

**NANOPARTÍCULAS Y RADIOTERAPIA: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE UNA
NANOPLATAFORMA DOPADA CON IONES LANTÁNIDOS COMO UN AGENTE
RADIOSENSIBILIZADOR EN EL TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA EN UN
MODELO *in vitro***

Mayerly Natalia Ochoa Paipilla

Tutora:

Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD



**Universidad del
Rosario**



VISUADA Y ASESORADA

UNIVERSIDAD

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
UNIVERSIDAD ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2024**

Por y para los cuatro robles...

AGRADECIMIENTOS

Durante este proyecto la presencia y amor a Dios en mi vida fue de vital importancia, a Él le agradezco por mostrarme el camino siempre y por darme la bendición y lo mejor que hay en mi vida, mi familia. A mi luz más grande, la mujer más fuerte, amorosa y amor de mi vida, Rosaura. A mi papá, Roberto quien es para mí la mejor representación de trabajo e ingenio. A Juan Manuel, mi hermano y mi mayor alegría, porque es muestra de resiliencia, honestidad y amor. A mi abuelita, que siempre estuvo orgullosa y quién no logró ver este logro. Por ustedes siempre.

A Diana Rodríguez, mi tutora en este proyecto. Le agradezco por introducirme en el mundo de las nanopartículas, por los consejos para mejorar, por estos años llenos de nuevas experiencias, por la confianza depositada en mí. Agradezco su apoyo constante en cada uno de los pasos de mi vida y sobre todo por hacerme sentir en casa estando en una ciudad diferente a la mía.

También quiero agradecer a cada una de las personas, amigos y compañeros de trabajo que han sido compañía y apoyo. Especialmente, al grupo de trabajo de la Universidad del Rosario en el laboratorio de bioquímica. A Nicolás y Paula. A las nuevas personas que han llegado a mi vida, motivándome en esta parte final del camino.

A mis profesores de la Universidad del Rosario y de la Universidad Escuela Colombiana de Ingeniería, así mismo a las instituciones por brindarme las herramientas para desarrollar este trabajo. Agradezco al laboratorio de Bioquímica y Bioinstrumentación de la universidad del Rosario y a sus auxiliares Sonia Perilla y Juan Guarín. Al grupo de investigación SyNERGIA y SiBio, a sus profesores líderes por su colaboración en la adquisición de información y trabajo en conjunto.

RESUMEN

El glioblastoma es un tumor situado en el sistema nervioso central y es considerado como uno de los tumores más agresivos, por lo que es clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como de grado IV [1], [2]. Este tipo de tumor tiene múltiples mecanismos para evadir los tratamientos y logra invadir rápida y progresivamente el tejido nervioso. En la actualidad, su tratamiento se basa en la combinación entre cirugía, radioterapia y en algunos casos específicos, quimioterapia [2].

En el caso de la radioterapia, se presentan dos grandes retos: el primero es erradicar el tejido tumoral asegurando un daño mínimo al tejido sano circundante; el segundo desafío reside en el fenómeno de la radioresistencia de los tumores, es decir la capacidad del tumor a resistir los efectos destructivos de la radiación ionizante. Por esta razón, se ha explorado la incorporación de agentes radiosensibilizantes que permitan incrementar la dosis recibida en el tumor y evitar el daño en el tejido adyacente [3].

En los últimos años, algunos tipos de nanopartículas han jugado un papel importante en este tipo de aplicaciones debido a sus características particulares como su tamaño, composición, y biocompatibilidad las cuales las hacen capaces de interactuar con radiaciones ionizantes, aumentando la dosis depositada y así potencialmente incrementar la eficiencia de este tipo de terapia [4]. Para el caso específico del uso de nanopartículas como agentes radiosensibilizantes en radioterapia se busca que estas contengan en su composición elementos o especies químicas con un alto número de electrones, lo cual puede generar que en el proceso de irradiación se produzcan emisiones secundarias y por tanto la dosis aplicada en los tumores sea mayor. Los puntos de carbono (PC) son un nuevo tipo de nanopartículas basadas en carbono, atractivos por sus características de biocompatibilidad, biodistribución, propiedades ópticas y su facilidad de síntesis. Adicionalmente, este tipo de nanopartículas presenta la capacidad de agregar en su composición átomos que presenten un alto número atómico [5].

En este trabajo se desarrollaron nanoplataformas basadas en puntos de carbono dopadas con iones lantánidos para su preliminar evaluación como agente radiosensibilizador en el tratamiento de glioblastoma. Los PC son sintetizados por el método de microondas a una temperatura de 200°C usando urea y ácido cítrico como precursores orgánicos. En el proceso sintéticos se incluyen ácido dietilentiainopentaacético gadolinio (iii) sal dihidrógeno hidrato y cloruro de iterbio (III) hexahidrato como los precursores de iones lantánidos con el fin de incrementar la nube electrónica que interactuará con los haces de energía ionizante. Las nanoplataformas sintetizadas (PC: PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺,Yb³⁺) fueron caracterizadas por microscopia de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés), potencial Z, espectroscopia de fluorescencia, UV-Vis y de infrarrojo. A continuación, se evaluó el efecto citotóxico en

diferentes líneas celulares cancerosas y no cancerosas y cultivos primarios en función de las concentraciones de las nanoplateformas, observando que las PC, PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺,Yb³⁺ no son citotóxicas en concentraciones menores a 500µg/mL y que en células no cancerosas la viabilidad celular es menor que en las células cancerosas expuestas a los tratamientos. Con el fin de conocer las primeras acercaciones al potencial radiosensibilizador de estas nanoplateformas, líneas celulares y cultivos primarios fueron incubados con estos tratamientos y posteriormente irradiados. Dicho proceso, fue realizado en el Centro de Control de Cáncer a partir de un protocolo de irradiación previo. Después de sembrar las células irradiadas, se analizó su capacidad de proliferación celular obteniendo la curva de fracción de supervivencia para la línea celular U87 y los cultivos primarios de glioma, mostrando una disminución en la fracción de supervivencia de las células con tratamiento (PC y PC:Gd³⁺) respecto a las células sin el mismo. Concluyendo así, un posible potencial como agente radiosensibilizador en el tratamiento de glioblastoma, por medio del ensayo *in vitro*.

Palabras clave: *Puntos de carbono; Agente radiosensibilizador; Iones lantánidos; Radioterapia; Glioblastoma; Experimentos in vitro.*

ABSTRACT

Glioblastoma is a tumour located in the central nervous system and is considered one of the most aggressive tumours, which is why it is classified by the World Health Organisation (WHO) as grade IV [1], [2]. This type of tumour has multiple mechanisms to evade treatment and manages to rapidly and progressively invade nerve tissue. Currently, its treatment is based on a combination of surgery, radiotherapy and, in some specific cases, chemotherapy [2].

In the case of radiotherapy, there are two major challenges: the first is to eradicate tumour tissue while ensuring minimal damage to surrounding healthy tissue; the second challenge lies in the phenomenon of tumour radioresistance, i.e. the ability of the tumour to resist the destructive effects of ionising radiation. For this reason, the incorporation of radiosensitising agents has been explored to increase the dose received by the tumour and avoid damage to adjacent tissue [3].

In recent years, some types of nanoparticles have played an important role in this type of application due to their particular characteristics such as their size, composition and biocompatibility, which make them capable of interacting with ionising radiation, increasing the deposited dose and thus potentially increasing the efficiency of this type of therapy [4]. In the specific case of the use of nanoparticles as radiosensitising agents in radiotherapy, it is sought that these contain in their composition elements or chemical species with a high number of electrons, which can generate secondary emissions in the irradiation process and therefore the dose applied to tumours is higher. Carbon dots (CPs) are a new type of carbon-based nanoparticles, attractive for their biocompatibility, biodistribution, optical properties and ease of synthesis. Additionally, this type of nanoparticles has the ability to add atoms with high atomic number in their composition [5].

