un adenocarcinoma de mama. Las células MCF-7 son útiles para estudios de cáncer de mama in vitro. Presenta una forma irregular, crecen en forma de monocapa, y son adherentes. Esta línea retiene varias características particulares del epitelio mamario ideales para hacer varios estudios. Estos incluyen la capacidad de las células MCF-7 para procesar el estrógeno en forma de estradiol a través de los receptores de estrógeno en el citoplasma celular.” [13]

MCF-7 posee los receptores de progesterona (PR) y estrógeno (ER), pero no tiene amplificado el gen HER2, el cual es un receptor de factores de crecimiento. Los científicos han encontrado que, aunque estas células son fáciles de propagar, generalmente el tiempo de duplicación es de 30 a 40 horas. Las células MCF-7 son células grandes adherentes, con un tamaño de célula entre 20-25 micras. [14]

4.3.2. BT474.

La línea celular BT-474 fue aislada en 1978 por E. Lasfargues and W.G. Coutinho de un tumor sólido e invasivo de un carcinoma ductal del seno de una paciente caucásica de 60 años. Es receptor estrógeno (ER) positivo. [15]

BT-474 es una línea celular que sobreexpresa HER2 (Receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano, proteína producto de un protooncogén específico, un gen que tiene el potencial de producir cáncer). Tiene bajos niveles de HER1 (proteína que se encuentra en la superficie de algunas células a la cual se une el factor de crecimiento epidérmico y hace que las células se multipliquen). [16]

Se caracterizan por su forma piramidal, y tener morfología similar a la del epitelio mamario diferenciado. Crecen en forma de monocapa, son adherentes y de lento crecimiento.

4.3.3. M8 (MDA-MB468).

La línea celular MDA-MB-468 fue aislada en 1977 por R. Cailleau, et al., a partir de un derrame pleural de una paciente de raza negra de 51 años con adenocarcinoma de mama metastásico. Expresa receptor de estrógenos alfa negativo, factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante alfa (TGF alfa). Poseen forma circular y tamaño pequeño, presentan una morfología similar a la del epitelio mamario diferenciado. Crecen en forma de monocapa, y son adherentes. [17]

En la tabla 1 se presentan resumidas las características principales de las 3 líneas cancerígenas.

Tabla 1. Características de las líneas celulares cancerígenas empleadas en el proyecto.

Línea celular	Tejido de obtención	Perfil molecular
<i>MCF-7</i>	Adenocarcinoma de mama	PR positivo ER positivo HER2 negativo
<i>BT474</i>	Tumor sólido e invasivo de un carcinoma ductal de mama	HER2 sobreexpresado ER positivo PR negativo
<i>M8 (MDA-MB468)</i>	Derrame pleural de paciente con adenocarcinoma de mama metastásico	ER alfa negativo PR negativo EGF TGF alfa

- Receptor de progesterona (PR)
- Receptor de Estrógenos (ER)

4.4. Linfocitos.

Un linfocito es un tipo de glóbulo blanco, una célula importante del sistema inmunológico que ayuda al cuerpo a defenderse de los organismos invasores. Estas células se originan en la médula ósea de los huesos y migran a diferentes partes del cuerpo, donde se especializan en uno de dos tipos. Los linfocitos B, los cuales producen una proteína llamada anticuerpo que ataca a invasores extraños, como bacterias o virus. Los linfocitos T, que atacan las células del propio cuerpo si han sido infectadas por un invasor o se han vuelto cancerosas y que normalmente cumplen una función reguladora a través de la producción de moléculas llamadas "linfoquinas" que son la base de los fenómenos de cooperación celular en la respuesta inmune [18]. Algunos linfocitos tienen la capacidad de "recordar" el objetivo de un ataque y producir anticuerpos que pueden hacer que el cuerpo sea inmune a futuras enfermedades de esos mismos invasores. [19]. Estos se pueden aislar a partir de una muestra de sangre.

4.5. Nanofibras.

Las nanofibras como su nombre lo indica son estructuras nanométricas en forma de fibras, tubos, cintas, varillas y cables, que debido a su tamaño del orden de 10^{-9} , poseen

propiedades nuevas que no tienen estructuras de igual composición y tamaño macroscópico.

La posibilidad de fabricar fibras de diferentes materiales, con propiedades como la alta relación superficie-volumen, flexibilidad, tenacidad y resistencia a la tracción gracias a su tamaño, hace que estas estructuras sean apropiadas para numerosas aplicaciones. Entre las aplicaciones más estudiadas se encuentran algunos dispositivos biomédicos, sistemas de liberación controlada de fármacos y principios activos e ingeniería de tejidos; también en productos de consumo, tales como prendas de vestir, sensores y nanocables para aplicaciones en nanoelectrónica, entre otras. [20]. Para el presente estudio, se evaluó la citotoxicidad de nanofibras de diferente origen que pueden llegar a ser candidatos a ser usadas como posibles vehículos de medicamentos para el tratamiento del cáncer. La principal técnica empleada en la elaboración de las nanofibras fue el electrospinning.

4.5.1. Electrospinning.

La técnica de electrospinning, también conocida como electrohilado, hace uso de las fuerzas eléctricas para producir fibras de tamaño micro y nanométrico. Los elementos requeridos en la técnica son: Una fuente de alto voltaje, una jeringa, una aguja y un colector; y se puede realizar tanto de forma vertical como lo muestra la figura 2, como de forma horizontal como se aprecia en la figura 3. Se inicia colocando la solución polimérica en la jeringa, la cual es eléctricamente cargada cuando se conecta a la aguja con un alto voltaje entre 1 y 30 kV. La distancia entre la aguja y el colector debe ser entre 5 y 30 cm. La solución se bombea con un flujo constante, formando una gota en el extremo de la aguja. La fuerza eléctrica aplicada a la solución polimérica supera la tensión superficial, generando un haz cargado eléctricamente que se expulsa al colector. Cuando las fibras se secan, se cargan eléctricamente y son dirigidas y aceleradas por fuerzas eléctricas en el colector, donde se depositan. [21]

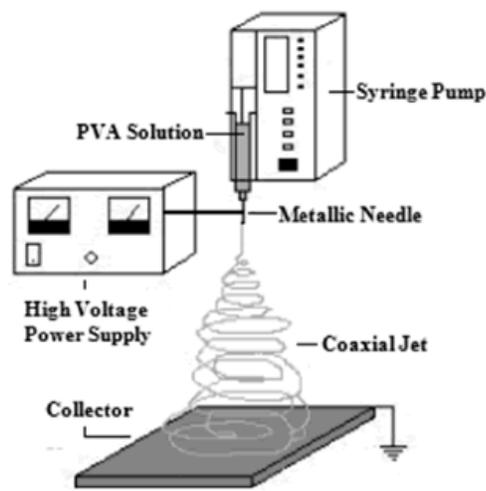


Figura 2. Configuración vertical para la técnica de electrospinning. Tomado de Medina et al 2013 [21].

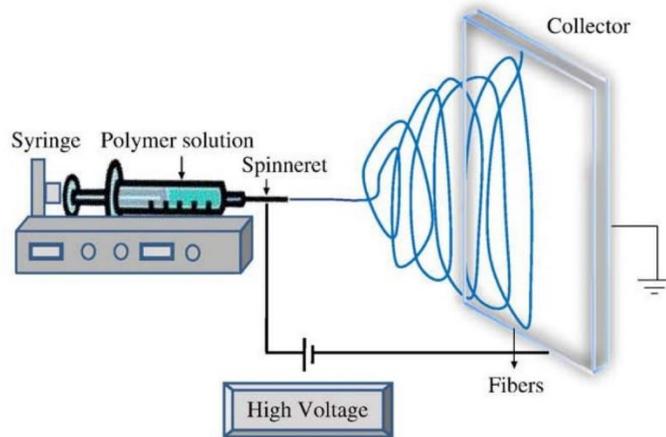


Figura 3. Configuración horizontal para la técnica de electrospinning. Tomado de Zhu et al. [22].

Existen diferentes parámetros, como voltaje, flujo, distancia de la aguja al colector, humedad, concentración del polímero usado, temperatura, los cuales influyen en el proceso y deben ser estandarizados, estos parámetros se presentan en la tabla 2. Para realizar el trabajo se fabricaron nanofibras de PVA y Nylon, y se evaluaron otras existentes en el grupo de CBM de la universidad del Rosario (PCL, PCL+tamoxifén) y otras proporcionadas por el grupo de nanotecnología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano dirigido por la profesora Alis Pataquiva.

Tabla 2. Parámetros y características de las nanofibras. Adaptada de Duque et al 2013 [3].

PARÁMETRO		CARACTERÍSTICA QUE APORTA
Concentración de la solución polimérica	↑	Dificulta el paso de la solución a través del capilar
	↓	Las fibras se rompen en gotas antes de llegar al plato colector.
Voltaje	↑↑	Fibras gruesas, distorsión del jet, aparición de beads.
	↓	Poco impulso para llegada de la solución al plato colector.
Flujo de salida	↑	Fibras más gruesas, beads con mayores tamaños.
	↓	Mayor tiempo para evaporación del solvente, fibras sin defectos.
Distancia aguja-colector	↑	Las fibras pueden romperse debido a su propio peso. Mayor estiramiento de la solución, obtención de fibras delgadas.
	↑↑	Aparición de defectos (beads) en las fibras al trabajar con muy altas o muy bajas distancias.
	↓↓	

	↓	Poco tiempo para la evaporación del solvente, por tanto, las fibras llegan húmedas al plato colector.
Humedad relativa	↑	Aparición de poros en las nanofibras.

4.5.2. PVA.

El polivinil alcohol (PVA) es un polímero soluble en agua producido industrialmente mediante la hidrólisis del polivinil acetato. El PVA tiene excelentes propiedades tanto físicas como mecánicas, permitiendo su uso en diferentes aplicaciones como fabricación de fibras para revestimientos de papel, adhesivos, hormigón reforzado con fibra, plástico reforzado con fibra, materiales no tejidos, hilos y otros. En los últimos años, el uso de PVA ha estado enfocado en aplicaciones biomédicas, como hidrogeles, incluyendo lentes de contacto, órganos artificiales y administración de medicamentos.

En el grupo de Zhang et al 2005 [23], emplearon una solución polimérica de PVA a una concentración entre 6-8% diluida en agua destilada. Ocasionalmente agregaron a la solución, etanol y cloruro de sodio. A esta nanofibra le adicionaron aspirina, como medicamento, la cual fue disuelta en etanol y agregada a la solución anterior, gota a gota durante la agitación, también se adicionó albúmina de suero bovino (BSA) (disuelta en agua). Durante el electrospinning se aplicó un voltaje entre 5-15 kV y las fibras se recolectaron en un papel aluminio conectado a tierra, situado a 8-15 cm debajo de la punta de la aguja. Observaron que al agregar aspirina y BSA se generaron perlas en las nanofibras de PVA. Aunque la adición de estos dos compuestos a la solución de PVA disminuyó la capacidad de formar fibras uniformes, muestra el potencial para preparar fibras ultrafinas por electrospinning, que transportan medicamentos [23].

Por otro lado, Estevez-Areco et al en el 2018 [25]; sugiere que la reticulación del PVA con un agente comestible reduce su solubilidad en agua, lo que constituye una de las principales limitaciones para su uso como sistema de liberación controlada en medios acuosos. Adicional a esto, en un estudio de López-Córdoba et al en el año 2016 [24], se demostró que la reticulación con ácido cítrico (CA) mejora la estabilidad del agua de las nanofibras de PVA, y gracias a esto obtuvieron un sistema de liberación controlada para el clorhidrato de tetraciclina [25]

En el presente trabajo se incorporó extracto de romero en nanofibras de PVA para obtener un material activo con capacidad de liberación controlada. Primero, se obtuvo el extracto de romero por extracción con solvente en una solución de etanol:agua (70:30 v / v), este se incorporó en una solución acuosa de PVA y se fabricaron las nanofibras por electrospinning.

4.5.3. PCL.

La policaprolactona es un polímero semicristalino, biodegradable, que posee buenas propiedades mecánicas, es fácil de procesar, compatible tanto con tejidos duros como blandos y aceptado por la FDA. Este polímero es útil en la producción de fibras electrohiladas que simulan la matriz extracelular. Sin embargo, su hidrofobicidad limita la adhesión y proliferación celular. [26]

Varios estudios indicaron el uso de la técnica de electrohilado para lograr la liberación controlada de un modelo hidrofílico de fármaco (ampicilina) presentando una baja compatibilidad con la policaprolactona. Esto se consiguió bajo la técnica de electrohilado coaxial modificado que consistió en cubrir o envolver la mezcla de la solución polimérica y el fármaco, con la solución del polímero a una menor concentración, bombeando la mezcla con una aguja dentro de la aguja del polímero. [27] Los resultados de la investigación de Sultanoa et al, 2016, demostraron que, el área de aplicación del electrospinning coaxial modificado podría expandirse para fármacos y polímeros con baja compatibilidad.

4.5.4. NYLON.

El nylon es un polímero sintético que posee buena resistencia mecánica, excelente capacidad de rotación y estabilidad, el cual ha demostrado poseer una buena biocompatibilidad con varias células y tejidos humanos. Sin embargo, la poca tendencia a disolverse en agua, la lenta tasa de degradación, la alta cristalinidad y la fragilidad dificultan su aplicación en la ingeniería biomédica. [28]

4.5.5. BNC.

La nanocelulosa bacteriana (BNC) se ha convertido en una fuente biodegradable y prometedora de material fibroso. Este biopolímero es sintetizado por bacterias del ácido acético pertenecientes a las especies *Gluconacetobacter Xylinus* y *Gluconacetobacter Hansenii*, en un proceso de fermentación estrictamente aeróbico a temperatura ambiente (25-30 ° C), utilizando como fuente de carbono la glucosa o cualquier otro carbohidrato.

La estructura de red tridimensional (3D) nativa de BNC, conocida como película, posee un área de superficie alta, así como alta capacidad de absorción de agua, biodegradabilidad y biocompatibilidad. Para aprovechar estas propiedades, BNC se ha estudiado ampliamente en aplicaciones que incluyen ingeniería de tejidos, vendaje de heridas, administración de fármacos, dispositivos electrónicos y nanocompuestos de polímeros. [29]

4.5.6. ARROZ

Fibras de celulosa o cristales de tamaño nanométrico se pueden obtener de diversos materiales naturales que son ricos en celulosa entre los que se encuentra el arroz. Las nanofibras de celulosa producidos a partir de estos subproductos agroindustriales son ampliamente utilizados en diversas aplicaciones industriales, tales como la alimentación, farmacéutica, envases, papel, etc. [30]

La nanofibra de celulosa es un compuesto extraído a partir de la pulpa de la madera, el arroz u otras plantas, y que se aglutina en fibras cuyo diámetro es de 10-20 nanómetros, es decir unas 20.000 veces más estrechas que un cabello humano. [31]

El grupo papelerero japonés Nippon Paper en el año 2016 creó la mayor planta de producción de nanofibra de celulosa del mundo, en la que se desarrolló este nuevo material a partir de cosecha propia. La fibra resultó ser cinco veces más fuerte que el hierro, pero con la quinta parte del peso de este, y se caracteriza por su transparencia, lo que la dota de una amplia funcionalidad que la empresa está estudiando y que podría ir desde su uso en la creación de componentes hasta su incorporación al sector médico. [32]

4.6. Liberación de fármacos.

Los sistemas de liberación controlada de fármacos fueron desarrollados con el fin de mejorar las propiedades terapéuticas del medicamento, hacerlo más seguro, efectivo y confiable. Este método ofrece diferentes ventajas como la reducción de la toxicidad del medicamento entregándolo a un ritmo controlado, incrementado su eficiencia y selectividad, y prolongando su tiempo de vida. [33]

Estos sistemas permiten la liberación de un medicamento en un sitio específico, un beneficio buscado para minimizar la toxicidad y evitar los efectos secundarios que genera ese fármaco en otros tejidos, todo enfocado para la comodidad del paciente. Para el tratamiento de enfermedades como el cáncer existen sistemas nanofibrosos muy prometedores, los cuales pueden transportarse a través del torrente sanguíneo y atravesar barreras naturales, y una vez lleguen al sitio, deben tener receptores en su superficie que les permitan el reconocimiento específico de la célula afectada y la interacción con el medicamento y de esta forma poder destruirla. La ventaja de emplear nanofibras es que se pueden evitar las limitaciones en la carga de fármacos que poseen las micelas y liposomas usadas actualmente para el tratamiento de tumores, [20] ya que las micelas conforman una esfera cuya cavidad interna puede contener lípidos, mientras que la cavidad interna de los liposomas solo contiene una solución acuosa de un principio activo.

4.6.1. Nanofibras como sistema de liberación.

Existen diversos sistemas de liberación de fármacos como liposomas, microesferas, proteínas conjugadas, hidrogeles, nanopartículas y nanofibras.

Las nanofibras han sido exploradas como un nuevo método, debido a las grandes ventajas que posee incluyendo su amplia área superficial, alta porosidad y una estructura que imita la matriz extracelular. Por otro lado, los nanofibras a base de polímeros se utilizan generalmente para la administración de fármacos, el suministro de oxígeno, la entrega de genes y la entrega de proteínas. Para implementarlas como sistema de liberación de medicamentos, la forma más sencilla es preparar una solución polimérica y mezclarla con el fármaco y posteriormente fabricar las nanofibras con electrospinning. La carga exitosa de la droga en el nanofibra es la clave para mejorar la liberación sostenida del ingrediente activo. [33] Debido a su tamaño pueden atravesar los tumores, una vez allí, la velocidad de liberación del medicamento depende de la solubilidad de este y de la velocidad de difusión a través de la membrana en caso de estar recubierto por el polímero, o de la biodegradación de la nanofibra.

4.6.2. Tamoxifén

El medicamento más antiguo y destacado de la familia SERM (moduladores selectivos del receptor estrógeno) es el tamoxifén, que se dirige específicamente a los receptores de estrógeno en el tejido mamario y bloquea los efectos que promueven el crecimiento del estrógeno en los cánceres de seno con ER positivo. El tamoxifén se ha utilizado terapéuticamente para tratar la enfermedad mamaria metastásica y también para prevenir las recurrencias del cáncer de mama, con un éxito significativo. Varios estudios han demostrado que los pacientes que reciben este medicamento tienen tasas de recurrencia y mortalidad más bajas que los pacientes que no lo reciben. Por ejemplo, un estudio realizado por el NCI's National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP)

en 2010, mostró que el uso preventivo de tamoxifén redujo el riesgo de cáncer de mama invasivo en mujeres de alto riesgo en un 50 por ciento. [8]

4.7. Pruebas de viabilidad y citotoxicidad celular.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado.

En los ensayos de citotoxicidad comúnmente se aplican diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de forma indirecta el número de células viables, luego de someterlas a algún tipo de tratamiento. Sin embargo, la mayoría de estos suelen ser métodos de tipo terminal, ya que emplean sistemas de tinción destructivos. Entre los métodos más empleados están la reducción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), que requiere de células vivas, o que, al menos, muestren actividad óxido-reductasa, para convertir el colorante precursor en un producto cuantificable, y la tinción con sulforodamina B (SRB) que, por su afinidad con los aminoácidos básicos de las proteínas, se fija selectivamente en éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular. Al igual que los métodos anteriormente mencionados, el resazurin fue introducido como indicador de viabilidad celular no tóxico, útil para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad. [34]

Resazurin

El resazurin se utiliza como un indicador de oxidación-reducción (REDOX) que sufre un cambio colorimétrico en respuesta a la reducción metabólica celular. El crecimiento celular continuo mantiene un ambiente reducido, mientras que la inhibición del crecimiento mantiene un ambiente oxidado. La reducción relacionada con el crecimiento hace que el indicador redox cambie de forma oxidada (no fluorescente, azul) a forma reducida (fluorescente, roja). Estos procesos se asocian principalmente con actividad mitocondrial de células viables. La señal fluorescente se monitorea mediante equipos con láseres a una longitud de onda apropiada. En el presente trabajo el resazurin fue medido en un equipo Cytation 3 a una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 595nm. La señal fluorescente o colorimétrica generada a partir del ensayo es proporcional al número de células vivas en la muestra. [35]

5. METODOLOGÍA

A continuación, se expone la metodología implementada. En primera instancia se describe la obtención de nanofibras; se enuncian las que fueron adquiridas y las de elaboración propia, de igual forma se muestra el procedimiento seguido para su fabricación. Posterior a esto se mencionan los protocolos seguidos para toda la parte de cultivo celular, y los montajes realizados para la curva de proliferación y las pruebas de citotoxicidad/viabilidad. Por último, se explica la medición de fluorescencia, necesaria para entender la obtención de los resultados, y se menciona el protocolo para la realización de la tinción de las placas de cultivo luego de la finalización de los experimentos, para su almacenamiento, y en caso de ser necesario observarlas en el microscopio.

