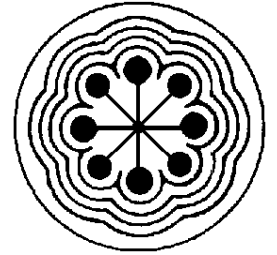




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES NUCLEARES



ININ

FACULTAD DE MEDICINA

**Evaluación de las propiedades
teranósticas de nanopartículas de
oro de 5 nm para tratamiento de
cáncer**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FÍSICA MÉDICA

PRESENTA

Fís. Juan Carlos Cruz Rodríguez



Comité de Tutores: Dra. en C. Keila Isaac Olivé
Dr. en C. Eugenio Torres García
Dr. en C. Miguel Ángel Camacho López

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

2022

Este trabajo se llevó a cabo en Laboratorio de Investigación en Teranóstica, Laboratorio de Fotomedicina, Biofotónica y Espectroscopía Láser de Pulsos Ultracortos, Laboratorio de Dosimetría y Simulación Monte Carlo, todos de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México y Laboratorio Nacional de Investigación en Radiofármacos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

Índice

Agradecimientos.....	3
Resumen	8
Abstract	10
Abreviaturas	12
Índice de figuras	13
Índice de tablas.....	15
Capítulo 1. Introducción	16
1.1. Introducción.....	16
Capítulo 2. Estado del arte	18
2.1. Antecedentes.....	18
2.1.1. Nanopartículas de oro como agentes de imagen	19
2.1.2. Nanopartículas de oro como agentes de terapia	19
2.2. Planteamiento del problema	21
2.3. Pregunta de investigación.....	21
2.4. Hipótesis	21
2.5. Objetivos.....	22
2.4.1. Objetivo general	22
2.4.2. Objetivos específicos.....	22
Capítulo 3. Marco teórico	23
3.1. Interacción de la radiación con la materia	23
3.2. Interacción de las AuNP con la luz	25
3.2.1. Extinción de la luz.....	25
3.2.2. Producción de calor.....	26
3.2.3. Producción de ROS	26
3.2.4. Detección de la producción de ROS	29
3.2.5. Mecanismo de muerte celular	30
Capítulo 4. Metodología	31
4.1. Reactivos y equipos	31
4.1.1. Reactivos y células	31
4.1.2. Equipamiento	31
4.2. Metodología.....	32
4.3.1. Irradiación con láser	32

4.3.2.	Irradiación de Rx generados por una diferencia de potencial de 6 MV	33
4.3.3.	Incremento de temperatura.....	34
4.3.4.	Evaluación de las AuNP como agentes de imagen	35
4.3.5.	Viabilidad de células T47D tratadas con AuNP e irradiadas con láser de 532 nm y 1064 nm.....	35
4.3.6.	Análisis estadístico.....	36
Capítulo 5.	Resultados y discusión	37
5.1.	Determinación de producción de especies reactivas de oxígeno.....	37
5.1.1.	Irradiación bajo luz láser de 532 nm	37
5.1.2.	Irradiación bajo luz láser de 1064 nm	44
5.1.3.	Irradiación bajo rayos X generados por una diferencia de potencial de 6 MV	48
5.2.	Incremento de temperatura	52
5.3.	Evaluación de las AuNP como agentes de imagen.....	56
5.4.	Evaluación in vitro de la citotoxicidad provocada en células T47D tratadas con AuNP e irradiación con láser	58
Capítulo 6.	Conclusiones y trabajo futuro	62
Capítulo 7.	Referencias bibliográficas	63
Anexos.....		75
Anexo A.	Artículo de investigación producto del trabajo de tesis.....	75
Anexo B.	Participación en congresos referentes al trabajo de tesis	77

Resumen

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Aunque existen diferentes opciones terapéuticas constantemente se desarrollan tratamientos alternativos más eficaces y menos tóxicos que complementen o sustituyan los existentes. Uno de los enfoques actuales en el tratamiento del cáncer es la llamada medicina personalizada, que utiliza información específica tanto del tumor como del paciente para facilitar el diagnóstico, planificar el tratamiento y determinar su eficacia. Con este propósito resultan de suma importancia los sistemas combinados terapia-imagen, denominados teranósticos.

Entre las terapias actuales contra el cáncer resultan de interés la terapia fototérmica (PTT) y la terapia fotodinámica (PDT). En la PTT se genera calor en la zona tumoral, mientras que en la PDT se producen especies reactivas de oxígeno (ROS). Ambos resultados son letales para las células. Para ello, se dirigen agentes fototérmicos (PT) o fotosensibles (PS) al sitio de interés y posteriormente se irradia con luz láser de apropiada longitud de onda o con rayos X (Rx). Las nanopartículas de oro (NP Au) muestran al unísono propiedades fototérmicas y fotosensibles debido a la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) por lo que tienen un gran potencial para la PTT y la PDT. Las propiedades fisicoquímicas y optoelectrónicas de las NP Au dependen de su tamaño, forma, composición y concentración por lo que sus ventajas como PT o PS dependen, en gran medida, de las condiciones experimentales específicas.

En este trabajo se evalúa si la irradiación de NP Au esféricas de 5 nm con luz láser (532 nm y 1064 nm) y con Rx produce suficiente cantidad de ROS y de calor para el diseño posterior de sistemas teranósticos. Se irradiaron NP Au con luz láser de 532 nm, que es una longitud de onda cercana a la banda de absorción del LSPR. Sin embargo, debido a que el tejido humano absorbe gran parte de esta longitud de onda, su uso clínico es limitado, por lo que también se irradió a 1064 nm longitud de onda que se absorbe menos por el tejido. El efecto multifotónico a 1064 nm puede ser el mismo que el monofotónico a 532 nm. Al irradiar las NP Au a ambas longitudes de onda se observó producción de ROS y aumento de temperatura (T) en el medio. Estos resultados permiten concluir que las NP Au esféricas de 5 nm son agentes potenciales para impartir, de manera simultánea, PTT y PDT, mediante irradiación con luz láser de 532 y 1064

nm. Se experimentó también la producción de ROS al irradiar con Rx generados por una diferencia de potencial de 6 MV. En este caso no se obtuvieron los resultados esperados. La irradiación con Rx en las condiciones experimentales utilizadas no demostró que puedan utilizarse estas NP como agentes para PDT. Sin embargo, la irradiación de suspensiones de diferente concentración de NP Au con Rx de uso diagnóstico mostró un aumento de la atenuación de los Rx directamente proporcional a la concentración de NP, lo que confirma el potencial uso de estas nanoestructuras como agentes de imagen.

Se concluye que las NP Au esféricas de 5 nm tienen capacidad como agentes terapéuticos oncológicos ya que producen calor y ROS cuando se irradian con luz de apropiada longitud de onda. Sus cualidades como agentes de imagen, posibilitan el desarrollo futuro de sistemas teranósticos terapia-imagen.

Abstract

Cancer is one of the main health problems worldwide. Although there are different therapeutic options, more effective and less toxic alternative treatments are constantly being developed to complement or replace existing ones. One of the current approaches in cancer treatment is called personalized medicine, which uses specific information from both the tumor and the patient to facilitate diagnosis, plan treatment and determine its effectiveness. For this purpose, combined therapy-image systems, called theranostics, are extremely important.

Among the current cancer therapies, photothermal therapy (PTT) and photodynamic therapy (PDT) are of interest. In PTT, heat is generated in the tumor area, while in PDT, reactive oxygen species (ROS) are produced. Both outcomes are lethal to cells. To do this, photothermal (PT) or photosensitive (PS) agents are directed at the site of interest and then it is irradiated with laser light of the appropriate wavelength or with X-rays (Rx). Gold nanoparticles (NP Au) show both photothermal and photosensitive properties due to localized surface plasmon resonance (LSPR) and therefore have great potential for PTT and PDT. The physicochemical and optoelectronic properties of NP Au depend on their size, shape, composition, and concentration, so their advantages as PT or PS depend, to a large extent, on the specific experimental conditions.

In this work, it is evaluated if the irradiation of 5 nm spherical Au NPs with laser light (532 nm and 1064 nm) and with Rx produces enough ROS and heat for the subsequent design of theranostic systems. Au NPs were irradiated with 532 nm laser light, which is a wavelength close to the absorption band of the LSPR. However, because much of this wavelength is absorbed by human tissue, its clinical use is limited, so it was also irradiated at 1064 nm, a wavelength that is less absorbed by tissue. The multiphoton effect at 1064 nm can be the same as the single photon effect at 532 nm. When irradiating the Au NPs at both wavelengths, ROS production and temperature increase (T) were observed in the medium. These results allow us to conclude that 5 nm spherical Au NPs are potential agents for simultaneously imparting PTT and PDT by irradiation with 532 and 1064 nm laser light. The production of ROS was also experimented upon irradiation with Rx generated by a potential difference of 6 MV. In this case, the expected results were not obtained. Rx irradiation under the experimental conditions used did not show

that these NPs can be used as agents for PDT. However, the irradiation of suspensions of different concentrations of NP Au with Rx for diagnostic use showed an increase in the attenuation of the Rx directly proportional to the concentration of NP, which confirms the potential use of these nanostructures as imaging agents.

It is concluded that 5 nm spherical Au NPs have the capacity as oncological therapeutic agents since they produce heat and ROS when irradiated with light of the appropriate wavelength. Their qualities as imaging agents enable the future development of theranostic therapy-image systems.

Abreviaturas

AuNP	Nanopartículas de oro “desnudas” estabilizadas en citrato
AuNPf	Nanopartículas de oro funcionalizadas con dodecanotiol
CT	Tomografía computarizada
IR	Infrarrojo
ISC	Cruce entre sistemas
LSPR	Resonancia de plasmón de superficie localizada
NIR	Infrarrojo cercano
NP	Nanopartículas
NP Au	Nanopartículas de oro (genéricas)
PDT	Terapia fotodinámica
PS	Agente fotosensible
PT	Agente fototérmico
PTT	Terapia fototérmica
PPTT	Terapia fototérmica plasmónica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rx	Rayos X
S	Estado singlete excitado
T	Temperatura

Índice de figuras

Figura 3.1. Diagrama de Jablonski para los estados excitados de un PS en PDT. Imagen tomada de: https://trends.directindustry.es/list/edinburgh-instruments-25178.html	27
Figura 4.1. Diagrama del proceso de irradiación y registro del espectro de absorción UV-Vis de cada una de las soluciones.	33
Figura 4.2. Diagrama del proceso de irradiación con fotones generados por una diferencia de potencial de 6 MV.	34
Figura 4.3. Diagrama del proceso de registro de temperatura durante la irradiación de las soluciones AuNP y AuNPf.	35
Figura 5.1. Espectros de absorción de las soluciones AuNP y AuNPf, así como de los indicadores ABMA y DCPIP en medio acuoso y en DMSO, a diferentes tiempos de irradiación bajo luz láser de 532 nm.....	38
Figura 5.2. Espectros de absorción de las soluciones AuNP y AuNPf en presencia de los indicadores ABMA y DCPIP, a diferentes tiempos de irradiación bajo luz láser de 532 nm.	42
Figura 5.3. Espectros de absorción de las soluciones AuNP y AuNPf, así como de los indicadores ABMA y DCPIP en medio acuoso y en DMSO a diferentes tiempos de irradiación bajo luz láser de 1064 nm.....	45
Figura 5.4. Espectros de absorción de las soluciones AuNP en presencia de los indicadores ABMA y DCPIP, a diferentes tiempos de irradiación bajo luz láser de 1064 nm.	47
Figura 5.5. Espectros de absorción de las soluciones de ABMA y DCPIP en ausencia y presencia de AuNP al ser irradiadas con diferentes dosis de Rx de 6MV.	50
Figura 5.6. Gráfica de temperatura vs tiempo de irradiación bajo luz láser de 532 nm de AuNP y AuNPf.....	53
Figura 5.7. Irradiación de células T47D a 532 nm y 1064 nm en ausencia y presencia de AuNP de 5 nm. Se muestra también la irradiación en presencia de liposomas cargados con siRNA de RAD51, utilizado para inhibir la reparación del ADN celular y en presencia de SIRT3 utilizado	

para inhibir la reparación celular causada por ROS. Se muestra también la toxicidad de los sistemas en ausencia de radiación con y sin presencia de AuNP.60

Índice de tablas

Tabla 4.1. Especificaciones de las soluciones irradiadas con luz láser.....	32
Tabla 4.2. Especificaciones de las soluciones irradiadas con fotones generados por una diferencia de potencial de 6 MV.	33
Tabla 5.1. Intensidad de rayos X al atravesar suspensiones con distintas concentraciones de AuNP.....	58

Capítulo 1. Introducción

1.1. Introducción

El aumento creciente de la incidencia del cáncer obliga a la búsqueda de nuevos tratamientos que incrementen la efectividad y disminuyan la toxicidad de los existentes. Una estrategia actual para el tratamiento del cáncer es la llamada medicina personalizada que, a diferencia de la medicina convencional, adapta el tratamiento médico en función del tipo de tumor y las singularidades de cada paciente con el objetivo de obtener mayor eficacia terapéutica (Meiliana, Dewi and Wijaya, 2016).

Los sistemas teranósticos (sistemas terapia-imagen) combinan en una sola formulación propiedades diagnósticas y terapéuticas. Al impartir terapia guiada por imagen se puede supervisar en tiempo real la respuesta terapéutica, disminuir los efectos adversos y mejorar la supervivencia de los pacientes. Debido a la gran disponibilidad de medios de administración de fármacos que existen, los sistemas teranósticos tienen un gran potencial en la medicina personalizada (Hapurachchige and Artemov 2020).

Las nanopartículas de oro (NP Au) poseen propiedades convenientes para las aplicaciones médicas. Absorben intensamente la luz y los rayos X (Rx); sus máximos de absorción se pueden ajustar a voluntad durante el proceso de síntesis; pueden convertir con eficiencia en calor la luz que absorben, dispersar la luz, mejorar los espectros Raman de moléculas cercanas a su superficie, producir fluorescencia, fenómenos todos útiles para la terapia y la formación de imágenes (Chen, Li and Wang, 2014; Chhour *et al.*, 2016; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Bai *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020; Sarfraz and Khan 2021; George *et al.*, 2022). A esto se añade que tienen alta afinidad por los tioles, disulfuros y aminas por lo que se pueden funcionalizar con moléculas biológicamente activas y utilizar como sistemas transportadores de drogas (Chen, Li and Wang, 2014; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Bai *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Seaberg *et al.*, 2021; George *et al.*, 2022). Son biocompatibles y de baja toxicidad (Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Sani, Cao and Cui, 2021; Seaberg *et al.*, 2021).

Las propiedades fisicoquímicas y la fisiología de las NP Au dependen significativamente de la banda de resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) (Chhour *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2016; Amendola *et al.*, 2017; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Guerrero-Flores *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Sarfraz and Khan 2021; Seaberg *et al.*, 2021). Este fenómeno vibratorio, típico de los plasmas, se produce en superficies metálicas cuyo interior se asemeja a un “plasma sólido”. Las NP Au manifiestan el LSPR en función de su forma y tamaño (Chhour *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2016; Amendola *et al.*, 2017; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Hu *et al.*, 2020; Sarfraz and Khan 2021; Seaberg *et al.*, 2021). Se han desarrollado diversas rutas sintéticas que permiten controlar la forma y el tamaño de las NP Au para lograr propiedades ópticas específicas en función del LSPR. Así, es posible obtener esferas, varillas, jaulas, conchas, estrellas, cubos, platos y otras formas (Chhour *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Liu *et al.*, 2021; Sarfraz and Khan 2021; Seaberg *et al.*, 2021;) de acuerdo con la aplicación deseada. La posibilidad de acoplarlas con diferentes tipos de ligandos biológicamente activos, ácidos nucleicos, péptidos, anticuerpos, así como de poderlas recubrir con polímeros y lipoproteínas brinda una gran versatilidad para aplicaciones biomédicas (Chen, Li and Wang, 2014; Chhour *et al.*, 2016; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Bai *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Seaberg *et al.*, 2021; George *et al.*, 2022).

Las propiedades de las NP Au para aplicación en imagen se han investigado ampliamente (Chen, Li and Wang, 2014; Yao *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020). En menor medida se han evaluado sus propiedades como fotosensibilizadores (PS) aunque publicaciones recientes demuestran un creciente interés en ellas (Yang *et al.*, 2018; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020; Li, Yang and Sun, 2021). El presente trabajo de tesis está dirigido a estudiar la producción de ROS y el incremento de temperatura (T) en el medio que provocan NP Au “desnudas” (AuNP) y funcionalizadas con dodecanotiol (AuNPf) utilizando como fuente de luz un láser de 532 nm y 1064 nm. Se evalúa también la posible producción de ROS al irradiar con Rx de 6 MV y su posible aplicación como agentes de imagen con el objetivo de diseñar un sistema teranóstico multimodal *terapia fotodinámica-terapia fototérmica plasmónica-imagen por Rx* basado en estas NP para su futura aplicación en la terapia personalizada del cáncer.

Capítulo 2. Estado del arte

2.1. Antecedentes

Las NP Au son pequeñas nanoestructuras de oro de diferente forma dispersadas en agua u otro medio en las que al menos una de sus dimensiones está entre 1 y 100 nm (Chen, Li and Wang, 2014; Abdollahi *et al.*, 2021; Sani, Cao and Cui, 2021). Poseen propiedades ópticas que no se manifiestan a otras escalas y que son de gran utilidad en el diagnóstico y la terapia (Chen, Li and Wang, 2014; Chhour *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Bai *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Seaberg *et al.* 2021).

Una de las propiedades más importantes de las NP Au es la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR), fenómeno que, al igual que en los plasmas, se produce en la superficie de nanoestructuras metálicas debido a que los electrones de conducción oscilan colectivamente bajo la estimulación de luz llegando a producir un acoplamiento entre las frecuencias del fotón incidente y la oscilación de los electrones en el metal (Chen, Li and Wang, 2014; Yao *et al.*, 2016; Amendola *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Bai *et al.*, 2020; Sarfraz and Khan 2021; Seaberg *et al.*, 2021). Cuando ocurre la LSPR, los campos electromagnéticos cerca de la superficie de la NP se pueden cambiar para mejorar las señales espectrales de las sustancias cercanas (Amendola *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2020). También se puede maximizar la extinción óptica, lo que mejora la eficiencia de conversión fototérmica, fotoquímica y la absorción de energía luminosa, cualidades que posibilitan su aplicación en diagnóstico y terapia (Yang *et al.*, 2018; Bai *et al.*, 2020; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020).

Debido al alto número atómico del oro las NP Au absorben intensamente los Rx, propiedad de gran utilidad en diagnóstico (Chen, Li and Wang, 2014; Cole *et al.*, 2015; Mahan and Doiron, 2018; Bai *et al.*, 2020). Por otro lado, su fácil funcionalización con ligandos que contienen grupos funcionales como tioles (-SH), fosfinas (-PH₃) y aminas (-NH₂), con alta afinidad por el Au, posibilita su acople a ligandos y biomoléculas para su traslado hacia los tejidos diana (Chen, Li and Wang, 2014; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Bai *et al.*, 2020). Un ejemplo interesante es el uso de las NP Au en PDT para transportar agentes fotosensibles (PS) hacia las células

tumorales para mejorar la eficacia de la PDT ya que actúan como catalizadores en las reacciones de fotosensibilización (Yao *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Li, Yang and Sun, 2021).

2.1.1. Nanopartículas de oro como agentes de imagen

La tomografía computarizada (CT) es una de las modalidades de imagen por Rx más utilizada en la actualidad debido a su alta resolución espacial y temporal, rapidez y bajo costo. La CT utiliza agentes de contraste para aumentar la nitidez de la imagen entre tejidos con similar o baja atenuación a los Rx, sin incrementar la dosis de radiación al paciente (Cole *et al.*, 2015; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Mahan and Doiron, 2018).

Entre los agentes de contraste más utilizados en la práctica clínica para imágenes de Rx están las suspensiones de bario y las moléculas yodadas (Cole *et al.*, 2015). Sin embargo, las NP Au constituyen también excelentes agentes de contraste (Cole *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Mahan and Doiron, 2018; Bai *et al.*, 2020; Oumano *et al.*, 2021) debido a que tienen un coeficiente de atenuación de Rx mayor al bario y al yodo para los niveles de energía que habitualmente se usan en imagen CT (Cole *et al.*, 2015; Oumano *et al.*, 2021).