In this work, lanthanide ion doped carbon dots based nanoplatfoms were developed for preliminary evaluation as radiosensitising agent in the treatment of glioblastoma. PCs are synthesised by microwave method at a temperature of 200°C using urea and citric acid as organic precursors. In the synthetic process, diethylenetriaminepentaacetic acid gadolinium(iii) salt dihydrogen hydrate and ytterbium(III) chloride hexahydrate are included as the lanthanide ion precursors in order to increase the electronic cloud that will interact with the ionising energy beams. The synthesised nanoplatfoms (PC: PC:Gd³⁺ and PC:Gd³⁺,Yb³⁺) were characterised by atomic force microscopy (AFM), Z-potential, fluorescence, UV-Vis and infrared spectroscopy. The cytotoxic effect was then evaluated in different cancer and non-cancer cell lines and primary cultures as a function of the concentrations of the nanoplatfoms, observing that PC, PC:Gd³⁺ and PC:Gd³⁺,Yb³⁺ are not cytotoxic at concentrations below 500µg/mL and that in non-

cancer cells cell viability is lower than in cancer cells exposed to the treatments. In order to gain initial insights into the radiosensitising potential of these nanoplatforms, cell lines and primary cultures were incubated with these treatments and subsequently irradiated. This process was carried out at the Cancer Control Centre on the basis of a previous irradiation protocol. After seeding the irradiated cells, their cell proliferation capacity was analysed, obtaining the survival fraction curve for the U87 cell line and the primary glioma cultures, showing a decrease in the survival fraction of the cells with treatment (PC and PC:Gd³⁺) with respect to the cells without treatment. Thus concluding a possible potential as a radiosensitising agent in the treatment of glioblastoma, by means of the in vitro assay.

Keywords: *Carbon dots; Radiosensitising agent; Lanthanide ions; Radiotherapy; Glioblastoma; In vitro experiments.*

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GENERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1. CÁNCER	19
4.1.1. <i>Glioblastoma</i>	19
4.1.2. <i>Diagnóstico y tratamiento</i>	19
4.1.3. <i>Radiosensibilizadores</i>	21
4.2. PUNTOS DE CARBONO	23
4.2.1. <i>Propiedades de los PC</i>	24
4.2.2. <i>Métodos de síntesis de PC</i>	25
5. METODOLOGÍA	28
5.1. FASE 1: DESARROLLO DE NANOPLATAFORMAS CON POTENCIAL RADIOSENSIBILIZANTE	28
5.1.1. <i>Desarrollo de un protocolo base para síntesis de PC</i>	28
5.1.2. <i>Incorporación del Gd³⁺ como dopante (PC:Gd³⁺)</i>	29
5.1.3. <i>Introducción de Yb³⁺ como co-dopante (PC:Gd³⁺, Yb³⁺)</i>	30
5.1.3.1. Método de microondas (para la obtención de PC: Gd ³⁺ , Yb ³⁺)	30
5.1.3.2. Método de tubo de condensación para co-dopaje (PC: Gd ³⁺ , Yb ³⁺)	31
5.1.4. <i>Caracterización de las nanoplataformas</i>	31
5.1.4.1. Espectroscopia UV-Vis	31
5.1.4.2. Espectroscopia de fluorescencia	32
5.1.4.3. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	32
5.1.4.4. Potencia Z	32
5.1.4.5. Espectroscopia infrarroja	32
5.2. FASE 2: ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN PC, PC: Gd ³⁺ , PC:Gd ³⁺ ,Yb ³⁺ EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS	33
5.2.1. <i>Estudio de citotoxicidad de las nanoplataformas por MTT (Bromuro de Tetrazolio Azul de Tiazolilo)</i>	33
5.2.2. <i>Estudio de citotoxicidad por ensayo de azul tripán</i>	35
5.3. FASE 3: IRRADIACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON RAYOS X	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1. FASE 1: DESARROLLO DE NANOPLATAFORMAS CON POTENCIAL RADIOSENSIBILIZANTE	40
6.1.1. <i>Desarrollo de un protocolo base para síntesis de PC</i>	40
6.1.2. <i>Incorporación de Gd³⁺ como dopante (PC:Gd³⁺)</i>	46
6.1.3. <i>Introducción de Yb³⁺ como co-dopante (PC:Gd³⁺, Yb³⁺)</i>	50
6.2. FASE 2: ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN PC, PC: Gd ³⁺ , PC: Yb ³⁺ , PC:Gd ³⁺ ,Yb ³⁺ EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS	56
6.2.1. <i>Estudio de citotoxicidad de las nanoplataformas por MTT (Bromuro de Tetrazolio Azul de Tiazolilo)</i>	56
6.2.2. <i>Estudio de citotoxicidad por ensayo de azul tripán</i>	59
6.3. FASE 3: IRRADIACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON RAYOS X	61

7.	CONCLUSIONES	65
8.	TRABAJOS FUTUROS	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	EFECTO DIRECTO E INDIRECTO DE LA RADIACIÓN EN LAS CÉLULAS-----	13
FIGURA 2.	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL EFECTO BIOLÓGICO DE LA RADIOTERAPIA CONVENCIONAL COMPARADA CON LA RADIOTERAPIA IMPLEMENTANDO NANOPARTÍCULAS COMO RADIOSENSIBILIZADOR. A. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA RADIOTERAPIA CONVENCIONAL. B. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA RADIOTERAPIA CON AGENTES RADIOSENSIBILIZADORES. 16	
FIGURA 3.	DESCRIPCIÓN GRÁFICA DEL EFECTO DIRECTO E INDIRECTO DE LA RADIOTERAPIA EN LAS CÉLULAS-----	21
FIGURA 4.	FLUORESCENCIA DE PC, IMAGEN OBTENIDA DE MENG LI LIU, A BIN BIN CHEN ET AL. EL MECANISMO DE FLUORESCENCIA DE LOS CD BASADO EN EL GRADO DE OXIDACIÓN DE LA SUPERFICIE. -----	25
FIGURA 5.	MECANISMO DE LUMINISCENCIA DE LOS PC -----	25
FIGURA 6.	MÉTODOS DE SÍNTESIS DE LOS PC -----	26
FIGURA 7.	DIAGRAMA DE FLUJO FASES DE LA METODOLOGÍA. -----	28
FIGURA 8.	PROCEDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS DE PC POR MEDIO DEL MÉTODO DE MICROONDAS. -----	29
FIGURA 9.	SÍNTESIS DE LOS PC:Gd ³⁺ POR MEDIO DEL MÉTODO DE MICROONDAS A UNA TEMPERATURA DE 200°C. -----	30
FIGURA 10.	SÍNTESIS DE LOS PC:Gd ³⁺ , Yb ³⁺ POR MEDIO DEL MÉTODO DE MICROONDAS. -----	31
FIGURA 11.	SÍNTESIS DE LOS PC:Gd ³⁺ , Yb ³⁺ POR MEDIO DEL MÉTODO DE PLANCHA-----	31
FIGURA 12.	PROCEDIMIENTO ENSAYO MTT-----	34
FIGURA 13.	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL MONTAJE REALIZADO EN EL ENSAYO MTT EN LÍNEAS CELULARES DE 3T3, VERO, HT29 Y U87, CADA CAJA DE COLOR REPRESENTA UN TRATAMIENTO USADO Y EN LA PARTE IZQUIERDA SE DENOTAN LAS CONCENTRACIONES DE LAS NANOPLATAFORMAS. -----	35
FIGURA 14.	PROCEDIMIENTO ENSAYO AZUL TRIPÁN -----	36
FIGURA 15.	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL MONTAJE REALIZADO EN EL ENSAYO MTT EN LÍNEAS CELULARES DE 3T3, VERO, HT29 Y U87 EN EL CUADRO AMARILLO, Y POR PARTE DEL CUADRO VIOLETA SON LOS ENSAYOS REALIZADOS A UNA CONCENTRACIÓN EN CULTIVOS PRIMARIOS. -----	37
FIGURA 16.	PROCEDIMIENTO USADO PARA IRRADIAR LOS TRATAMIENTOS EN LAS LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS. -	38
FIGURA 17.	MONTAJE DE LAS PRUEBAS DE IRRADIACIÓN DE LAS CÉLULAS Y TRATAMIENTOS EN EL EQUIPO VARIAN MEDICAL SYSTEM DE RAYOS X. CENTRO DE CONTROL DE CÁNCER. -----	39
FIGURA 18.	ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE SOLUCIONES ACUOSAS DE PC (CONCENTRACIÓN 0,05 MG/ML) SINTETIZADOS EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA DE REACCIÓN. -----	41
FIGURA 19.	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE PC. EN ESTA ESTRUCTURA, TAMBIÉN HAY PRESENCIA DE HETEROÁTOMOS DE NITRÓGENO, OXÍGENO Y GRUPOS FUNCIONALES EN LA SUPERFICIE DE LA NANOPLATAFORMA. -----	42
FIGURA 20.	ESPECTRO DE EMISIÓN DE UNA SOLUCIÓN ACUOSA DE PC (CONCENTRACIÓN DE 0,05 MG/ML) SINTETIZADOS A 200°C A PARTIR DE N, N DIMETILFORMAMIDA, UREA Y ÁCIDO CÍTRICO ($\lambda_{exc} = 365\text{nm}$). LAS IMÁGENES DENTRO DEL ESPECTRO MUESTRAN A. CON EXPOSICIÓN DE LUZ UV A $\lambda_{exc} = 365\text{nm}$, B. SIN EXPOSICIÓN DE LUZ UV. -----	43
FIGURA 21.	IMAGEN OBTENIDAS EN MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA. A. IMAGEN OBTENIDA EN 2D A UNA RESOLUCIÓN DE 300NM, EN BLANCO SE MUESTRAN LOS PC, B. DISTRIBUCIÓN DE RUGOSIDAD DE LA MUESTRA. C. IMAGEN DE PROFUNDIDAD A $\pm 30\text{nm}$.-----	44
FIGURA 22.	ESPECTRO INFRARROJO DE PC SINTETIZADOS A 200°C A PARTIR DE N,N DIMETILFORMAMIDA, UREA Y ÁCIDO CÍTRICO. 45	
FIGURA 23.	REPRESENTACIÓN GRÁFICAS DE LOS PC:Gd ³⁺ , EN ESTA ESTRUCTURA, TAMBIÉN HAY PRESENCIA DE HETEROÁTOMOS DE NITRÓGENO, OXÍGENO Y GRUPOS FUNCIONALES EN LA SUPERFICIE DE LA NANOPLATAFORMA. -----	46
FIGURA 24.	ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE SOLUCIONES ACUOSAS DE PC:Gd ³⁺ (CONCENTRACIÓN 0,05 MG/ML).-----	47
FIGURA 25.	ESPECTRO DE EMISIÓN DE UNA SOLUCIÓN ACUOSA DE PC:Gd ³⁺ (CONCENTRACIÓN DE 0,05 MG/ML) SINTETIZADOS A 200°C A PARTIR DE UREA, ÁCIDO DIETILENTRIAMINOPENTAACÉTICO GADOLINIO (III) SAL DIHIDRÓGENO Y ÁCIDO CÍTRICO ($\lambda_{exc} = 365\text{nm}$). LAS IMÁGENES DENTRO DEL ESPECTRO MUESTRA LA MUESTRA EN UNA CELDA DE CUARZO A. CON EXPOSICIÓN A LUZ UV A $\lambda_{exc} = 365\text{nm}$, B. SIN EXPOSICIÓN A LUZ UV. -----	48
FIGURA 26.	IMAGEN OBTENIDAS EN MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA. A. IMAGEN OBTENIDA EN 2D A UNA RESOLUCIÓN DE 300NM, EN BLANCO SE MUESTRAN LOS PC:Gd ³⁺ , B. DISTRIBUCIÓN DE RUGOSIDAD DE LA MUESTRA. C. IMAGEN DE PROFUNDIDAD A $\pm 30\text{nm}$. -----	49