5.1. Obtención de Nanofibras.

En este proyecto se emplearon nanofibras de diferente origen; las membranas de BNC y arroz fueron brindadas por la Universidad Jorge Tadeo Lozano; la nanofibra de arroz se aprecia en la figura 4. La fibra de PCL y PCL + tamoxifén se adquirieron de una universidad en Minas Gerai en Brasil, y las de PVA y nylon se elaboraron personalmente en el laboratorio de nanotecnología en la universidad Jorge Tadeo Lozano de la ciudad de Bogotá.

La BNC fue obtenida a partir de un cultivo de un consorcio de bacterias y levaduras; y la membrana de arroz es un biopolímero que busca el aprovechamiento integral de la cascarilla de arroz, por lo cual está hecho a base de almidón de arroz, glicerina, nanopartículas de sílice y la nanocelulosa restante.



Figura 4. Nanofibra de arroz proporcionada por la Profesora Alis Pataquiva de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

5.1.1. Preparación soluciones.

Las nanofibras fabricadas personalmente se hicieron en la Universidad Jorge Tadeo Lozano por medio de la técnica de electrospinning con una configuración vertical. Se elaboraron un total de 4 nanofibras; se describe a continuación de manera puntual la preparación de cada una de las soluciones.

Se preparó una solución de 30 mL de nylon (hilo nylon marca barracuda) al 10% (w/v) usando como solvente ácido acético glacial. Se mantuvo en una plancha magnética por 40 minutos, a una temperatura de 77°C y 855 rpm (revoluciones por minuto).

Se prepararon 30 mL de solución de PVA al 11% (w/v), en esta ocasión se empleó como solvente agua destilada. Se mezcló la solución por una hora en la plancha, a una temperatura de 85°C y 400 rpm. Ver figura 5.



Figura 5. Proceso de preparación de la solución de PVA (11%).

Luego de los resultados del primer experimento, al observar que la nanofibra de PVA se disolvió instantáneamente luego de ser adicionada en las placas de cultivo; con el fin de reducir la solubilidad en agua del PVA, se fabricaron dos soluciones de PVA al 10% (w/v) agregándole romero, según lo indicado en el artículo de Estevez-Areco et al, 2018, en el que indica que los extractos de romero han sido previamente incorporados en diferentes películas poliméricas para producir posibles envases activos [25]. Una nanofibra PVA1, fue preparada con esencia de romero de fabricación comercial, y la segunda PVA2 con extracto de romero, obtenido a partir de hojas secas de romero.

Para la obtención del extracto de romero se tomaron cinco gramos de hojas secas de romero (ver figura 6) y en un mortero se molieron (ver figura 7), luego en un falcon se agregaron 17,5 mL de etanol (75%) y 7,5 mL de agua destilada para tener una solución etanol:agua (70:30 v/v), lo anterior se mezcló con las hojas molidas, y posteriormente se introdujo el falcon en el baño maría a 50°C durante 1 hora. Finalmente, la solución resultante se pasó por un filtro con un poro de 0,45 μm (ver figura 8).



Figura 6. Hojas secas de romero.



Figura 7. Romero molido en mortero.



Figura 8. Filtro empleado para la obtención del extracto de romero.

En la preparación de las soluciones para cada una se tomaron 46 mL de agua destilada, y 10 mL de la esencia ó extracto de romero respectivamente. Ambas soluciones se dejaron en la plancha durante una hora y media a 80°C y 150 rpm.

5.1.2. Fabricación de nanofibras en el equipo de electrospinning.

Este proceso se llevó a cabo en el equipo de electrospinning NANOFIB100 de la marca QUBITexp perteneciente a los grupos de investigación del laboratorio de nanotecnología de la universidad Jorge Tadeo Lozano. Se observa el equipo en la figura 9.



Figura 9. Equipo de electrospinning de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

5.1.2.1. Montaje.

Inicialmente se coloca la solución polimérica dentro de la jeringa, se le acopla la manguera y la aguja, y esta última se ubica al interior del equipo donde se le conecta el ánodo, en la parte inferior se sitúa el colector (aluminio) conectado al cátodo; se verifica que la distancia entre la bandeja colectora y la punta de la aguja sea la correcta dependiendo el polímero a usar Figura 10. Posterior a esto se dispone la jeringa en la bomba de infusión, se selecciona un flujo alto aproximadamente 3 mL/h y se realiza una purga. Finalmente se cierran las puertas del equipo, se enciende, se elige un flujo más bajo aproximadamente de 1 mL/h, y se empieza a subir el nivel del voltaje hasta que se observe la formación del cono de Taylor y la deposición de las nanofibras en el colector. En la tabla 3 mostrada a continuación se tienen los parámetros usados en cada una de las nanofibras fabricadas.

En la tabla 3 mostrada a continuación, se presentan los parámetros empleados a la hora de elaborar cada una de las nanofibras.

Tabla 3. Parámetros empleados en la elaboración de las nanofibras.

	PVA	PVA + esencia romero	PVA + extracto romero	Nylon
Distancia aguja a colector	10 cm	10 cm	10 cm	11,4 cm
Voltaje	24 kV – 30 kV	26 kV – 29 kV	26 kV – 29 kV	26 kV – 27 kV
Flujo	0,6 mL/h	0,8 mL/h – 1 mL/h	0,8 mL/h – 1 mL/h	1,8 mL/h
Humedad	60% - 65%	54% - 58%	54% - 58%	59 % - 63%

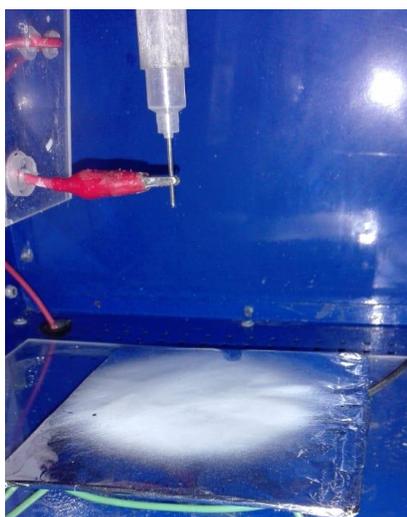


Figura 10. Fabricación de una nanofibra de PVA por electrospinning en el equipo NANOFIB100 de la marca QUBITexp.

5.1.2.2. Desmontaje y limpieza.

Una vez se termina de fabricar la membrana (aproximadamente 5 horas, esto varía dependiendo el polímero y el flujo) se debe apagar el equipo, bajar el voltaje a cero, apagar la bomba de infusión, desconectar el ánodo y el cátodo de la aguja y colector respectivamente; sacar el colector (aluminio) que contiene la membrana y guardarla en un desecador. Enseguida se debe desensamblar la jeringa, manguera y aguja, expulsar la solución polimérica restante de la jeringa, y por último se limpia rigurosamente los materiales empleados y el equipo, para retirar por completo residuos de la solución, que hayan podido quedar. Luego se coloca la nanofibra en un desecador para eliminar el exceso de solvente. (Ver figura 11).



Figura 11. Desecador donde se guardan las nanofibras una vez se retiran del equipo.

5.1.3. Corte y desinfección.

Cuando las membranas están secas, se despegan cuidadosamente del aluminio, y el corte se ejecuta con un sacabocados manteniendo las nanofibras entre dos hojas de papel, para así no maltratarlas, a los trozos obtenidos se les denominó confetis. Con ayuda de unas pinzas se toman los confetis de la nanofibra y se procede a desinfectarlas, exponiéndolas a luz UV durante 20 minutos por cada lado. A las BNC previo a la luz UV se les hizo un lavado con etanol al 75% por 10 minutos. Se cortaron 18 confetis de cada nanofibra, para cada línea celular por experimento.

5.2. Cultivo celular.

En el presente proyecto se trabajó con 3 líneas celulares cancerígenas; MCF-7, BT474 Y M8 (MDA-MB468), y una no cancerígena (linfocitos). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂. Se observaron en un microscopio invertido, para determinar su confluencia, las células alcanzan un 100% de confluencia cuando ocupan toda la superficie del frasco de cultivo en el que se encuentran adheridas. Los procedimientos realizados en cultivo celular se describen brevemente a continuación.

5.2.1. Limpieza y desinfección de la cabina.

Cualquier procedimiento en que se trabaje con células y se necesite mantener la esterilidad, debe ejecutarse en la cabina de flujo laminar, previo a su uso se debe limpiar de adentro hacia afuera con etanol al 70%, al igual que los materiales antes de organizarlos al interior de la cabina; posteriormente se enciende la luz UV durante 20 minutos para garantizar su desinfección.

5.2.2. Cambio de medio.

Este proceso estimula a las células para su crecimiento y consiste en renovar el medio de cultivo que fue DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico. El SFB les proporciona los nutrientes necesarios a las células para su proliferación, por tal motivo cuando se observa el medio de un color naranja o amarillo indica que ya no hay suficientes nutrientes y debe realizarse un cambio de medio. Ver protocolo en anexo 1.

5.2.3. Cambio de pase.

El cambio de pase se ejecuta cuando las células presentan un nivel de confluencia cercano o superior al 80%. Debido a que las líneas celulares, crecen adheridas al frasco de cultivo, se deben desprender mediante la incubación con tripsina, una enzima que rompe los enlaces de las proteínas implicadas en la adhesión celular. El cambio de pase se llevó a cabo al momento de cada montaje de los experimentos o cuando era necesario cambiarlas a un frasco de cultivo más grande, o la subdivisión en varios frascos. Ver protocolo en anexo 2.

5.2.4. Descongelamiento.

Las células se pueden conservar en una nevera a -80°C o en nitrógeno líquido ya sea en fase vapor alcanzando temperaturas entre -140°C y -180°C ; o sumergidas en el líquido siendo almacenadas a -196°C , en nitrógeno se conservan por más tiempo. En caso de querer transportar viales, se guardan en un termo con un poco de nitrógeno líquido. Este proceso se realizó al inicio del proyecto para iniciar los cultivos celulares y tener la cantidad de células necesarias para todos los experimentos. Ver protocolo en anexo 3.

5.2.5. Congelamiento.

Este proceso llamado criopreservación permite conservar las células por mucho tiempo. Las células son congeladas a muy bajas temperaturas con el fin de disminuir su actividad biológica y poderlas mantener en condiciones de vida suspendida. Es indispensable el uso de un criopreservante (dimetilsulfóxido "DMSO"), este compuesto reduce el punto de congelación permitiendo una velocidad de enfriamiento más lenta, lo que reduce el riesgo de formación de cristales de hielo que puede dañar las células y la muerte celular a causa de ello. El congelamiento se realiza cuando se tiene gran cantidad de células y se quieren almacenar para ser utilizadas después o para almacenar las células y tenerlas como stock. Se Conservan en un cooler en una nevera a -80°C (ver figura 12), o en nitrógeno líquido donde alcanzan temperaturas de -196°C . Ver protocolo en anexo 4.



Figura 12. Cooler donde se conservan las células en nevera de -80°C . Congelamiento de células M8.

5.2.6. Conteo celular.

Para cumplir con los parámetros de cantidad de células en cada experimento, se hicieron conteos mediante el uso de azul tripán y una cámara de Neubauer figura 13. Esta tiene una cuadrícula formada por nueve cuadrados grandes, cada uno de ellos con una superficie de 1 mm^2 , los cuatro cuadrados grandes de las esquinas están formados por 16 cuadrados medianos.

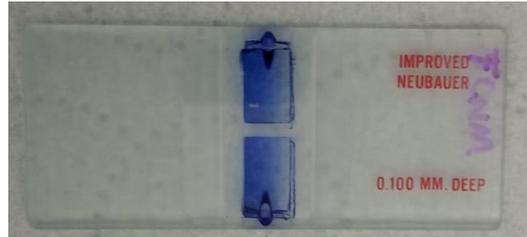


Figura 13. Cámara de Neubauer, con la preparación con azul tripán y células, lista para efectuar el conteo celular.

Para ejecutar el conteo se deben tener las células en suspensión, luego se toman $10 \mu\text{l}$ de la solución celular y se adicionan $90 \mu\text{l}$ de azul tripán, este es un colorante que permite diferenciar células muertas de células vivas, ya que el colorante atraviesa la membrana de las células muertas, tiñéndolas de color azul. Sobre la cámara de Neubauer se ubica un cubreobjetos, se ponen $10 \mu\text{L}$ de la solución anterior, y se procede al conteo bajo el microscopio invertido.

Se cuentan las células vivas que se encuentren en los cuatro cuadrados grandes de las esquinas tal como lo indica la figura 14, incluyendo las que estén en contacto con los bordes izquierdo y superior de cada cuadrado y excluyendo las que estén tocando los bordes derecho e inferior.

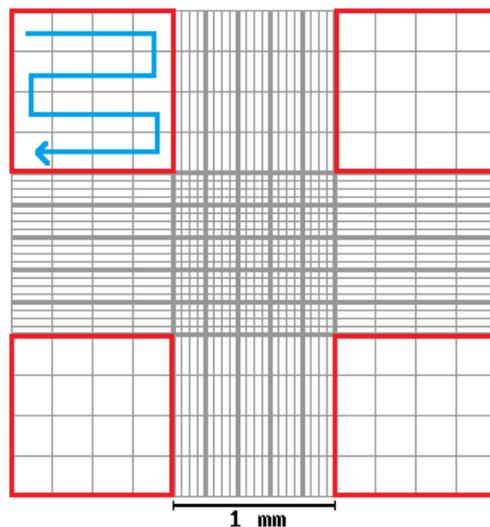


Figura 14. Cuadrícula de la cámara de Neubauer donde se realiza el conteo. Adaptada de [36]

El conteo lo realizan dos personas, después de tener el número de células de los cuatro cuadrantes se saca el promedio \bar{x} y se utiliza la siguiente fórmula para calcular la cantidad de células por mililitro. En la figura 15 se observa un cuadrante de la cámara de Neubauer a través del microscopio para realizar el conteo.

$$\# \text{ células} / \text{mililitro} = 10 * \bar{x} * 10.000 \quad (1)$$

Ver protocolo en anexo 5.

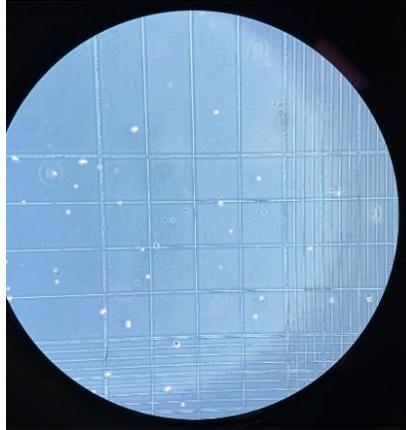


Figura 15. Imagen que muestra las células M8 (MDA-MB468), en uno de los cuadrantes de la cámara de Neubauer, que se usaron para contarlas.

5.3. Curva de proliferación.

Esta curva se realizó con el objetivo de estandarizar el número de células apropiada para realizar los experimentos de la línea M8 (MDA-MB468). Esto se hizo únicamente para esta línea celular, puesto que el semestre pasado ya se habían estandarizado las otras líneas.

M8 (MDA-MB468).

En una placa de 96 pozos se montó una curva con las siguientes concentraciones celulares: 70.000, 65.000, 60.000, 55.000, 50.000, 45.000, 40.000, 35.000, 30.000, 25.000, 20.000, 15.000, 10.000, 5.000, 2.500, 1000 y 500 (ver figura 16). Inicialmente se contaron las células en la cámara de Neubauer, se hicieron los cálculos para obtener las concentraciones mencionadas anteriormente, luego en cada pozo se puso el volumen con la cantidad de células y se adicionó DMEM completo para obtener un volumen final de 200 μ l, cada concentración se montó por triplicado. Se dejaron en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas, pasado este tiempo se retiró el medio de cada uno de los pozos, se lavaron con 200 μ l de PBS (buffer fosfato salino), y finalmente se agregó 250 μ l de resazurin (4,4 μ M). Después de incubar 4 horas, 6 horas y 24 horas se midió la fluorescencia emitida en un equipo Cytation 3, con el fin de medir indirectamente la cantidad de células viables o su actividad metabólica. Se tomaron a 3 horas distintas para tener un seguimiento de su comportamiento.

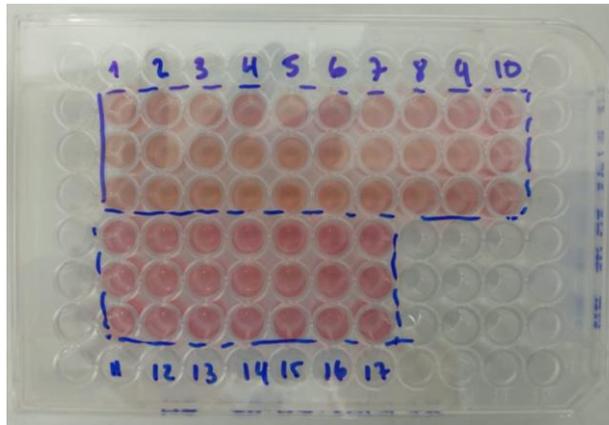


Figura 16. Montaje de la placa de cultivo con la curva de proliferación de M8.

5.4. Pruebas de citotoxicidad.

Se utilizó resazurin (4,4 μ M) para medir la sobrevivencia de las células luego de ponerlas en contacto con nanofibras durante uno a seis días. Se emplearon placas de 96 pozos para cada uno de los montajes. Diariamente se retiró el medio de los pozos respectivos, fueron lavados con 200ul de PBS (buffer fosfato salino) y finalmente se adicionó 250ul de resazurin. Se debe tener en cuenta que para las placas de las líneas cancerígenas se requirió de sumo cuidado y delicadeza para no despegar las células del fondo de los pozos; los linfocitos al estar en suspensión no tenían este inconveniente, siempre y cuando fueran centrifugados previamente.

5.4.1. Líneas celulares cancerígenas.

Se desarrollaron dos experimentos para las líneas celulares MCF-7 y BT474 y tres experimentos con la línea M8 (MDA-MB468), debido a la cantidad de células disponibles al momento del montaje de cada experimento. Inicialmente para cada montaje, se partió de las células en suspensión, se realizó el conteo en la cámara de Neubauer, y se hicieron los cálculos para obtener 15.000 células por pozo en un volumen final de 200 μ L con DMEM completo. Se dejaron las placas en incubación (37°C y 5% de CO₂) por 24 horas, se les adicionó en cada pozo los confetis de cada una de las nanofibras (ver figura 17) y nuevamente se llevaron a la incubadora para empezar las mediciones de fluorescencia 24 horas más tarde.

En la tabla 4 se presenta un resumen de los tratamientos empleados.

Tabla 4. Resumen de los tratamientos para medición de la citotoxicidad en las líneas cancerígenas.

Primer experimento (BT474, MCF-7, M8)		Segundo experimento (BT474, MCF-7, M8)		Tercer experimento (M8)	
Células solas	Triplicado	Células solas	Triplicado	Células solas	Triplicado
Con tamoxifén	Triplicado	Con BNC	Triplicado	Con arroz	Triplicado
Con PCL	Duplicado	Con Nylon	Triplicado	Con BNC	Triplicado

Con PCL + tamoxifén	Triplicado			Con Nylon	Triplicado
Con BNC	Triplicado			Con PVA1	Triplicado
Con PVA	Triplicado				
Tamoxifén solo	Unidad (3 días)				



Figura 17. Montaje citotoxicidad con nanofibras en pozos de la placa de cultivo con BT474 durante el segundo experimento.

5.4.2. Linfocitos.

A partir de una muestra de 5ml de sangre, se obtuvieron linfocitos, mediante separación con gradiente de ficoll. Se hicieron dos experimentos de citotoxicidad. Al igual que con las líneas cancerígenas se realizó el conteo, y los cálculos respectivos para poner 15.000 linfocitos en cada pozo en un volumen final de 200 μ L adicionando PBmax y 2% de fitohemaglutinina (PHA). Se incubaron por 24 horas y luego se adicionaron las nanofibras (ver figura 18), nuevamente se dejaron 24 horas en incubación y posteriormente se iniciaron las mediciones de fluorescencia.

En la tabla 5 se muestra un resumen de los tratamientos empleados para linfocitos.

Tabla 5. Resumen tratamientos empleados en la medición de citotoxicidad para linfocitos.