Las NP Au como agentes de contraste se utilizaron por primera vez en un estudio en el que se administró por vía intravenosa NP Au de 1.9 nm a ratones portadores de carcinomas mamarios subcutáneos EMT-6, obteniéndose una mejor visualización del tumor, al tomar imágenes con una unidad de Rx de mamografía (Hainfeld, Slatkin and Smilowitz, 2004). A partir de entonces, se han publicado numerosos trabajos que evalúan sus propiedades como agentes de contraste (Cole *et al.*, 2015; Mahan and Doiron, 2018; Hu *et al.*, 2020). Entre los avances más recientes en el uso de las NP Au como agentes de contraste está la optimización de imágenes CT en un maniquí humano, donde se demuestra la superioridad de estas NP con respecto al yodo (Oumano *et al.*, 2021).

2.1.2. Nanopartículas de oro como agentes de terapia

La terapia fototérmica (PTT) es una terapia oncológica en la que se genera calor en la zona tumoral para inducir la muerte por necrosis o apoptosis. Consiste en dirigir un agente

fototérmico (PT) al sitio de interés y seguidamente irradiar con luz láser. La interacción entre el PT y la luz proveniente del láser genera calor. La PTT mejorada debido a la LSPR que presentan nanoestructuras metálicas como las NP Au se conoce como terapia fototérmica plasmónica (PPTT) (Huang and El-Sayed, 2011). En las últimas décadas el uso de las NP Au en la PPTT ha ido en aumento debido a sus propiedades optoelectrónicas y a la facilidad de acoplarles moléculas de diversa naturaleza que contribuyen a transportarlas y depositarlas de manera específica en las células tumorales (Jiménez-Mancilla *et al.*, 2013; Chen, Li and Wang, 2014; Yao *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2020; Guerrero-Florez *et al.*, 2020). En los primeros estudios se experimentó con nanocapas de oro *in vitro* (Hirsch *et al.*, 2003); posteriormente se emplearon nanoesferas de oro (Pitsillides *et al.*, 2003) y nanocapas de oro *in vivo* (O'Neal *et al.*, 2004). Las investigaciones posteriores se han dirigido a mejorar la eficiencia de la PPTT variando la forma y tamaño de las nanoestructuras, así como los métodos de transporte y entrega.

La terapia fotodinámica (PDT) al igual que la PTT es una terapia contra el cáncer que presenta ventajas en comparación con otras existentes. Consiste en hacer llegar un agente fotosensibilizador (PS) a la zona tumoral y luego excitarlo con una longitud de onda apropiada (de acuerdo con sus bandas de absorción), preferiblemente en presencia de oxígeno, para producir reacciones fotoquímicas con los sustratos celulares o con el oxígeno molecular (O₂). Estas reacciones fotoquímicas conducen a la formación de especies letales para las células (Chilakamarthi and Giribabu, 2017; Ferreira dos Santos *et al.*, 2019; Bai *et al.*, 2020; George *et al.*, 2022).

En estudios de PDT donde se utilizan las NP Au en complejos AuNP-PS para la transportación del PS hacia las células (Eshghi *et al.*, 2013; Pantiushenko *et al.*, 2015; Haimov *et al.*, 2018), se ha detectado que las NP Au catalizan la producción de ROS incrementando la eficacia de la PDT (Yang *et al.*, 2018; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Li, Yang and Sun, 2021). También son capaces de producir ROS, en particular ¹O₂ (Krpetic *et al.*, 2010; Pasparakis, 2013; Chadwick *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Liaw, Kuo and Tsai, 2021; Li, Yang and Sun, 2021) por lo que constituyen PS *per se*. Sin embargo, aunque las NP Au son capaces de producir ROS al ser irradiadas con luz UV y/o Rx (Misawa and Takahashi 2011; Pasparakis, 2013; Chang *et al.*,

2016) los resultados son contradictorios pues dependen del tamaño, la forma y la concentración de las NP, así como de las condiciones de irradiación.

2.2. Planteamiento del problema

El uso de las NP Au como agentes de contraste en imagenología de Rx, como radiosensibilizador en radioterapia y como agentes PT está bien documentado. En menor medida se ha evaluado su empleo en la PDT. Los resultados publicados sobre la producción de ROS al irradiar con láser, luz UV o Rx las NP Au son contradictorios, muestran una fuerte dependencia de las condiciones experimentales, en particular del tamaño, la forma, la concentración de NP y las condiciones de irradiación, por lo que no existen en la actualidad conclusiones unívocas acerca de sus bondades como PS. Las publicaciones más recientes permiten suponer que es posible desarrollar un sistema teranóstico multimodal para la terapia del cáncer, basado en NP Au, que pueda impartir terapia fototérmica plasmónica (PPTT) y/o PDT mediante la irradiación con luz láser de 532 nm, 1064 nm o con Rx del orden de MV, y que pueda monitorearse mediante imagen por Rx aprovechando sus excelentes propiedades como agentes de contraste.

2.3. Pregunta de investigación

¿Es posible preparar un sistema teranóstico multimodal PPTT/PDT a base de NP Au que permita visualizar por imagen de Rx su acumulación en células de cáncer?

2.4. Hipótesis

Al irradiar células tumorales en presencia de NP Au con luz láser de 532 nm, 1064 nm o Rx de 6 MV se podrá impartir PPTT y/o PDT y obtener al mismo tiempo la imagen por Rx del sitio de acumulación.

2.5. Objetivos

2.4.1. Objetivo general

Evaluar el uso potencial de NP Au esféricas de 5 nm para impartir terapia fototérmica plasmónica y terapia fotodinámica dirigidas a células tumorales, así como su posible uso como agentes de imagen por Rx.

2.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la producción de especies reactivas de oxígeno y el incremento de temperatura al irradiar NP Au esféricas de 5 nm en solución de PBS (pH 7.4) con láser de 532 nm y 1064 nm, y con Rx de 6 MV.
- Evaluar el potencial de las NP de Au esféricas de 5 nm como agentes de imagen.
- Comparar *in vitro* la citotoxicidad de las NP Au esféricas de 5 nm al irradiar células T47D de cáncer de mama con láser de 532 nm y 1064 nm en presencia y ausencia de éstas.

Capítulo 3. Marco teórico

3.1. Interacción de la radiación con la materia

Cuando fotones provenientes de Rx o rayos gamma ($R\gamma$) interactúan con la materia, el efecto que se produce depende de la energía de los fotones, así como de la estructura atómica de material (Attix, 1986; Al-Okour 2021). Existen cuatro interacciones de los Rx con la materia: efecto fotoeléctrico, dispersión coherente de Rayleigh, efecto Compton y producción de pares (Al-Okour 2021). Las tres primeras son importantes en el rango de energías del diagnóstico (hasta 150 keV), en tanto que la producción de pares es importante solo a altas energías.

En el *efecto fotoeléctrico* el fotón interactúa con un electrón de las capas K o L del átomo y le transfiere toda su energía, lo que provoca su expulsión; el electrón emitido se denomina fotoelectrón y se absorbe en la vecindad del átomo (Mahan and Doiron 2018; Al-Okour 2021). Este efecto se produce cuando la energía de los fotones es cercana a las energías de enlace de los electrones en el átomo (Attix 1986). La probabilidad de que ocurra está dada por la ecuación 3.1, donde k_f es una constante de proporcionalidad, Z el número atómico del medio, E la energía de los fotones, n y m tienen valores entre 3 y 5 (Attix, 1986). El efecto fotoeléctrico es muy importante cuando se utilizan NP Au como agentes de contraste ya que es la interacción más relevante a las energías de los Rx de diagnóstico (Mahan and Doiron, 2018; Bai *et al.*, 2020; Oumano *et al.*, 2021).

$$\tau \cong k_f \frac{Z^n}{E^m} \quad . \quad (3.1)$$

La *dispersión coherente de Rayleigh* ocurre cuando la energía del fotón incidente es muy pequeña con relación a la energía de enlace de los electrones. El fotón se dispersa elásticamente sin excitar el átomo pues la interacción solo provoca una oscilación temporal de los electrones sin que ocurra ionización. Sin embargo, la radiación dispersa que produce afecta la calidad de las imágenes de diagnóstico por Rx (Al-Okour 2021).

En el *efecto Compton* el fotón incidente interactúa con un electrón de las capas más externas del átomo y le transmite parte de su energía. Por lo general, el electrón recibe suficiente energía

para abandonar el átomo y provocar ionización en átomos vecinos (Mahan and Doiron 2018; Al-Okour 2021). El fotón queda con una energía menor a la energía incidente (Attix, 1986; Al-Okour 2021). Este efecto predomina a energías de fotones usadas habitualmente en diagnóstico y en materiales con bajo número atómico (Attix, 1986; Al-Okour 2021). La probabilidad de que ocurra está dada por la ecuación 3.2, donde Z es el número atómico del medio con el que interaccionan los fotones y k_c una constante de proporcionalidad (Attix, 1986).

$$\sigma = k_c Z \quad . \quad (3.2)$$

Al igual que la dispersión de Rayleigh el efecto Compton es responsable de la radiación que se dispersa, por lo que influye también en la calidad de las imágenes de diagnóstico por Rx (Mahan and Doiron 2018). A medida que aumenta la energía del fotón su efecto disminuye por lo que es menos importante en la terapia (Ahn, Jung and Lee 2013).

Después que ocurre el efecto Compton o el efecto fotoeléctrico el átomo ionizado queda en estado excitado debido a la vacante que se produce cuando se emiten electrones de las capas interiores. Para desexcitarse, emite Rx característicos (elementos de alto número atómico) y electrones Auger (elementos de bajo número atómico) (Al-Okour 2021).

La *producción de pares* ocurre cuando la energía de los fotones es mayor a 1.022 MeV (doble de la equivalencia masa-energía en reposo de un electrón). En este proceso el fotón interactúa, por lo general, con el campo eléctrico del entorno del núcleo atómico, desaparece y su energía se transforma en un par electrón-positrón. En ocasiones, el efecto puede ocurrir con el campo eléctrico de un electrón (Al-Okour 2021). La probabilidad de que ocurra está dada por la ecuación 3.3, donde k_p es una constante de proporcionalidad y Z el número atómico del medio (Attix, 1986).

$$\kappa \cong k_p Z \quad . \quad (3.3)$$

Cuando se forma un par electrón-positrón el electrón resultante es capaz de ionizar los átomos vecinos, en tanto que el positrón experimenta aniquilación dando lugar a dos cuantos γ de 511 keV que también interaccionan con los átomos circundantes. Estos efectos explican el alto poder ionizante de los fotones de alta energía.

Otro efecto que pueden producir los fotones de alta energía es la denominada producción de triplete. Ocurre cuando al formarse un par electrón-positrón el electrón diana sale expulsado con gran energía. De esta forma, se ponen en movimiento dos electrones y un positrón (Al-Okour 2021). La energía umbral para que se produzca un triplete viene dada por la ecuación 3.4.

$$E_u = 4m_0c^2 \quad (3.4)$$

3.2. Interacción de las AuNP con la luz

3.2.1. Extinción de la luz

La extinción total de la luz o pérdida de su energía al atravesar un medio se debe a su absorción y dispersión en el medio (ecuación 3.5). La absorción de la luz se produce cuando la energía del fotón se disipa debido a procesos inelásticos. En la dispersión, como ya se mencionó, la energía de la luz provoca oscilaciones de los electrones del material donde incide. El fotón incidente se puede desviar con la misma frecuencia de la luz incidente (dispersión Rayleigh) o con una frecuencia distinta (dispersión Raman). Ambos procesos se mejoran en presencia de LSPR (Jain *et al.*, 2006). Según la teoría de Mie las eficiencias de dispersión (Q_{sca}) y absorción (Q_{abs}) para nanoesferas de oro están dadas respectivamente por las ecuaciones 3.6 y 3.7, donde m es la relación entre el índice de refracción de la esfera n y el medio circundante n_m , x es el parámetro de tamaño dado como $2\pi n_m R/\lambda$, con R el radio de la nanoesfera y λ la longitud de onda de la luz incidente, ψ_n y ξ_n son las funciones de Riccati-Bessel, y la prima representa la primera derivada con respecto al argumento entre paréntesis (Jain *et al.*, 2006).

$$Q_{ext} = \frac{2}{x^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n + 1) Re[a_n + b_n] \quad , \quad (3.5)$$

$$Q_{sca} = \frac{2}{x^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n + 1) [a_n^2 + b_n^2] \quad , \quad (3.6)$$

$$Q_{abs} = Q_{ext} - Q_{sca} \quad , \quad (3.7)$$

donde:

$$a_n = \frac{m\psi_n(mx)\psi'_n(x) - \psi_n(x)y'_n(mx)}{m\psi_n(mx)\xi'_n(x) - m\xi_n(x)\psi'_n(mx)} \quad , \quad (3.8)$$

$$b_n = \frac{\psi_n(mx)\psi'_n(x) - m\psi_n(x)\psi'_n(mx)}{\psi_n(mx)\xi'_n(x) - m\xi'_n(x)\psi'_n(mx)} \quad . \quad (3.9)$$

De las ecuaciones 3.5-3.9 se deduce que a medida que aumenta el tamaño de la NP el proceso de extinción más relevante es la dispersión (Jain *et al.*, 2006; Amendola *et al.*, 2017), la cual ha sido observada experimentalmente (Wrigglesworth and Johnston, 2021). Por lo anterior, las NP Au de mayor tamaño son más adecuadas para la obtención de imágenes por dispersión mientras que las más pequeñas son mejores para PTT y como agentes de contraste en imágenes de células y tejidos (Jain *et al.*, 2006; Wrigglesworth and Johnston, 2021).

3.2.2. Producción de calor

Como ya se mencionó, al incidir la luz sobre una NP Au ésta puede ser absorbida o dispersada. Si ocurre absorción los electrones de las NP Au se excitan y la luz absorbida se convierte en energía cinética. Los electrones en movimiento se dispersan por la red/fonón, y parte de la energía cinética se transforma en energía vibratoria de la red, que termina expresándose en forma de calor en el entorno cercano al sitio de absorción de la luz. Este fenómeno se conoce como efecto fototérmico (Yao *et al.*, 2016; Moustououi *et al.*, 2019; Vines *et al.*, 2019; Bai *et al.*, 2020). Debido a la LSPR las NP Au producen efecto fototérmico, en particular en la región visible e infrarroja cercana (NIR), con una eficiencia muy superior a los agentes PT comunes (Yao *et al.*, 2016; Elahi, Kamali and Baghersad, 2018; Moustououi *et al.*, 2019; Vines *et al.*, 2019; Bai *et al.*, 2020).

3.2.3. Producción de ROS

En la PDT la formación de ROS en las células se debe a que el PS en estado base (S_0) tiene dos electrones con espines opuestos en el orbital molecular de baja energía. Cuando el PS absorbe luz, uno de los electrones se excita a un orbital molecular de mayor energía sin cambiar su

espín. A este estado, de vida muy corta (ns), se le conoce como estado singlete excitado (S^*). Para volver al estado fundamental el PS excitado puede irradiar energía en forma de luz (fluorescencia) o liberar energía térmica mediante conversión interna o relajación vibracional sin emisión de luz. Sin embargo, puede ocurrir también que el espín del electrón excitado del PS cambie, produciéndose el llamado cruce entre sistemas (ISC). El PS pasa entonces a un estado denominado triplete excitado (T_1) cuya vida es relativamente larga ($>\mu\text{s}$). En estado T_1 el PS puede volver al estado fundamental S_0 por emisión de energía luminosa (fosforescencia), puede liberar energía térmica o puede reaccionar químicamente con los sustratos celulares mediante transferencia de un electrón o un protón (reacción tipo I) y generar especies radicales que pueden atacar otras moléculas o recombinarse dando lugar a una gran cantidad de productos, en particular las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS). También puede transferir energía al oxígeno molecular (reacción tipo II) y producir oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) que es una ROS muy electrofílica y reacciona rápidamente con biomoléculas (lípidos, aminoácidos, proteínas, carbohidratos y ADN) que también producen ROS, en una cadena de reacciones muy dañinas para las células, que provocan su muerte mediante apoptosis, autofagia o necrosis (Chilakamarthi and Giribabu, 2017; Ferreira dos Santos *et al.*, 2019; Bai *et al.*, 2020). La figura 3.1 muestra el mecanismo descrito.

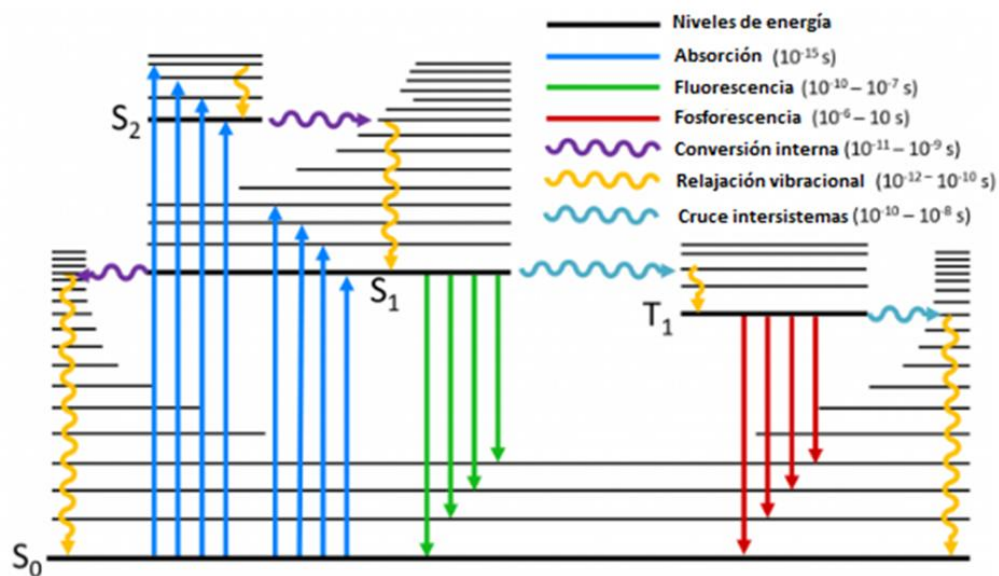


Figura 3.1. Diagrama de Jablonski para los estados excitados de un PS en PDT. Imagen tomada de: <https://trends.directindustry.es/list/edinburgh-instruments-25178.html>.

Las NP Au también pueden producir ROS al ser irradiadas con luz, pero por un mecanismo diferente al de los PS tradicionales, con la ventaja de que el Au tiene mayor fotoestabilidad y resistencia a la oxidación (Hashimoto *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2020; Carrasco *et al.*, 2020; Guerrero-Flores *et al.*, 2020). En las NP de Au las ROS se producen como consecuencia de la excitación plasmónica (Gao *et al.*, 2014; Chadwick *et al.*, 2016; Carrasco *et al.*, 2020; George *et al.*, 2022). Cuando el plasmón se excita bajo irradiación promueve la aparición de una subpoblación particular de electrones de conducción (“electrones no térmicos”) con un nivel de energía (~ 10 eV) muy superior al Nivel de Fermi, que es la energía umbral para que los electrones de conducción participen en reacciones químicas o abandonen la partícula metálica (Gao *et al.*, 2014; Carrasco *et al.*, 2020; George *et al.*, 2022). El exceso de energía de los electrones no térmicos se distribuye rápidamente (100-500 fs) entre todos los electrones de la NP debido a interacciones electrón-electrón dando lugar a electrones menos energéticos (“electrones calientes”) cuya energía térmica promedio (1–5 eV) es significativamente superior a la energía promedio del resto de los electrones de la NP (Hashimoto *et al.* 2012; Chadwick *et al.*, 2016; Amendola *et al.*, 2017; Kim and Lee 2018; Carrasco *et al.*, 2020; George *et al.*, 2022). Tanto los electrones no térmicos como los electrones calientes pueden transferirse directamente desde la superficie de la NP hacia moléculas lo suficientemente cercanas o adsorbidas en la superficie de la NP en el momento de la excitación, induciendo reacciones redox (Gao *et al.*, 2014; Chadwick *et al.*, 2016; Her, Jaffray and Allen 2017; Carrasco *et al.*, 2020; George *et al.*, 2022). En condiciones aeróbicas la transferencia puede realizarse hacia el orbital desocupado $2p^*$ antienlazante del O_2 y dar lugar al ion O_2^* (Gao *et al.*, 2014; Carrasco *et al.*, 2020). Posteriormente, el O_2^* puede sufrir los siguientes procesos: (a) relajarse rápidamente, liberando un electrón de regreso a la superficie de la NP y producir 1O_2 (Gao *et al.*, 2014; George *et al.*, 2022); (b) reducirse, ya sea por otro electrón caliente que se encuentre en la superficie de la NP, o a través de una reacción redox con una tercera molécula, y producir H_2O_2 , que a su vez origina *OH mediante la reacción $H_2O_2 + H^+ + e^- \rightarrow ^*OH + H_2O$ (Gao *et al.*, 2014; Carrasco *et al.*, 2022; George *et al.*, 2022).