FIGURA 27.	ESPECTRO INFRARROJO DE PC:Gd ³⁺	50
FIGURA 28.	MÉTODOS DE DOPAJE Y FUNCIONALIZACIÓN DE LOS PC: Gd ³⁺ ,Yb ³⁺	51
FIGURA 29.	ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE SOLUCIONES ACUOSAS DE PC:Gd ³⁺ ,Yb ³⁺ MÉTODO 1 (CONCENTRACIÓN DE 0,05 MG/ML).52	
FIGURA 30.	ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE SOLUCIONES ACUOSAS DE PC:Gd ³⁺ ,Yb ³⁺ MÉTODO 2 (CONCENTRACIÓN DE 0,05 MG/ML).53	
FIGURA 31.	ESPECTRO DE EMISIÓN DE UNA SOLUCIÓN ACUOSA DE PC:Gd ³⁺ ,Yb ³⁺ (CONCENTRACIÓN DE 10MG/ML) SINTETIZADOS A 200°C A PARTIR DE N, N DIMETILFORMAMIDA, UREA, ÁCIDO DIETILENTRIAMINOPENTAACÉTICO GADOLINIO (III) SAL DIHIDRÓGENO, CLORURO DE ITERBIO (III) Y ÁCIDO CÍTRICO ($\lambda_{exc} = 365\text{nm}$). LAS IMÁGENES DENTRO DEL ESPECTRO MUESTRA LA MUESTRA EN UNA CELDA DE CUARZO: A. CON EXPOSICIÓN DE LUZ UV A $\lambda_{exc} = 365\text{nm}$, B. SIN EXPOSICIÓN DE LUZ UV. 54	
FIGURA 32.	IMAGEN OBTENIDAS EN MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA PARA PC:Gd ³⁺ , Yb ³⁺ . A. IMAGEN OBTENIDA EN 2D A UNA RESOLUCIÓN DE 300NM, EN BLANCO SE MUESTRAN LAS NANOPLATAFORMAS. B. DISTRIBUCIÓN DE RUGOSIDAD DE LA MUESTRA. C. IMAGEN DE PROFUNDIDAD A $\pm 30\text{nm}$	55
FIGURA 33.	ESPECTRO INFRARROJO DE PC:Gd ³⁺ , Yb ³⁺	56
FIGURA 34.	PRUEBA DE MTT EN LÍNEAS CELULARES CON TRATAMIENTOS DE NANOPARTÍCULAS CONCENTRACIONES DE 0 A 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A. PC B. PC : Gd ³⁺	57
FIGURA 35.	PRUEBA DE MTT PARA PC:Gd ³⁺ ,Yb ³⁺ A UNA CONCENTRACIÓN 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	59
FIGURA 36.	ENSAYO DE AZUL TRIPÁN EN LÍNEAS CELULARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PC.	60
FIGURA 37.	PRUEBA DE AZUL TRIPÁN PARA: A: PC, PC:Gd ³⁺ EN G200 A CONCENTRACIONES DE 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. B: PC, PC:Gd ³⁺ ,PC : Gd ³⁺ ,Yb ³⁺ EN G298 A CONCENTRACIONES DE 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	61
FIGURA 38.	FRACCIÓN DE SUPERVIVENCIA DE LA LÍNEA U87 CON LOS TRATAMIENTOS DE SIN PC Y CON PC, CON PC:Gd ³⁺ AL SER IRRADIADAS CON DOSIS CONVENCIONALES.	62
FIGURA 39.	FRACCIÓN DE SUPERVIVENCIA DEL CULTIVO PRIMARIO G200 AL SER IRRADIADAS CON DOSIS CONVENCIONALES EN TRATAMIENTOS A. SIN PC Y PC B. SIN PC Y PC : Gd ³⁺	63

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. CANTIDAD DE REACTIVOS Y SOLVENTES PARA SINTETIZAR PC Y PC:Gd ³⁺ . -----	30
TABLA 2. DESCRIPCIÓN DE LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS USADOS EN LOS ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD. (* CORRESPONDIENTE A LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS DEL SEMILLERO SIBIO DE LA UNIVERSIDAD DEL ROSARIO) -----	33
TABLA 3. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD REALIZADOS EN LAS NANOPLATAFORMAS DESARROLLADAS, CONCENTRACIÓN USADA Y LÍNEAS CELULARES.-----	34
TABLA 4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD REALIZADOS EN LAS NANOPLATAFORMAS DESARROLLADAS, CONCENTRACIÓN USADA Y LÍNEAS CELULARES/CULTIVOS PRIMARIOS.-----	36
TABLA 5. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE IRRADIACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS -----	37
TABLA 6. PARÁMETROS USADOS EN LA SÍNTESIS DE PC-----	40
TABLA 7. ENLACES ATRIBUIDOS A LAS FRECUENCIAS DE VIBRACIÓN EN ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.-----	44
TABLA 8. RESULTADOS PRUEBA ANOVA PARA ENSAYO MTT DE PC Y PC : Gd ³⁺ -----	58
TABLA 9. RESULTADOS PRUEBA ANOVA PARA ENSAYO MTT PARA PC:Gd ³⁺ , Yb ³⁺ -----	59
TABLA 10. RESUMEN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPLATAFORMAS -----	63
TABLA 11. RESUMEN DE LAS PRUEBAS Y RESULTADOS REALIZADAS EN EL ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD. EN COLOR NARANJA SE SEÑALAN LOS VALORES DE VIABILIDAD MENORES AL 80%, CON VERDE LAS VIABILIDADES MAYORES AL 80% Y SIN COLOR SON LAS PRUEBAS QUE NO SE REALIZARON. -----	63
TABLA 12. RESUMEN DE LAS PRUEBAS REALIZADAS EN IRRADIACIÓN A 0, 1, 2, 4, 6, 8.Y 10 Gy. -----	64