Primer experimento		Segundo experimento	
Linfocitos solos	Triplicado	Linfocitos solos	Duplicado
Con arroz	Triplicado	Con arroz	Duplicado
Con BNC	Triplicado	Con BNC	Duplicado
Con Nylon	Triplicado	Con Nylon	Duplicado
Con PVA1	Triplicado	Con PVA1	Duplicado
Con PVA2	Triplicado	Con PVA2	Duplicado

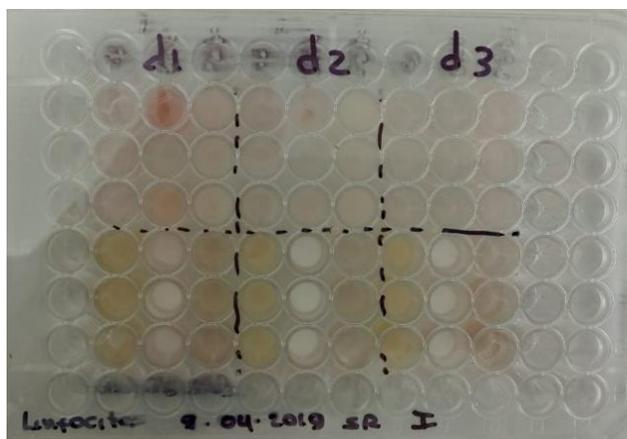


Figura 18. Montaje citotoxicidad con nanofibras en pozos de la placa de cultivo con linfocitos durante el primer experimento.

Obtención de linfocitos mediante Ficoll

Se obtuvo una muestra de sangre heparinizada de un voluntario sano, posterior a la firma del consentimiento informado. Se tomó 2 mL de ficoll, y cuidadosamente se adicionó 4ml de sangre para no mezclar los dos componentes. Enseguida, fueron centrifugados a 2000 rpm durante 30 minutos, luego se tomó la capa blanca de linfocitos y se agregó a un falcon de 15ml, con el propósito de obtener únicamente los linfocitos sin otros componentes de la sangre. Se hicieron tres lavados, primero con 10ml de PBS (buffer fosfato salino), y cinco minutos de centrifugación a 2000rpm, luego dos con 5ml de PBS, a las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, pusieron en 2ml de medio PBMAX, y fueron transportados hasta la universidad del Rosario, en una caja especial para evitar fugas de líquido. Ver protocolo en anexo 6.

5.5. Medición de fluorescencia para viabilidad celular

Las mediciones de fluorescencia fueron hechas durante seis días, y cada día a las 4h, 6h y 24h luego de agregar el resazurin en los pozos correspondientes, a los tratamientos de cada día. Para esto se empleó el equipo Cytation 3 que permite la lectura de placas como lo muestra la figura 19. Se colocó una longitud de onda de excitación de 535 nm y 595 nm para emisión, una ganancia de 50 y la lectura se hizo por la base de la placa en el caso de las células cancerígenas y para los linfocitos se realizó tanto por la base como por la tapa, debido a que son células que no crecen adheridas al sustrato. Durante el traslado de las placas hasta el equipo, estas se mantuvieron cubiertas con papel de aluminio para evitar que el resazurin estuviera expuesto a la luz y hubiese pérdida de fluorescencia. Ver protocolo en anexo 7.

Se agregó 250ul del reactivo resazurin en un pozo que no contuviera células, diariamente para poder restar el valor correspondiente de fluorescencia a los resultados de los demás pozos, con el fin de tener las curvas que genera cada nanofibra sin verse alterada por otro compuesto.



Figura 19. Medición de una placa en equipo Cytation 3.

5.6. Tinción de Wright.

Luego de finalizar los experimentos, las placas fueron teñidas con colorante de Wright (ver figura 20). Este procedimiento se debe ejecutar en la cabina extractora de gases debido a que el colorante empleado contiene metanol. Inicialmente se retira el resazurin de toda la placa, luego se hace un lavado con PBS (buffer fosfato salino) con ayuda de una pipeta pasteur, se retira y se adiciona el colorante Wright y agua, se retira y se realiza un último lavado con agua para finalmente dejar secar la placa. Ver protocolo en anexo 8.

Este procedimiento permite almacenar las placas de cultivo para poder observarlas más adelante en el microscopio (ver figura 21).

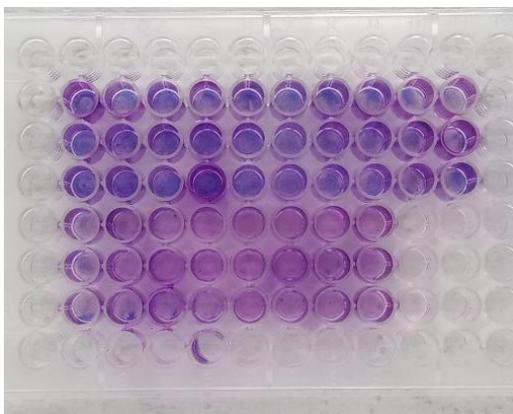


Figura 20. Tinción de Wright de la placa de la curva de proliferación de M8 (MDA-MB468).

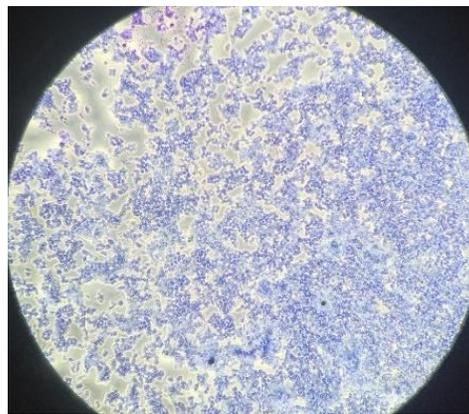


Figura 21. Imagen que muestra un pozo de la placa con una concentración de 65.000 células M8 (MDA-MB468), luego de la tinción.

6. RESULTADOS.

En esta sección se exponen los resultados obtenidos para cada uno de los procesos descritos en la metodología. Primeramente, se presentan los resultados en cuanto a la elaboración de las nanofibras. Se muestra de forma gráfica, los resultados obtenidos de la curva de proliferación para M8 y para las pruebas de citotoxicidad/viabilidad tanto en las líneas cancerígenas como los linfocitos, de igual forma se muestra de forma gráfica el porcentaje de sobrevivencia calculado para cada experimento y cada línea celular, con los valores de fluorescencia obtenidos a las 24 horas.

6.1. Elaboración nanofibras

Inicialmente se fabricó una membrana de PVA al 11%, se observa en la figura 22. Esta se usó en el primer experimento de citotoxicidad en las líneas celulares cancerígenas, al momento de ser adicionada en los pozos en un medio acuoso, los confetis se deshicieron instantáneamente. Por tal motivo, se fabricaron dos nuevas membranas de PVA (10%); en esta ocasión agregando romero, una con esencia de romero comercial (PVA1), y otra con el extracto de romero obtenido en el laboratorio (PVA2).

Al someter las nuevas membranas a medios acuosos, se pudo observar que, a diferencia de la primera membrana de PVA, estas tardaron aproximadamente 1 o 2 días en deshacerse, siendo la membrana con esencia (PVA1) la que más tardó en disolverse.

Adicionalmente, se fabricó una membrana de nylon empleando como disolvente ácido acético (10%) esta se aprecia en la figura 23.



Figura 22. Nanofibra de PVA finalizada.



Figura 23. Nanofibra de Nylon finalizada.

Es importante resaltar que, durante la elaboración de las membranas en el equipo, al tener una configuración vertical, se presentaba goteo, incrementándose al haber mucha humedad; por lo que las membranas no quedaron perfectamente lisas y uniformes. Con el fin de disminuir la humedad se colocó sílica y deshumidificadores cerca al equipo y en su interior cuando no estaba en uso.

6.2. Curva de proliferación M8

La curva de proliferación de MDA-MB468 fue realizada con el fin de determinar la cantidad óptima de células para cultivar en cada pozo de las placas de 96 pozos, para así obtener mejores resultados en todas las pruebas.

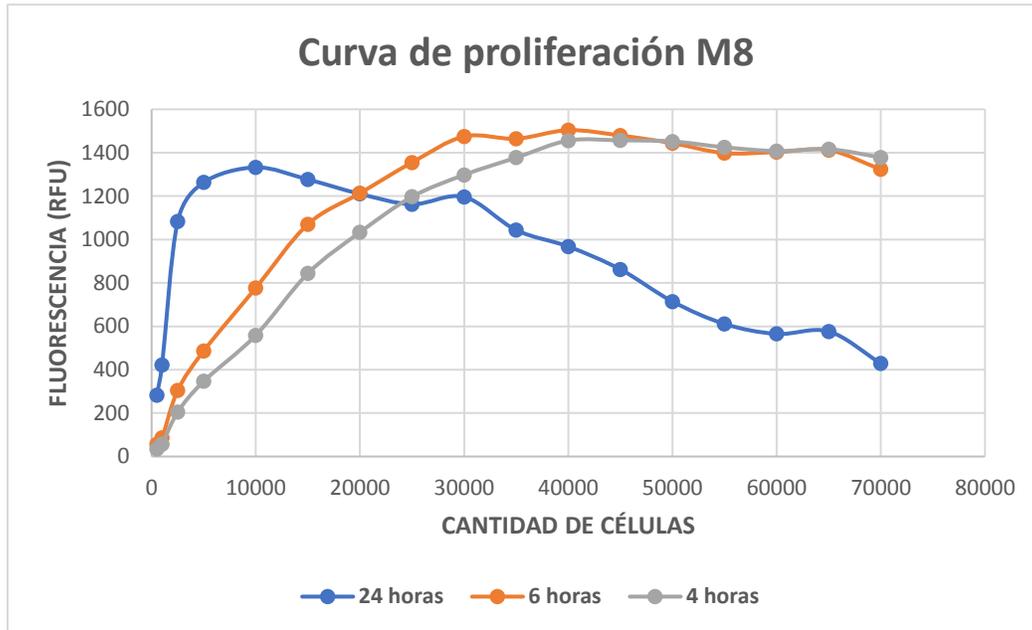


Figura 24. Gráfica primera curva de proliferación M8 (MDA-MB468).

En la Figura 24 se aprecia la fluorescencia en función de la cantidad de células medida en tres tiempos diferentes de incubación, a las 4, 6 y 24 horas de haber adicionado el resazurin.

Se observa que en las curvas de 4 y 6 horas los valores más altos de fluorescencia se tienen en los pozos con 30.000 – 40.000 células, sin embargo, en la curva de las 24 horas se observa que la fluorescencia es mayor en 10.000 células, esto no es lo esperado, pero se puede explicar, porque se adiciono en cada pozo 100 μ L de resazurin que al parecer fueron metabolizados en su totalidad por las células y producía una señal baja. Particularmente a las 6 horas se observó que los valores de fluorescencia disminuían drásticamente. Por lo anterior, se tomó la decisión de adicionar a partir de ese momento en cada pozo 250 μ L del reactivo resazurin, ya que el volumen inicial se agotó muy pronto por lo que la medición de las 24h es más un efecto de carencia de reactivo que manifestación de daño o muerte celular. Debido a que esto es un resultado poco confiable se procedió a realizar una segunda curva de proliferación.

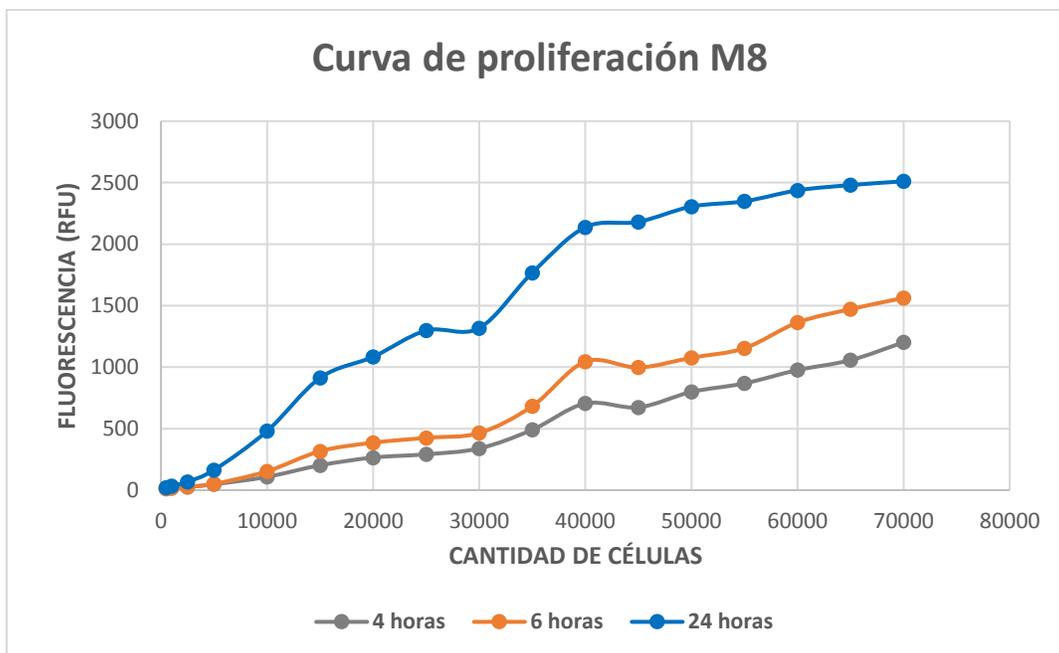


Figura 25. Gráfica segunda curva de proliferación M8 (MDA-MB468).

A primera vista, en la figura 25, se puede observar que los datos tienen mayor coherencia. En esta ocasión se adicionaron los 250 μ L de resazurin. Las tres curvas tienen un comportamiento similar, en el que a mayor cantidad de células hay más fluorescencia. Adicionalmente, se tiene que a medida que pasan las horas, mayor fluorescencia, indicativo de la proliferación celular y por ende mayor actividad metabólica.

En las curvas de 4 y 6 horas no se ve una diferencia muy drástica, ya que, una vez montado el experimento, las células se adaptan al nuevo entorno, y empiezan a adherirse al fondo de los pozos, posteriormente comienzan a proliferar, generando una mayor actividad metabólica. En los pozos en que hay muchas células, se llega a una confluencia alta en un tiempo menor, por lo tanto, las células comienzan a crecer unas sobre otras, situación poco ideal para su supervivencia. Asimismo, en los pozos con muy pocas células, se puede observar una baja actividad, incluso pasadas las 24 horas.

Teniendo en cuenta lo anterior la cantidad adecuada de células sería 40.000, no obstante, si se desean realizar experimentos de varios días esta cantidad no sería ideal; por lo que se concluye que entre 20.000 – 25.000 células es la cantidad apropiada para placas de cultivo de 96 pozos, teniendo presente que el tamaño de estas células es menor a las otras líneas cancerígenas empleadas en este estudio.

6.3. Pruebas citotoxicidad

Cuando se trata de liberación controlada de fármacos al interior del cuerpo humano, se deben emplear materiales que no generen daños indeseados a las células, por lo tanto, es importante realizar pruebas que permitan determinar si un material es apto o no para entrar en contacto con distintas células de los tejidos del cuerpo.

Por este motivo, se realizaron pruebas de citotoxicidad para observar el efecto que generan las distintas membranas sobre las células (MCF-7, BT-474, MDA-MB468 y linfocitos).

Los linfocitos fueron empleados como control, por representar las células sanas que puedan estar cerca de las regiones donde entra en contacto la nanofibra que liberará de manera controlada de algún fármaco.

6.3.1. Líneas celulares cancerígenas

Se presentan a continuación las gráficas obtenidas del primer experimento en el que se empleó PCL, PCL + tamoxifén, BNC, PVA, tamoxifén y células solas (control positivo) en tratamientos de cada una de las líneas elegidas. Se muestran los resultados de las mediciones de 4, 6 y 24 horas para todos los días. Estas horas con el fin de tener un seguimiento diario del comportamiento de las células.

Algunos datos en este experimento fueron omitidos por baja confiabilidad. Se determinó al revisar los valores obtenidos de fluorescencia, puesto que no eran coherentes con medidas del mismo día a distinta hora; concluyendo que la placa se introdujo de forma incorrecta en el equipo Cytation 3 al momento de realizar las mediciones, o errores en los parámetros puestos, como las longitudes de onda.

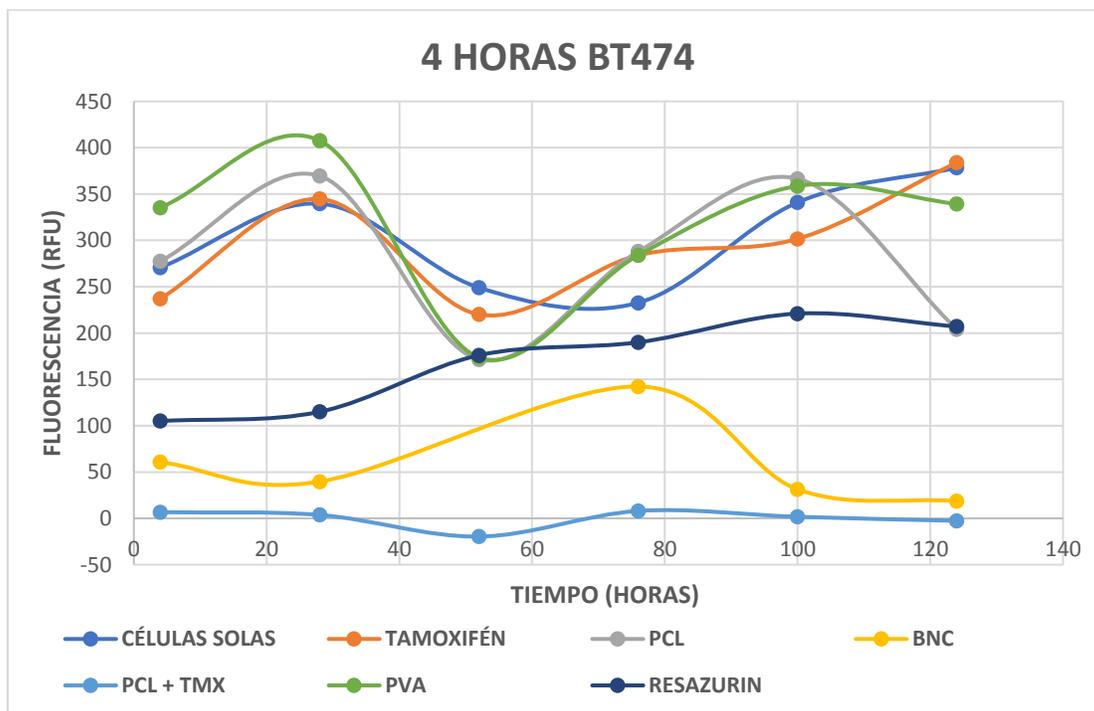


Figura 26. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

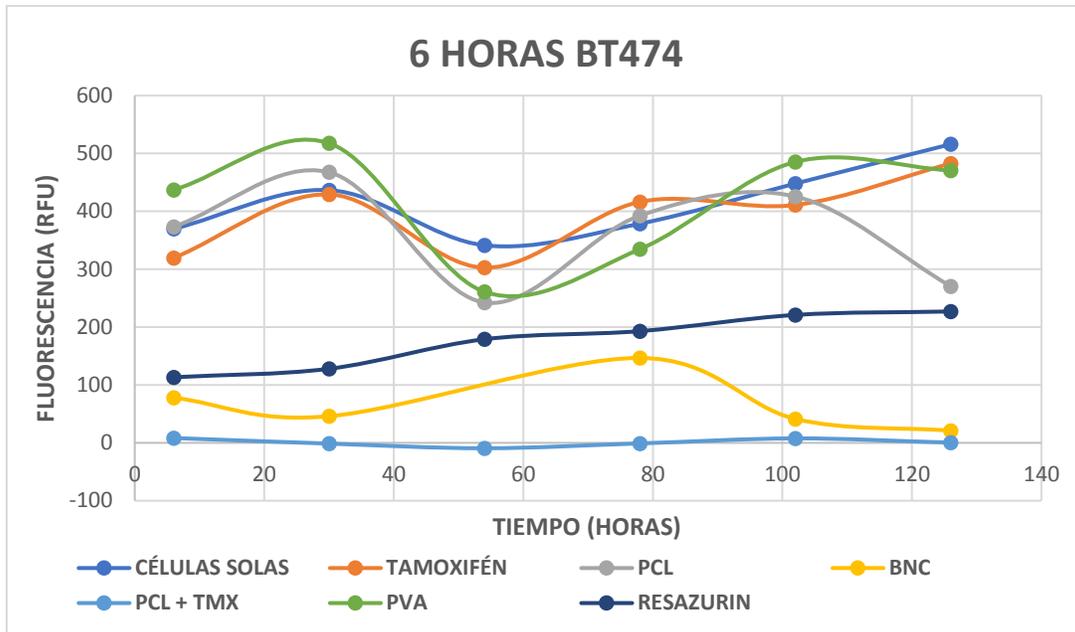


Figura 27. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

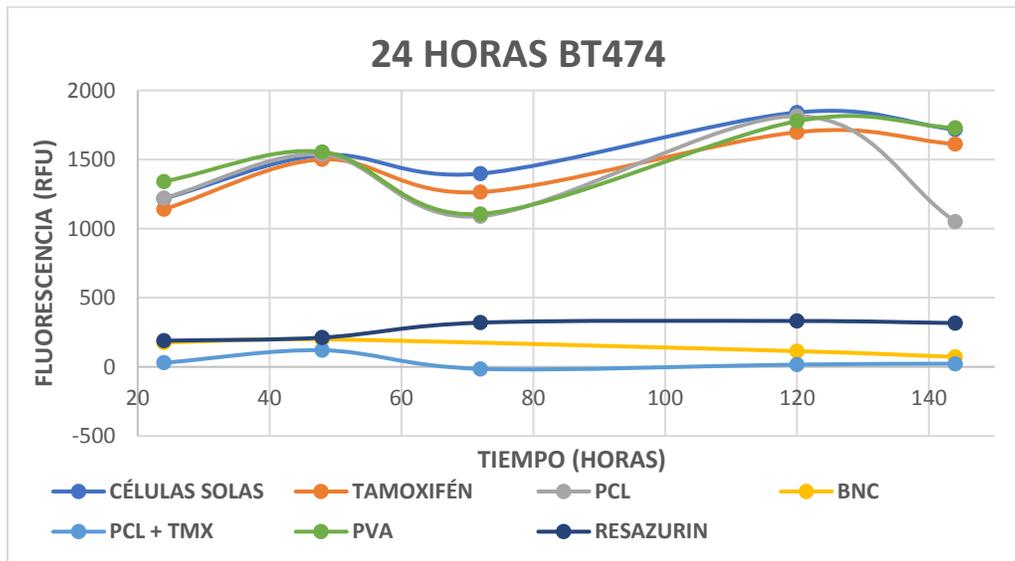


Figura 28. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

En las figuras 26, 27 y 28, se observan curvas similares en los pozos de células solas, PVA, PCL y tamoxifén, eso indica que las membranas de PVA y PCL no son tóxicas para las células ya que no afectan su proliferación, de igual forma el tamoxifén no las perjudica en gran medida. Se piensa que esto se debe a que no hay suficiente concentración del medicamento.