Un mecanismo alternativo de producción de ROS puede ocurrir también cuando se utiliza un láser pulsado de pulso corto o ultracorto (ps-fs) (Hashimoto *et al.*, 2012; Pasparakis 2013;

Carrasco *et al.*, 2020). Cuando el medio que rodea la NP excitada se ioniza por la acción de este tipo de láser se produce un plasma que se descompone en diferentes radicales (Hashimoto *et al.*, 2012; Carrasco *et al.*, 2020). En solución acuosa se producen HO*, H* y H₂O₂, en tanto que en presencia de otros solventes la descomposición del plasma puede dar lugar a otras moléculas reactivas (Hashimoto *et al.*, 2012; Carrasco *et al.*, 2020) que también son citotóxicas.

Para las nanoesferas de oro la banda del LSPR se encuentra alrededor de 520 nm, cuyo valor aumenta conforme aumenta el tamaño de la nanoestructura (Huang and El-Sayed, 2010). Sin embargo, estos valores están fuera de la primera y segunda ventana del NIR que va de 650 nm a 1350 nm. La luz con longitud de onda dentro de este rango logra penetrar mejor el tejido humano. El hecho de que la banda del LSPR se encuentre fuera del rango 650-1350 nm limita su aplicación clínica debido a su pobre penetración en el tejido humano (Bcharskaya *et al.*, 2016). Es sabido que dos fotones con una energía tal que la suma sea igual a la energía de un fotón cuya longitud de onda es cercana a la banda del LSPR, pueden provocar la misma excitación en una nanoestructura. De esta forma, puede usarse luz que este dentro de la ventana del NIR y utilizarla en tejidos más profundos (Shen *et al.*, 2016).

3.2.4. Detección de la producción de ROS

Para detectar la producción de ROS por lo regular se usan sondas cuyas propiedades se alteran en presencia de éstas. Para determinar los cambios en las propiedades de estas sondas se utilizan diversos métodos, entre los que destaca la espectrometría de absorción UV-Vis. Una de las sondas más utilizadas para la detección de ROS es el 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) capaz de detectar ¹O₂, ion superóxido (O₂^{-*}), radical hidroxilo (OH*) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El DPBF muestra una fuerte absorción a 410 nm. Sin embargo, aunque el DPBF es un buen indicador de ROS tiene el inconveniente de no ser soluble en agua (Entradas, Waldron and Volk, 2020). Otro indicador de ROS muy utilizado es el ácido 9,10-antracenediilbis(metileno)dimalónico (ABMA o ABDA), soluble en agua. El ABMA en solución acuosa tiene 3 máximos de absorción en 360 nm, 380 nm y 400 nm (Entradas, Waldron and Volk, 2020; Quintos-Meneses *et al.*, 2020; Takajo and Anzai 2020) que son muy útiles. Su reacción con el ¹O₂ es específica e irreversible (Entradas, Waldron and Volk, 2020; Quintos-Meneses *et al.*, 2020

Takajo and Anzai 2020,). El 2,6-diclorofenoolindofenol (DCPIP) se ha utilizado para la detección de O_2^{*-} (Quintos-Meneses *et al.*, 2020; Jiménez-Mancilla *et al.*, 2021). Disuelto en agua muestra una fuerte absorción a 600 nm, en tanto que cuando se disuelve en DMSO el máximo se encuentra en 648 nm.

3.2.5. Mecanismo de muerte celular

Existen diferentes mecanismos de muerte celular. La *apoptosis*, proceso ordenado en el cual se destruyen células dañadas. Las células apoptóticas comienzan a perder contacto con las células vecinas y a formar ampollas en las membranas. Las células se contraen y las ampollas se separan formando los llamados cuerpos apoptóticos que son ingeridos por las células vecinas por fagocitosis. En la muerte celular dependiente de la *autofagia* hay una degradación de la célula generada por ella misma. La *necrosis* es un daño repentino y violento que afecta a un conglomerado de células, dando paso a un aumento del volumen celular, tumefacción de los orgánulos y estallido de la membrana plasmática con pérdida concomitante del contenido intracelular (Chilakamarthi and Giribabu, 2017; Tang *et al.*, 2019). Las reacciones tipo I y II que se producen durante la PDT producen muerte celular por apoptosis y necrosis (Kessel and Oleinik 2018; Ferreira dos Santos *et al.*, 2019). En el caso de la PTT el mecanismo más generalizado es la apoptosis (Krpetic *et al.*, 2010; Vines *et al.*, 2019).

Capítulo 4. Metodología

4.1. Reactivos y equipos

4.1.1. Reactivos y células

Solución coloidal de nanopartículas de oro (AuNP) de 5 nm (3-7 nm) estabilizadas en 0.1 mM PBS (4.92×10^{13} - 6.01×10^{13} partículas/mL, media: 5.46×10^{13} partículas/mL) (Sigma-Aldrich, 752568). Solución coloidal de nanopartículas de oro (HAuCl₄ 0.01% en tolueno) funcionalizadas con dodecanotiol (AuNPf) de 3-6 nm (Sigma-Aldrich, 54349). Solución 200 μM de 9,10-antraceniil-bis metileno dimalónico (ABMA) (Sigma-Aldrich, 75068). Solución 932 μM de 2,6 diclorofenolindofenol (DCPIP) (Sigma-Aldrich, D1878). Células T47D (cáncer de mama humano subtipo luminal A dependiente de hormonas) obtenidas originalmente de ATCC (Atlanta, GA, USA) y cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de anfotericina B y antibióticos (100 unidades /mL penicilina y 100 μg/mL estreptomicina). siRNA/RAD51 (Thermo Fisher Scientific, 4392421, id: s531929); siRNA/SIRT3 (Thermo Fisher Scientific, 4392420, ID: s534086). Lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668027). Medio Opti-MEM (Gibco, 22600134). Kit de proliferación celular XTT (Roche, 11465015001).

4.1.2. Equipamiento

Espectrofotómetro UV-Vis de doble haz modelo Lambda 650 (Perkin Elmer). Espectrofotómetro Genesys 50 (Thermo Fisher Scientific). Lector de placas UV-Vis, modelo Epoch (Bio Tek Instruments, Inc.). Láser pulsado ultrarrápido Nd:YAG de 30 ps y 10 Hz de frecuencia (Ekspla). Multímetro autorango RMS con interfaz USB, modelo MUL-630 (Stereon). Esfera de integración para mediciones láser de 6 pulgadas (Stellar Net). Acelerador lineal (Siemens). Equipo Xtreme (Brucker) para la toma de imágenes preclínicas por Rx.

4.2. Metodología

4.3.1. Irradiación con láser

Se utilizaron soluciones de NP Au esféricas “desnudas” (AuNP) suspendidas en solución acuosa y funcionalizadas con dodecanotiol (AuNPf) suspendidas en tolueno. Se prepararon soluciones de ABMA y DCPIP en agua y en DMSO, así como suspensiones de AuNP-ABMA y AuNP-DCPIP en agua; AuNPf-ABMA y AuNPf-DCPIP en DMSO (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Especificaciones de las soluciones irradiadas con luz láser.

Solución	Especificaciones
ABMA en agua	133.3 μM : 2000 μL ABMA 200 μM + 1000 μL DDW
DCPIP en agua	139.8 μM : 300 μL DCPIP 932 μM + 1700 μL DDW
AuNP	2000 μL AuNP de 5 nm estabilizadas en citrato
AuNP-ABMA	1000 μL de AuNP + 2000 μL ABMA 200 μM
AuNP-DCPIP	1700 μL de AuNP + 300 μL DCPIP 932 μM
ABMA en DMSO	ABMA 600 μM preparado en DMSO
DCPIP en DMSO	300 μL de DCPIP 932 μM + 3700 μL de DMSO
AuNPf	2000 μL AuNP de 5 nm funcionalizadas con dodecanotiol disueltas en tolueno
AuNPf-ABMA	2800 μL de AuNPf + 700 μL de ABMA 600 μM en DMSO
AuNPf-DCPIP	1700 μL de AuNPf + 300 μL de DCPIP 932 μM en DMSO + 2000 μL de DMSO

Todas las soluciones se colocaron en cubetas de cristal para espectrofotómetro UV-Vis de 3 mL de capacidad y 1 cm de paso óptico y se irradiaron de manera individual a diferentes intervalos de tiempo con luz láser de 532 nm (0.03 J/cm^2) y de 1064 nm (1.91 J/cm^2). En la irradiación a 532 nm el haz de luz incidía en una de las caras transparentes laterales de la cubeta (Figura 4.1). En la irradiación a 1064 nm la luz incidía directamente sobre la muestra por la parte superior de ésta (Figura 4.1). Después de cada irradiación, se registró el espectro UV-Vis de las muestras en

el espectrofotómetro Lambda 650 (Perkin Elmer Inc.) en los siguientes rangos de longitudes de onda: 450-700 nm para AuNP y AuNPf; 300-450 nm para ABMA; 500-700 nm para DCPIP; 300-700 nm para AuNP-ABMA y AuNPf-ABMA; 450-700 nm para AuNP-DCPIP y AuNPf-DCPIP. Para detectar cambios durante la irradiación se analizaron las bandas de 360 nm, 380 nm y 401 nm en el ABMA, 600 nm en el DCPIP acuoso y 648 nm en el DCPIP disuelto en DMSO. El λ_{\max} del LSPR de ambas NP se evaluó en el entorno cercano a 520 nm.

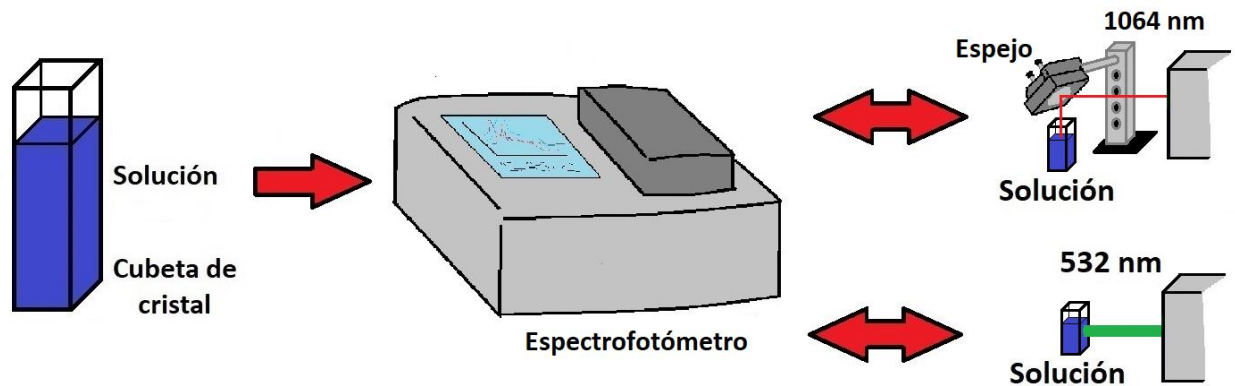


Figura 4.1. Diagrama del proceso de irradiación y registro del espectro de absorción UV-Vis de cada una de las soluciones.

Para evaluar la posible producción de ROS, se analizaron los espectros de absorción obtenidos prestando mayor atención a las bandas de absorción características del DCPIP (600 nm y 648 nm), ABMA (360, 380 y 400 nm) y del plasmón de superficie de las NP Au (cerca a 520 nm).

4.3.2. Irradiación de Rx generados por una diferencia de potencial de 6 MV

Para las irradiaciones en el acelerador lineal se utilizaron solo AuNP, dada la conocida sensibilidad del tolueno a las radiaciones (Lukianova *et al.*, 2020). Se prepararon 16 cajas de Petri de 5 mL de volumen con las soluciones que se especifican en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Especificaciones de las soluciones irradiadas con fotones generados por una diferencia de potencial de 6 MV.

Solución	Especificaciones
ABMA en agua	1.5 ml de ABMA (200 μ M) + 3.5 ml de DDW
DCPIP en agua	0.5 ml de DCPIP (932 μ M) + 4.5 ml de DDW
AuNP-ABMA	1.5 ml de AuNP + 1.5 ml de ABMA (200 μ M) y 2 ml de DDW
AuNP-DCPIP	1.5 ml de AuNP + 0.5 ml de DCPIP (932 μ M) + 3 ml de DDW

Para cada solución se dispuso de 4 cajas de Petri, que se irradiaron individualmente con Rx de 6 MV. La geometría empleada se muestra en la Figura 4.2. Las muestras se ubicaron en el isocentro de 6 campos colimados con colimador multihojas y recibieron las dosis de 0, 2, 8 y 20 Gy respectivamente (una dosis por cada caja de Petri) con un 97% de cobertura. Después de la irradiación se registró el espectro UV-Vis de las muestras en el espectrofotómetro Genesys 50 (Thermo Fisher Scientific) en las condiciones previamente descritas. Para detectar cambios durante el proceso de irradiación se analizaron las bandas de 360 nm, 380 nm y 401 nm del ABMA, 600 nm en el DCPIP y el plasmón de superficie en el caso de la AuNP.

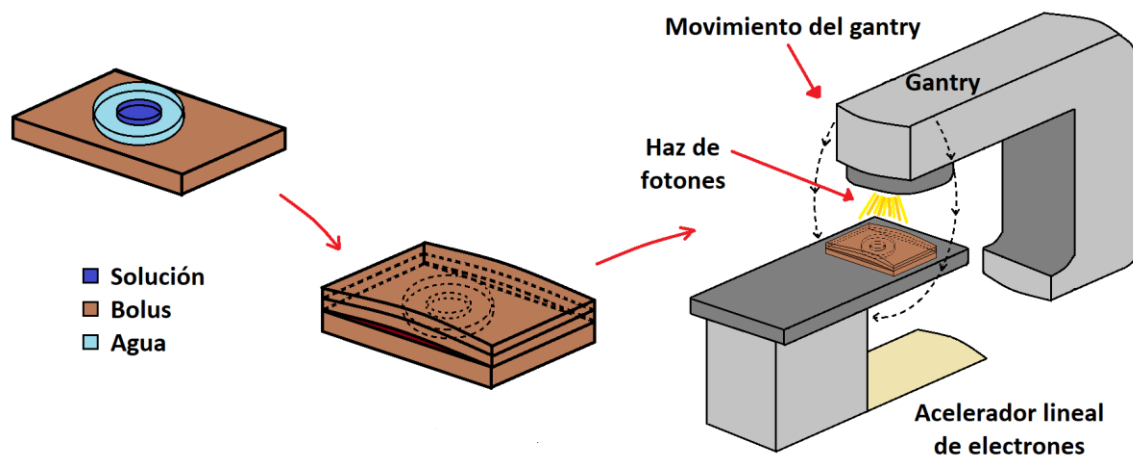


Figura 4.2. Diagrama del proceso de irradiación con fotones generados por una diferencia de potencial de 6 MV.

4.3.3. Incremento de temperatura

Para el control de la temperatura (T) durante irradiación con láser se tomaron volúmenes de 300 μ L de AuNP disueltas en PBS y de AuNPf disueltas en tolueno, colocándolos en pozos (n = 3) de una placa de 96 pozos. En el pozo a irradiar se introdujo la sonda del multímetro MUL-360 (Steren) de manera que la muestra cubriera la sonda (Figura 4.3). Las soluciones se irradiaron con luz láser de 532 nm o 1064 nm utilizando una geometría tal que el haz de luz incidía directamente sobre la suspensión por la parte superior del pozo. Se registró la temperatura durante 10 min a intervalos de 0.5 min.

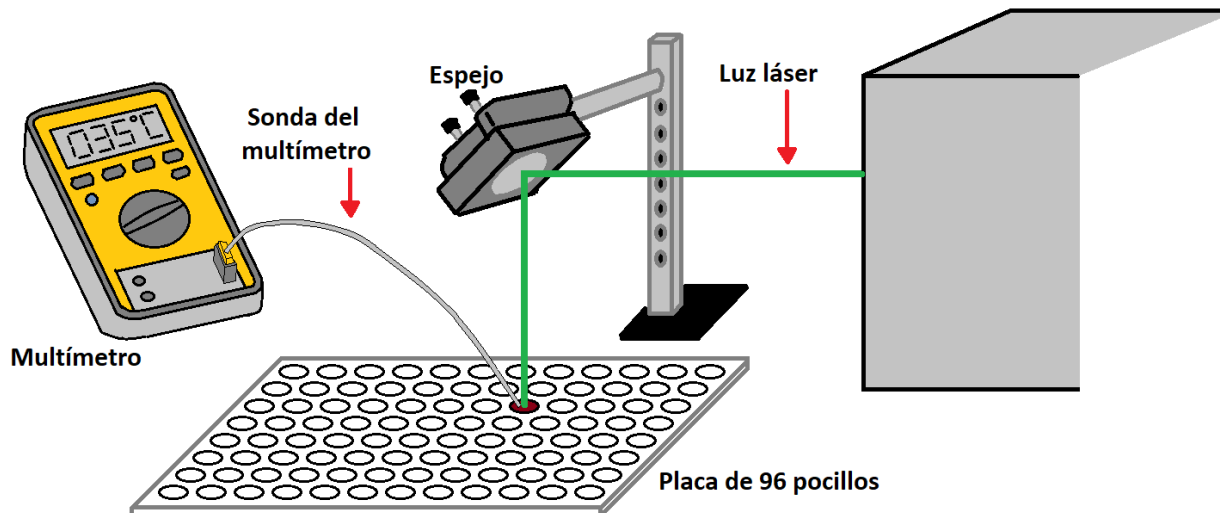


Figura 4.3. Diagrama del proceso de registro de temperatura durante la irradiación de las soluciones AuNP y AuNPf.

4.3.4. Evaluación de las AuNP como agentes de imagen

En viales de vidrio de 10 mL de capacidad se añadieron las siguientes soluciones ($n = 3$): (i) 1 mL de AuNP (5.46×10^{13} NP); (ii) 500 μ L de AuNP y 500 μ L de DDW (2.73×10^{13} NP); (iii) 250 μ L de AuNP y 750 μ L de DDW (1.37×10^{13} NP). Los viales se analizaron en el equipo de imagen preclínica Xtreme (Bruker). Se tomó la imagen en la modalidad de Rx bajo los siguientes parámetros: Rx de 45 kVp, corriente 497 μ A y filtro de 0.8 mm. La geometría de análisis de las muestras fue la misma, en todos los casos, se analizaron ROI de igual tamaño.

4.3.5. Viabilidad de células T47D tratadas con AuNP e irradiadas con láser de 532 nm y 1064 nm

En dos placas de 96 pozos se sembraron células T47D de cáncer de mama en forma alternada (un pozo si y uno no) cubriendo un total de 70 pozos. En cada pozo se sembraron 4×10^4 células. Las células se incubaron con CO₂ al 5% y 85% de humedad durante 24 h. Para sensibilizar las células al daño potencial que pudiera provocar la irradiación de las AuNP, una porción se transfectó con siRNA/RAD51 y otra, con siRNA/SIRT3. La mezcla de transfección se preparó al agregar 5 pmoles de siRNA (RAD51 o SIRT3) y 0.25 μ L de lipofectamina en 25 μ L de Medio Opti-MEM. Esta mezcla de reacción se incubó 20 min a T ambiente antes de agregarla a las células. A los pozos con células que no recibieron el tratamiento de transfección se les añadió un volumen

igual al de la mezcla de transfección para mantener el mismo volumen en todos los pozos. Las placas con los pozos con células (transfectadas o no) se incubaron por otras 24 h antes de añadir los tratamientos con las AuNP de 5 nm en PBS. Los tratamientos añadidos fueron los siguientes (n=5): (i) control: 50 μ L de medio a células no transfectadas; (ii) control lipofectamina: 0.25 μ L de lipofectamina + 49.75 μ L de medio en células no transfectadas; (iii) control lipofectamina-(siRNA/RAD51): 50 μ L de medio en células transfectadas con lipofectamina-(siRNA/RAD51); (iv) control lipofectamina-(siRNA/SIRT3): 50 μ L de medio en células transfectadas con lipofectamina-(siRNA/SIRT3); (v) control de AuNP + lipofectamina-(siRNA/RAD51): 50 μ L de AuNP en células transfectadas con lipofectamina-(siRNA/RAD51); (vi) control de AuNP + lipofectamina-(siRNA/SIRT3): 50 μ L de AuNP en células transfectadas con lipofectamina-(siRNA/SIRT3); (vii) control 532 nm: 50 μ L de medio a células no transfectadas + 532 nm; (viii) tratamiento 1: 50 μ L de AuNP a células no transfectadas + 532 nm; (ix) tratamiento 2: 50 μ L de AuNP a células transfectadas con lipofectamina-(siRNA/RAD51) + 532 nm; (x) tratamiento 3: 50 μ L de AuNP a células transfectadas con lipofectamina-(siRNA/SIRT3) + 532 nm; (xi) control 1064 nm: 50 μ L de medio a células no transfectadas + 1064 nm; (xii) tratamiento 4: 50 μ L de AuNP a células no transfectadas + 1064 nm; (xiii) tratamiento 5: 50 μ L de AuNP a células transfectadas con lipofectamina-(siRNA/RAD51) + 1064 nm; (xiv) tratamiento 6: 50 μ L de AuNP a células transfectadas con lipofectamina-(siRNA/SIRT3) + 1064 nm. La irradiación a 532 nm se efectuó durante 5 min (0.03 J/cm^2) y a 1064 nm durante 2 min (1.91 J/cm^2). Al final de los tratamientos se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con PBS 1X estéril. Seguidamente, se colocaron 100 μ L de PBS 1X en cada pozo y se agregaron 50 μ L de la mezcla de reacción XTT. Después de 24 h, la viabilidad se midió por absorbancia en el lector de microplacas Epoch.