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que puede afectar cualquier parte de un organismo. Según la OMS, en 2015 el cáncer fue responsable de 8,8 millones de muertes, y actualmente se considera la segunda causa de muerte en el mundo [6], [7]. Esta patología es causada por una división descontrolada de células anormales en el cuerpo que puede invadir el tejido de origen y progresivamente otros órganos, lo que se conoce como metástasis. En el cáncer, los mecanismos celulares que regulan la expresión génica y la proliferación están alterados, debido a mutaciones en el material genético. El tipo celular y estas alteraciones determinan principalmente la tasa de crecimiento del tumor, el potencial metastásico y en consecuencia su gravedad [8].

El glioblastoma es un tipo de tumor ubicado en el sistema nervioso central, que se origina a partir de las células gliales y es caracterizado por su alta difusión en el tejido, dificultad y resistencia al tratamiento [9]. Es considerado un tumor de alto riesgo con incidencia de 2,8 a 4,7 casos nuevos por cada 100.000 habitantes por año y el pronóstico de supervivencia media de los pacientes es de 12-18 meses [10]. Actualmente, el tratamiento usado en una persona diagnosticada con glioblastoma se basa en el protocolo de Stupp el cual combina cirugía, quimioterapia y radioterapia [11]. Inicialmente, se realiza la resección del tumor de forma parcial o total, evitando dañar el tejido sano del cerebro y posteriormente se utiliza la radioterapia, para atacar los restos del tumor no eliminados en la cirugía [12]. En el caso de la quimioterapia, la mayoría de los fármacos disponibles no pueden atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica debido a su alta selectividad, es por esta razón que los tratamientos post quirúrgicos, en la mayoría de casos de tratamiento de glioblastomas, se limitan a radioterapia [13].

La radioterapia usa altas dosis de radiación ionizante para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. Los rayos X son el tipo de radiación más usado en estas terapias; sin embargo, en algunos casos se usan otros tipos de radiaciones, como protones y Rayos Gamma. Durante esta terapia, la radiación ionizante interactúa con los tejidos, generando alteraciones en las moléculas que los componen y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). De esta forma, la radiación ionizante modifica estructuralmente diferentes componentes de la célula, particularmente al ADN ubicado en el núcleo [14], [15]. Estas interacciones pueden ser directas o indirectas. En la Figura 1 se muestra una representación gráfica de estas interacciones. En el caso de la interacción directa se genera un daño en la doble cadena del ADN por el impacto de los fotones de alta energía. En la interacción indirecta, el daño en el ADN se da por los radicales generados en el proceso de radiólisis del agua, presente en el ambiente celular [16], [17].



Figura 1. Efecto directo e indirecto de la radiación en las células

En la actualidad, este tratamiento en pacientes con glioblastoma tiene dos factores que limitan su eficacia: la resistencia del tumor a la radioterapia, provocada por la rápida difusión en los tejidos y su recurrencia; por otra parte, los efectos secundarios de la terapia en los tejidos sanos que rodean la zona tratada [8]. En la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, se ha implementado el uso de agentes radiosensibilizadores, los cuales tienen como propósito la erradicación de las células tumorales mientras se minimiza el impacto en los tejidos sanos [18]. Inicialmente se han clasificado en cinco categorías de acuerdo al daño generado en el ADN: I) sustancias radioprotectoras endógenas, II) formación de sustancias citotóxicas por radiólisis, III) inhibidores de la reparación de biomoléculas, IV) análogos de la timina que pueden incorporarse al ADN e V) imitadores del oxígeno que tienen actividad electrofílica [19].

En los últimos años se ha propuesto el uso de nanomateriales como agentes radiosensibilizadores. Son las características propias de estos materiales de tamaño que se caracteriza en la escala nanométrica, los que los hacen atractivos para este tipo de aplicación. Su tamaño, favorece su comportamiento como partículas dentro del organismo y en algunas ocasiones pueden atravesar la membrana celular de acuerdo a sus componentes. Adicionalmente, algunos nanomateriales pueden contener en su estructura elementos de alto número atómico lo que favorece la atenuación de los rayos X y la posibilidad de depositar alta energía de la radiación en el tumor [10]. Dentro de

los nanomateriales estudiados en este tipo de aplicaciones se encuentran las nanopartículas de oro y las nanopartículas de tierras raras, entre otras [20]. Las primeras presentan características importantes como biocompatibilidad, facilidad en la modificación química y se ha demostrado en diferentes estudios su efecto radiosensibilizante, mostrando que pueden inducir un incremento en el daño del ADN cuando se irradia con rayos X [21]. Es importante considerar las limitaciones que se encuentran al implementar las nanopartículas en estos tratamientos, por ejemplo la biocompatibilidad de estas en tamaños mayores a 100nm, la composición, material y funcionalización de la superficie que pueden afectar su estabilidad coloidal y sus morfologías que pueden depender de las vías de síntesis usadas [22].

Las nanopartículas basadas en tierras raras han sido estudiadas por su alto número atómico. Un caso específico es el ion gadolinio (Gd^{3+}), un lantánido que se ha utilizado ampliamente como agente de contraste para imágenes por resonancia magnética (IRM) y que se puede usar en tratamiento de cáncer debido a su efecto radiosensibilizador [3].

Dentro de los materiales de escala nanométrica, se encuentran los puntos de carbono que presentan un tamaño menor a 10 nm, propiedades ópticas como la fluorescencia, estabilidad coloidal acuosa, fotoestabilidad y biocompatibilidad [5]. Estas características los han hecho llamativos en diferentes aplicaciones biomédicas tales como agentes de contraste en la adquisición de imágenes médicas, liberación controlada de medicamentos, diagnóstico y terapia del cáncer [23]. Por otra parte, la citotoxicidad de este tipo de nanopartículas ha sido estudiada, reportando baja citotoxicidad a pesar de las diferentes fuentes de precursores orgánicos, solventes y estrategias de funcionalización que se encuentran en la literatura [24]. Adicionalmente, este tipo de nanopartículas pueden doparse con heteroátomos como los iones lantánidos, con el fin de aumentar la energía depositada que permita liberar electrones secundarios hacia las células cancerosas. Zhao, Y., et al, encontraron biocompatibilidad en una nanoplataforma basada en puntos de carbono dopada con Yb^{3+} y Gd^{3+} sintetizada a través de la ruta solvotérmica a 200°C por 10h, encontraron una mayor producción de electrones secundarios generados por la interacción de los rayos X con la nanopartícula, generando un efecto positivo en el contraste de imágenes médicas [25], [26].