Por otro lado, la membrana de BNC y PCL + tamoxifén si disminuyen la proliferación de las células; por consiguiente, BNC es tóxica para las células, y la membrana de PCL al no ser tóxica por sí sola, pero al ser efectiva al matar las células cuando contiene el medicamento; se considera adecuada como sistema de liberación de fármacos. Se observa mayor eficacia a los tres días de exposición.

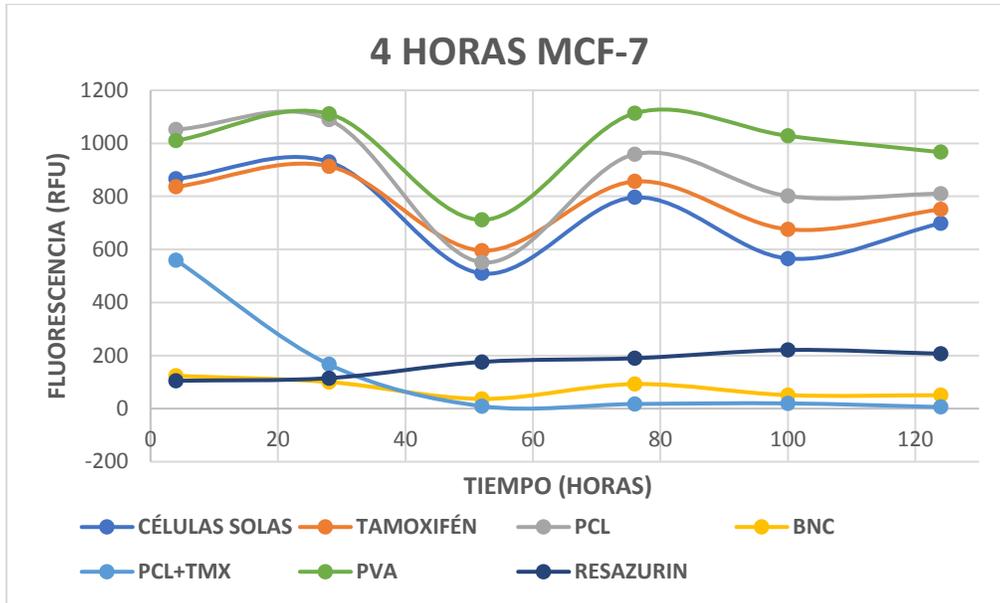


Figura 29. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

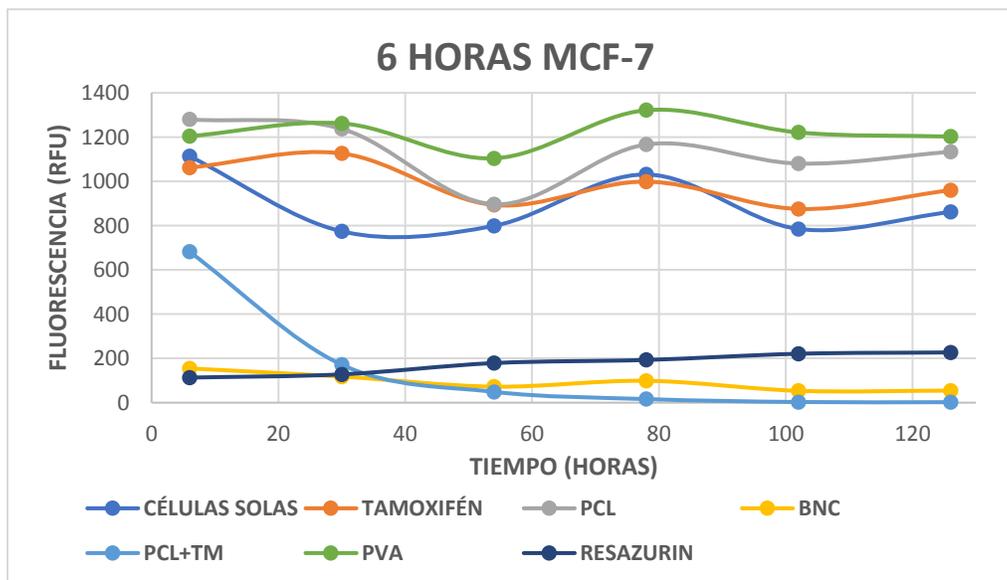


Figura 30. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

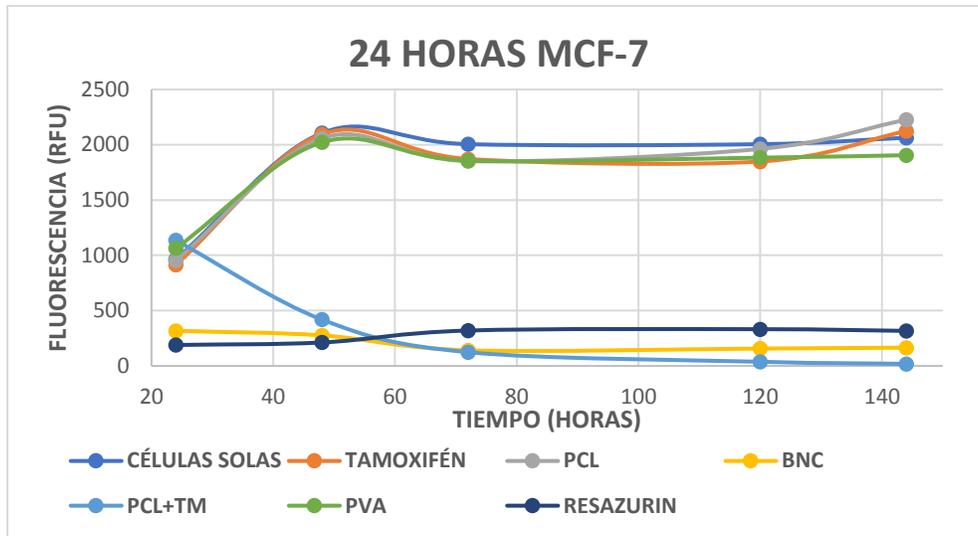


Figura 31. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

Con la línea celular MCF-7 como se observa en las figuras 29, 30 y 31 ocurre algo similar que con BT474, en las mediciones de 4 y 6 horas parece que las membranas de PVA y PCL indujeran la proliferación, pero pasadas las 24 horas ya las curvas son muy similares a la curva de células solas. Al igual que antes no se consideran tóxicas.

Pasa algo semejante en el caso de las membranas de BNC y PCL + tamoxifén, pero a diferencia que con BT474, a mayor tiempo de exposición de las células con la fibra de PCL + tamoxifén, menor fluorescencia y por consiguiente menor cantidad de células vivas al día seis.

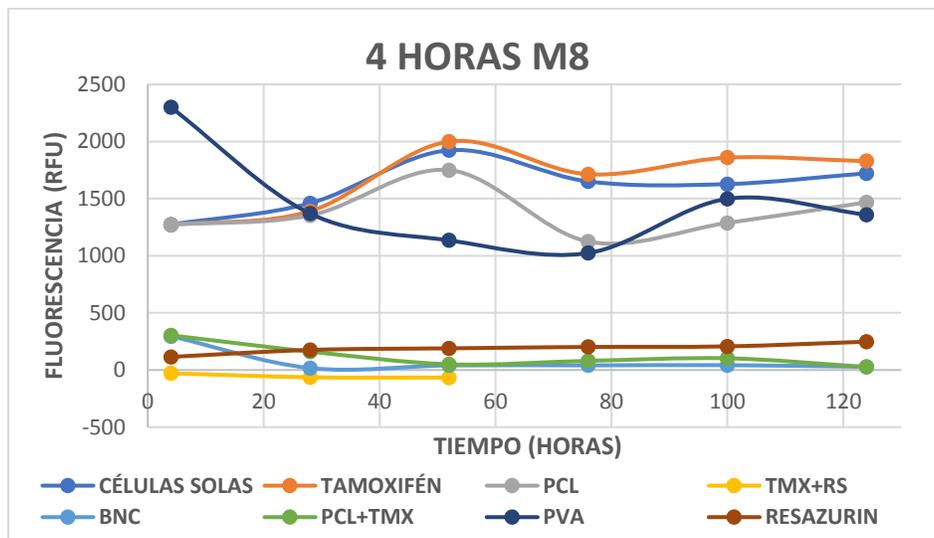


Figura 32. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

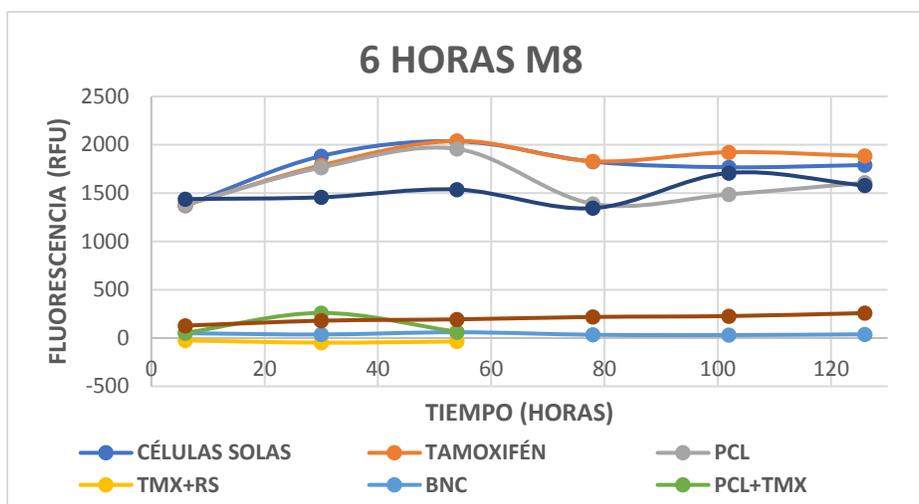


Figura 33. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

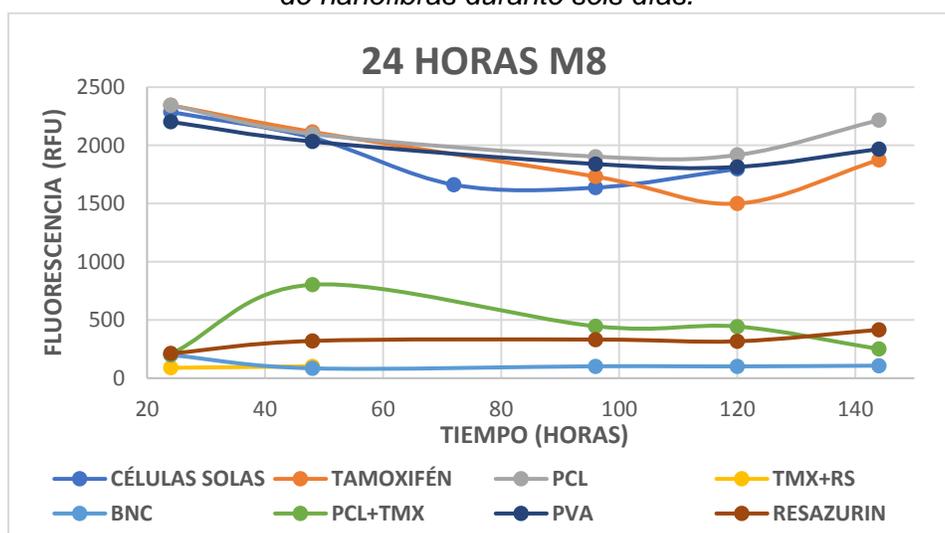


Figura 34. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

En la línea celular M8 en las figuras 32, 33 y 34, se observa que en las mediciones de 4 y 6 horas con la membrana de PVA se disminuye la fluorescencia con respecto a células solas y PCL y tamoxifén, pero pasadas las 24 horas se tienen curvas muy parecidas entre sí, por lo que ninguna de estas se llega a considerar tóxica.

Tanto BNC como PCL + tamoxifén reducen la sobrevivencia de las células, pero a diferencia de MCF-7 y BT474, aquí la membrana de BNC es más perjudicial que PCL + tamoxifén, mostrando la curva con menor fluorescencia a medida que pasan los días de exposición.

Con el fin de determinar el porcentaje de sobrevivencia de las tres líneas celulares cancerígenas tras exponerlas a las nanofibras, se muestran a continuación tres graficas obtenidas a las 24 horas de los seis días del experimento. (Ver figuras 35, 36 y 37)

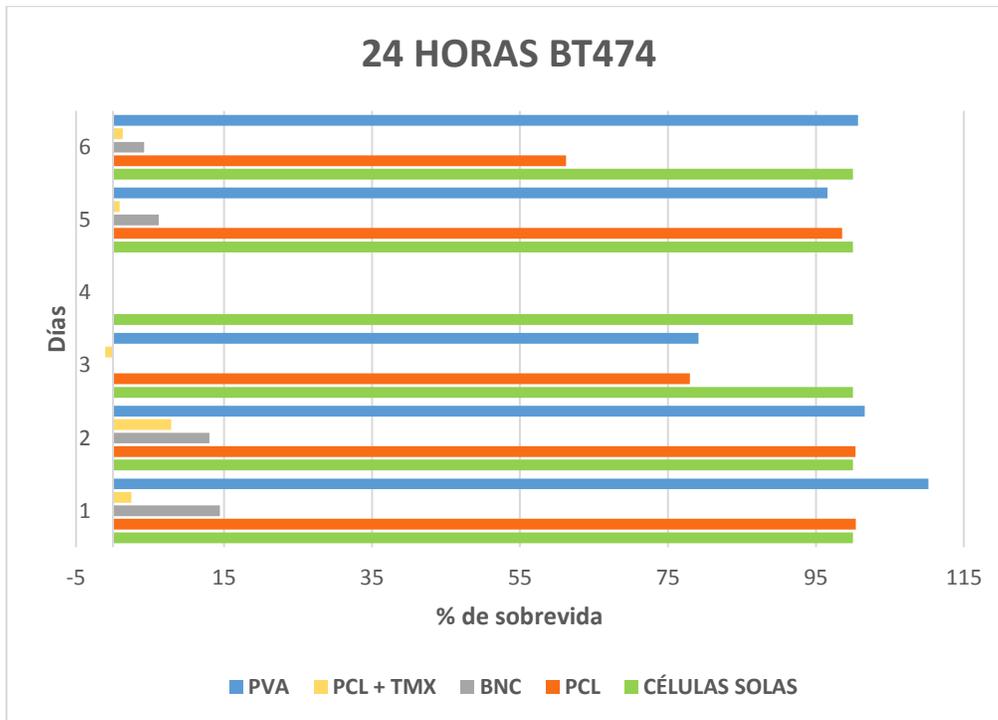


Figura 35. Gráfica porcentaje de sobrevivencia 24 horas BT474 primer experimento de citotoxicidad.

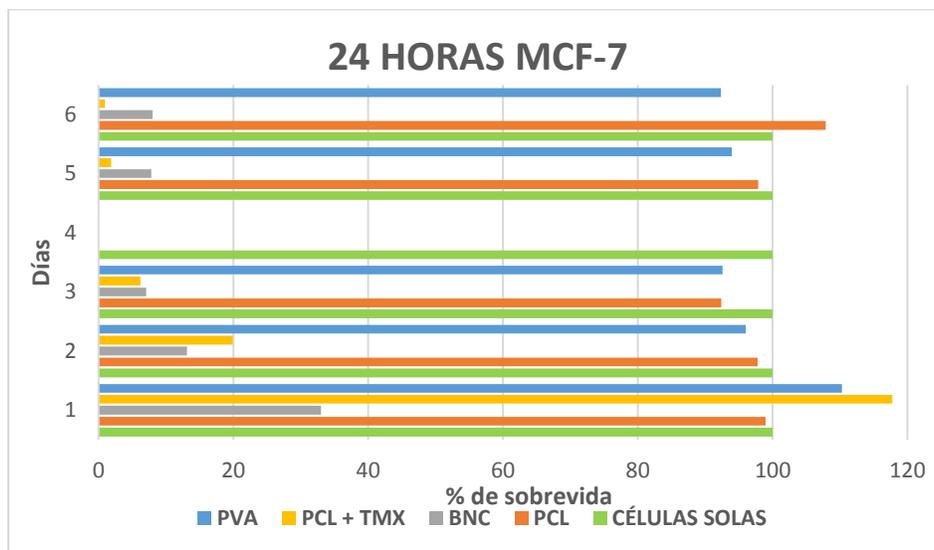


Figura 36. Gráfica porcentaje de sobrevivencia 24 horas MCF-7 primer experimento de citotoxicidad.

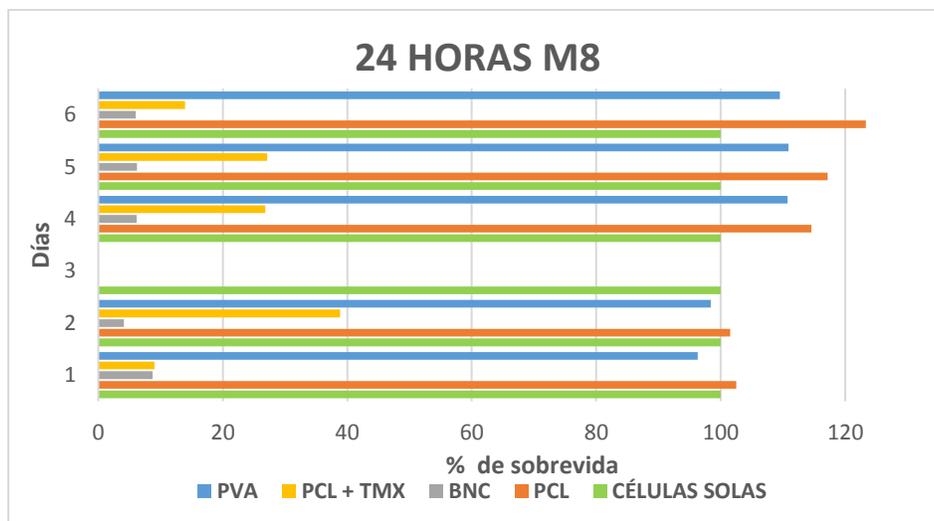


Figura 37. Gráfica porcentaje de sobrevivencia 24 horas M8 (MDA-MB468) primer experimento de citotoxicidad.