Las AuNPf no se utilizaron en este experimento debido a la toxicidad celular que provoca el tolueno (Pestana 2007).

4.3.6. Análisis estadístico

La comparación de la absorbancia obtenida al final de cada irradiación con el control ($t = 0 \text{ min}$), así como la viabilidad celular entre diferentes muestras se efectuó mediante la prueba t de Student. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$ para la prueba de una cola.

Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1. Determinación de producción de especies reactivas de oxígeno

5.1.1. Irradiación bajo luz láser de 532 nm

La excitación del LSPR de las NP Au induce absorción y dispersión de los fotones incidentes y una gran amplificación del campo electromagnético localizado a su alrededor. Su espectro de absorción está caracterizado por una fuerte banda (λ_{\max}) en la región visible o del NIR del espectro electromagnético determinada por la forma, el tamaño y la composición de la NP, así como por las interacciones interpartículas y el ambiente dieléctrico que las rodea (Ghosh and Pal 2007; Huang and El-Sayed 2010; Hashimoto *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Amendola *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2017; Panahi *et al.*, 2017; Kim and Lee 2018; Hogan *et al.*, 2020; Sahu *et al.*, 2021; Sarfraz and Khan 2021).

En la Figura 5.1 se muestran los espectros de absorción de las suspensiones de AuNP, AuNPf y de los indicadores ABMA y DCPIP, a diferentes tiempos de irradiación bajo luz láser de 532 nm. Ambos nanosistemas manifiestan la banda única de absorción en el entorno de 520 nm, característica de las NP Au esféricas monodispersas del tamaño de las empleadas (Peixoto de Almeida *et al.*, 2014; Amendola *et al.*, 2017; Sahu *et al.*, 2021). La λ_{\max} de las AuNP experimenta un leve corrimiento hipocrómico de 6 nm al tiempo que la intensidad disminuye ~15% durante los 15 min de irradiación, evidencia de disminución del tamaño inicial (Gosh and Pal 2007; Huang and El-Sayed 2010; Hashimoto *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2006, 2017). La λ_{\max} de las AuNPf no varió su posición (524 nm) y la intensidad disminuyó solo ~5% durante los 10 min de irradiación, lo que sugiere que la funcionalización imprimió mayor estabilidad a estas NP.

Como se observa en la Figura 5.1. al irradiar las AuNP y AuNPf a 532 nm se produjeron dos cambios importantes en λ_{\max} : (a) disminución de la intensidad y (b) ligero corrimiento al azul en el caso de las AuNP (6 nm).

Las NP Au expuestas a uno o varios pulsos láser experimentan, en función de la energía y el tamaño del pulso, reducción de tamaño, cambio de forma y fragmentación (Gosh and Pal 2007;

Hashimoto *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2006, 2017). La disminución del tamaño de las NP que se produce a medida que se incrementa el tiempo de irradiación va cambiando paulatinamente sus propiedades ópticas y electrónicas. Estos cambios se reflejan en la disminución de la intensidad y el corrimiento de λ_{max} . (Huang and El-Sayed 2010).

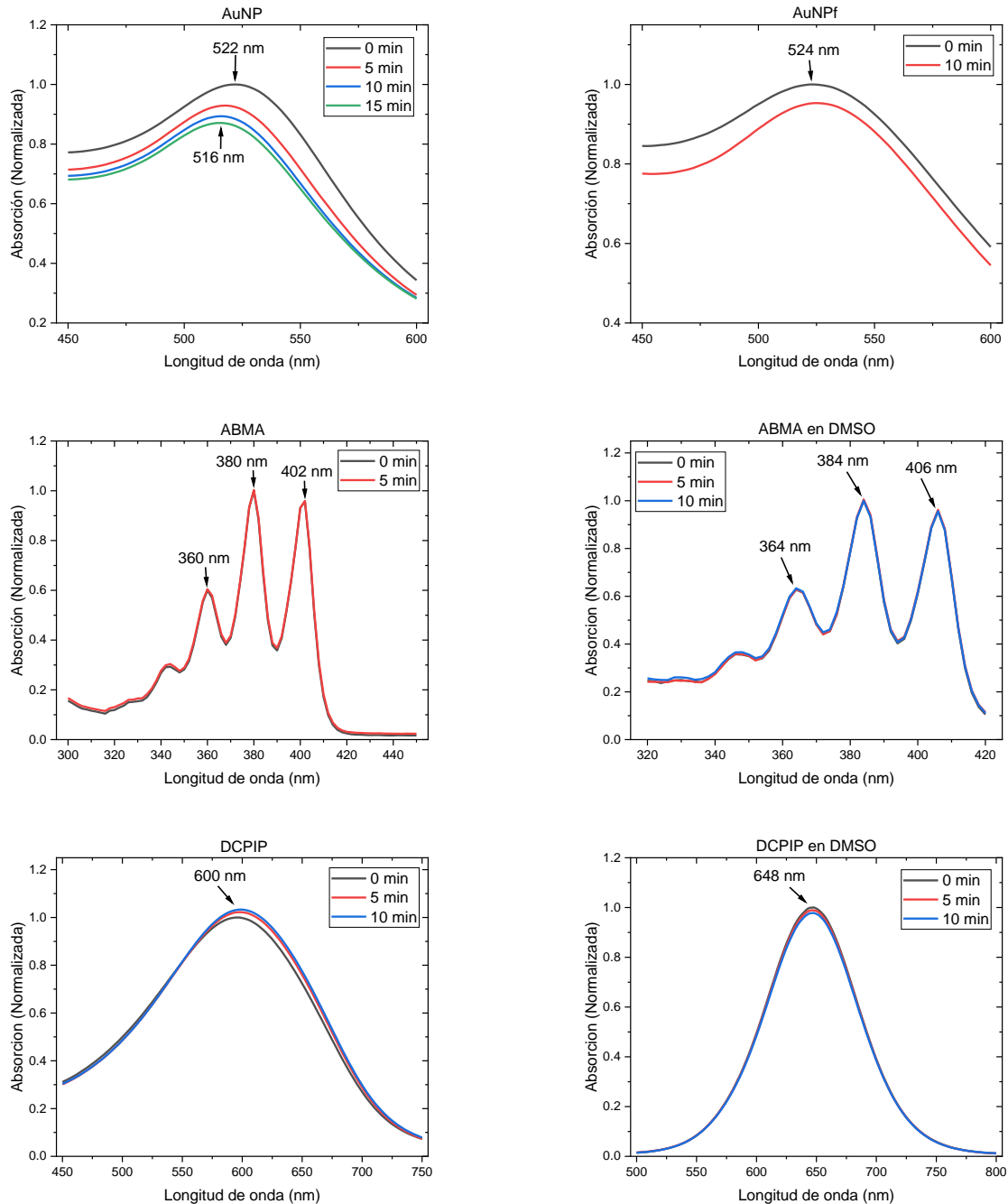


Figura 5.1. Espectros de absorción de las soluciones AuNP y AuNPf, así como de los indicadores ABMA y DCPIP en medio acuoso y en DMSO, a diferentes tiempos de irradiación bajo luz láser de 532 nm.

La disminución de la intensidad de λ_{\max} con la disminución del tamaño de la NP está relacionada con el hecho de que la absorbancia es proporcional a la sección eficaz de extinción (σ_{ext}). Al disminuir el tamaño de la NP disminuye σ_{ext} y, por tanto, la intensidad de λ_{\max} (Ghosh and Pal 2007; Huang and El-Sayed 2010; Hashimoto *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2017; Tsekov *et al.*, 2017). A esto se añade que después de varios pulsos láser el plasmón se descompone como consecuencia de procesos radiativos y no radiativos (Kim and Lee 2018). Estos procesos provocan pérdidas en la absorción y la dispersión de la luz incidente que inducen disminución gradual de la intensidad de λ_{\max} . (Ghosh and Pal 2007; Hashimoto *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2017; Sarfraz and Khan 2021). En NP Au del tamaño de las utilizadas (5 nm) el proceso radiativo es despreciable (Huang and El-Sayed 2010; Hashimoto *et al.*, 2012; Chadwick *et al.*, 2016; Amendola *et al.*, 2017; George *et al.*, 2022) por lo que la mayor proporción de la energía de excitación se traduce en generación de pares electrón-hueco que provocan transiciones interbandas (IB) desde la banda de valencia 5d10 ocupada a los niveles desocupados de la banda de conducción 6s1p, cuyo solapamiento es significativo en el Au (Hashimoto *et al.*, 2012; Carrasco *et al.*, 2020). Estas transiciones IB aumentan significativamente la tasa de dispersión electrón-electrón y electrón-fonón con la consiguiente disminución de la intensidad de λ_{\max} (Ghosh and Pal 2007; Yang *et al.*, 2015; Amendola *et al.*, 2017; Carrasco *et al.*, 2020).

El corrimiento de la posición de λ_{\max} es también una manifestación de la disminución del tamaño de la NP (Huang and El-Sayed 2010; Hashimoto *et al.*, 2012; Yeh *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2017; Tsekov *et al.*, 2017). Se han descrito diferentes causas que provocan el corrimiento al azul de λ_{\max} vinculadas con la disminución de tamaño, aunque hay que tener en cuenta que también influyen las variaciones en la forma de las NP y en la constante dieléctrica del medio que las rodea (ϵ_m). Al disminuir el tamaño de las NP se incrementa la cantidad relativa de electrones superficiales lo que aumenta el confinamiento cuántico del gas de electrones libres por su superficie (Chhour *et al.*, 2016; Amendola *et al.*, 2017; George *et al.*, 2022). En estas condiciones, se modifica la estructura de los electrones superficiales de la NP produciéndose cambios en la constante óptica del metal (Ghosh and Pal 2007; Yang *et al.*, 2015; Amendola *et al.*, 2017) y en sus propiedades cuánticas (Amendola *et al.*, 2017). Estos cambios impulsan la resonancia del plasmón hacia frecuencias más altas (Yeh *et al.*, 2012) y se manifiestan con más

nitidez en las AuNP que en las AuNPf (Hashimoto *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2017). Se ha reportado que, a diferencia de los corrimientos que provocan la agregación y el cambio de forma de la NP, los corrimientos de λ_{\max} debidos a variaciones de tamaño no suelen ser grandes (Yang *et al.*, 2015).

La variación de tamaño de las NP Au influye también en las interacciones electromagnéticas entre ellas (Ghosh and Pal 2007; Dreaden *et al.*, 2012; Hashimoto *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Tsekov *et al.*, 2017). Cuando dos NP se acercan se incrementa el campo magnético entre ellas y los plasmones pueden interaccionar para formar excitaciones acopladas, denominadas “modos híbridos del plasmón”, de manera similar a como interactúan los electrones en las moléculas para formar enlaces (Gosh and Pal 2007; Mayer and Hafner 2011; Panahi *et al.*, 2017). Dado que la intensidad del acoplamiento depende del grado de separación, la distancia entre NP tiene una marcada influencia en su espectro de absorción (Gosh and Pal 2007; Dreaden *et al.*, 2012). Al disminuir el tamaño de las NP a causa de la irradiación con el láser, aumenta la distancia entre ellas (Hashimoto *et al.*, 2012), disminuyen las interacciones electromagnéticas interpartículas y se produce un ligero corrimiento de λ_{\max} hacia el azul (Ghosh and Pal 2007).

La posición de λ_{\max} depende también de la ϵ_m que rodea las NP (Ghosh and Pal 2007; Mayer and Hafner 2011; Hashimoto *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Tsekov *et al.*, 2017; George *et al.*, 2022). La frecuencia del pico del plasmón (ω_{max}) está relacionada con ϵ_m por la expresión: $\omega_{max} = \frac{\omega_p}{\sqrt{2\epsilon_m - 1}}$ donde ω_p es la frecuencia del plasma del gas electrónico, cuya magnitud para el Au es conocida (Mayer and Hafner 2011; Hashimoto *et al.*, 2012; Tsekov *et al.*, 2017). La irradiación provoca cambios en la ϵ_m de la solución que rodea la NP (Mayer and Hafner 2011; Hashimoto *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2017). Cuando ϵ_m decrece, λ_{\max} se corre hacia el azul. Estos corrimientos de λ_{\max} en función de la variación de ϵ_m no son grandes, varían entre 5 y 10 nm (Peixoto de Almeida *et al.*, 2014).

La posición de λ_{\max} de las AuNPf, sin embargo, no mostró variación durante la irradiación a 532 nm, aunque su intensidad disminuyó (Figura 5.1). El recubrimiento con dodecanotiol protege la superficie de la NP induciendo mayor estabilidad a las AuNPf en comparación con las AuNP (Mayer and Hafner 2011; Amendola *et al.*, 2017; Panahi *et al.*, 2017). El dodecanotiol no afecta

la naturaleza intrínseca del núcleo de las NP Au (Negishi *et al.*, 2014), pero la monocapa compacta que forma en la superficie provoca disminución de la población de electrones efectivos del núcleo plasmónico (Amendola *et al.*, 2017), lo que proporciona mayor estabilidad. Las AuNPf se pueden considerar entidades de carga neutra compuestas de un núcleo cristalino compacto, formado por paquetes de átomos de Au, cubierto por un manto denso de grupos de cadena lineal. El grupo $-CH_3$ de cola del dodecanotiol que las recubre origina interacciones débiles de las AuNPf tanto con las moléculas del tolueno en el que están disueltas como entre ellas, por lo que su plasmón es menos sensible a los efectos de la luz incidente (Amendola *et al.*, 2017).

En la misma Figura 5.1 se aprecia que el ABMA y el DCPIP tampoco experimentan cambios significativos en la intensidad y posición de sus bandas de absorción a medida que aumentó el tiempo de irradiación tanto en medio acuoso como en DMSO. Al irradiar el ABMA en solución acuosa durante 5 min sus máximos de absorción (360 nm, 380 nm y 402 nm) no variaron ni de posición ni de intensidad. Igualmente, el máximo de 600 nm del DCPIP disuelto en agua tampoco mostró una variación significativa durante la irradiación. La posición presentó un cambio hipsocrómico de 4 nm y la intensidad mostró un ligero cambio hipercrómico. Estos cambios (<5%) del máximo de absorción del DCPIP acuoso bajo irradiación con láser han sido reportados (Quintos-Meneses *et al.*, 2020) y se presupone que están relacionados con interacciones DCPIP-H₂O y con reacciones de reducción-reoxidación que el DCPIP experimenta en condiciones aeróbicas y en presencia de luz (Jahn *et al.*, 2020).

Al pasar del medio acuoso al orgánico los máximos del ABMA a $t = 0$ (360 nm, 380 nm y 402 nm) mostraron un ligero corrimiento batocrómico de 4 nm (364, 384 y 406 nm) relacionado, muy probablemente, con (a) variación de la constante dieléctrica del medio (ϵ_m); (b) formación de puentes de H entre el grupo $-S=O$ del DMSO y los grupos $-COOH$ del ABMA (Ren *et al.*, 2022) (figura 5.1.). La irradiación no produjo cambios posteriores ni en la posición ni en la intensidad de estos máximos. En el caso del DCPIP, al pasar del medio acuoso al DMSO se observa el característico corrimiento del máximo de 600 nm hasta 648 nm (Dvoranová *et al.*, 2015). Al igual que en el ABMA, la posterior irradiación no produjo cambios significativos ni de posición ni de intensidad de este máximo. Dado que ambos indicadores resultaron estables frente a la

irradiación a 532 nm y la posición de sus máximos no interfiere con el λ_{\max} de las AuNP y AuNPf se confirmó que son adecuados para la detección de ROS en experimentos con las NP Au en estudio.

En la Figura 5.2 se reflejan los cambios que se producen en los espectros del ABMA y el DCPIP en presencia de AuNP y AuNPf cuando se irradian a diferentes tiempos con láser de 532 nm. Conforme aumenta el tiempo de irradiación la intensidad de las bandas características de los indicadores disminuye significativamente. La banda de 380 nm del ABMA disminuye > 30% durante la irradiación en presencia de AuNP debido a la generación de 1O_2 . Al mismo tiempo, la intensidad de λ_{\max} de las AuNP disminuyó > 20%. A $t = 0$ la posición de λ_{\max} es la misma que en ausencia de ABMA (522 nm). La irradiación provocó un corrimiento hipsocrómico de 8 nm debido a la disminución progresiva del tamaño de la NP (Gosh and Pal 2007; Huang and El-Sayed 2010; Hashimoto *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2006, 2017).

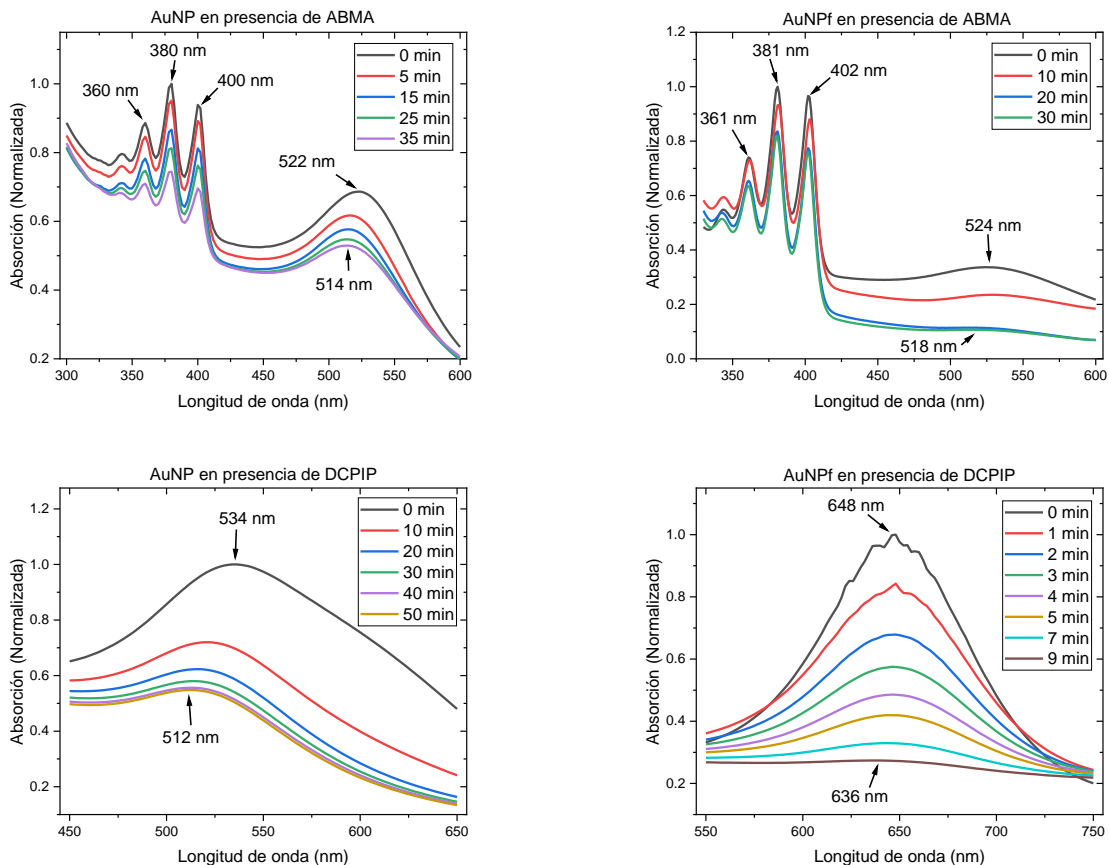


Figura 5.2. Espectros de absorción de las soluciones AuNP y AuNPf en presencia de los indicadores ABMA y DCPIP, a diferentes tiempos de irradiación bajo luz láser de 532 nm.