De esta manera y considerando la importancia de buscar alternativas en los tratamientos del glioblastoma, a través de este proyecto se busca establecer una ruta de síntesis de nanopartículas basadas en puntos de carbono dopadas con iones lantánidos (PC: Gd^{3+} , Yb^{3+}) a partir de moléculas como urea y ácido cítrico, adicionalmente se introdujo ácido dietilentiainopentaacético gadolinio (iii) sal dihidrógeno hidrato para obtener PC: Gd^{3+} y finalmente se añadió cloruro de iterbio (III)

hexahidrato para obtener otra nanoplateforma PC: Gd^{3+} , Yb^{3+} . Cada una de estas nanoplateformas fueron caracterizadas por propiedades ópticas, tamaño y topografía, carga superficial y enlaces obtenidos en la superficie. Por otro lado, la citotoxicidad fue evaluada en las líneas celulares y cultivos primarios, donde se busca encontrar valores igual o superior al 80% de viabilidad celular cuando son expuestas a los tratamientos de las nanoplateformas sintetizadas a concentraciones menores a $500\mu g/mL$. Finalmente, al comprobar la biocompatibilidad de los tratamientos en las células, fueron irradiadas según el protocolo creado en el Centro de Control del Cáncer, en un equipo de uso clínico y después de 15 días se evaluó la capacidad de proliferación, la cuál fue menor en los tratamientos con PC respecto a los que no fueron tratados con nanopartículas. Por medio de la información, se obtuvieron las curvas de supervivencia comparando el comportamiento celular post irradiación con y sin las nanoplateformas. Estos experimentos preliminares se estudiaron sobre líneas celulares comerciales U87, HT29, VERO y 3T3 y cultivos primarios de gliomas (G200, G298). Este trabajo se realizó bajo el marco del proyecto “Développement d'une nanoplateforme radiosensibilisante à base des points de carbone dopés aux lanthanides pour la radiothérapie” de la Universidad del Rosario en alianza con Concordia University y Université Côte d'Azur y con la participación de investigadores del laboratorio de Bioquímica e integrantes de los semilleros SyNERGIA y SiBio de la escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario.

2. JUSTIFICACIÓN

El glioblastoma es uno de los desafíos más grandes en el área de la oncología debido a su alta agresividad, rápida progresión y radioresistencia. En los tratamientos a pacientes con este tipo de tumores se usa la radioterapia convencional, la cual se basa en la exposición de las células cancerosas a un haz de fotones de rayos X, que inciden en la célula generando un efecto directo dañando el ADN y un efecto indirecto generando hidrólisis del agua, lo cual produce especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas que generan muerte celular [17]. Sin embargo, parte de esta radiación se escapa o no interactúa con la célula cancerosa de la célula afectando el tejido adyacente y no el tumor.

Por esta razón, se buscan nuevas alternativas que permitan tratamientos más eficientes, disminuyendo el daño en tejidos adyacentes y el efecto radioresistente de algunos tumores como el glioblastoma. En el caso especial de este proyecto, se busca hacer uso de nanomateriales que permitan obtener una respuesta radiosensibilizante en las células cancerosas que han sido tratadas por las nanoplateformas desarrolladas, por medio del acercamiento *in vitro*, proceso que se muestra en la Figura 2. De esta manera, se desarrollaron una serie de nanoplateformas basadas en PC y dopadas con tierras raras con el fin de explorar si es posible generar un aumento del efecto de la radioterapia en líneas celulares y cultivos primarios de glioblastoma.

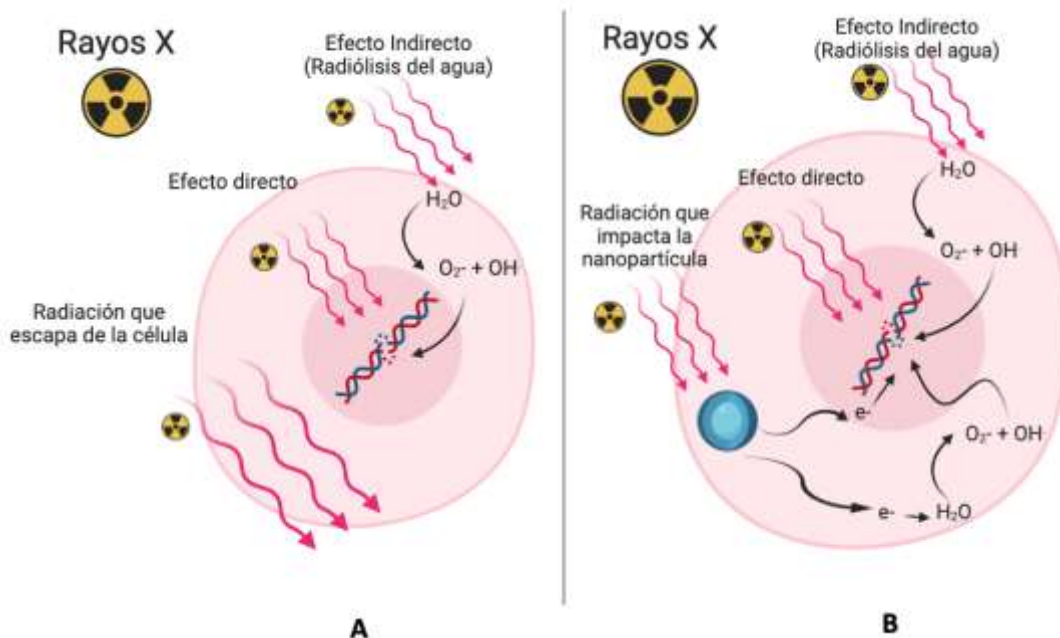


Figura 2. Representación gráfica del efecto biológico de la radioterapia convencional comparada con la radioterapia implementando nanopartículas como radiosensibilizador.

A. Representación gráfica de la radioterapia convencional. B. Representación gráfica de la radioterapia con agentes radiosensibilizadores.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el potencial de nanoplataformas basadas en puntos de carbono (PC) dopada con iones lantánidos (Gd^{3+}, Yb^{3+}) como un agentes radiosensibilizadores en el tratamiento de glioblastoma en un modelo *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar y caracterizar nanoplataformas basadas en PC dopada con iones lantánidos (Gd^{3+}, Yb^{3+}).
- ✓ Evaluar el posible efecto citotóxico de las nanoplataformas en las líneas derivadas de glioblastoma U87, HT29, 3T3 y VERO, y en cultivos primarios de glioblastoma.
- ✓ Estudiar la eficacia radiosensibilizante de las nanoplataformas desarrolladas en cultivos de células U87, HT29, 3T3 y VERO y cultivos primario de glioblastoma, sometidos a radiación ionizante (Rayos X).

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades que pueden iniciar en cualquier parte del cuerpo debido a un crecimiento descontrolado de células que han sufrido algún tipo de daño, las cuales no mueren sino que siguen produciendo células anormales [27]. Existen dos categorías principales de cánceres: hematológicos y de tumor sólido; los cuales tienen características similares, sin embargo pueden crecer con mayor o menor velocidad y pueden tener diferentes perspectivas de tratamiento [28].

El cáncer es considerado por la OMS como la segunda causa de muerte en el mundo, para el año 2018 causó 9,6 millones de muertes, y presenta una relación de 1 a 6 con respecto a otras causas de muerte. Algunos de los tipos de cáncer que tienen mayor incidencia en la población mundial son el de mama, pulmón, colon y recto y próstata [29]. Aunque el desarrollo en salud y creación de nuevas alternativas de tratamiento han venido creciendo considerablemente en los últimos años, principalmente para los tipos de cáncer más comunes mencionados anteriormente, la investigación en tumores malignos, como el glioblastoma, de menor incidencia en la población no han obtenido los mismos resultados.

4.1.1. *Glioblastoma*

Dentro de los tipos de tumores malignos de menor incidencia se encuentra el glioblastoma. Esta clase de cáncer, presenta una incidencia de 3,2 por cada 100.000 habitantes [30] y es considerado por la OMS como un tumor de grado IV debido a su agresividad y crecimiento infiltrativo y descontrolado dentro del sistema nervioso central [31]. La formación de este tumor se da por las células conocidas como gliales que se conforman por astrocitos y oligodendrocitos, células que brindan soporte al cerebro y a la médula espinal [32]. El origen de este tipo de glioma se asocia directamente a su agresividad, esta información puede ser detectada a través de pruebas con biomarcadores como es el caso del *IDH* que corresponde al gen llamado isocitrato deshidrogenasa, en el que se presenta una mutación que representa que el origen del tumor si se da por los astrocitomas, y que representan un crecimiento acelerado [1].