A partir de lo anterior se observa que las membranas de PCL y PVA mantienen vivas las células, mientras que para BT474 y MCF-7 las nanofibras de BNC reduce el porcentaje de sobrevivencia a un 10 % - 15 % al igual que las de PCL + tamoxifén, por otro lado en el caso de M8 las membranas de PCL + tamoxifén reduce el porcentaje de sobrevivencia a un 20 % - 25 % mientras que las de BNC tienen un mayor efecto perjudicial reduciendo a un 8 % - 10 %.

Se presentan a continuación las gráficas obtenidas del segundo experimento en el que se empleó BNC, Nylon y células solas (control positivo) en cada una de las líneas. Se muestran los resultados de las mediciones de 4, 6 y 24 horas para todos los días.

Algunos datos en este experimento fueron omitidos por baja confiabilidad.

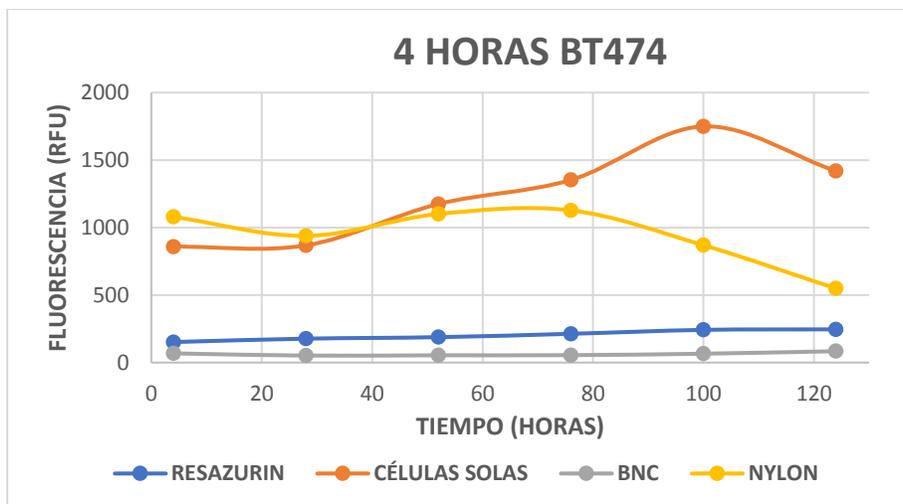


Figura 38. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurina, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

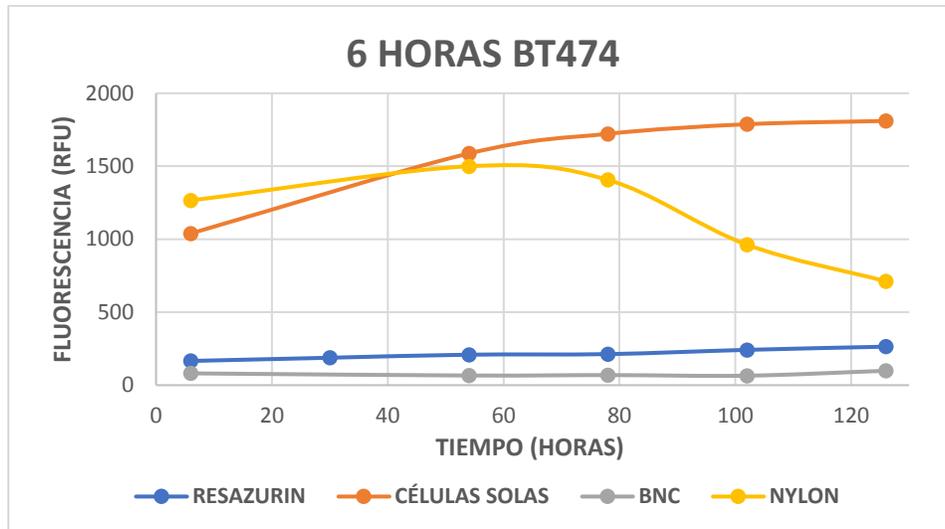


Figura 39. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

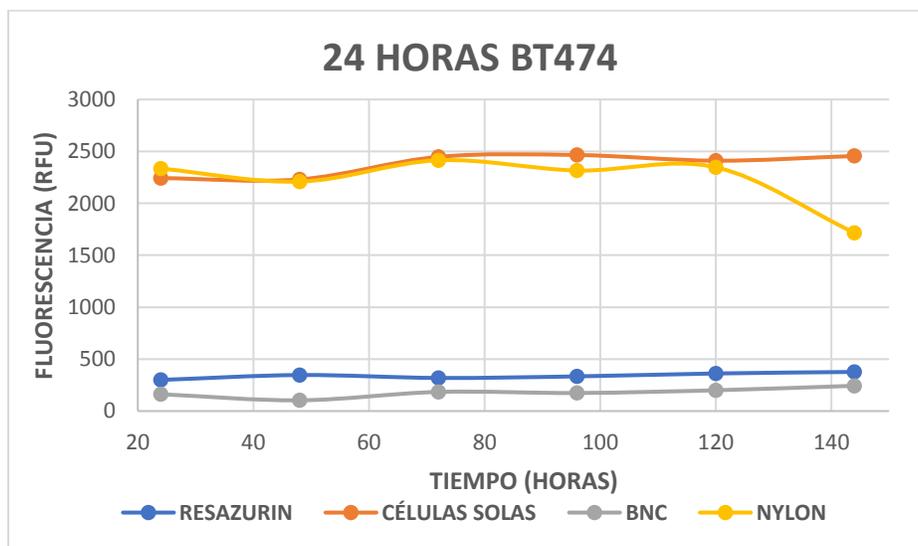


Figura 40. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular BT474 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

En las figuras 38, 39 y 40 se puede observar que en todos los casos los valores más altos de fluorescencia se obtuvieron en células solas y los más bajos en BNC, esto lleva a pensar que esta membrana es tóxica. Adicionalmente, Nylon mantuvo valores de fluorescencia altos, por ende, no es tóxica, no obstante, a partir del día cinco de exposición se observa que la proliferación celular disminuye drásticamente.

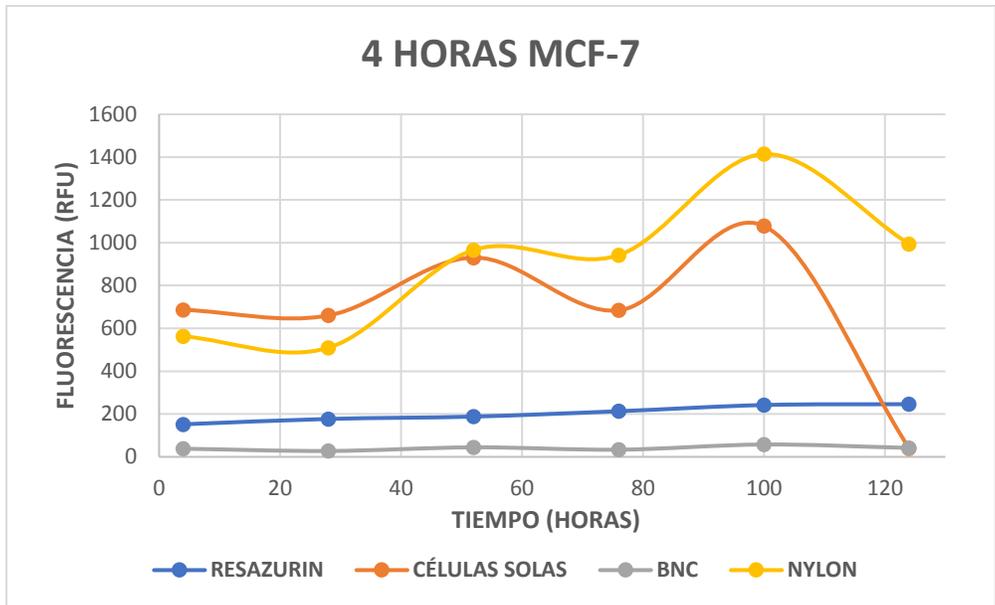


Figura 41. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

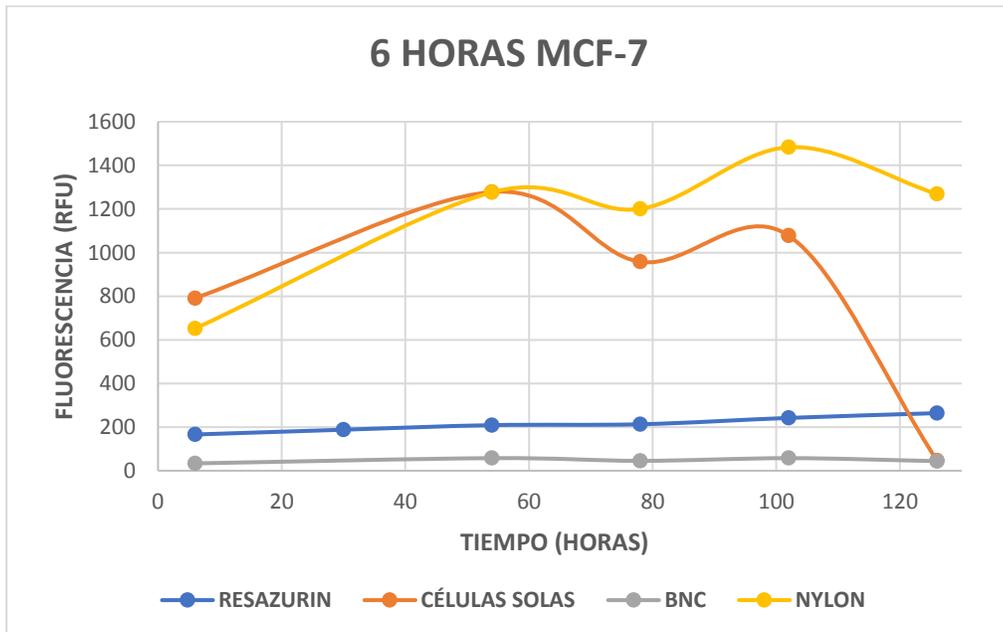


Figura 42. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

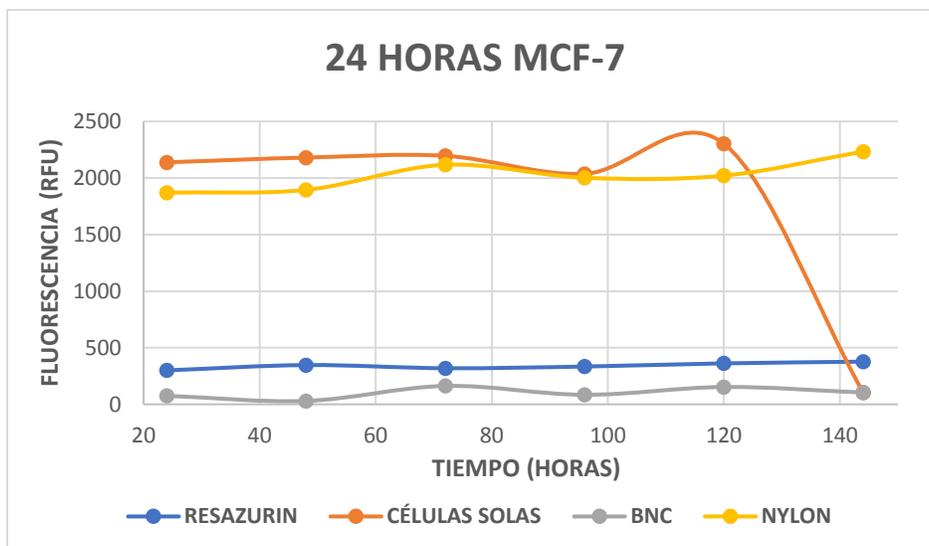


Figura 43. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

En los resultados para MCF-7 se puede ver un comportamiento similar a BT474, en las figuras 41, 42 y 43 los valores más altos se dieron en las células solas y en Nylon, y los más bajos en BNC. Se presume que las nanofibras de BNC, son tóxicas para las células MCF-7, y las de Nylon no son tóxicas. Adicionalmente, se muestra que en el día seis los valores de fluorescencia de células solas y nylon se reducen radicalmente, concluyendo que los experimentos podrían acortarse un día.

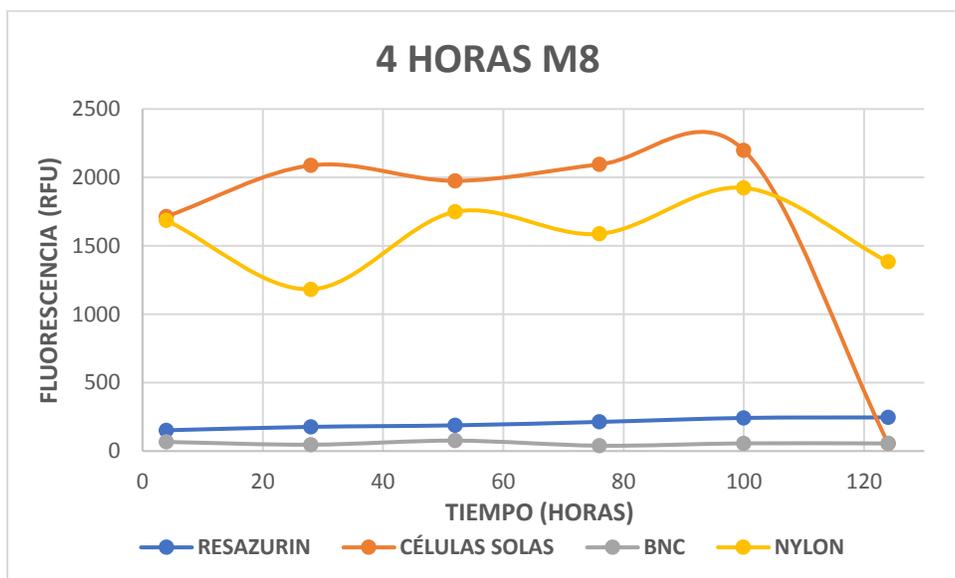


Figura 44. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

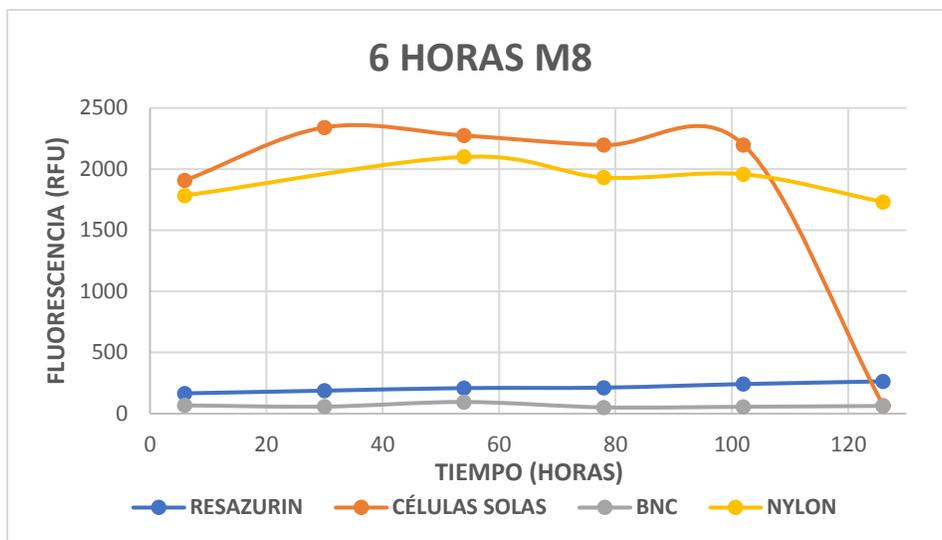


Figura 45. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

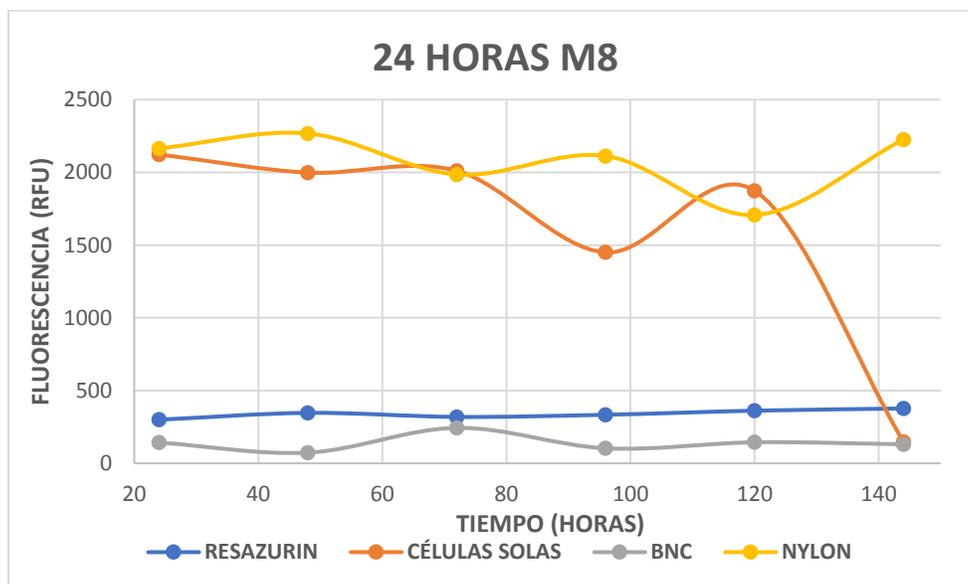


Figura 46. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

En las gráficas anteriores de M8, figuras 44, 45 y 46, sucede exactamente lo mismo que para MCF-7, se asume que las nanofibras de BNC, son tóxicas y las de Nylon no son tóxicas.

Con el fin de determinar el porcentaje de sobrevivencia de las tres líneas celulares cancerígenas tras exponerlas a las nanofibras, se muestran a continuación tres gráficas obtenidas a las 24 horas de los días del experimento. (Ver figuras 47, 48 y 49).

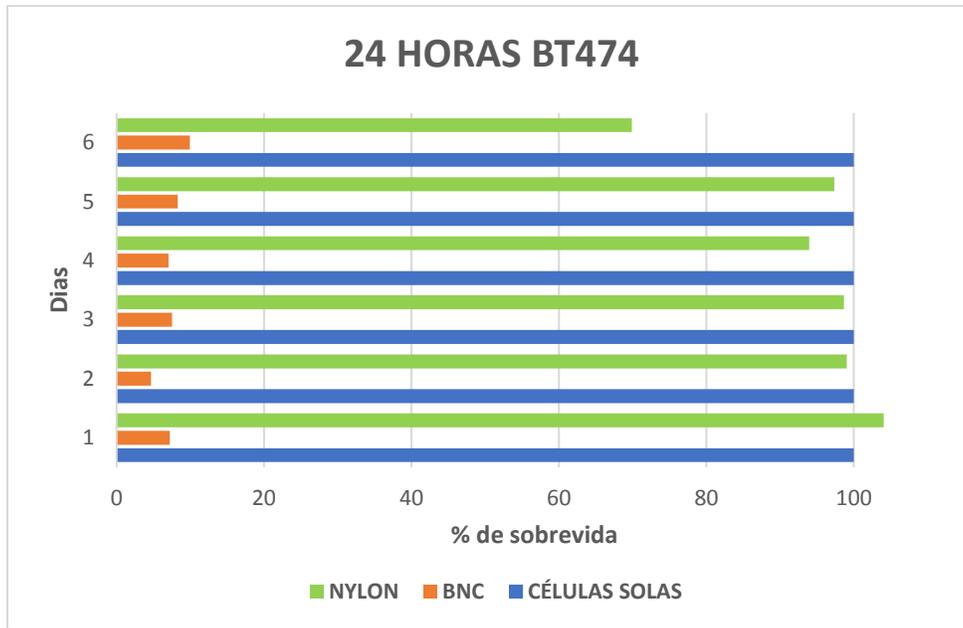


Figura 47. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas BT474 segundo experimento de citotoxicidad.