En presencia de AuNPf los máximos de absorción del ABMA en DMSO mostraron un corrimiento insignificante (1 nm) a $t = 0$. Durante la irradiación la posición registró ligeras oscilaciones que no fueron significativas. La λ_{\max} de las AuNPf a $t = 0$ no varió en presencia de DMSO (524 nm) lo que confirma su mayor estabilidad con respecto a las AuNP. Sin embargo, la irradiación provocó una apreciable disminución de intensidad, corrimiento hipsocrómico de 6 nm y un notable ensanchamiento de λ_{\max} , hasta casi desaparecer (Figura 5.2). Tales cambios sugieren no sólo formación de $^1\text{O}_2$, sino también una intensa reducción del tamaño de la NP. Se ha reportado que en presencia de DMSO las NP Au experimentan una acentuada reducción de tamaño e incluso cambio de forma (esferas a esferoides) al ser irradiadas a 532 nm (4 J/cm^2 , 1Hz) (Amendola *et al.*, 2006).

En presencia de DCPIP las soluciones de las AuNP manifiestan un comportamiento singular. Los máximos del plasmón (522 nm) y del DCPIP (600 nm) se funden en una sola banda (534 nm) a $t = 0$ lo que revela una fuerte interacción entre las AuNP y el DCPIP, probablemente adsorción del DCPIP en la superficie de la NP debido a su electrofilicidad (Tandiana *et al.*, 2021). Durante la irradiación se produjo un corrimiento hipsocrómico de 22 nm del máximo de la solución en tanto que su intensidad disminuyó >40%, lo que evidencia no solo disminución del tamaño de la NP, sino también formación de ROS (Amendola *et al.*, 2006; Chadwick *et al.*, 2016; Carrasco *et al.*, 2020; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Li, Yang and Sun 2021; George *et al.*, 2022). Cuando el DCPIP se irradió en medio acuoso en ausencia de AuNP su máximo de absorción no se desplazó ni disminuyó significativamente su intensidad (Figura 5.1), comportamiento reportado previamente (Quintos-Meneses *et al.*, 2020). El resultado observado confirma que las AuNP son capaces de inducir, además del $^1\text{O}_2$ detectado por el ABMA, otras ROS capaces de reducir el DCPIP.

Las soluciones de AuNPf en presencia de DCPIP presentaron un comportamiento similar. Es imposible distinguir por separado los máximos de las AuNPf (524 nm) y del DCPIP (648 nm) en DMSO ya que ambos se superponen. La solución AuNPf-DCPIP muestra a $t = 0$ un máximo único a 648 nm característico del DCPIP en DMSO (Dvoranová *et al.*, 2015). Durante los primeros 2 min de irradiación este máximo permaneció sin variar su posición, lo que sugiere que la NP no experimentó cambios relevantes de tamaño durante ese tiempo. Sin embargo, la absorción

disminuyó ~30% debido a la reducción del DCPIP. Luego, la posición del máximo se fue corriendo gradualmente hacia menores longitudes de onda hasta un corrimiento total de 12 nm al final de la irradiación al tiempo que la intensidad continuó disminuyendo hasta > 60% y el plasmón casi desaparece. Esta intensa reducción de la absorbancia de la solución AuNPf -DCPIP se debe a la acción conjunta que provocan: (a) la producción de ROS al irradiar las AuNPf (Chadwick *et al.*, 2016; Carrasco *et al.*, 2020; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Li, Yang and Sun 2021; George *et al.*, 2022); (b) la disminución de tamaño que experimentan las NP de Au en presencia de DMSO (Amendola *et al.*, 2006); y (c) la intensa reducción del DCPIP en presencia de DMSO (Dvoranová *et al.*, 2015). A diferencia del ABMA cuya reacción con el $^1\text{O}_2$ es específica, la decoloración del DCPIP es inespecífica pues ocurre debido a cualquier proceso de transferencia electrónica, por lo que es muy probable que el DCPIP haya detectado la presencia de O_2^{*-} y $^*\text{OH}$, comprobada al irradiar NP Au (Pasparakis 2013).

5.1.2. Irradiación bajo luz láser de 1064 nm

La producción de ROS que inducen las NP Au al ser irradiadas con láser ha sido ampliamente reportada (Chadwick *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2020; Carrasco *et al.*, 2020; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Li, Yang and Sun 2021; Liu *et al.*, 2021; George *et al.*, 2022). Sin embargo, la irradiación a 532 nm presenta limitaciones para aplicaciones clínicas ya que esta longitud de onda se absorbe fuertemente por el tejido humano, por lo que no se puede utilizar en lesiones profundas (Liaw, Kwo and Sai 2021). Teóricamente, dos fotones de 1064 nm (el doble de 532 nm) pudieran provocar el mismo efecto que un fotón de 532 nm. Por este motivo se realizaron experimentos con luz láser de 1064 nm con una mayor fluencia para garantizar la absorción bifotónica deseada. Se ha reportado que la irradiación bifotónica puede aumentar la cantidad de ROS inducidas por las NP Au (Liaw, Quo and Sai 2021).

La irradiación a 1064 nm de las NP Au y de las soluciones acuosas y orgánicas de ABMA y DCPIP se muestran en la Figura 5.3.

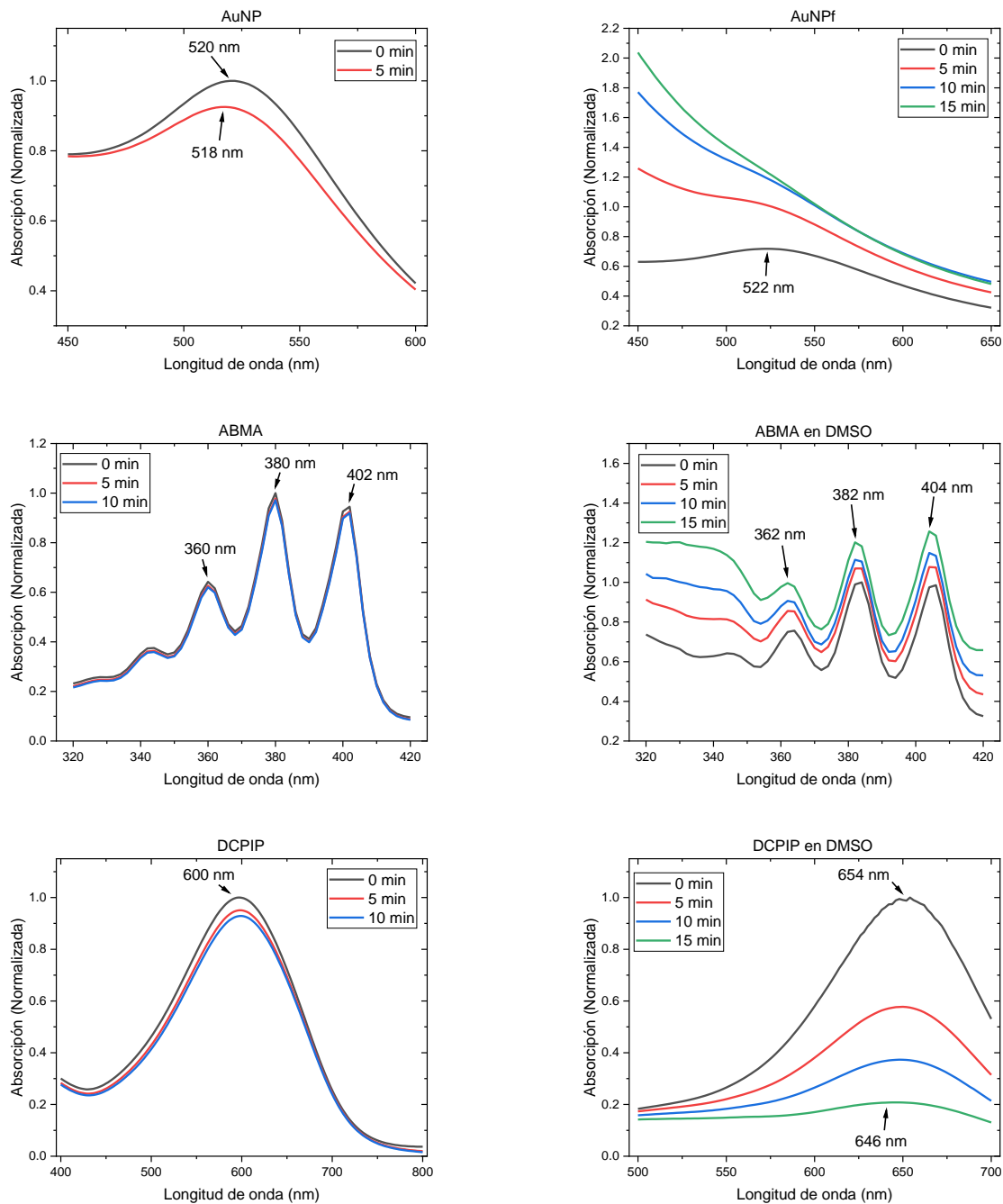


Figura 5.3. Espectros de absorción de las soluciones AuNP y AuNPf, así como de los indicadores ABMA y DCPIP en medio acuoso y en DMSO a diferentes tiempos de irradiación bajo luz láser de 1064 nm.

La Figura 5.3 muestra que cuando las AuNP se irradian a 1064 nm su comportamiento es similar a cuando se irradian a 532 nm, pero las AuNPf se comportan diferente. Mientras que las AuNP suspendidas en medio acuoso disminuyen su tamaño inicial, manifestado por la disminución de la intensidad ($\sim 8\%$) y el corrimiento (2 nm) de λ_{\max} , las AuNPf disueltas en tolueno aumentan de

tamaño a medida que se incrementa el tiempo de irradiación. Tal aumento de tamaño se deduce del aumento de la intensidad de λ_{\max} , (Gosh and Pal 2007; Serkov *et al.*, 2015; Tsekov et al 2017) cuya posición no se pudo evaluar con precisión debido al ensanchamiento que experimenta hasta casi pérdida total. Al parecer, la mayor fluencia del láser a 1064 nm produjo evaporación de una parte del tolueno, cuya volatilidad es conocida, lo que incrementó la concentración de AuNPf. Cuando aumenta la concentración de NP estas tienden a agregarse, lo que se manifiesta en aumento de la intensidad de λ_{\max} (Gosh and Pal 2007; Serkov *et al.*, 2015; Tsekov et al 2017). A esto se añade que las ROS que se forman cuando las AuNPf se irradian (epígrafe 5.1.1) contribuyen a oxidar el tolueno, formando diferentes intermediarios (Liang *et al.*, 2020) que contribuyen a incrementar la absorbancia de la solución en lugar de la esperada disminución. No fue posible comparar en cuál de las dos suspensiones el efecto de la irradiación sobre λ_{\max} es mayor debido a que el número de partículas es diferente.

La irradiación del ABMA y DCPIP acuoso a 1064 nm reflejó nuevamente la estabilidad del ABMA a la irradiación. Al igual que a 532 nm, sus máximos de absorción no mostraron cambios ni de posición ni de intensidad. El DCPIP por su lado mantuvo estable su posición, aunque en lugar del cambio hipercrómico observado a 532 nm, al irradiar a 1064 nm, el cambio observado resultó hipocrómico. Ambos cambios de intensidad fueron menores al 5% y han sido previamente reportados (Jahn *et al.*, 2020; Jiménez-Mancilla *et al.*, 2020) como ya se indicó.

Al irradiar el ABMA disuelto en DMSO a 1064 nm se produjo un incremento de la intensidad del ABMA proporcional al tiempo de irradiación (~20%), así como cambios oscilantes en la posición de los máximos. Los máximos de 364 nm y 406 nm se corrieron a 362 nm y 404 nm en los primeros 5 min de irradiación y luego se mantuvieron sin variación hasta el final. El máximo de 384 nm se mantuvo sin cambios de posición en los primeros 5 min de irradiación y luego se corrió a 382 nm hasta el final. Hipotetizamos que estas variaciones pueden estar relacionadas con la formación de nuevas estructuras en solución debido a que las moléculas de ABMA sufren redistribución electrónica en presencia de DMSO (Ren *et al.*, 2022). La mayor intensidad de irradiación a 1064 nm pudo intensificar la redistribución electrónica dando lugar a nuevas estructuras en solución.

En el caso del DCPIP al irradiar a 1064 nm se produjo una significativa disminución (~80%) de la intensidad del máximo de absorción con el aumento del tiempo de irradiación, debido a la acentuada fotoreducción que experimenta el DCPIP en presencia DMSO (Dvoranová *et al.*, 2015). Debido a estos resultados, se desestimó la irradiación de ambos indicadores a 1064 nm en presencia de DMSO.

En la Figura 5.4 se muestran los espectros de absorción de las AuNP en presencia de ABMA y DCPIP, a diferentes tiempos de irradiación con luz láser de 1064 nm. Tal como ocurrió al irradiar a 532 nm la λ_{\max} de las AuNP disminuye la intensidad al tiempo que experimenta un ligero corrimiento hipsocrómico. En presencia de los indicadores también disminuye la intensidad de los máximos de absorción del ABMA y el DCPIP, por lo cual se puede concluir que, al igual que cuando se irradia a 532 nm, la irradiación a 1064 nm también genera ROS.

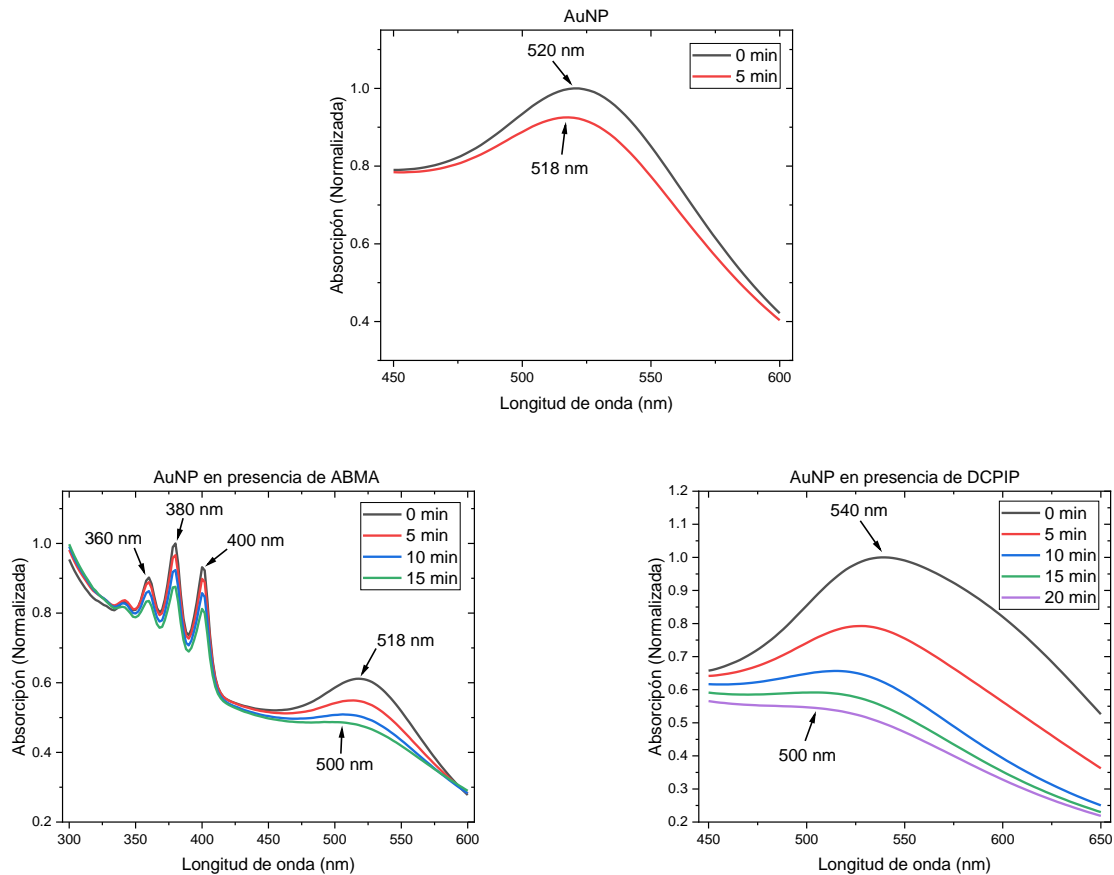


Figura 5.4. Espectros de absorción de las soluciones AuNP en presencia de los indicadores ABMA y DCPIP, a diferentes tiempos de irradiación bajo luz láser de 1064 nm.

5.1.3. Irradiación bajo rayos X generados por una diferencia de potencial de 6 MV

Se ha demostrado que el Au incrementa la reacción tisular a los Rx (McMahon *et al.*, 2011; Kwatra, Venugopal and Anant 2013; Her, Jaffray and Allen 2017; Bai *et al.*, 2020; Abdollahi *et al.*, 2021). Sin embargo, el mecanismo de radiosensibilización de las NP Au no está asociado al LSPR, sino a la interacción de los Rx con la materia (epígrafe 3.1). En dependencia de la energía de los Rx incidentes las NP Au pueden producir fotoelectrones, electrones producto de la dispersión Compton, formación de pares electrón-positrón y electrones Auger. Como resultado de estos mecanismos se producen electrones con energías muy bajas (< 50 eV) llamados electrones secundarios que constituyen la principal fuente de formación de ROS y radicales libres que generan las NP Au cuando se irradian con Rx (Chithrani *et al.*, 2010; McMahon *et al.*, 2011; Kwatra, Venugopal and Anant 2013; Her, Jaffray and Allen 2017; Bai *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020; Abdollahi *et al.*, 2021). Si la NP Au está depositada en un tejido tumoral, las ROS y radicales libres producto de la interacción Rx-NP y Rx-agua presente en la célula, promueven estrés oxidativo, disrupción del ciclo celular, inhibición de la reparación de DNA y daños en la estructura de la membrana. Se ha comprobado que los electrones secundarios dañan directamente las cadenas de DNA (Her, Jaffray and Allen 2017; Bai *et al.*, 2020; Abdollahi *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021). Todos estos mecanismos conducen a la apoptosis y necrosis y constituyen la base del aumento significativo de la sensibilidad celular a los Rx que inducen las NP Au.

Si bien el efecto radiosensibilizador de las NP Au ha sido ampliamente demostrado (Her, Jaffray and Allen 2017; Abdollahi *et al.*, 2021), los resultados publicados son contradictorios pues se utilizan Rx de diferentes intensidades, energías que abarcan desde los kV hasta los MV, NP de Au desde 1.7 nm hasta cientos de nm, líneas celulares con diferente radiosensibilidad y diferente localización celular de la NP (Chithrani *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2011; Kwatra, Venugopal and Anant 2013; Kodiha *et al.*, 2015; Her, Jaffray and Allen 2017; Bai *et al.*, 2020; Abdollahi *et al.*, 2021). Esta variedad de condiciones experimentales provoca diferentes mecanismos de interacción Rx-NP (epígrafe 3.1) que se traducen en la heterogeneidad de los resultados.

Se ha demostrado que al irradiar con Rx de 6 MV la línea celular SK-OV-3 de cáncer de ovario humano en presencia de NP Au de 14.4 ± 2.5 nm funcionalizadas con tioglucosa se producen ROS intracelulares (Geng *et al.*, 2011). Se sabe también que los Rx son capaces de inducir la radiólisis del agua dando lugar no solo a especies cargadas como H_2O^+ , sino también a radicales libres como H^* , OH^* y O_2^{*-} (Kwatra, Venugopal and Anant 2013; Hu *et al.*, 2020). A partir de estas dos premisas se decidió evaluar si la irradiación de las AuNP esféricas de 5 nm con Rx de 6 MV en el rango de dosis de 0 a 20 Gy, produciría también ROS, en particular $^1\text{O}_2$, O_2^{*-} y $^*\text{OH}$, que pudieran detectarse con ABMA y DCPIP, ya que la práctica demuestra que los resultados dependen mucho de las condiciones experimentales.