4.1.2. *Diagnóstico y tratamiento*

El glioblastoma es diagnosticado a través técnicas de imágenes biomédicas como resonancia magnética convencional que por lo general usa medios de contraste, brindando una idea sobre el grado de tumor que se está presentando. Otras pruebas se realizan por tomografías computarizadas o por emisión de positrones. Por otra parte, se solicita una biopsia para conocer la clasificación histológica de la muestra y así

clasificarla según sus características. Se considera un tumor de grado II a las células que presenta atipia citológica (variación en la forma y tamaño nuclear + hiperchromasia); de tipo III, a las células con anaplasia y aumento de la actividad mitótica (aumento de la celularidad); y de tipo IV, a las células con proliferación microvascular y necrosis [33].

El tratamiento para los pacientes que han sido diagnosticados con este tipo de gliomablastoma empieza con cirugía con el fin de eliminar la mayor parte del tumor sin afectar el tejido sano. Es común que la imposibilidad de erradicar todas las células cancerosas por su proximidad con las células sanas, por lo que es importante usar otros tratamientos. Por lo general, la radioterapia y quimioterapia pueden ser los pasos a seguir [34]. La quimioterapia, es administrada al paciente por medio de una pastilla del medicamento (temozolomida, algunas veces bevacizumab), sin embargo la eficacia de este medicamento puede ser baja y requerir que el paciente vuelva a tomar otras dosis causando efectos secundarios importantes [35]. Estas limitaciones que se presentan al usar quimioterapia para este tipo de tumores se debe a la barrera hematoencefálica, la cuál es una estructura tanto funcional como anatómica que actúa como interfaz fronteriza entre la circulación sanguínea y los tejidos cerebrales y que se encarga de evitar el paso de posibles sustancias peligrosas, con el fin de proteger el cerebro. Limitando así, la entrega de los fármacos y estos tipos de tratamientos [36].

Estudios muestran que el efecto de la combinación de la radioterapia y la cirugía para estos pacientes tiene un efecto mayor, lo que da una mayor esperanza de vida a los pacientes que son tratados de esta manera [37]. En el tratamiento del glioblastoma se usa la radioterapia que usa radiación en forma de Rayos X dirigidos o partículas subatómicas para causar un daño en las células cancerosas provocando su muerte [38]. El tipo más común es la radioterapia de haz externo a través de un acelerador lineal y siendo dirigido a la zona de tratamiento. Así mismo, existen otros métodos como implantes de radioterapia o braquiterapia, terapia con radioisótopos y radioterapia intrahaz usado con frecuencia en cirugía de cáncer de mama [39]. En la práctica clínica, los tipos más comunes de radiación ionizante son los fotones y los electrones, siendo usados en centros especializados. Cada tipo de radiación tiene unas características físicas específicas, que influyen en la forma en que interactúa con el cuerpo humano y, a partir de ahí determinan la distribución de la dosis en el tejido [40].

La radiación por medio del comportamiento de los mecanismos de reparación del ADN de las células cancerosas, permite fraccionar la dosis total proporcionada a las células normales para que tengan la capacidad de repararse entre los tratamientos, mientras que el daño acumulado en las células cancerosas provoca su muerte [41]. Las células se ven afectadas cuando se exponen directa o indirectamente a radiaciones ionizantes. El daño del ADN puede producirse directamente en este proceso, siendo el resultado de la radiación ionizante que atraviesa una molécula y la ioniza directamente

dañando el ADN y causando la posterior muerte de las células cancerosas. O indirectamente, cuando se forma por una reacción química con un radical libre producido por la irradiación, en este caso la ionización de un agua tras varias reacciones químicas sucesivas, que dan lugar a la molécula radical OH. Debido a su alta reactividad, el radical hidroxilo puede dar lugar a daños en una molécula de ADN situada en sus inmediaciones (Figura 3) [42].

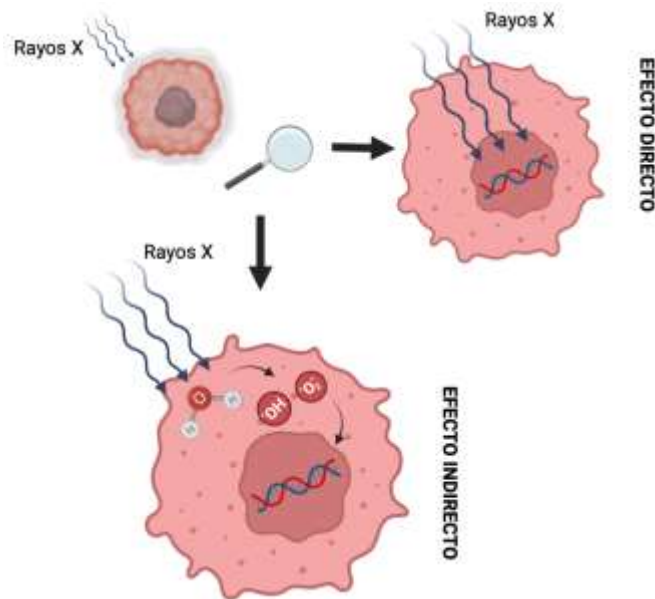


Figura 3. Descripción gráfica del efecto directo e indirecto de la radioterapia en las células

4.1.3. Radiosensibilizadores

Aunque se han logrado avances significativos en el campo de la terapia de pacientes con cáncer por medio de la radiación, llevando a un mejor enfoque y a una dosificación más regulada de las radiaciones ionizantes, la terapia sigue presentando algunos problemas importantes como lo son: I) el daño que se causa en el tejido adyacente del tumor y II) la radioresistencia de algunos tumores, como es el caso del glioblastoma. Por esta razón, se ha implementado el uso de agentes radiosensibilizadores para potenciar esta terapia. Los radiosensibilizadores son fármacos que se utilizan con la radiación para dañar las células cancerosas de los tumores en una medida más significativa que la suma de los efectos combinados de cirugía, radioterapia y quimioterapia, “el uso de nuevos agentes terapéuticos en combinación con el protocolo Stupp ha demostrado ser superior al protocolo Stupp por sí solo para el tratamiento del glioblastoma recién diagnosticado” [43].

Los agentes radiosensibilizadores se pueden clasificar según el método de daño causado en el ADN, de la siguiente manera: I) supresión de tiores intracelulares u otras sustancias radioprotectoras endógenas; II) formación de sustancias citotóxicas por radiólisis del radiosensibilizador; III) inhibidores de la reparación de biomoléculas; IV) análogos de timina que pueden incorporarse al ADN; y V) imitadores de oxígeno que tienen actividad electrofílica.

Sin embargo, por medio de la investigación en este tipo de aplicaciones se han estudiado los radiosensibilizadores de diversos materiales, clasificándolos también de acuerdo a su estructura: moléculas pequeñas, macromoléculas y nanomateriales [44], [45]. Para el caso de las moléculas pequeñas, se encuentra el oxígeno, molécula celular que presenta una característica electrófila, que permiten reducir fácilmente por los electrones liberados por la radiación incidente. Tras la irradiación del tumor oxigenado, la transferencia de energía es seguida por la radiólisis del agua con la formación inmediata de un ion radical, que tras reaccionar con otra molécula de agua, forma el radical hidroxilo altamente reactivo. El peróxido se forma a partir del oxígeno molecular mediante la reacción del radical hidroxilo [46].

En el segundo grupo de radiosensibilizadores se encuentran las macromoléculas, en este caso las oligonucleótidos que han sido probados en terapia contra el cáncer de hígado, debido a su inhibición en la telomerasa que se puede expresar en varios tipos de tumor y siendo usados con radiomarcadores, induciendo así daños en el ADN de estas células cancerosas. Change Yu, Ying Xu, et al. Busca potenciar el tratamiento de carcinomas nasofaríngeos al combinar la radioterapia y quimioterapia con oligonucleótidos antisentido del ADN, específicamente el hTR ASODN quien muestra una inhibición significativa de la proliferación celular y la longitud de los telomeros de las células cancerosas. Así mismo, se estudió la tasa apoptótica de las células expuestas a radiación versus las células tratadas con el oligonucleótido, observando un aumento en los efecto antitumorales en el segundo caso [47].