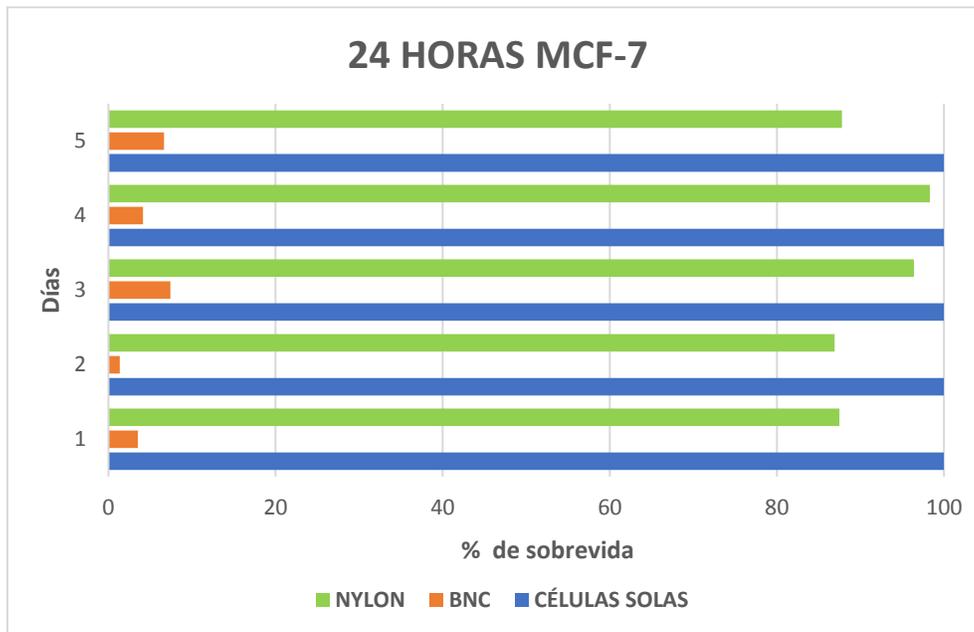


Figura 48. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas MCF-7 segundo experimento de citotoxicidad.

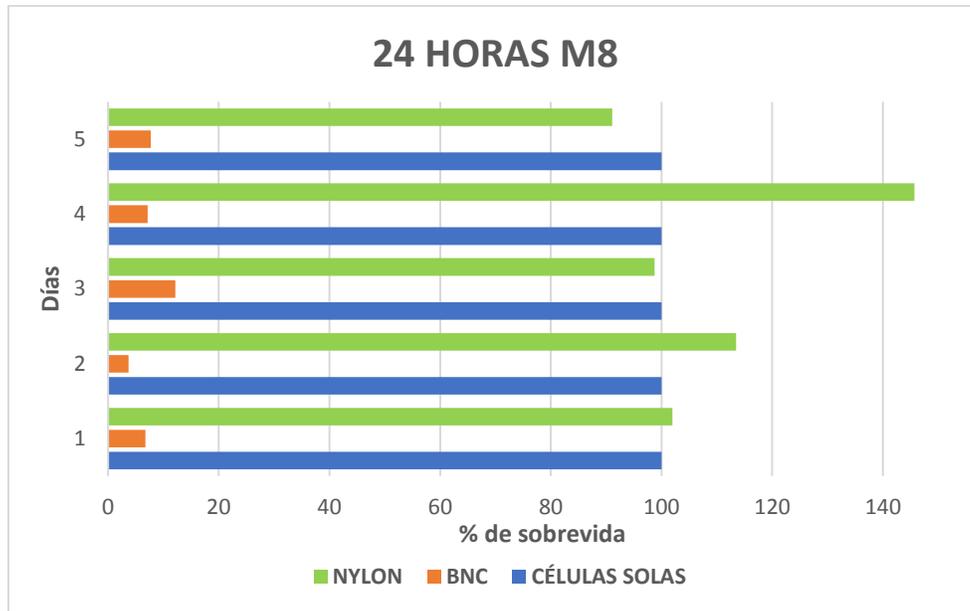


Figura 49. Gráfica porcentaje de supervivencia 24 horas M8 (MDA-MB468) segundo experimento de citotoxicidad.

Para todos los casos se observa que la membrana de BNC reduce el porcentaje de supervivencia a un 8 % - 10 %.

Se presentan por ultimo las gráficas obtenidas del tercer experimento en el que se empleó BNC, Nylon, Arroz, PVA1 y células solas (control positivo) únicamente en la línea celular M8. Se muestran los resultados de las mediciones de 4, 6 y 24 horas para todos los días.

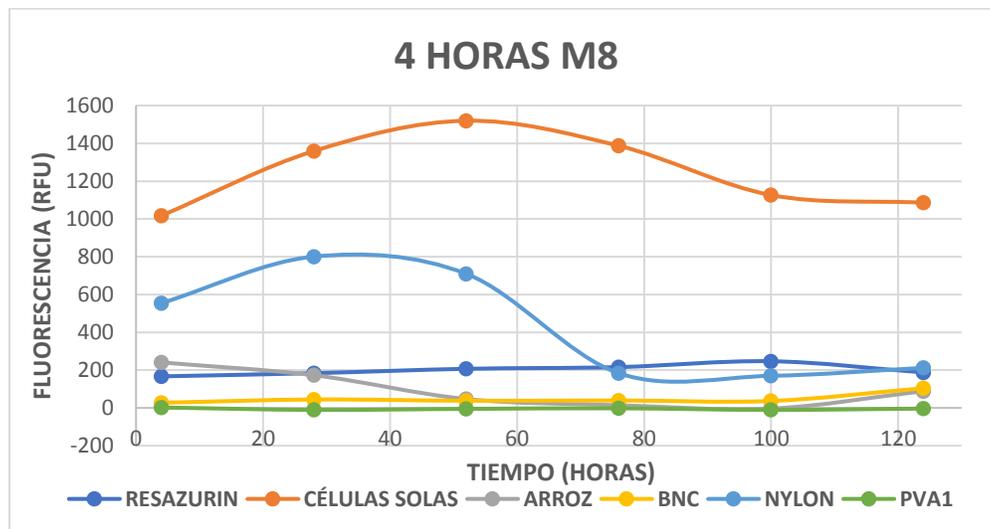


Figura 50. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurina, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

En la figura 50 se puede observar que los valores más altos obtenidos los seis días a las 4 horas del experimento se dieron en las células solas, y los más bajos en PVA1, BNC y arroz.

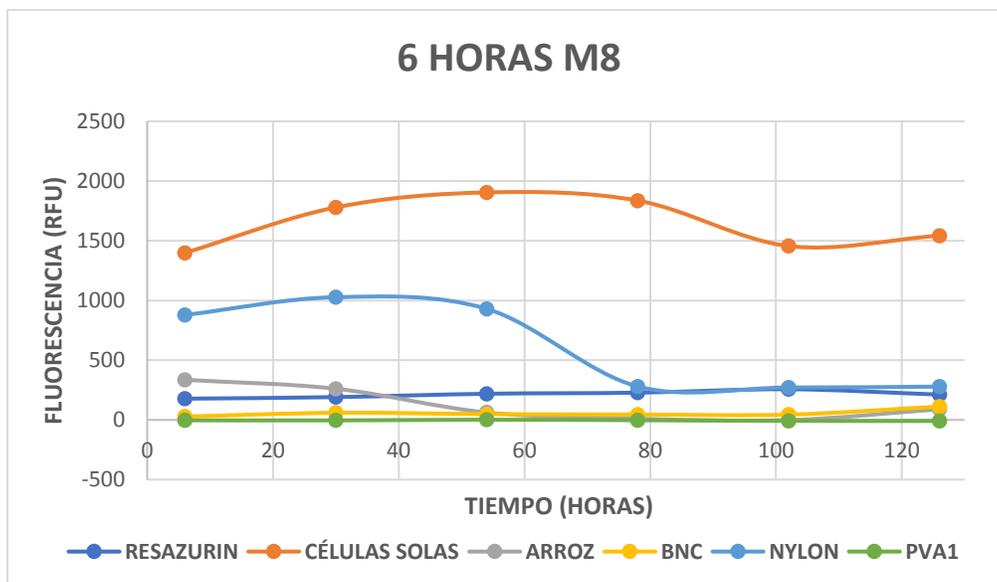


Figura 51. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

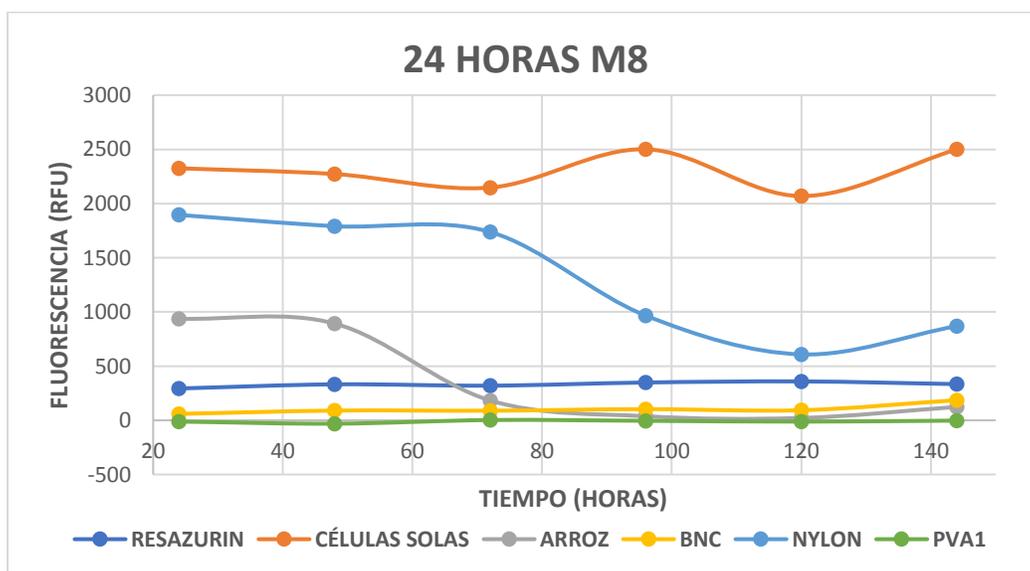


Figura 52. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de la línea celular M8 (MDA-MB468) expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

En las figuras 51 y 52, se puede observar un comportamiento similar al de la primera gráfica (4 Horas, figura 50).

De estos comportamientos se podría presumir que las nanofibras de PVA1, BNC, y Arroz son citotóxicas para las células MDA-MB468. Por otro lado, Nylon mantuvo valores más altos durante los 3 primeros días, por ende, se presume que no es citotóxica para las células MDA-MB468, sin embargo, la exposición prolongada a esta membrana hace que se reduzca la proliferación y sobrevivencia celular.

Cabe resaltar que, en la nanofibra de Arroz en los dos primeros días, una vez retirada la membrana y pasadas las 24 horas la fluorescencia era mayor con respecto a las 4 y 6 horas.

Con el fin de determinar el porcentaje de sobrevivencia de la línea celular MDA-MB468 tras exponerla a las nanofibras, se muestra a continuación la gráfica obtenidas a las 24 horas de los seis días del experimento.

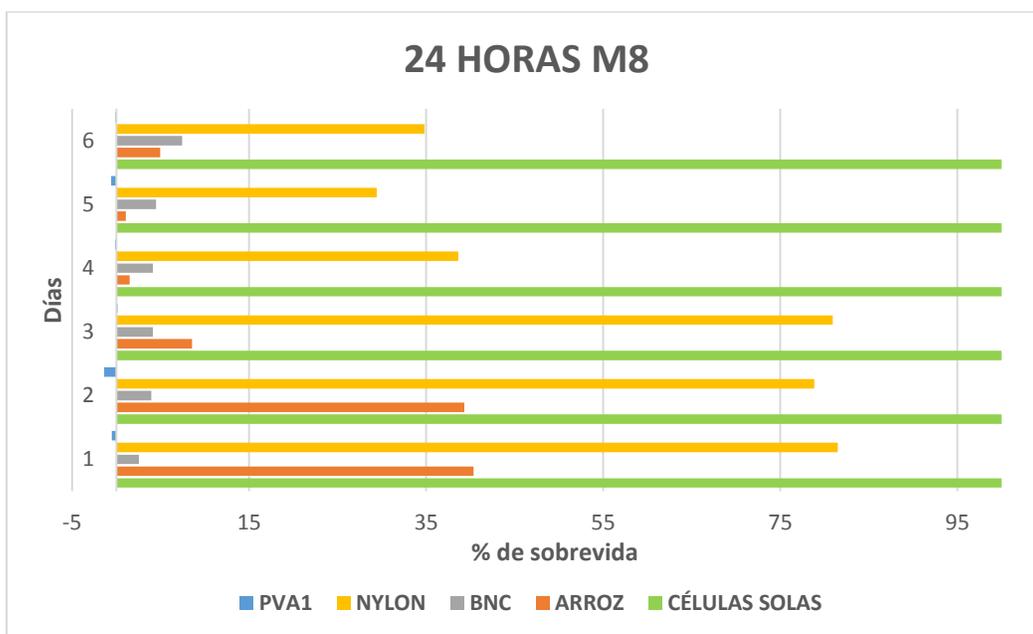


Figura 53. Gráfica porcentaje de sobrevivencia 24 horas M8 (MDA-MB468) tercer experimento de citotoxicidad.

En la figura 53 se observa que las cuatro nanofibras empleadas en este experimento reducen la sobrevivencia de las células, sin embargo, las que mayor efecto presentan son las de BNC reduciendo el porcentaje de sobrevivencia a 5 % - 8 % y la membrana de PVA1 con un porcentaje de 0% aniquilando por completo las células, esto puede ser por la adición que se hizo de esencia de romero.

6.3.2. Linfocitos

Se presentan a continuación las gráficas obtenidas del primer experimento en el que se empleó BNC, Nylon, Arroz, PVA1, PVA2 y células solas (control positivo) en los linfocitos. Se muestran los resultados de las mediciones de 4, 6 y 24 horas para todos los días. (Ver figuras 54, 55 y 56).

Algunos datos en este experimento fueron omitidos por baja confiabilidad.

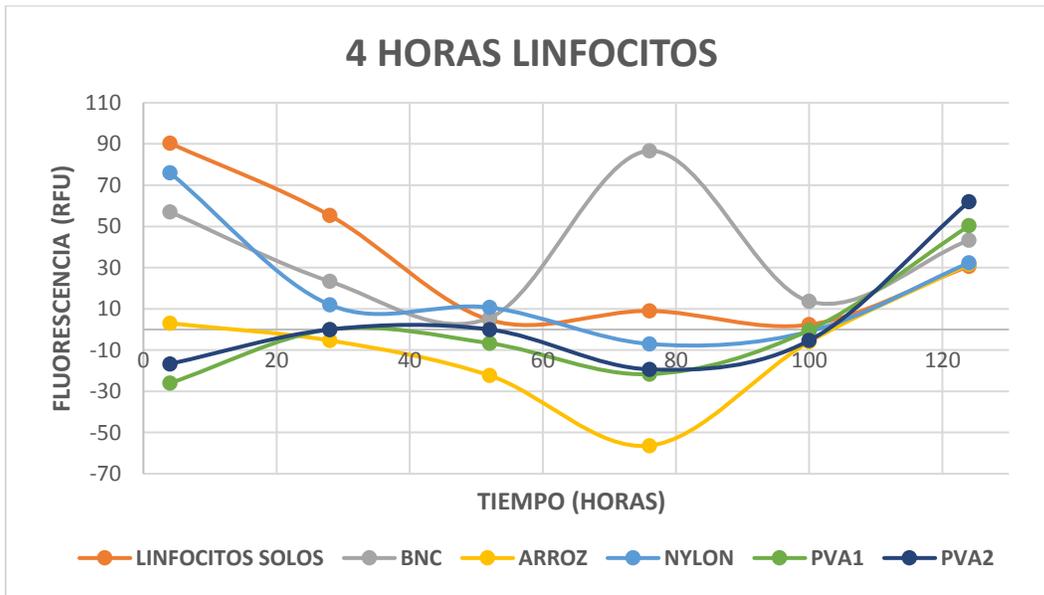


Figura 54. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

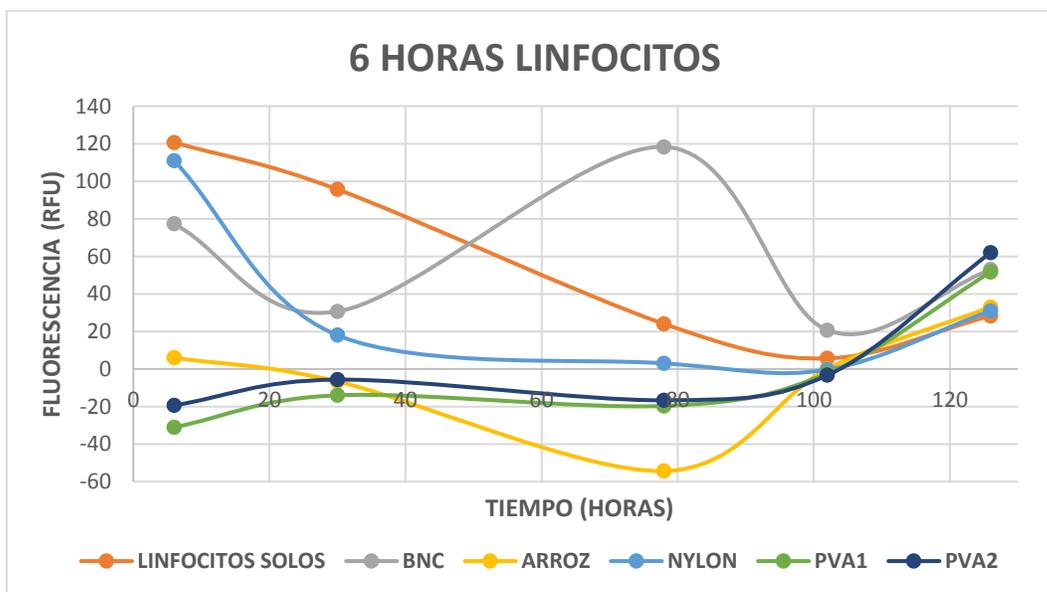


Figura 55. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

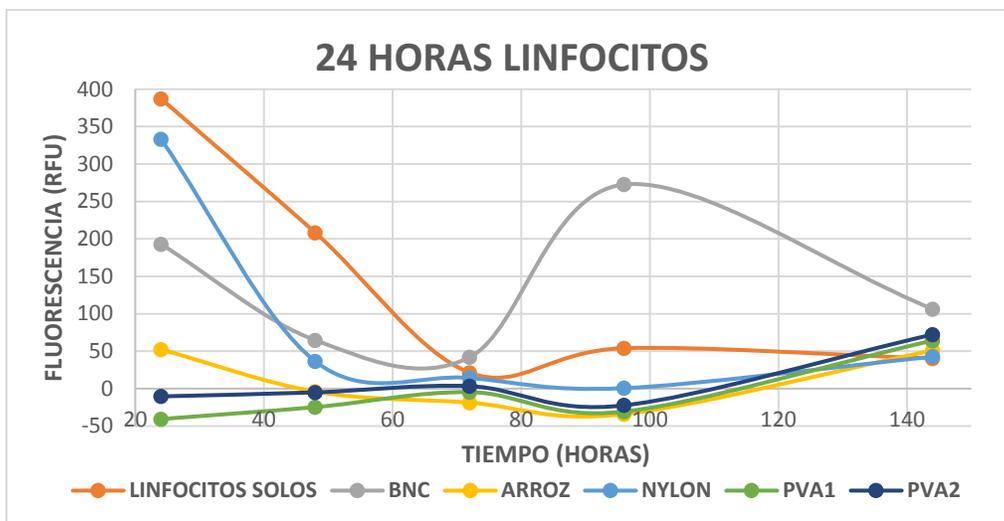


Figura 56. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

Se observa que los valores más bajos de fluorescencia se tienen con las membranas de Arroz, PVA1 y PVA2, considerándolas tóxicas. La curva de Nylon presenta un comportamiento un poco semejante a la curva de linfocitos solos, sin embargo, tiene menor fluorescencia que esta.

Por otro lado, es curiosa la curva que se genera al exponer los linfocitos a BNC pues parece que este material induce su proliferación ya que es la curva con mayor fluorescencia, presentando un pico al cuarto día.

Se presentan a continuación las gráficas obtenidas del segundo experimento en el que se empleó BNC, Nylon, Arroz, PVA1, PVA2 y células solas (control positivo) en los linfocitos. Se muestran los resultados de las mediciones de 4, 6 y 24 horas para todos los días.