Se obtuvieron los espectros de absorción del ABMA y del DCPIP al irradiar con los Rx de 6 MV en ausencia y en presencia de las AuNP (Figura 5.5). A diferencia de la irradiación con láser, que produjo corrimientos hipsocrómicos en la solución AuNP-ABMA (Figuras 5.2 y 5.4), al irradiar con Rx de 6 MV se produjo un corrimiento batocrómico de λ_{max} de la AuNP y variaciones oscilantes en su intensidad. Los máximos del ABMA también experimentaron oscilaciones en la intensidad con el aumento de la dosis de irradiación, pero la posición se mantuvo estable (Figura 5.5). Este resultado indica que en las condiciones experimentales utilizadas no se produjo $^1\text{O}_2$ en presencia de las AuNP. El corrimiento batocrómico de λ_{max} evidencia posible agregación de las nanoestructuras y/o cambios en ϵ_m (Gosh and Pal 2007; Dreaden *et al.*, 2012). Las oscilaciones de los picos del ABMA y de las AuNP indican la formación y desaparición de especies en solución producto de la interacción con los Rx. Se ha comprobado que los Rx provocan interacciones entre las moléculas de agua y especies disueltas en ella que inducen oscilaciones espectrales (Keller *et al.*, 2012).

Al irradiar el DCPIP en ausencia de AuNP también se observaron oscilaciones en la intensidad y la posición del máximo de la solución a medida que se incrementó la dosis de irradiación (Figura 5.5). Estas oscilaciones del DCPIP bajo irradiación en ambientes aeróbicos han sido reportadas y se deben a reacciones de reducción-reoxidación que el DCPIP experimenta en presencia de O_2 , (Jahn *et al.*, 2020). Cuando el DCPIP se irradió en presencia de AuNP, sin embargo, se produjo un aumento gradual de la intensidad del máximo de absorción sumado a un ligero cambio batocrómico, que descarta la producción esperada de O_2^{*-} y $^*\text{OH}$ en el medio, e indica la

formación de nuevas especies en solución provocadas por la interacción de los Rx con los componentes de ésta, incluyendo posible agregación de las AuNP.

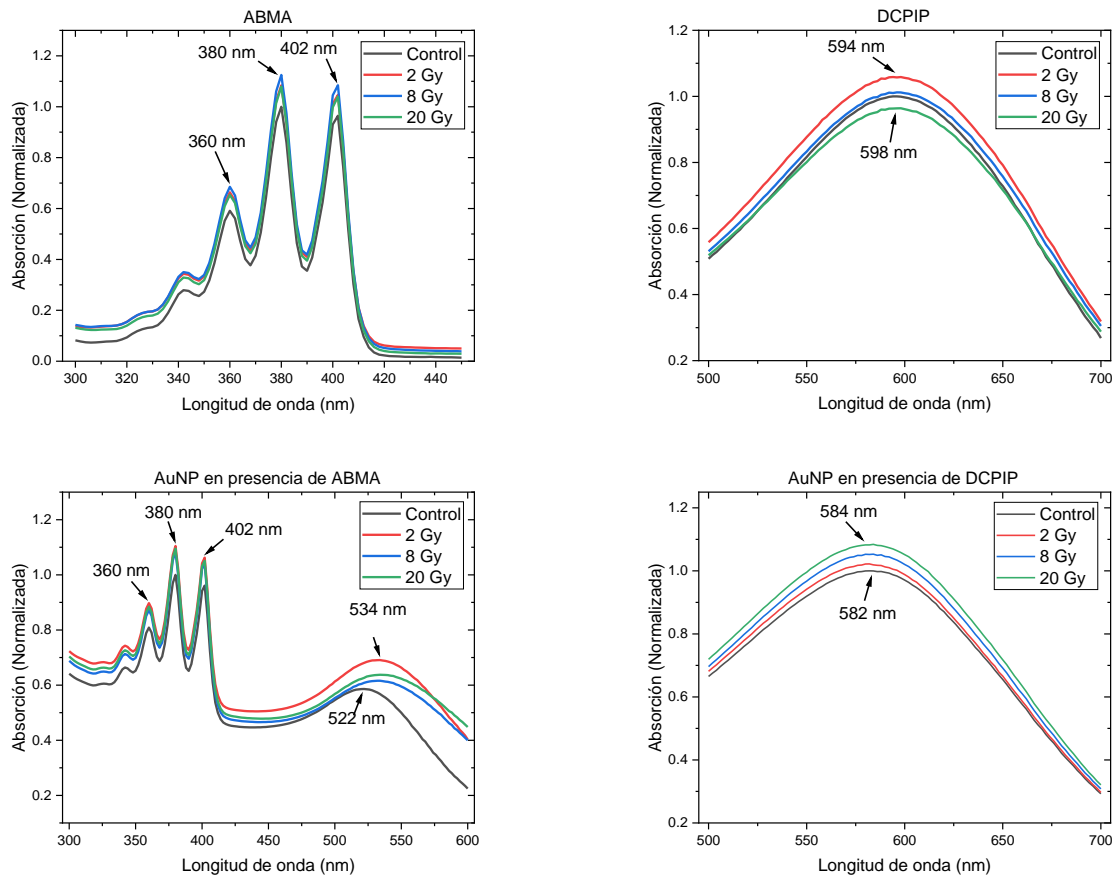


Figura 5.5. Espectros de absorción de las soluciones de ABMA y DCPIP en ausencia y presencia de AuNP al ser irradiadas con diferentes dosis de Rx de 6MV.

Se han publicado numerosos estudios *in vitro* sobre interacción de las NP Au con Rx. Una gran proporción de ellos se han enfocado en evaluar el incremento de la radiosensibilidad de diferentes líneas celulares en presencia de NP Au con diferentes energías de Rx. La producción de ROS en el medio que rodea la NP se considera un factor que contribuye al incremento de la radiosensibilidad (Bai *et al.*, 2020; Abdullahi *et al.*, 2021), pero ha sido poco abordada experimentalmente. Existe coincidencia en que la forma, el tamaño y la concentración de las NP, así como la energía de los Rx incidentes, la línea celular y la localización intracelular de las NP son los factores determinantes en el incremento de la radiosensibilidad (Chithrani *et al.*, 2010; McMahon *et al.*, 2011; Kwatra, Venugopal and Anant 2013; Her, Jaffary and Allen 2017; Kenefal *et al.*, 2020; Abdollahi *et al.*, 2021).

Un aspecto importante en el aumento de la sensibilidad a los Rx que inducen las NP Au es la ionización que se produce en el medio que circunda la NP a causa de los electrones formados por la interacción NP-Rx (Chithrani et al 2010; Bai *et al.*, 2020; Abdollahi *et al.*, 2021). Experimentos con Rx de 6 MV demuestran que, aunque a esta energía la sección eficaz de interacción de los Rx con las NP Au es menor que a energías del orden de los kV (McMahon *et al.*, 2011; Ahn, Jung and Lee 2013,) las tasas de ionización del medio circundante son similares (Chithrani *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2011; McMahon *et al.*, 2011) debido a que la mayor cantidad de electrones secundarios que se produce, compensa la menor sección eficaz de interacción (Chithrani *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2011; McMahon *et al.*, 2011). De acuerdo con esto, se esperaba formación de radicales O_2^* y OH^* producto de la radiólisis del H_2O . Sin embargo, estas especies no fueron detectadas por el DCPIP.

Dado que el 1O_2 se forma debido a los electrones calientes producto de la excitación plasmónica (epígrafe 3.2.2) resulta congruente que no se haya detectado su presencia en las soluciones de ABMA. La excitación del plasmón a las longitudes de onda de los Rx es insignificante por lo que las ROS intracelulares observadas por Geng y col. (2011) se deben con alta probabilidad a: (a) la radiólisis del H_2O presente en la célula provocada por los Rx y (b) a reacciones que los electrones secundarios formados por la interacción Rx-NP provocan en el entorno de ésta. Ambos mecanismos son relevantes en el mejoramiento de la radiosensibilidad a energías de 6 MV (Bai *et al.*, 2020; Abdollahi *et al.*, 2021).

Otro motivo por el cual se esperaba producción de ROS al irradiar con Rx es que la superficie de las NP Au es capaz de catalizar reacciones químicas (Her, Jaffray and Allen 2017). Sin embargo, no se evidenció producción de O_2^* y OH^* probablemente debido al pequeño tamaño de las AuNP, la baja concentración de NP utilizada en el experimento, la energía de los Rx y la relativamente baja dosis de radiación.

El *tamaño de la NP Au* juega un papel fundamental en la producción de electrones secundarios y en la distribución subcelular de la NP. A mayor tamaño de NP mayor cantidad de electrones secundarios (Leung *et al.*, 2011). A mayor concentración subcelular de NP mayor efecto radiosensibilizador (Chithrani *et al.*, 2010; Kodiha *et al.*, 2015; Cchour *et al.*, 2016'; Her, Jaffray

and Allen 2017). Existe consenso en que para energías de Rx de similar orden a 6 MV las NP Au de 14-100 nm provocan más radiosensibilidad que las más pequeñas (Su *et al.*, 2014; Her, Jaffray and Allen 2017; Kenefal *et al.*, 2020). Igualmente se ha comprobado que a igual concentración de NP la mejor captación celular se obtiene con NP de 50 nm (Chithrani *et al.*, 2010).

La *concentración de NP* es un factor decisivo en el incremento de la radiosensibilidad. Experimentos con células tumorales *in vitro* e *in vivo* indican que los mejores efectos se logran a concentraciones de NP del orden de mg/g de tejido (Chithrani *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2014; Her, Jaffray and Allen 2017) muy superiores a las utilizadas en nuestro experimento.

La *energía de los Rx* incidentes, como se ha descrito (epígrafe 3.1), define los mecanismos de interacción Rx-NP Au y la producción de electrones secundarios, responsables de la formación de ROS. Experimentos *in vitro* con soluciones acuosas de NP Au irradiadas con Rx de 100 kV han constatado la presencia de O_2^{*-} y OH^* , debido a la radiólisis del agua causada, fundamentalmente por los fotoelectrones, los electrones Auger y los Rx característicos que se producen debido a la interacción Rx-NP (Kwatra, Venugopal and Anant 2013; Her, Jaffray and Allen 2017). En experimentos *in vitro* con células se ha confirmado que cuando se utilizan Rx de 6 MV se requieren concentraciones de NP 300 veces mayores para obtener el mismo efecto radiosensibilizador ya que las dosis absorbidas son menores que a energías de kV (Su *et al.*, 2014).

La baja dosis de radiación empleada influyó también en los resultados. Los experimentos más exitosos de incremento de la sensibilidad celular a los Rx utilizan dosis de radiación superiores (Her, Jaffray and Allen 2017).

5.2. Incremento de temperatura

El calentamiento instantáneo que se produce al irradiar con luz visible una NP de Au tiene un profundo efecto sobre ella y sobre el medio circundante (Hashimoto *et al.*, 2012; Hogan *et al.*, 2020). Este calentamiento ocurre debido a varios mecanismos de transferencia de energía desde la NP hacia el entorno que dependen de las propiedades de la partícula (tamaño, forma,

estado de agregación), las características del láser (longitud de onda, intensidad de la iluminación, continuo o pulsado, duración del pulso), la capacidad calorífica del medio circundante (Huang and El-Sayed 2010; Hashimoto *et al.*, 2012; Chen, Li and Wang 2014; Yao *et al.*, 2016; Amendola *et al.*, 2017; Kim and Lee 2018; Moustououi *et al.*, 2019; Hogan *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021) y el ángulo de incidencia del láser sobre la suspensión de NP (Hogan *et al.*, 2020).

En la Figura 5.6 se muestra el incremento de T en el medio provocado por las AuNP (PBS) y AuNPf (tolueno) al ser irradiadas a 532 nm (0.03 J/cm^2) y 1064 nm (1.91 J/cm^2) entre 0 y 10 min. Cuando se irradia a 532 nm ambas NP inducen un incremento gradual de T del disolvente de hasta $5 \text{ }^\circ\text{C}$, aunque la velocidad de elevación de T de las AuNPf fue ligeramente superior en los primeros minutos de irradiación.

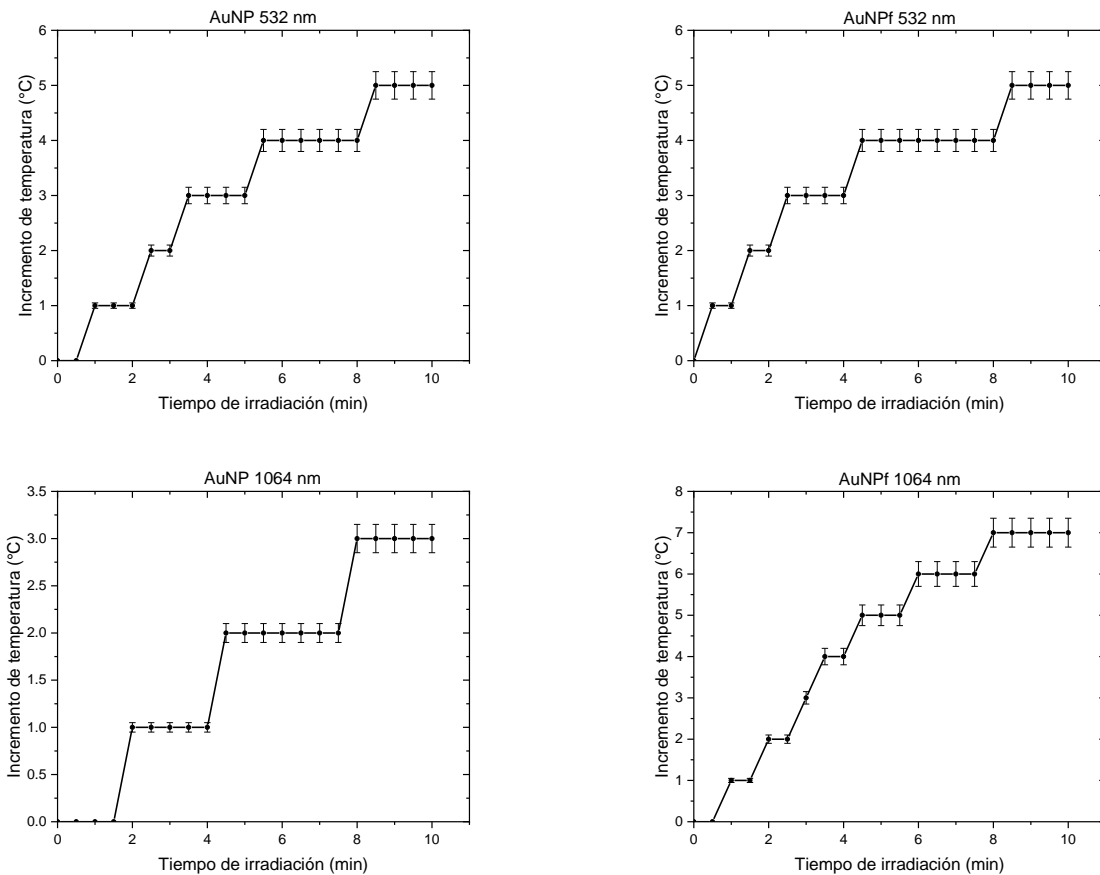


Figura 5.6. Gráfica de temperatura vs tiempo de irradiación bajo luz láser de 532 nm de AuNP y AuNPf.

El aumento de T de la solución circundante de las AuNP al irradiar a 532 nm y 1064 nm durante 10 min fue de 5 °C y 3 °C respectivamente, coherente con el resultado de la irradiación observado en la Figura 5.1. A bajas intensidades del láser prevalece el mecanismo fototérmico, más eficiente a 532 nm debido a que la sección eficaz de absorción es mayor que a 1064 nm, pues a 532 nm la absorción se corresponde casi totalmente con la extinción (Hashimoto *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2017; Sarfraz and Khan 2021). Otros autores han reportado también mayor efecto fototérmico a 532 nm que a 1064 nm al irradiar AuNP de 14 nm (Mendes *et al.*, 2017). Sin embargo, dado que a 1064 nm se utilizó una fluencia del láser mucho mayor que a 532 nm (1.91 J/cm² vs 0.03 J/cm²) se esperaba un mayor aumento de T de la suspensión de AuNP al irradiar a 1064 nm ya que a mayor energía/cm² debe producirse una mayor población de electrones calientes, que son los responsables iniciales de la elevación de T en la NP (Huang and El-Sayed 2010; Hashimoto *et al.*, 2012; Amendola *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2020; Carrasco *et al.*, 2020; George *et al.*, 2022) y, por consiguiente, del aumento de T del medio circundante (Chadwick *et al.*, 2016; Hashimoto *et al.*, 2012). Esta aparente contradicción confirma que el mecanismo de inducción del efecto fototérmico en las NP Au depende de combinaciones muy diversas de las variables ya mencionadas.

En láseres pulsados la generación de ROS es más eficiente que el calentamiento térmico (Hashimoto *et al.*, 2012; Pasparakis 2013). Cuando el tamaño del pulso es del orden de fs-ps la irradiación provoca una eficiente disminución del tamaño de la partícula, proporcional a la potencia del láser que puede monitorearse, como se aprecia en las Figuras 5.1-5.3, por la disminución de la intensidad de λ_{\max} (Huang and El-Sayed 2010; Hashimoto *et al.*, 2012) Algunos autores señalan que a menor tamaño de la NP mayor es la generación de calor (Jain *et al.*, 2006; Wrigglesworth and Johnston, 2021). Las intensidades del láser utilizadas tanto a 532 nm como a 1064 nm son mayores que el umbral para la reducción del tamaño de la NP (6.1 mJ/cm² - 120 mJ/cm², Hashimoto *et al.*, 2012), pero la intensidad de irradiación a 1064 nm fue significativamente superior a la utilizada a 532 nm, por lo que se esperaba una mayor disminución de tamaño de la NP y, por tanto, mayor calentamiento del medio. Cuando la NP disminuye su tamaño por debajo de 2 nm la conversión de luz en calor es cercana al 100% (Sarfraz and Khan 2021).

Otro aspecto que puede haber influido en el menor aumento de T a 1064 nm es que a medida que se incrementa la fluencia de los láseres pulsados se estimula también la formación burbujas (cavitación) alrededor de la NP (Amendola *et al* 2006; Hashimoto *et al.*, 2012; Serkov *et al.*, 2015) que, presumiblemente, provoca disminución del índice de refracción del agua en la vecindad de la NP, desde 1.33 a 1.0, induciendo menor absorción óptica (Hashimoto *et al.*, 2012). A menor absorción óptica, menor producción de electrones calientes, menor calentamiento de la red en la NP y, por tanto, menor aumento de T del medio. La sinergia de estos procesos es, al parecer, la responsable del menor aumento de T inducido por las AuNP al ser irradiadas a 1064 nm (3 °C) con respecto a la irradiación a 532 nm (5 °C).

Cuando las AuNPf se irradiaron a 532 nm se observó el mismo incremento de T (5 °C) que el inducido por las AuNP (Figura 5.6). Sin embargo, al irradiar a 1064 nm el incremento de T fue mucho mayor (7 °C) que en las Au NP. Las diferencias de superficie de las NP sumado a las diferencias fisicoquímicas entre el medio acuoso y el medio orgánico que rodean las AuNP y AuNPf respectivamente provocaron estos resultados. El tolueno en el que están disueltas las AuNPf es un líquido muy volátil, su índice de refracción (1.49) es mayor que el del agua (1.33) y su capacidad calórica mucho menor. A mayor índice de refracción, como se ha descrito (epígrafe 5.1.1), la absorción óptica es mayor, lo que incrementa la producción de electrones calientes que depende fuertemente de la relación absorción/dispersión (Amendola *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018; Hogan *et al.*, 2020). A esto se une que la mayor fluencia del láser a 1064 nm provocó la evaporación de una gran parte del tolueno (observado a simple vista), con el consiguiente incremento de la concentración de NP en el medio. Cuando la concentración de NP se incrementa de manera apreciable se induce agregación (Amendola *et al.*, 2006; Serkov *et al.*, 2015) con la consiguiente alteración de sus propiedades. Como la agregación produce corrimientos batocrómicos de λ_{\max} , es posible que se haya incrementado la absorción a 1064 nm y, por tanto, se haya producido una mayor población de electrones calientes a esta longitud de onda con el consiguiente aumento de T en la red de la NP (Serkov *et al.*, 2015; Amendola *et al* 2017). La menor capacidad calórica del tolueno con respecto al agua indujo también un mayor aumento de T en la solución orgánica. La ocurrencia simultánea de estos procesos contribuyó a que en la solución de AuNPf se produjera mayor aumento de T al ser irradiada a

1064 nm con respecto a la irradiación a 532 nm. Otros autores han reportado que cuando las NP se concentran aumentan los efectos fototérmico y fotodinámico (Serkov *et al.*, 2015; Kim and Lee 2018).