En base a esta última clasificación de los radiosensibilizadores, correspondiente nanomateriales, es importante conocer cuáles son las características que los hacen relevantes en este tipo de avances. Los nanomateriales poseen algunas características únicas al servicio del campo de la biomedicina. Su tamaño en la escala nanométrica les permite interactuar a nivel celular y subcelular en la administración de fármacos y la detección de enfermedades. Otras características incluyen una gran superficie en la que pueden unirse las biomoléculas, mientras que la modificabilidad de la superficie puede utilizarse en la personalización hacia un objetivo especial. Sus propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas pueden modificarse para adaptarlas a aplicaciones terapéuticas y de imagen médica. La biocompatibilidad y biodegradabilidad han hecho posible la seguridad dentro del cuerpo, y el cruce de barreras biológicas ha permitido

dirigir los tratamientos a determinados tejidos. En conjunto, estas cualidades convierten a los nanomateriales en herramientas versátiles y prometedoras para la medicina moderna [48][49].

En el caso de los radiosensibilizadores basados en nanomateriales se han estudiado varios tipos como de metales nobles, de ferrita, semiconductores, no metálicos o metales pesados. En el primer caso, los metales nobles cuenta con un número atómico alto que produce una mayor interacción de las moléculas de la célula generando emisiones secundarias y con ellas, daño en el ADN. Las nanopartículas de oro y plata, han sido probadas en diferentes estudios *in vitro* en tumores de ratones, que al ser combinadas con radioterapia han aumentado la supervivencia de los ratones, demostrando que este tratamiento logra detener las células en la fase G2 y generar así una apoptosis [48], [50]. Así mismo en el caso de los semiconductores, tienen muchas propiedades únicas, como el efecto de dimensión cuántica, el efecto de superficie y el efecto de confinamiento cuántico, y son excelentes candidatos para su uso en biomedicina. Estos ejercen la función de absorción de fotones que al interactuar con los electrones genera la liberación de electrones secundarios los cuáles pueden generar daños en el ADN de la célula cancerosa al interactuar con el agua y así dar paso a la creación de especies reactivas de oxígeno (ROS), actuando como radiosensibilizadores para causar daño a las células cancerosas cuando los niveles de energía electrónica estén en el rango de keV y MeV (incluyendo Rayos X) [51].

Los nanomateriales han sido usados en diferentes investigaciones, Mukherjee S Patra CR et al., realizaron un estudio que identificó las nanopartículas de oro como posibles agentes radiosensibilizadores contra el cáncer de cuello de útero, estas nanopartículas se funcionalizaron con un péptido de baja inserción de pH, posteriormente se realizaron ensayos *in vitro* en células de pulmón humano (células A549), para conocer su efecto citotóxico e irradiaron con Rayos X a diferentes dosis. Se captó la distribución de las nanopartículas de oro dentro de las células por medio de la técnica de microscopía óptica. Finalmente, observando la variación del pH de las células cancerosas antes y después de la irradiación de las células con la nanoplataforma, se observó una reducción significativa de la proliferación debido a la inserción del péptido y la variación del pH [52].

4.2. Puntos de carbono

En los últimos años se han dado a conocer un tipo de nanopartículas conocidas como puntos de carbono (PC), nanoestructuras basadas en carbono que presentan una hibridación sp^2 y sp^3 , razón por la que se atribuyen las propiedades ópticas como la fluorescencia [53]. Aunque son nanopartículas relativamente nuevas, desde el 2004

han recibido cada vez más atención debido a sus importantes ventajas en términos de baja toxicidad, inercia química, fluorescencia y estabilidad coloidal acuosa [54].

4.2.1. *Propiedades de los PC*

Los PC poseen propiedades como la capacidad de absorber y almacenar energía electromagnética en forma de luz visible o ultravioleta, dependiendo de sus propiedades ópticas. Dicho fenómeno ocurre cuando la energía de los fotones incidentes excita los electrones hasta un nivel de energía mayor y puede ser influenciada por varios factores, incluyendo su tamaño, forma, estructura y composición química [55]. También, se presentan propiedades electroquímicas que se refieren a su capacidad de interactuar con el medio y diferentes moléculas, permitiendo así la transferencia de iones como nitrógeno y oxígeno. Así mismo, pueden transferir electrones entre la superficie del material y las especies químicas en solución. Esta capacidad de transferencia de electrones es fundamental en procesos electroquímicos, como la oxidación y la reducción de especies químicas [56].

La fluorescencia corresponde a una de las propiedades más interesantes en los PC (Figura 4). Corresponde a la capacidad de estos nanomateriales de absorber energía en ciertas longitudes de onda y luego emitir luz a longitudes de onda mayores [57]. Así mismo, es posible funcionalizarlas con diferentes grupos químicos para modificar y ajustar sus propiedades ópticas y mejorar su compatibilidad con sistemas biológicos [58]. Nasir Javed and Deirdre M. O'Carroll* et al. Reporta información sobre las propiedades de los PC, los cuales presentan una absorción en la región espectral ultravioleta (UV) con una cola de absorción que se extiende hacia lo visible. La absorción UV de longitud de onda más corta, que está aproximadamente entre 200 y 350 nm, se atribuye a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ de CC y CN; sin embargo, la absorción UV de longitud de onda más larga, que generalmente aparece en forma de hombro o un pico más débil entre 300 y 400nm, se atribuye a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ de CO. Por lo general, la longitud de onda de emisión de luminiscencia depende de la longitud de onda de la radiación de excitación, esto significa que su longitud de onda de emisión cambia con la longitud de onda de excitación [59].

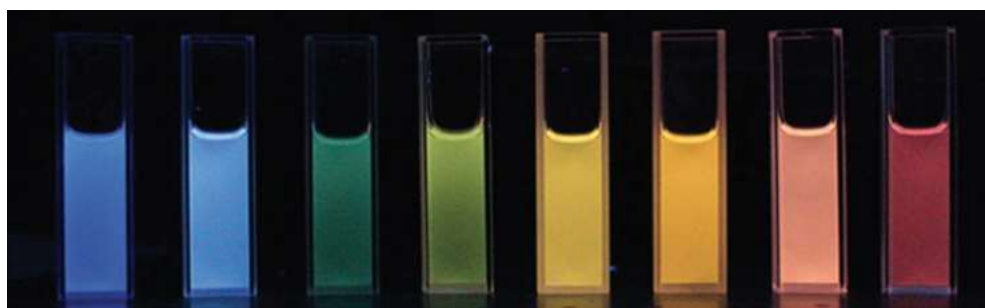


Figura 4. Fluorescencia de PC, imagen obtenida de Meng Li Liu, a Bin Bin Chen et al. El mecanismo de fluorescencia de los CD basado en el grado de oxidación de la superficie.

El mecanismo de luminiscencia de los PC se genera cuando las nanopartículas son excitadas con energía provocando una transición de los electrones del nivel HOMO (Orbital Molecular ocupado más alto) hacia el nivel HUMO (orbitales moleculares más bajos desocupados) y posteriormente se observa fluorescencia, resultado de la energía disipada de este salto de electrones. En este caso, se genera la transición $\pi \rightarrow \pi^*$. Sin embargo, los electrones pueden también tener transiciones desde el estado HOMO hasta los estados superficiales que se generan de los heteroátomos que se agregan a la nanopartícula como el nitrógeno u oxígeno, afectando la fluorescencia y generando un corrimiento en la absorción hacia los 450nm, favoreciendo la posibilidad de tener nuevos estados superficiales y así emisiones de hasta 650nm [60].

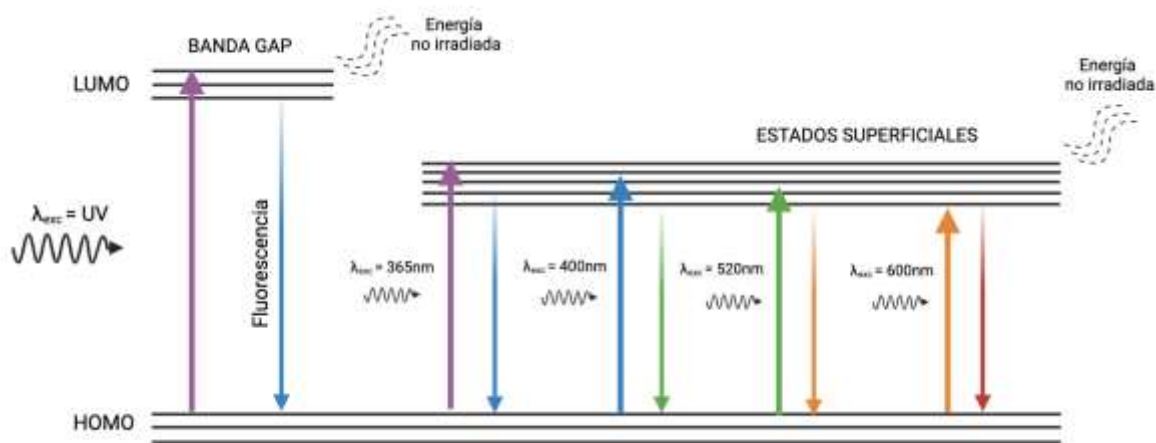


Figura 5. Mecanismo de luminiscencia de los PC

En el caso de la excitación con luz UV se han generado aplicaciones biomédicas que buscan incluir fluorescencia dentro de sus estudios. Sin embargo, para el caso de los PC como radiosensibilizadores la energía usada es mucho más alta (Rayos X), por lo tanto en este caso se busca una liberación de electrones de los estados superficiales en forma de electrones secundarios, con el fin de potenciar el daño en las células cancerosas por medio de la generación de ROS.