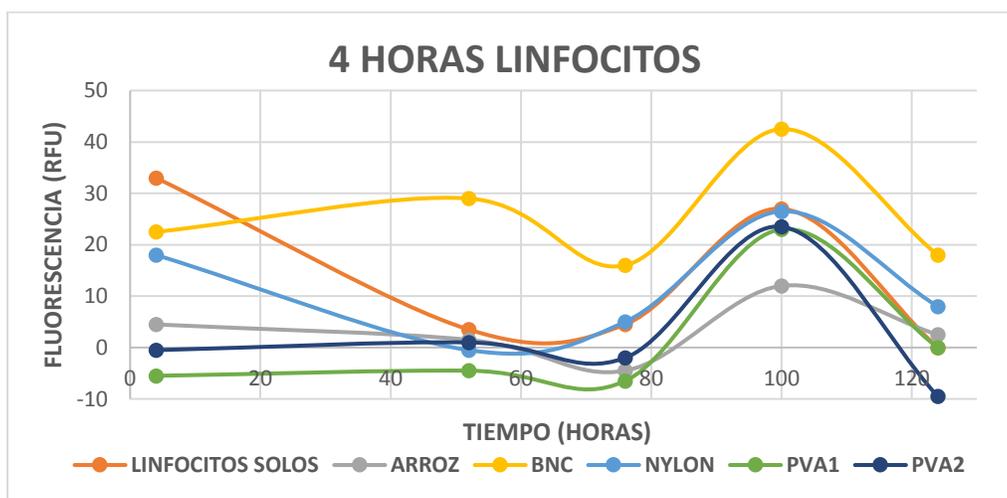


Figura 57. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de cuatro horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

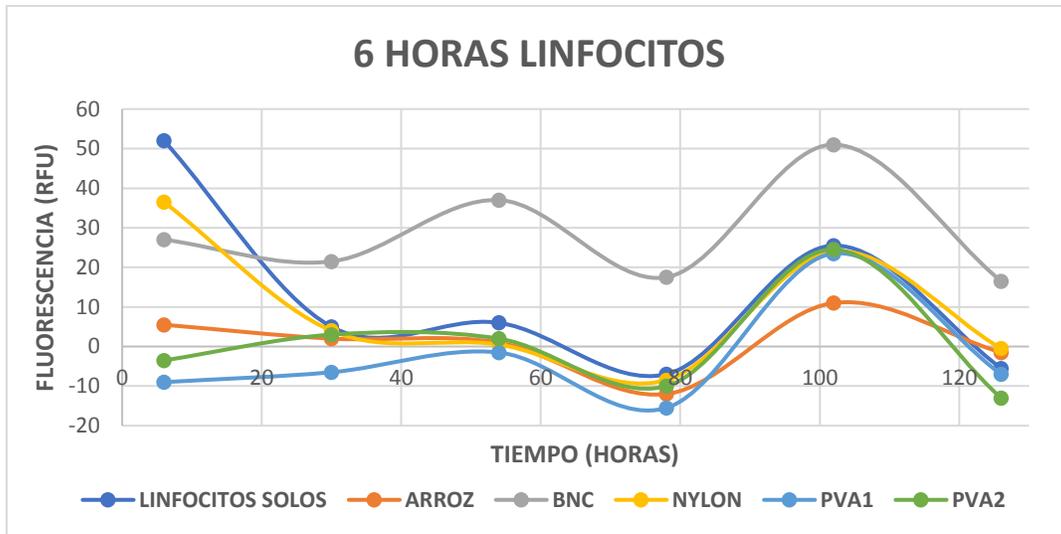


Figura 58. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de seis horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

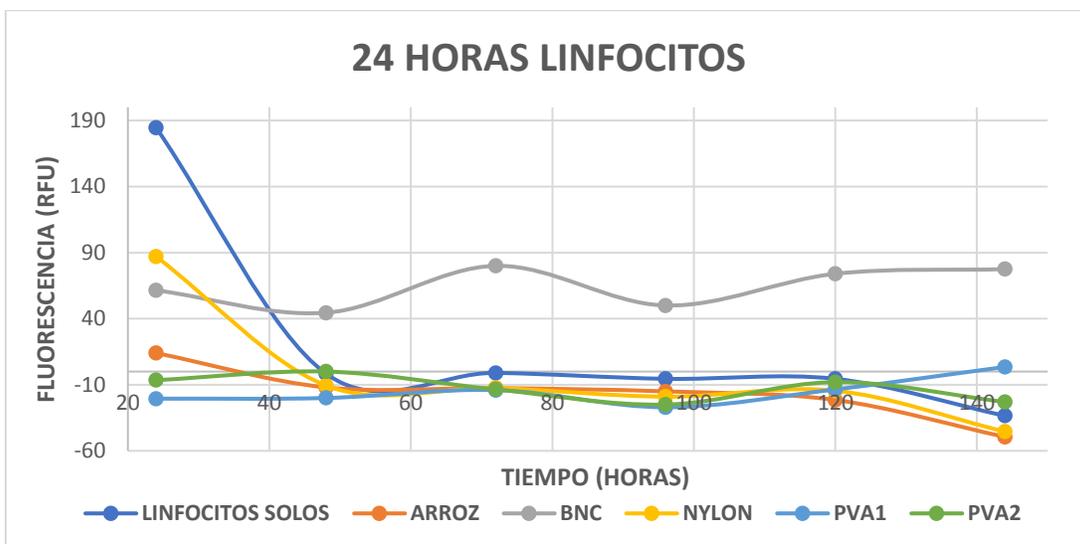


Figura 59. Gráfica de valores de fluorescencia en el tiempo, después de 24 horas de incubación con resazurin, de linfocitos expuesta a diferentes tipos de nanofibras durante seis días.

En las figuras 57, 58 y 59 se observa que las curvas de linfocitos solos, Arroz, Nylon, PVA1 y PVA2 tienen comportamientos similares, pero entre estas la de mayor fluorescencia es la de linfocitos solos. Al igual que en el primer experimento de linfocitos se muestra que la exposición de linfocitos a la membrana de BNC parece estimular su proliferación a lo largo de los seis días pues es la que mayor fluorescencia presenta, incluso por encima de los linfocitos solos.

Con el fin de determinar el porcentaje de sobrevivencia de los linfocitos tras exponerlos a las nanofibras, se muestra a continuación la gráfica obtenidas a las 24 horas de los seis días del experimento. (Ver figura 60).

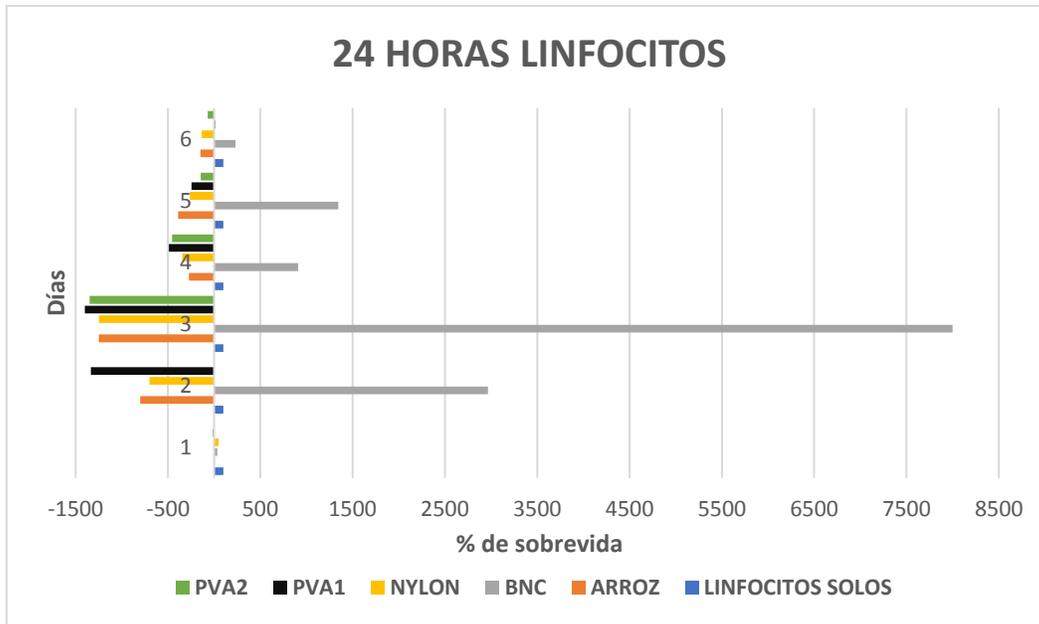


Figura 60. Gráfica porcentaje de sobrevivida 24 horas linfocitos segundo experimento de citotoxicidad.

Se tomaron como 100% los linfocitos sin tratamiento para cada uno de los días. En el caso de los linfocitos se observa un comportamiento totalmente distinto a las líneas celulares cancerígenas, en este caso se tiene que la membrana de BNC aumenta el porcentaje de sobrevivida promedio aproximadamente un 2000 % y al tercer día un 8000 %.

Se observa en la gráfica valores negativos de porcentaje, esto ocurre debido a que a cada tratamiento se le resta el valor del resazurin diario, este al tener valores de fluorescencia mayores a los valores de fluorescencia obtenidos con los tratamientos en los linfocitos; exceptuando BNC, resulta en valores negativos.

7. DISCUSIÓN

Se lograron fabricar las nanofibras mediante la técnica de electrospinning, fue un método sencillo y práctico.

Con la curva de proliferación de M8 se logró plantear que la cantidad de células adecuada para la realización de experimentos de varios días, en las placas de 96 pozos, es aproximadamente entre 20.000 y 25.000. Es una cantidad mayor a la estandarizada el semestre pasado para las otras líneas cancerígenas, debido a que el tamaño de M8 es menor a BT474 y MCF-7. Sin embargo, en este proyecto se trabajó con una misma cantidad de células (15.000) en todos los experimentos, para poder comparar los resultados entre líneas celulares.

En cuanto a los resultados de fluorescencia cabe resaltar que las líneas cancerígenas alcanzan niveles más altos en comparación con los linfocitos, esto se debe a que las células tumorales crecen adheridas al fondo de los pozos mientras que los linfocitos se encuentran en suspensión; por lo que, al realizar la lectura en el Cytation por la base, es más sencillo adquirir la señal que emiten las células que crecen adheridas a esta, siendo esta más fuerte.

En principio la membrana de PVA no debería ser tóxica para las células sin embargo al ser hidrosoluble no es adecuada como sistema de liberación de fármacos, por tal motivo se fabricó una nanofibra de PVA reticulada con romero para disminuir la hidrosolubilidad que esta presenta, al asumir que se generaron enlaces de hidrógeno entre los polifenoles del romero y el PVA haciendo que la estructura de la nanofibra sea más rígida, no obstante al agregar este ingrediente la nanofibra cambia el comportamiento que presentan las células, provocando que sea tóxica tanto para las líneas celulares cancerígenas como para los linfocitos; por lo que se descarta por completo esta membrana.

Por otra parte, el comportamiento que presentan las células frente a la exposición de la membrana de nylon lleva a la conclusión de que esta no es tóxica, sin embargo, al no ser biodegradable no es posible su utilización en el campo de liberación de medicamentos. De igual forma cuando existe una prolongada exposición de las células a la nanofibra de nylon, esta termina matando las células.

En cuanto a la membrana de PCL se considera la membrana más apropiada, ya que por sí sola no muestra ser citotóxica, al contrario, pareciera que estimula la proliferación celular, y cuando tiene el medicamento tamoxifén, se observa una efectividad bastante alta para inducir la muerte en las líneas celulares, reduciendo el porcentaje de supervivencia de las células cancerígenas a un 15% aproximadamente. Esta nanofibra ya había sido evaluada el semestre pasado en los linfocitos.

Se puede llegar a pensar que los distintos comportamientos de las células frente a las nanofibras se deben a los distintos perfiles moleculares que cada una de las líneas cancerígenas presentan, en los resultados del primer experimento se observa que PCL + tamoxifén perjudica más la proliferación de las líneas BT474 y MCF-7 las cuales poseen receptores de estrógeno positivo, mientras que la línea M8 (MDA-MB469) se ve afectada en su mayoría por BNC, esta línea celular a diferencia de las otras dos posee receptores de estrógeno negativos; por lo que al no responder al estrógeno para su proliferación, el tamoxifén no actúa como ligando de los receptores, porque no los posee.

Se evidencia que, entre los datos obtenidos, se destaca BNC. En todas las pruebas de fluorescencia realizadas en las líneas celulares cancerígenas, el comportamiento que predominó en las mismas fue disminución de fluorescencia. Este comportamiento puede ser interpretado como muerte celular, por lo tanto, se podría pensar que las nanofibras de BNC son citotóxicas para las líneas celulares cancerígenas en cuestión.

Por otro lado, el comportamiento que presentaron los linfocitos frente a la presencia de BNC fue completamente opuesta al comportamiento observado en las líneas de células cancerígenas, hubo un aumento de fluorescencia. Esto puede significar que las nanofibras de BNC están estimulando a los linfocitos, ya sea a su proliferación, o a un aumento en su actividad metabólica.

En el artículo de Stanisławska et al 2016 [37] resaltan que la nanocelulosa bacteriana posee propiedades en las que se destaca la no toxicidad, biocompatibilidad, hipoadalergenidad y biofuncionalidad, también mencionan el amplio uso de este compuesto en campos como la industria alimenticia, tecnológica, electrónica; sin embargo, se considera que hay gran esperanza para emplearla en la medicina. Hasta el momento ha sido utilizada en implantes bioactivos de cartilago, prototipos de vasos sanguíneos en forma de tubos e implantes quirúrgicos como válvulas artificiales del corazón.

Teniendo en cuenta lo anterior y trayendo a consideración los resultados obtenidos con BNC en el presente proyecto; se considera que es un material que con más estudios y otras pruebas se podría evaluar a profundidad si la sola nanofibra podría actuar como tratamiento contra el cáncer, y sistema de liberación de medicamentos.

8. CONCLUSIONES

- Se logró elaborar las nanofibras de PVA y Nylon, no obstante, no fueron apropiadas, debido a que PVA se deshizo en el medio y Nylon no es biodegradable.
- La nanofibra más tóxica para las líneas celulares cancerígenas fue BNC, sin embargo, fue la menos tóxica para los linfocitos.
- La nanofibra menos tóxica para las tres líneas celulares cancerígenas fue PCL.
- Es de vital importancia que las nanofibras sean biodegradables, por tal motivo se descarta la membrana de Nylon.
- Dado los resultados de citotoxicidad, la nanofibra candidata para ser usada como sistema de liberación de medicamentos es PCL.
- Con los hallazgos encontrados del comportamiento de las células cancerígenas y no cancerígenas en estudio, bajo la exposición a la membrana de BNC; se concluye que, con más estudios y análisis, podría ser considerada candidata como un tratamiento contra el cáncer, sin ser tan invasivo y costoso en comparación a los tratamientos actuales.

9. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS.

Sintetizar nanofibras de otros polímeros y evaluar citotoxicidad; posteriormente adicionarles medicamentos anticancerígenos como el tamoxifén, y evaluar el comportamiento que presentan las células luego de su exposición a estas.

Evaluar a profundidad el efecto de la nanofibra de BNC dado los resultados obtenidos en el presente proyecto; pues parece ser una alternativa para el tratamiento del cáncer sin que se vean afectadas las células no cancerígenas.

REFERENCIAS

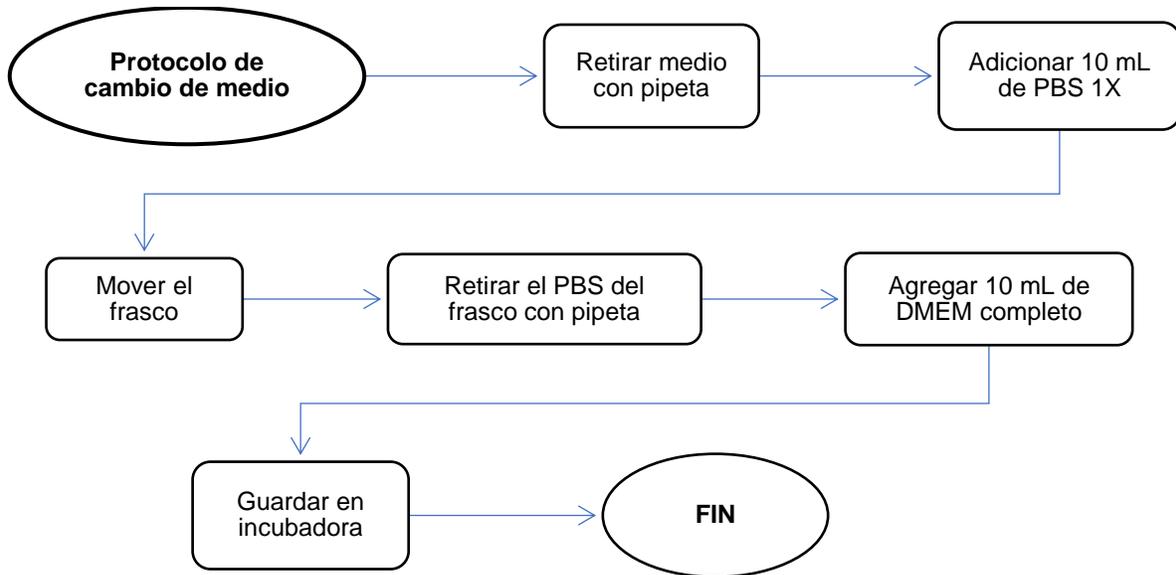
- [1] Y. Rojas Aguirre, K. Aguado Castrejón y I. González Méndez, «La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la revolución de la terapia contra el cáncer?,» *Science Direct*, vol. 27, nº 4, pp. 286-291, 2016.
- [2] Instituto Nacional de Salud, «informe de evento cáncer de mama y cuello uterino.,» Colombia., 2018.
- [3] L. M. Duque Sánchez, L. Rodríguez y M. López, «electrospinning: la era de las nanofibras,» *Revista Iberoamericana de Polímeros Duque et al*, vol. 14, nº 1, pp. 10-27, 2013.
- [4] «El cáncer de mama en cifras,» *El Tiempo*, 19 Octubre 2018.
- [5] Instituto Nacional del Cáncer, «Instituto Nacional del Cáncer,» 9 Febrero 2015. [En línea]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>. [Último acceso: 25 Enero 2019].
- [6] H. L. .. P. D. R. C. M. D. .. P. D. C. J. J. .. P. D. & A. R. P. D. Hosick, «Cancer.,» *Magill's Medical Guide (Online Edition)*., 2019.
- [7] E. M. Interactivo, «El Médico Interactivo,» 24 Septiembre 2018. [En línea]. Available: <http://elmedicointeractivo.com/la-oms-estima-que-en-2018-se-superaran-los-18-millones-de-casos-nuevos-de-cancer-y-96-millones-falleceran-por-cancer/>. [Último acceso: 25 Enero 2019].
- [8] S. P. A. R. P. Crawford, «Breast cancer.,» *Magill's Medical Guide (Online Edition)*, 2018.
- [9] T.-F. L, «Implicaciones del estudio de inestabilidad del ciclo celular en la biología del cáncer.,» *Revista CENIC Ciencias Biologicas.*, vol. 45, nº 3, p. 200–209, 2014.
- [10] A. M. Gonzalez y J. S. Raisman, «Ciclo celular,» Abril 2001. [En línea]. Available: <http://biblioteca.org.ar/libros/hipertextos%20de%20biologia/ciclo.htm>. [Último acceso: 28 Abril 2019].
- [11] C. A. González, «Botanica,» [En línea]. Available: <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/DibulgGeneral/Divcelu/CicloCelular.htm>. [Último acceso: 28 Abril 2019].
- [12] Z. Gutiérrez, , S. Herrero Gámiz y E. Pérez Ca, «Factores moleculares pronósticos relacionados con el control del ciclo celular en el cáncer de mama. Situación actual,» *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*, vol. 36, nº 1, pp. 19-24, 2008.
- [13] «MCF-7 Cells,» [En línea]. Available: <http://www.mcf7.com/>. [Último acceso: 26 Enero 2019].
- [14] «Células MCF-7,» [En línea]. Available: <http://www.mcf7.com/>. [Último acceso: 28 Abril 2019].