No obstante, el aumento de T observado al irradiar las AuNP y AuNPf no fue significativo. Se ha demostrado que las nanoesferas de Au de pequeño tamaño son menos eficientes que otras formas de NP en convertir la luz en calor (Yang *et al.*, 2015; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020). Algunos autores consideran que para un buen efecto fototérmico el diámetro de la nanoesfera debe estar entre 10-30 nm (Mendes *et al.*, 2017; Guerrero-Florez *et al.*, 2020). La toxicidad celular observada al irradiar NP de Au endocitadas con láseres pulsados incapaces de elevar significativamente la T del medio, atribuida por algunos autores a efecto fototérmico (Krpetic *et al.*, 2010; Vankayala *et al.*, 2014), es cuestionada por investigadores que consideran que la producción de ROS y no la elevación de la T es la principal causante de la muerte celular (Pasparakis 2013; Chadwick *et al.*, 2016;). A diferencia de los láseres continuos, que sí provocan un apreciable efecto fototérmico (Huang and El-Sayed 2010; Yang *et al.*, 2015), cuando se utilizan láseres pulsados los incrementos de T son ligeros (Hogan *et al.*, 2020) como los observados en nuestro experimento. Para alcanzar incrementos de T elevados se requieren intensidades luminosas muy altas en ocasiones superiores a las dosis máximas tolerables por la piel (Yang *et al.*, 2015; Chadwick *et al.*, 2016). No obstante, un aumento de 5 °C como el observado al irradiar las NP a 532 nm significa un aumento de T en un tejido de 37°C a 42°C, que contribuye a aumentar la citotoxicidad debida a la producción de ROS (Pasparakis 2013; Bai *et al.*, 2020; Guerrero-Florez *et al.*, 2020) ya que el calentamiento celular por encima de 41 °C puede causar efecto fototérmico (Yang *et al.*, 2015) debido a desnaturalización de proteínas y rompimiento de la membrana celular, más acentuado en las células de cáncer por ser menos resistentes a la T que las células normales (Bai *et al.*, 2020; Guerrero-Florez *et al.*, 2020).

5.3. Evaluación de las AuNP como agentes de imagen

La radiología médica de contraste se basa en la desigual absorción de Rx que experimentan los diferentes tejidos del cuerpo. Cuando los Rx atraviesan la materia se produce absorción y dispersión. La intensidad de estos procesos define el grado de atenuación (epígrafe 3.1).

Mientras mejor sea la diferencia de atenuación entre los tejidos, en particular la absorción, mejor es el contraste y mejor la imagen. Los materiales que absorben intensamente los Rx se utilizan para incrementar el contraste en la imagen. Existen diferentes medios de contraste, entre los que destacan las NP Au de pequeño tamaño (Mc Mahon *et al.*, 2011; Ahn, Jung and Lee 2013; Mahan and Doiron 2018; Hu *et al.*, 2020; Abdullahi *et al.*, 2021). Su coeficiente de absorción de Rx es superior al del yodo y del bario, dos agentes de contraste muy utilizados en radiografía (Jung and Lee 2013; Mahan and Doiron 2018), experimentan menos interferencia de huesos y tejidos, por lo que brindan mejor contraste a dosis de radiación más bajas. A esto se suma que como pueden permanecer en sangre más tiempo que las soluciones de yodo, proporcionan mayor tiempo para la toma de imagen. (Ahn, Jung and Lee 2013; Abdollahi *et al.*, 2021). Sin embargo, los resultados de imagen de Rx por contraste en presencia de NP Au dependen significativamente de las condiciones experimentales. Mientras que algunos autores consideran que la imagen apenas depende del tamaño y la forma de las NP (Ahn, Jung and Lee 2013), otros señalan lo contrario (Konefal *et al.*, 2020). No obstante, existe unanimidad de criterios en cuanto a las bondades de las NP Au como medio de contraste. Debido a esto, para conocer las potencialidades de una NP Au específica como medio de contraste se requiere evaluar la atenuación que experimentan los Rx en las condiciones experimentales previstas.

En la Tabla 5.1 se observa la intensidad de Rx detectada después de atravesar suspensiones de tres concentraciones diferentes de las AuNP evaluadas. A mayor concentración de AuNP la intensidad registrada por el detector de imagen es menor, lo que indica mayor atenuación de los Rx. Este efecto ha sido descrito previamente para Rx de varios cientos de keV y para radiación γ utilizada en braquiterapia (Chen *et al.*, 2014; Cole *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2020; Konefal *et al.*, 2020), por lo que el resultado confirma que las AuNP esféricas de 5 nm son potenciales agentes para imagen de Rx, aunque se requieren experimentos adicionales *in vitro* e *in vivo* para confirmar el resultado.

Tabla 5.1. Intensidad de rayos X al atravesar suspensiones con distintas concentraciones de AuNP.

Suspensión (AuNP:DDW)	Intensidad registrada en el detector
5.46×10^{13} AuNP	2870 ± 54
2.73×10^{13} AuNP	3107 ± 56
1.37×10^{13} AuNP	3532 ± 59

5.4. Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad provocada en células T47D tratadas con AuNP e irradiación con láser

Cuando se proyecta utilizar NP *in vivo* es necesario entender primero su comportamiento *in vitro* a nivel celular. En ausencia de AuNP la irradiación de células T47D a 532 nm (5 min) no afectó significativamente (< 20%) la viabilidad celular. Sin embargo, la irradiación a 1064 nm (2 min) produjo una intensa disminución de la viabilidad celular (~80%). Otros autores han insistido en la importancia de la potencia del láser en la supervivencia celular (Krpetic *et al.*, 2010; Chadwick *et al.*, 2016). En presencia de AuNP la viabilidad celular disminuyó significativamente (> 60%) cuando se irradió a 532 nm, en tanto que al irradiar a 1064 nm la viabilidad celular disminuyó también de manera significativa (~90%, $p < 0.05$) aunque en menor proporción que la observada a 532 nm (Figura 5.7).

Para evaluar si el mecanismo de toxicidad inducida por las AuNP al irradiar con láser a 532 nm se debe a la producción de ROS previamente detectadas en solución, se irradiaron las células: (a) en presencia de AuNP y de liposomas cargados con siRNA/RAD51 y (b) en presencia de AuNP y de liposomas cargados con siRNA/SIRT3. El RAD51 repara con gran eficiencia las roturas de doble cadena (DBS) que se producen en el DNA debido, principalmente, a la radiación ionizante (Wassing and Esashi 2020) por lo que la irradiación en presencia de siRNA/RAD51 inhibe, en particular, este tipo de reparación. El SIRT3 promueve la longevidad celular mediante la activación de enzimas que minimizan los efectos causados por ROS en la mitocondria celular (Iwahara *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos al irradiar de acuerdo con los esquemas (a) y (b) muestran que la viabilidad celular disminuye aún más cuando se evita la reparación de las células dañadas. En ambos esquemas la disminución de la viabilidad fue >80%. Los liposomas

vacíos y cargados con siRNA/RAD51 y con siRNA/SIRT3 sin irradiar, utilizados como control, mostraron una toxicidad menor al 20%, 40% y 20% respectivamente lo que confirma que la irradiación en presencia de AuNP produce un efecto citotóxico notable en las células. Al inhibir la reparación celular se confirmaron los resultados previos de detección de ROS (epígrafes 5.1.1 y 5.1.2) pues las AuNP esféricas de 5 nm produjeron suficientes ROS para dañar el DNA celular. El ligero incremento de T que se produce también (epígrafe 5.1.4.) contribuyó a aumentar la citotoxicidad (Guerrero-Florez *et al.*, 2020). La irradiación en presencia de AuNP, de conjunto con siRNA/RAD51 y siRNA/SIRT3 confirmó el efecto catalizador del daño celular causado por las ROS inducidas por las AuNP (Li *et al.*, 2021). Ni las AuNP solas ni los inhibidores de la reparación celular solos o en presencia de AuNP fueron capaces de provocar citotoxicidad apreciable en ausencia de irradiación a 532 nm (Figura 5.7). Sólo la irradiación en presencia de AuNP produjo la significativa disminución de la viabilidad celular observada en la Figura 5.7, a la que también contribuyó el ligero efecto fototérmico que produce la irradiación.

Las ROS producidas al irradiar en presencia de las AuNP inducen estrés oxidativo, que causa apoptosis y necrosis (Parvez *et al.*, 2018; Bai *et al.*, 2020; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Ransy *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Shang *et al.*, 2021). Afectan la concentración de calcio intracelular, activan factores de transcripción e inducen producción de citocinas (Abdollahi *et al.*, 2021) causando daño en el ADN, interferencia con funciones de señalización y modulación de la transcripción genética (Khan *et al.*, 2012). El daño depende no solo del tipo y cantidad de ROS sino también de factores externos como temperatura, presencia de O₂ y el entorno celular (Ferreira dos Santos *et al.*, 2019; Abdollahi *et al.*, 2021).

La irradiación a 1064 nm provocó por sí sola, un efecto citotóxico significativamente mayor que a 532 nm (Figura 5.7). Esta mayor disminución de viabilidad celular al irradiar a 1064 nm (~80%) en ausencia de las NP en comparación con la irradiación a 532 nm se debe a que las células tienen agentes fototérmicos naturales que inducen formación de ROS cuando son irradiadas. Si bien la eficiencia de producción de ROS en las células es baja, cuando la intensidad del láser aumenta significativamente, como al irradiar a 1064 nm, esta eficiencia se incrementa de

manera apreciable (Mendes *et al.*, 2017). Se ha reportado también que la irradiación bifotónica puede aumentar la cantidad de ROS inducidas por las NP Au (Liaw, Quo and Sai 2021).

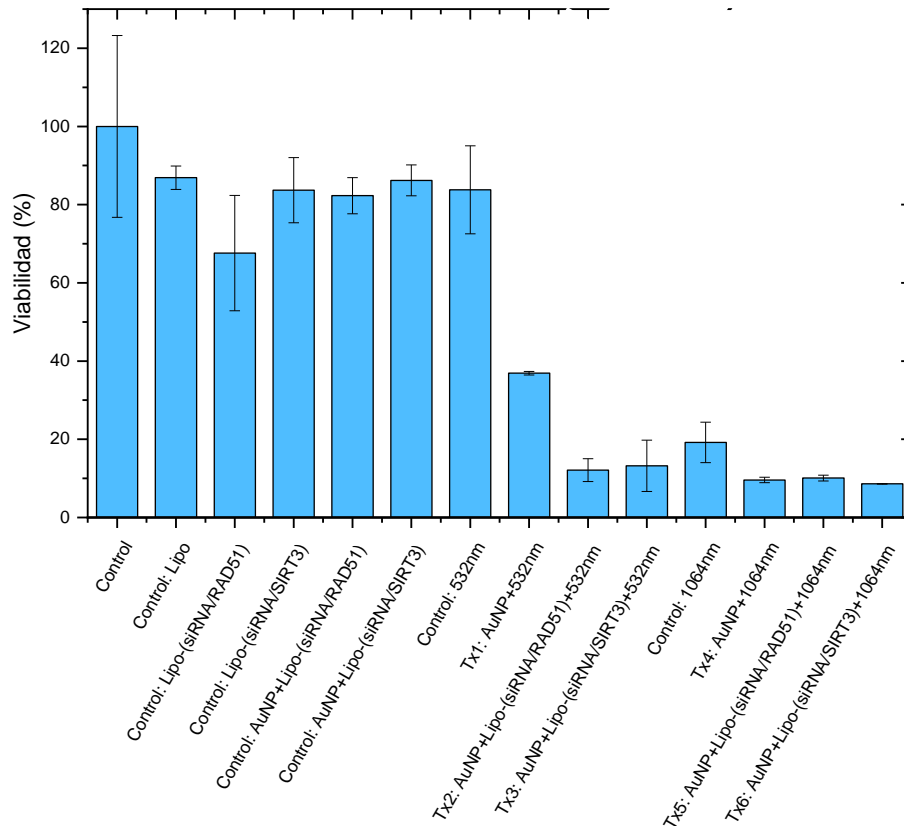


Figura 5.7. Irradiación de células T47D a 532 nm y 1064 nm en ausencia y presencia de AuNP de 5 nm. Se muestra también la irradiación en presencia de liposomas cargados con siRNA de RAD51, utilizado para inhibir la reparación del ADN celular y en presencia de SIRT3 utilizado para inhibir la reparación celular causada por ROS. Se muestra también la toxicidad de los sistemas en ausencia de radiación con y sin presencia de AuNP.

Entre los mecanismos que explican esta mayor producción de ROS en las células al irradiar a 1064 nm destacan (a) la mayor excitación de constituyentes aromáticos y de ácidos grasos celulares, que provoca mayor formación de 1O_2 , (Parvez *et al.*, 2018); (b) la irradiación a 1064 nm contribuye a la apoptosis (Liu *et al.*, 2021).; (c) en los láseres de fs-ps, como ya se ha descrito, la formación de burbujas (cavitación) puede inducir lisis celular (Yang *et al.*, 2015) cuya magnitud depende directamente de la intensidad del láser (Hashimoto *et al.*, 2012; Chadwick et al 2016).

Otro aspecto para considerar en la citotoxicidad observada en la Figura 5.7 es que las NP < 10 nm tienden a acumularse en la membrana celular donde existen enzimas capaces de inducir la producción de ROS (Mendes *et al.*, 2017; Parvez *et al.*, 2018; Bai *et al.*, 2020; Ransy *et al.*, 2020) incluso en ausencia de NP Au. El incremento de ROS en la superficie celular hace más vulnerables las células al efecto fototérmico (Guerrero-Florez *et al.*, 2020). Dado el pequeño tamaño de las AuNP, es posible que una porción de ellas se haya endocitado durante la incubación (Chhour *et al.*, 2016; Guerrero-Florez *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). La endocitosis a nivel de citoplasma o de núcleo incrementa significativamente la toxicidad celular (Chhour *et al.*, 2016; Woźniak *et al.*, 2017; Guerrero-Florez *et al.*, 2020).

Capítulo 6. Conclusiones y trabajo futuro

Se demostró que las AuNP y AuNPf esféricas de 5 nm son capaces de producir ROS al ser irradiadas tanto a 532 nm como a 1064 nm, independientemente de que se encuentren suspendidas en medio acuoso u orgánico, lo que constituye una ventaja para aplicaciones futuras. La producción de ROS inducida por las AuNP se confirmó no solo en presencia de ABMA y DCPIP, sino también mediante estudios de viabilidad celular con células T47D de cáncer mamario.

El efecto hipertérmico que las nanoestructuras evaluadas producen en el medio circundante es ligero, pero puede contribuir a la citotoxicidad inducida por las ROS ya que las células tumorales son más sensibles a la temperatura que las células sanas.

La irradiación con Rx de alta energía, generados con una diferencia de potencial de 6 MV no produjo los resultados esperados. Los cambios ocurridos en los espectros de absorción del ABMA y el DCPIP en presencia de AuNP no fueron secuenciales en una sola dirección, sino oscilantes, a diferencia de la degradación gradual que experimentan debido a la presencia de ROS.

La atenuación de Rx de diagnóstico, directamente proporcional a la concentración de AuNP, confirma que estas nanopartículas pueden ser utilizadas como agentes de imagen.

Los resultados obtenidos indican que las NP Au esféricas de 5 nm, “desnudas” o funcionalizadas con dodecanotiol, son agentes potenciales para diseñar sistemas teranósticos multimodales que impartan simultáneamente PTTT y PDT mediante irradiación con luz láser de 532 o 1064 nm y que es posible monitorear los efectos mediante imagen por Rx.

Capítulo 7. Referencias bibliográficas

Abdollahi, B.b., Malekzadeh, R., Azar, F.P., Salehnia, F., Naseri, A.R., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., Farajollahi, A.R. (2021). *Main Approaches to Enhance Radiosensitization in Cancer Cells by Nanoparticles: A Systematic Review*. *Adv Pharm Bull* 11(2):212-223 doi: 10.34172/apb.2021.02.

Ahn, S., Jung, S.Y., Lee, S.J. (2013) *Gold Nanoparticle Contrast Agents in Advanced X-ray Imaging Technologies*. *Molecules* 18:5858-5890; doi:10.3390/molecules18055858.

Al-Okour, A. (2021) *Radiation Physics: Radiation interaction with matter* *Materials Today: Proceedings* doi: 10.1016/j.matpr.2020.11.566.

Amendola, V., Polizzi, S., Meneghetti, M. (2006.) *Laser Ablation Synthesis of Gold Nanoparticles in Organic Solvents*. *J. Phys. Chem. B* 110 (14): 7232-7237 doi: 10.1021/jp0605092.

Amendola, V., Pilot, R., Frasca, M., Maragò, O.M., Iatì, M.A. (2017) *Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review*. *J. Phys.: Condens. Matter* 29: 203002 doi: 10.1088/1361-648X/aa60f3.

Attix, F.H. (1986) *Introduction to radiological physics and radiation dosimetry*. Wiley and Sons.

Bai, X., Wang, Y., Song, Z., Feng, Y., Chen, Y., Zhang, D., Feng, L. (2020) *The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment*. *Int J Mol Sci* 21(7):2480 doi: 10.3390/ijms21072480

Bucharskaya, A., Maslyakova, G., Terentyuk, G., Yakunin, A., Avetisyan, Y., Bibikova, O., Tuchina, E., Khlebtsov, B., Khlebtsov, N., Tuchin, V. (2016). *Towards effective photothermal/photodynamic treatment using plasmonic gold nanoparticles*. *Int J Mol Sci* 17(8)1295. doi:10.3390/ijms17081295.

Carrasco, E., Stockert, J.C., Juarranz, A., Blázquez-Castro, A. (2020). *Plasmonic Hot-Electron Reactive Oxygen Species Generation: Fundamentals for Redox Biology*. *Front Chem* 8:591325 doi: 10.3389/fchem.2020.591325.

Chadwick, S.J., Salah, D., Livesey, P.M., Brust, M., Volk, M. (2016) *Singlet oxygen generation by laser irradiation of gold nanoparticles*, J Phys Chem C, 120(19):10647–10657. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b02005>.

Chang, J., Taylor, R.D., Davidson, R.A., Sharmah, A., Wou, T. (2016). *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy Investigation of Radical Production by Gold Nanoparticles in Aqueous Solutions under X-ray Irradiation*, J Phys Chem A 120(18): 2815–2823. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b01755>.

Chen, X., Li, Q.W. and Wang, X.M. (2014) *Gold nanostructures for bioimaging, drug delivery and therapeutics*. Precious Met Biomed App. 163–176. Available at: <https://doi.org/10.1533/9780857099051.2.163>.

Chhour, P., Naha, P.C., Cheheltani, R., Benardo, B., Mian, Sh., Cormode, D.P. (2016) *Gold nanoparticles for biomedical applications: Synthesis and in vitro evaluation* In: Lu, Z.R., Sakuma, S. (eds) *Nanomaterials in Pharmacology. Methods in Pharmacology and Toxicology*. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3121-7_5

Chilakamarthi, U. and Giribabu, L. (2017) *Photodynamic Therapy: Past, Present and Future Chemical Record*. John Wiley and Sons Inc., pp. 775–802. Available at: <https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>.

Chithrani, D.B., Jelveh, S., Jalali, F., van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R.G., Hill, R.P., Jaffray, D.A. (2010) *Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy* Radiat Res 173: 719–728 doi: 10.1667/RR1984.1

Cole, L.E., D Ross, R., Tilley, J. M., Vargo-Gogola, T., Roeder, R.K. (2015) *Gold nanoparticles as contrast agents in X-ray imaging and computed tomography*. Nanomedicine (Lond) 10(2): 321–341. doi: 10.2217/nnm.14.171.

Dreaden, E.C. Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., El-Sayed, M.A. (2012). *The golden age: gold nanoparticles for biomedicine* Chem. Soc. Rev., 41:2740–2779 doi: 10.1039/c1cs15237h.

Dvoranová, D., Barbieriková, Z., Dorotíková, S., Malček, M., Brincko, A., Rišpanová, L., Bučinský, L., Staško, A., Brezová, V., Rapta, P. (2015) *Redox processes of 2,6-dichlorophenolindophenolate in different solvents. A combined electrochemical, spectroelectrochemical, photochemical, and theoretical study* J Solid State Electrochem doi: 10.1007/s10008-015-2823-x.

Elahi, N., Kamali, M. and Baghersad, M.H. (2018) *Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review* Talanta 184:537-556 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>.

Entradas, T., Waldron, S. and Volk, M. (2020) *The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments* J Photochem Photobiol B: Biology, 204:111787. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787>.

Eshghi, H. Sazgarnia, A., Rahimizadeh, M., Attaran, N., Bakavoli, M., Soudmand, S. (2013) *Protoporphyrin IX-gold nanoparticle conjugates as an efficient photosensitizer in cervical cancer therapy Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(3):304–312 doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.02.003.

Ferreira dos Santos, A., Queiroz de Almeida, D.R., Ferreira Terra, L., Baptista, M.S., Labriola, L. (2019) *Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review*. J Cancer Metastasis Treat 2019; 5:25-45; doi: 10.20517/2394-4722.2018.83.

Gao, L., Liu, R., Gao, F., Wang, Y., Jiang, X., Gao, X. (2014). *Plasmon-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species from Near - Infrared Light Excited Gold Nanocages for Photodynamic Therapy in Vitro*. ACS Nano 8(7):7260-7271 <https://doi.org/10.1021/nn502325j>.

Geng, F., Song, K., Xing, J.Z., Yuan, C., Yang, S., Yang, Q., Chen, J., Kong, B., 2011. *Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer*. Nanotechnology 22: 285101 doi:10.1088/0957-4484/22/28/285101

George, B.P., Chota, A., Sarbadhikary, P., Abrahamse, H. (2022) *Fundamentals and applications of meta-nanoparticle-enhanced singlet oxygen generation for improved cancer photodynamic therapy* Front Chem 10: 964674 <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.964674>.

Ghosh, S.K., Pal, T., 2007. *Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications*. Chem. Rev 107(11): 4797–4862 <https://doi.org/10.1021/cr0680282>.

Guerrero-Florez, V., Méndez, S.C., Patron, A.A., Rodríguez González, V., Blach, D., Martínez, O.F. (2020) *Gold nanoparticle-mediated generation of reactive oxygen species during plasmonic photothermal therapy: A comparative study for different particle sizes, shapes, and surface conjugations* J Mater Chem B, 8(14):2862–2875. <https://doi.org/10.1039/d0tb00240b>.

Guo, J., Rahme, K., He, Y., Li, L-L., Holmes, J.D., O’Driscoll, C.M. (2017). *Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics*. Int J Nanomedicine 12:6131-6152. doi: 10.2147/IJN.S140772.

Haimov, E., Weitman, H., Polani, S., Schori, H., Zitoun, D., Shefi, O. (2018) *Meso-Tetrahydroxyphenylchlorin-Conjugated Gold Nanoparticles as a Tool to Improve Photodynamic Therapy*, ACS Appl Mat Interfaces 10(3):2319–2327. doi: 10.1021/acsami.7b16455.

Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N. and Smilowitz, H.M. (2004) *The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice*. Phys Med Biol 49(18): N309-15. doi: 10.1088/0031-9155/49/18/n03.

Hashimoto, S., Werner, D., Uwada, T. (2012). *Studies on the interaction of pulsed lasers with plasmonic gold nanoparticles toward light manipulation, heat management, and nanofabrication*. J Photochem Photobiol C 13: 28-54 doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2012.01.001.

Hapurachchige and Artemov (2020). *Theranostic Pretargeting Drug Delivery and Imaging Platforms in Cancer Precision Medicine*. Front Oncol 10:1131 <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01131>.

Her, S., Jaffray, D.A., Allen, C. (2017) *Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements*. Adv Drug Deliv Rev 109:84-101 <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.012>

Hirsch, L.R. Stafford, R.J., Bankson, J.A., Sershen, S.R., Rivera, B., Price, R.E., Hazle, J.D., Halas, N.H., Westet, J.L. (2003) *Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under*

magnetic resonance guidance. Proc Natl Acad Sci USA 100(23):13549-54. doi: 10.1073/pnas.2232479100.

Hogan, N., Wu, S., Sheldon, M. (2020). *Photothermalization and Hot Electron Dynamics in the Steady State*. J Phys Chem C 124(9): 4931-4945 DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b08916.

Hu, X., Zhang, Y., Ding, T., Liu, J., Zhao, H. (2020) *Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities*. Fronts Bioeng Biotechnol 8: 990 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00990>.

Huang, X. and El-Sayed, M.A. (2010) *Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy* J Adv Res 1(13):13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>.

Huang, X. and El-Sayed, M.A. (2011) *Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT)* Alexandria J Med 47(1): pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2011.01.001>.

Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V., Reinberg, D., 2012. *SIRT3 Functions in the Nucleus in the Control of Stress-Related Gene Expression*. Molec Cell Biol 32(24):5022-5034 doi: 10.1128/MCB.00822-12.

Jahn, B., Jonasson, N.S.W., Hu, H., Singer, H., Pol, A., Good, N. M., Op den Camp, H. J. M., Martinez-Gomez, N. C., Dauman, L. J. (2020). *Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays*. J Biol Inorg Chem 25:199–212 <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01752-9>.

Jain, P.K., Lee, K.S., El-Sayed, I.H., El-Sayed, M.A. (2006) *Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine*, J Phys Chem B, 110(14): 7238–7248. <https://doi.org/10.1021/jp057170o>.

Jiménez-Mancilla, N., Ferro-Flores, G., Santos-Cuevas, C., Ocampo-García, B., Luna-Gutiérrez, M., Azorín-Vega, E., Isaac-Olivé, K., Camacho-López, M., Torres-García, E. (2013) *Multifunctional targeted therapy system based on ^{99m}Tc/ ¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles-Tat (49-57)-Lys3-*

bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells J Labelled Compd Radiopharm 56(13): 663–671. doi: 10.1002/jlcr.3087.

J Jiménez-Mancilla, N.P, Aranda-Lara, L., Morales-Ávila, E., Camacho-López, M.A., Ocampo-García, B. E, Torres-García, E., Estrada-Guadarrama, J.A., Santos-Cuevas, C.L., Isaac-Olivé, K. (2021) *Electron transfer reactions in rhodamine: Potential use in photodynamic therapy* J Photochem Photobiol A: Chemistry, 409: 113131. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113131>.

Keller, H., Saracino, M., Nguyen, H.M.T., Huynh, T.M.T., Broekmann, P. (2012). *Competitive Anion/Water and Cation/Water Interactions at Electrified Copper/Electrolyte Interfaces Probed by in Situ X-ray Diffraction*. J Phys Chem C 116: 11068-11076 [dx.doi.org/10.1021/jp301709z](https://doi.org/10.1021/jp301709z).

Kessel, D. and Oleinick, N.L. (2018) *Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update*, Photochem Photobiol. 94(2): 213–218. doi: 10.1111/php.12857.

Khan, M.I., Mohammad, A., Patil, G., Naqvi, S.A., Chauhan, L.K., Ahmad, I. (2012). *Induction of ROS, mitochondrial damage, and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles*. Biomaterials 33(5):1477-88 doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.080.

Kim, H.S., Lee, D.Y., (2018). *Near-Infrared-Responsive Cancer Photothermal and Photodynamic Therapy Using Gold Nanoparticles*. Polymers 10(9): 961 doi:10.3390/polym10090961.

Kodiha, M., Wang, Y.M., Hutter, E., Maysinger, D., Stochaj, U. (2015) *Off to the Organelles - Killing Cancer Cells with Targeted Gold Nanoparticles*. Theranostics 5(4) 357-370 doi: 10.7150/thno.10657.

Konefał, A., Lniaka, W., Rostocka, J., Orlef, A., Sokół, M., Kasperczyk, J., Jarzabek, P., Wronskad, A., Rusiecka K. (2020.) *Influence of a shape of gold nanoparticles on the dose enhancement in the wide range of gold mass concentration for high-energy X-ray beams from a medical linac*. Rep Pract Oncol Radiother 25(4):579-585 doi: 10.1016/j.rpor.2020.05.003.

Krpetić, Z., Nativo, P., See, V., Prior, J.A., Brust, M., Volk, M. (2010). *Inflicting Controlled Nonthermal Damage to Subcellular Structures by Laser-Activated Gold Nanoparticles*. *Nano Lett* 10(11): 4549-4554 DOI: 10.1021/nl103142t.

Kwatra, D.; Venugopal, A.; Anant, S. (2013) *Nanoparticles in radiation therapy: A summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer*. *Transl. Cancer Res.* 2(4): 330–342

Leung, M.K.K., Chow, J.C.L., Chithrani, B.D., Lee, M.J.G., Oms, B., Jaffray, D.A. (2011) *Irradiation of gold nanoparticles by x-rays: Monte Carlo simulation of dose enhancements and the spatial properties of the secondary electrons production* *Med Phys* 38(2):624-631 doi: 10.1118/1.3539623.

Li, Y., Yang, J. and Sun, X. (2021) *Reactive Oxygen Species-Based Nanomaterials for Cancer Therapy* *Front. Chem. Secc Nanoscience*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.650587>.

Liaw, J.-W., Kuo, C.-Y. and Tsai, S.-W. (2021) *The Effect of Quasi-Spherical Gold Nanoparticles on Two-Photon Induced Reactive Oxygen Species for Cell Damage* *Nanomaterials*, 11(5):1180. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano11051180>.

Liang, S., Shu, Y., Li, K., Jian, J., Huang, H., Deng, J., Leung, D.Y.C., Wu, M., Zhang, Y. (2020) *Mechanistic insights into toluene degradation under VUV irradiation coupled with photocatalytic oxidation*. *J Haz Materials* 399:122967 doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122967.

Liu, X-Y., Wang, J-Q., Ashby, C.R, Jr., Zeng, L., Fan, Y-F., Chen, Z-S. (2021). *Gold nanoparticles: synthesis physiochemical properties and therapeutic applications in cancer*. *Drug Discov Today* 26(5): 1284-1292. doi: 10.1016/j.drudis.2021.01.030.

Lukianova, M.A., Sosulin, I.S., Tyurin, D.A., Feldman, V.I. (2020) *Radiation-induced transformations of isolated toluene molecules in low-temperature matrices: Towards better understanding of molecular radiation chemistry in condensed phases*. *Radiat Phys Chem* 176:109022 <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.109022>.

Mahan, M. M., Doiron, A.L. (2018) *Gold Nanoparticles as X-Ray, CT, and Multimodal Imaging Contrast Agents: Formulation, Targeting, and Methodology*. J Nanomat. 2018:5837276. <https://doi.org/10.1155/2018/5837276>.

Mayer, K.M., Hafner, J.H. (2011). *Localized Surface Plasmon Resonance Sensors*. Chem Rev 111(6): 3828-3857 <https://doi.org/10.1021/cr100313v>.

McMahon, S.J., Hyland, W.B., Muir, M.F., Coulter, J.A., Jain, S., Butterworth, K.T., Schettino, G., Dickson, G.R., Hounsell, A.R., O'Sullivan, J.M., Prise, K.M., Hirst, D.G. (2011). *Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy*. Radiother Onc 100: 412-416

Meiliana, A., Dewi, N.M. and Wijaya, A. (2016) *Personalized Medicine: The Future of Health Care* Indonesian Biomed J 8(3):127. <https://doi.org/10.18585/inabj.v8i3.271>.

Mendes, R., Pedrosa, P., Lima, J.C., Fernandes, A.R., Baptista, P.V. (2017). *Photothermal enhancement of chemotherapy in breast cancer by visible irradiation of Gold Nanoparticles*. Scientific Rep 7:10872 | DOI:10.1038/s41598-017-11491-8.

Misawa, M. and Takahashi, J. (2011) 'Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(5), pp. 604–614. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.01.014>.

Moustaoui, H., Saber, J., Djeddi, I., Liu, Q., Diallo, A.T., Spadavecchia, J., de la Chapelle, M.L., Djaker, N. (2019) *Shape and Size Effect on Photothermal Heat Elevation of Gold Nanoparticles: Absorption Coefficient Experimental Measurement of Spherical and Urchin-Shaped Gold Nanoparticles* J Phys Chem C 123(28):17548–17554. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b03122>.

Negishi, Y., Nakazaki, T., Malola, S., Takano, S., Niihori, Y., Kurashige, W., Yamazoe, S., Tsukuda, T., Hakkinen, H (2015). *A Critical Size for Emergence of Nonbulk Electronic and Geometric Structures in Dodecanethiolate-Protected Au Clusters*. J Am Chem Soc 137(3):1206-1212 <https://doi.org/10.1021/ja5109968>.

O'Neal, D.P., Hirsch, L.R., Halas, N.J., Payne, J.D., Westet, J.L. (2004) *Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles* Cancer Lett, 209(2):171–176. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.02.004>.

Oumano, M., Russell, L., Salehjahromi, M., Shanshan, L., Sinha, N., Ngwa, W., Yu, H. (2021) *CT imaging of gold nanoparticles in a human-sized phantom*, J Appl Clin Med Phys, 22(1):337–342 doi:10.1002/acm2.13155.

Panahi, Y., Mohammadhosseini, M., Nejati-Koshki, K., Abadi, A.J.N., Moafi, H.F., Akbarzadeh, A., Farshbaf, M. (2017). *Preparation, Surface Properties, and Therapeutic Applications of Gold Nanoparticles in Biomedicine*. Drug Res (Stuttg)67(2):77-87. doi: 10.1055/s-0042-115171.

Pantiushenko, I.V., Rudakovskaya, P.G., Starovoytova, A.V., Mikhaylovskaya, A.A., Abakumov, M.A., Kaplan, M.A., Tsygankov, A.A., Majouga, A.G., Grin, M.A., Mironov, A.F. (2015) *Development of bacteriochlorophyll a-based near-infrared photosensitizers conjugated to gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer*, Biochem (Moscow), 80(6):752–762. Doi:10.1134/S0006297915060103.

Parvez, S., Long, M.J.C., Poganik, J.R., Aye, Y. (2018.) *Redox Signaling by Reactive Electrophiles and Oxidants*. Chem Rev 118:8798-8888 DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00698.

Pasparakis, G. (2013) *Light-induced generation of singlet oxygen by naked gold nanoparticles and its implications to cancer cell phototherapy* Small, 9(24):4130–4134. doi: 10.1002/smll.201301365.

Peixoto de Almeida, M., Pereira, E., Baptista, P., Gomes, I., Figueiredo, S., Soares, L., Franco, R. (2014). *Gold Nanoparticles as (Bio)Chemical Sensors*. In: Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry 1st Ed. Edited by: Valcarcel, M., Lopez-Lorente, A., Chp 13: 529-567 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63285-2.00013-4>.

Pestana, Z. (2007). *Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial uncoupling*. Toxicology in Vitro 21:782–788 doi: 10.1016/j.tiv.2007.01.012.

Pitsillides, C.M. *et al.* (2003) 'Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles', *Biophysical Journal*, 84(6), pp. 4023–4032. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75128-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75128-5).

Quintos-Meneses, H.A., Aranda-Lara, L., Morales-Ávila, E., Torres-García, E., Camacho-López, M.A., Sánchez-Holguín, M., Luna-Gutiérrez, M.A., Ramírez-Durán, N., Isaac-Olivé, K. (2020). *In vitro irradiation of doxorubicin with ¹⁸F-FDG Cerenkov radiation and its potential application as a theragnostic system.* *J Photochem Photobiol, B: Biology* 210:111961 <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111961>.

Ransy, C., Vaz, C., Lombès, A., Bouillaud, F. (2020). *Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue.* *Int J Mol Sci* 21:9149; doi:10.3390/ijms21239149.

Ren, M., Rigele, A., Shun, N., Natsagdorg, N. (2022) *A quantum chemical study of the interaction of carboxylic acids with DMSO.* *Mongolian J Chem* 23(49): DOI:10.5564/mjc. v23i49.1407

Sahu, A.K., Das, A., Ghosh, A., Raj, S. (2021). *Understanding blue shift of the longitudinal surface plasmon resonance during growth of gold nanorods.* *Nano Express* 2: 010009 <https://doi.org/10.1088/2632-959X/abd966>

Sani, A., Cao, C. and Cui, D. (2021) *Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review* *Biochem Biophys Reports* 26: 100991 <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100991>.

Sarfraz, N., and Khan, I. (2021). *Plasmonic Gold Nanoparticles (AuNPs): Properties, Synthesis, and their Advanced Energy, Environmental and Biomedical Applications.* *Chem Asian J.* 16:720 – 742 DOI: 10.1002/asia.202001202.

Seaberg, J., Montazerian, H., Hossen, M. N., Bhattacharya, R., Khademhosseini, A., Mukherjee, P. (2021). *Hybrid Nanosystems for Biomedical Applications.* *ACS Nano* 15(2):2099-2142 <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c09382>.

Serkov, A.A., Shcherbina, M.E., Kuzmin, P.G., Kirichenko, N.A. (2015). *Laser-induced agglomeration of gold nanoparticles dispersed in a liquid.* *Appl Surface Sci* 336:96-102 <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.09.173>.

Shang, L., Zhou, X., Zhang, J., Shi, Y., Zhong, L. (2021). *Metal Nanoparticles for Photodynamic Therapy: A Potential Treatment for Breast Cancer*. *Molecules* 26(21): 6532 <https://doi.org/10.3390/molecules26216532>.

Shen, Y., Shuhendler, A.J., Ye, D., Xua, J-J., Cheet, H-Y. (2016) *Two-photon excitation nanoparticles for photodynamic therapy*, *Chem. Soc Rev.*45:6725–6741. <https://doi.org/10.1039/c6cs00442c>.

Su, X-Y., Liu, P-D., Wu, H., Gu, N. (2014) *Enhancement of radiosensitization by metal-based nanoparticles in cancer radiation therapy*. *Cancer Biol Med* 11:86-91. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.02.003.

Takajo, T., and Anzai, K. (2020.) *Is There a Simple and Easy Way to Detect Singlet Oxygen? Comparison of Methods for Detecting Singlet Oxygen and Application to Measure Scavenging Activity of Various Compounds*. *Arch Pharmacol Ther.*2(2):29-33

Tandiana, R., Van-Oanh, N.T., Clavaguéra, C. (2021). *Interaction between organic molecules and a gold nanoparticle: a quantum chemical topological analysis*. *Theor Chem Acc* 140 (8): 118 <https://doi.org/10.1007/s00214-021-02821-1>.

Tang, D., Kang, R., Van den Berghe, T., Vandenaabeele, P., Kroemeret, G. (2019) *The molecular machinery of regulated cell death*, *Cell Res* 29(5):347–364. doi: 10.1038/s41422-019-0164-5.

Tsekov, R., Georgiev, P., Simeonova, S., Balashev, K. (2017). *Quantifying the Blue Shift in the Light Absorption of Small Gold Nanoparticles*. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 70(9): 1237-1246 [arXiv 1702.04513].

Vankayala, R., Huang, Y-K., Kalluru, P., Chiang, C-S., Hwang, K.Ch. (2014). *First Demonstration of Gold Nanorods-Mediated Photodynamic Therapeutic Destruction of Tumors via Near Infra-Red-Light Activation*. *Small* 10(8):1612-1622 doi: 10.1002/smll.201302719.

Wassing, I.E., Esashi, F. (2021). *RAD51: Beyond the break*. *Semin Cell Dev Biol* 113: 38-46 doi: 10.1016/j.semcdb.2020.08.010.

Woźniak, A., Malankowska, A., Nowaczy, G., Grześkowiak, B.F., Tuśnio, K., Słomski, R., Zaleska-Medynska, A., Jurga, S. (2017). *Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications*. J Mater Sci: Mater Med 28(6):92. doi: 10.1007/s10856-017-5902-y.

Wrigglesworth, E.G. and Johnston, J.H. (2021) *Mie theory and the dichroic effect for spherical gold nanoparticles: an experimental approach*, Nanoscale Adv 3(12):3530–3536. <https://doi.org/10.1039/d1na00148e>.

Yao, C., Zhang, L., Wang, J., He, Y., Xin, J., Wang, S., Xu, H., Zhang, Z. (2016) *Gold Nanoparticle Mediated Phototherapy for Cancer*, J Nanomater. 2016: Article ID 5497136 <https://doi.org/10.1155/2016/5497136>.

Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M., Xia, Y. (2015). *Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine*. Chem. Rev. 115(19):10410-88. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00193.

Yang, Y., Hu, D., Ren, L., Wang, H. (2018) *Colloidal plasmonic gold nanoparticles and gold nanorings: Shape-dependent generation of singlet oxygen and their performance in enhanced photodynamic cancer therapy* Int. J Nanomedicine 2018(13):2065–2078. <https://doi.org/10.2147/IJN.S156347>.

Yeh, Y-Ch., Creran, B., Rotello, V.M. (2012). *Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology*. Nanoscale 4:1871 DOI: 10.1039/c1nr11188d.