- [15] H.-J. van Slooten, B. Bonsing, A. Hiller, G. Colbern, J. van Dierendonck, C. Cornelisse y H. Smith, «Outgrowth of BT-474 human breast cancer cells in immune-deficient mice: a new in vivo model for hormone-dependent breast cancer,» *British Journal of Cancer*, vol. 72, pp. 22-30, 1995.
- [16] «BT-474 (ATCC® HTB-20™),» [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-20.aspx#characteristics>. [Último acceso: 28 Abril 2019].
- [17] «MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™),» [En línea]. Available: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-132.aspx#characteristics>. [Último acceso: 06 05 2019].
- [18] «Eosinofilos,» 2019. [En línea]. Available: <https://www.eosinofilos.info/linfocitos-t/#>. [Último acceso: 09 05 2019].
- [19] R. Sheposh, *Lymphocyte*, Salem Press Encyclopedia of Health, 2017.
- [20] P. C. Caracciolo, P. R. Cortez Tornello, F. Buffa, F. Montini Ballarin, T. R. Cuadrado y G. A. Abraham, «Pequeñas fibras, grandes aplicaciones,» *Ciencia hoy*, vol. 21, nº 121, pp. 57-64, 2011.
- [21] E. Franco Medina, S. Delvasto Arjona, F. Zuluaga Corrales y V. Amigó Borrás, «morphological and mechanical response characterization of nanofiber aggregates of pva produced by electrospinning sol-gel process,» *DYNA*, vol. 80, nº 178, 2013.
- [22] X. C. Ning Zhu, «Biofabricación de andamios de tejido,» de *Avances en la ciencia de los biomateriales y aplicaciones biomédicas*.
- [23] C. Zhang, X. Yuan, L. Wu, Y. Han y J. Sheng, «Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats,» *European Polymer Journal*, vol. 41, nº 3, pp. 423-432, 2005.
- [24] A. López-Córdoba, G. R. Castro y S. Goyanes, «A simple green route to obtain poly(vinyl alcohol) electrospun mats with improved water stability for use as potential carriers of drugs,» *Materials Science and Engineering*, vol. 69, pp. 726-732, 2016.
- [25] S. Estevez-Areco, L. Guz, R. Candal y S. Goyanes, «Release kinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) polyphenols from polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibers in several food simulants,» *Food Packaging and Shelf Life*, vol. 18, pp. 42-50, 2018.
- [26] Á. P. Sánchez Cepeda, R. Vera-Graziano, E. d. J. Muñoz-Prieto, E. Y. Gómez-Pachón, M. J. Bernad-Bernad y A. Maciel-Cerda, «Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina,» *Ciencia en Desarrollo*, vol. 7, nº 2, pp. 133-151, 2016.
- [27] G. K. G. K. a. M. M. Z. Sultanova, «Controlled Release of a Hydrophilic Drug from Coaxially Electrospun Polycaprolactone Nanofibers,» *International Journal of Pharmaceutics*, 2016.

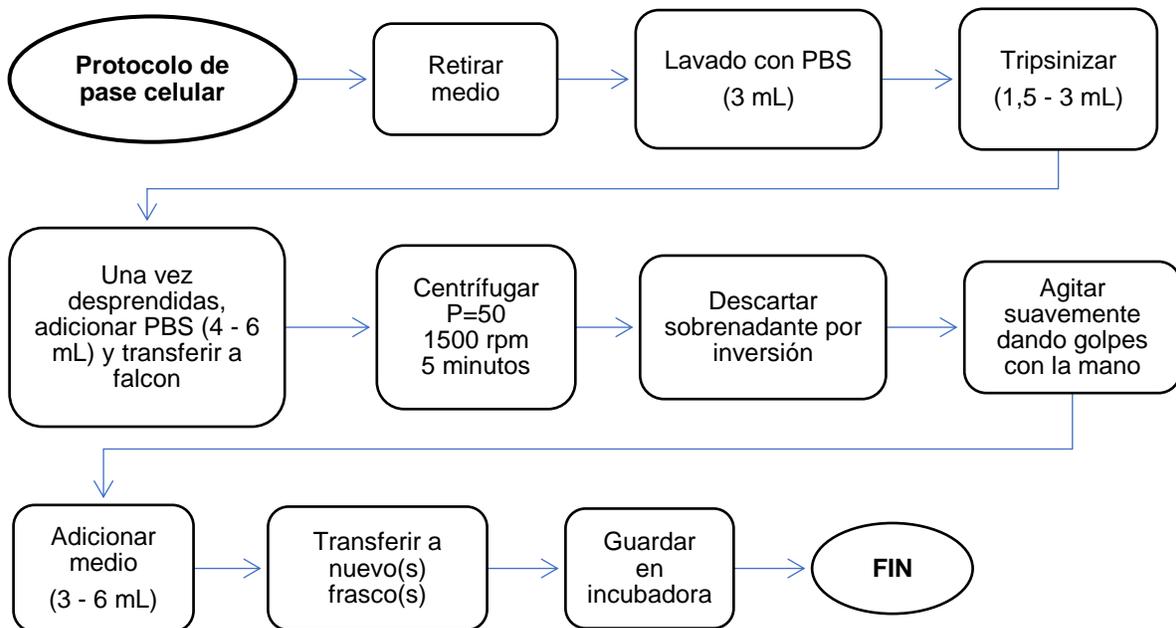
- [28] H. Raj Pant y C. Sang Kim, «Electrospun gelatin/nylon-6 compositen nanofibers for biomedical applications,» *Wiley Online Library*, vol. 62, p. 1008–1013, 2012.
- [29] G. Ishikawa y T. Kondo, «Thermodynamic effect on interaction between crystalline phases in size-controlled ACC-bacterial nanocellulose and poly(vinyl alcohol),» *Cellulose*, vol. 24, nº 12, p. 5495–5503, 2017.
- [30] A. F. O. Larrota, «obtención de nanofibras de celulosa cationica a partir del bagazo de la caña de azúcar y teñidas con colorante reactivo anionico para la aplicación textil,» Tunja, Colombia, 2015.
- [31] EFE, «Japón investigará aplicaciones industriales para la nanofibra de celulosa,» *El espectador*, 21 Agosto 2015.
- [32] «Papelera nipona construirá la mayor planta de nanofibra de celulosa del mundo,» *La vanguardia*, 18 Mayo 2016.
- [33] A. Meera Moydeen, M. Syed Ali Padusha, E. F. Aboelfetoh, S. S. Al-Deyab y M. H. El-Newehy, «Fabrication of electrospun poly(vinyl alcohol)/dextran nanofibers via emulsion process as drug delivery system: Kinetics and in vitro release study,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 116, pp. 1250-1259, 2018.
- [34] L. m. Escobar M y F. A. Aristizábal G, «Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales,» *Revista de la facultad de química farmacéutica*, vol. 17, nº 2, pp. 173-180, 2010.
- [35] «Biotium: Glowing products for science.,» 2019. [En línea]. Available: <https://biotium.com/product/resazurin-cell-viability-assay-kit/>. [Último acceso: 26 Enero 2019].
- [36] Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología Universidad del País Vasco, «Recursos de microbiologia,» [En línea]. Available: http://insilico.ehu.eus/camara_recuento/. [Último acceso: 28 Abril 2019].
- [37] A. Stanisławska, «Bacterial Nanocellulose as a Microbiological Derived Nanomaterial,» *Advances in Materials Science*, vol. 16, nº 4, p. 45–57, 2016.
- [38] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre y A. Jemal, «Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,» *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68, nº 6, pp. 394-424, 2018.

ANEXOS

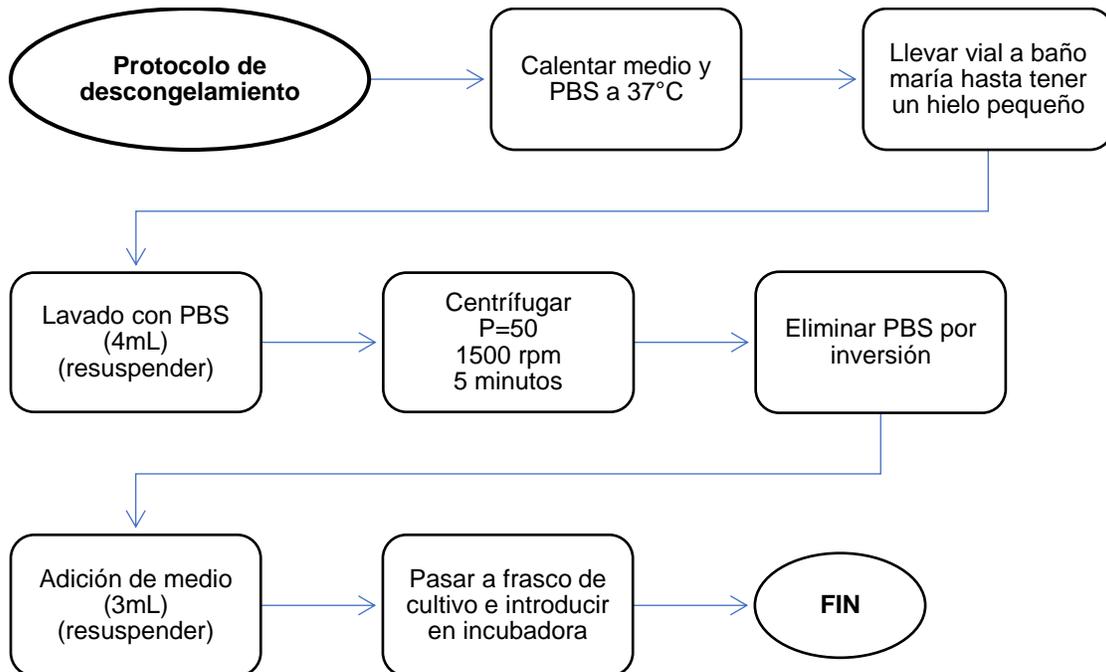
Anexo 1. Protocolo cambio de medio.



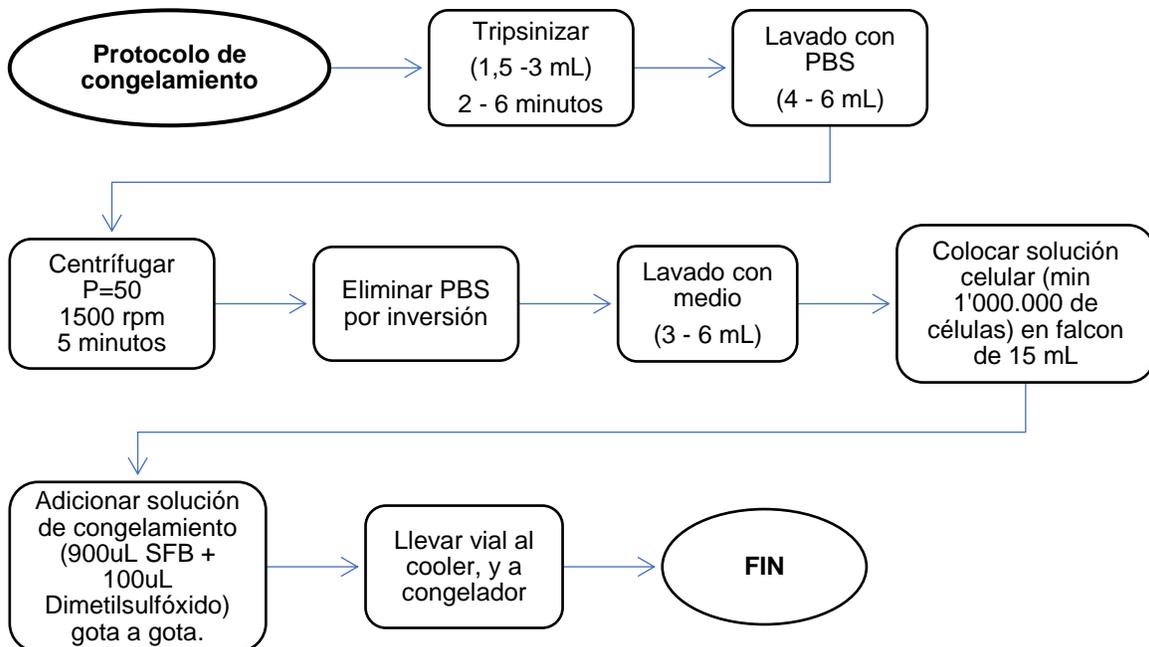
Anexo 2. Protocolo cambio de pase.



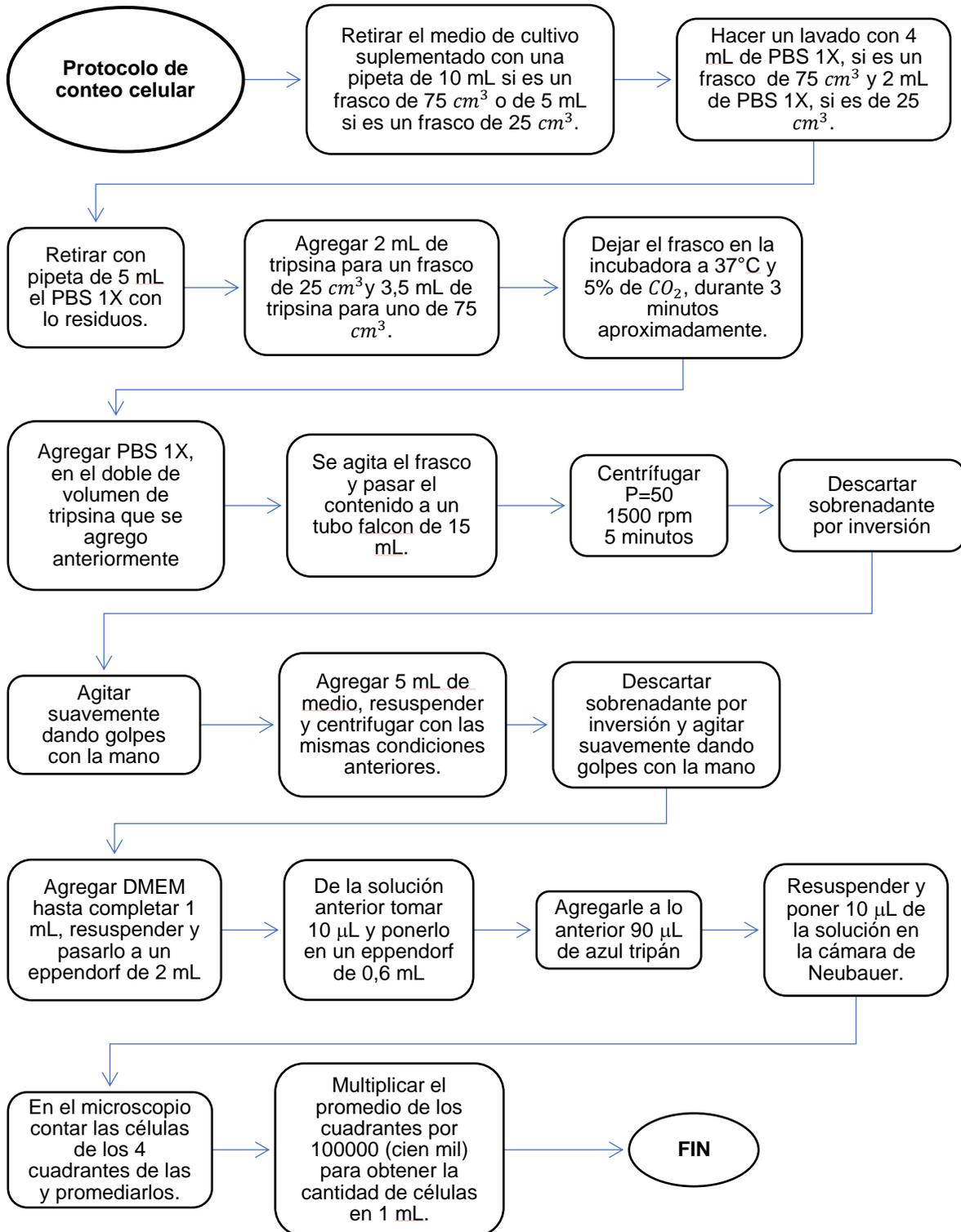
Anexo 3. Protocolo descongelamiento.



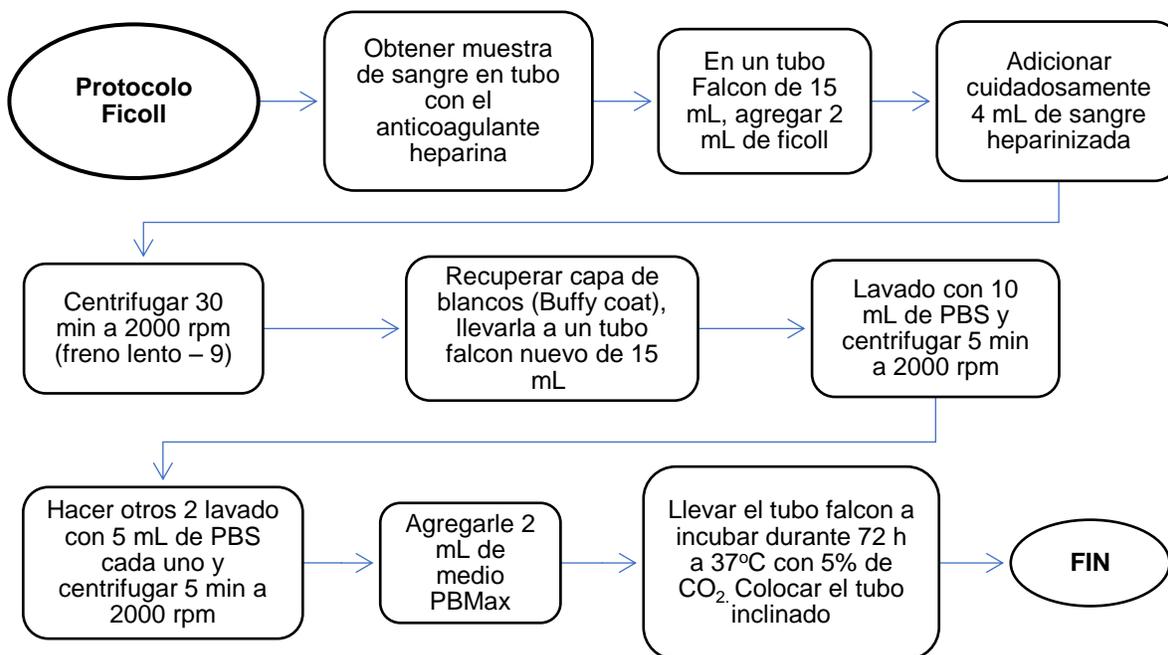
Anexo 4. Protocolo congelamiento.



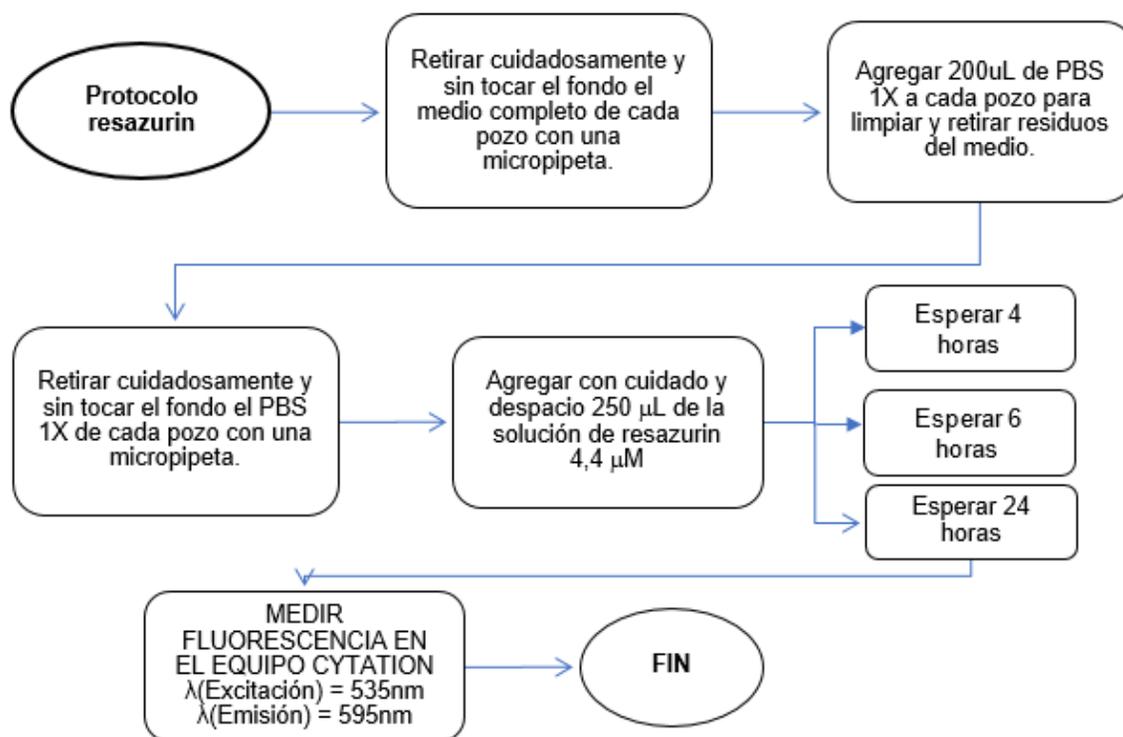
Anexo 5. Protocolo de conteo celular.



Anexo 6. Protocolo de ficoll.



Anexo 7. Protocolo de resazurin.



Anexo 8. Protocolo tinción de Wright.