4.2.2. Métodos de síntesis de PC

La síntesis de los PC se puede realizar por métodos “top down” y “bottom up”. Los métodos top down (Figura 6), consisten en descomponer materiales de mayor tamaño en nanopartículas. En aplicaciones biomédicas, estos métodos se utilizan para producir nanopartículas con tamaños, formas y propiedades específicos, adecuadas para diversos fines, como la administración de fármacos, la obtención de imágenes y la

terapéutica [61]. Incluyen procedimientos como ablación laser, arco eléctrico, oxidación electroquímica y métodos ultrasónicos.

Por otra parte, en los métodos tipo *bottom up* generan nanopartículas a partir de componentes moleculares o atómicos más pequeños. Estos métodos permiten obtener nanopartículas con propiedades específicas, como tamaño, forma, química superficial y funcionalidad controlados. Algunos tipos de síntesis son solvotermal, hidrotérmal, descomposición térmica y método de microondas [62].

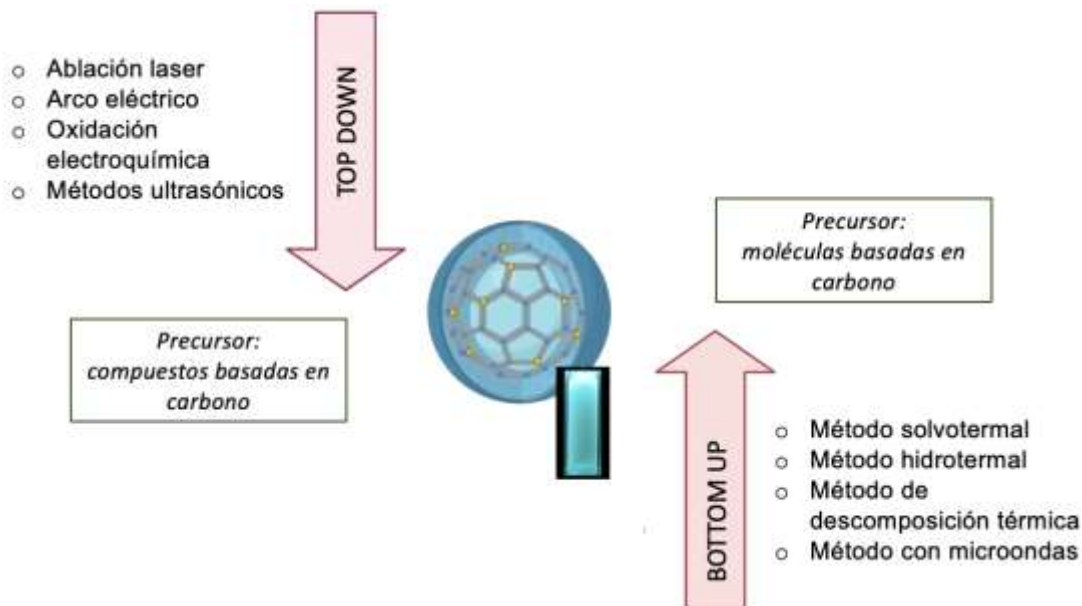


Figura 6. Métodos de síntesis de los PC

Los PC pueden ser sintetizados por reacción microondas y presentan varias ventajas sobre otros métodos de síntesis, un menor tiempo de reacción es menor y se encuentra en el orden de los minutos, calentamiento más uniforme y generación de un menor número de reacciones secundarias, lo que se traduce en propiedades fisicoquímicas y ópticas son más uniformes [63].

Adicionalmente, estos PC pueden ser dopados y funcionalizados para mejorar sus propiedades de acuerdo a su aplicación. En el caso del dopaje de los PC se refiere a la introducción de heteroátomos en el proceso de síntesis, adicionando estos átomos a los enlaces dobles y simples dentro del PC. Con el dopaje o codopaje, se busca optimizar las propiedades ópticas, electrónicas y catalíticas. También puede introducir funcionalidades específicas, como la mejora de la fotoluminiscencia, la estabilidad química o la actividad catalítica. En el caso de la funcionalización, consiste en la modificación química de la superficie de los puntos de carbono mediante la unión de grupos funcionales como grupos amino, grupos carboxilo, grupos hidroxilo o ligandos diana. Puede mejorar la biocompatibilidad, la solubilidad, la estabilidad y la capacidad

de orientación para aplicaciones de bioimagen, administración de fármacos y detección [64].

5. METODOLOGÍA

En este proyecto se busca evaluar el potencial radiosensibilizante de nanoplateformas basadas en puntos de carbono y dopadas con lantánidos en el tratamiento de glioblastoma, a través de ensayos *in vitro* en diferentes líneas celulares y cultivos primarios. Para lograr el objetivo propuesto, se realizaron tres fases como se detalla en la Figura 7: (I) desarrollo de nanoplateformas con potencial radiosensibilizante basadas en PC obtenidos a partir de urea y ácido cítrico (PC), dopadas con iones Gd^{3+} (PC: Gd^{3+}) y codopadas con iones Yb^{3+} (PC: Gd^{3+},Yb^{3+}) (II) estudios de citotoxicidad en diferentes líneas celulares y cultivos primarios y (III) irradiación de los tratamientos con Rayos X.

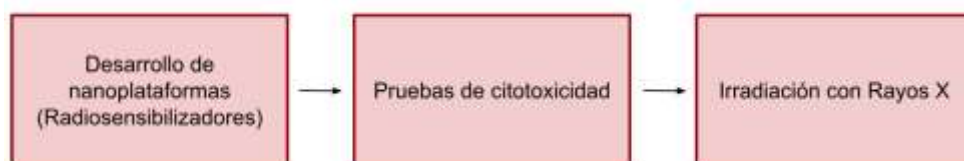


Figura 7. Diagrama de flujo fases de la metodología.

5.1. Fase 1: Desarrollo de nanoplateformas con potencial radiosensibilizante

5.1.1. Desarrollo de un protocolo base para síntesis de PC

Los PC fueron sintetizados por medio del método de reacción por microondas (Anton Paar, Microwave 50), partiendo de la modificación del procedimiento sintético reportado por Du F, Zhang M, Gong A et al. Para su síntesis se usó como precursores orgánicos urea (Sigma Aldrich, 99,5%, $CO(NH_2)_2$) y ácido cítrico monohidratado (Scharlau, $C_6H_8O_7$) en relación 2:1 respectivamente, y N,N dimetilformamida (Scharlau, $(CH_3)_2NCH$) como solvente [23]. La solución se sonicó por 20 minutos (Elmasonic Easy 30H) y se hace reaccionar en el microondas variando la temperatura en un rango de $160^{\circ}C$ a $200^{\circ}C$, usando un tiempo de reacción de 5 minutos. Para la purificación de las nanopartículas fluorescentes a base de carbono, el producto de la reacción se centrifuga a 10000 r.p.m. por 10 minutos (ThermoScientific mySPIN12). El sobrenadante se filtra (Minisart MY 25 PTFE f 0,22 mm) y se lleva a diálisis por 24h en 1L de agua destilada con agitación magnética. La solución dializada se llevó al horno a $100^{\circ}C$ por 12h. Los PC fueron guardados a $4^{\circ}C$ para su posterior uso. El procedimiento se muestra en la Figura 8.

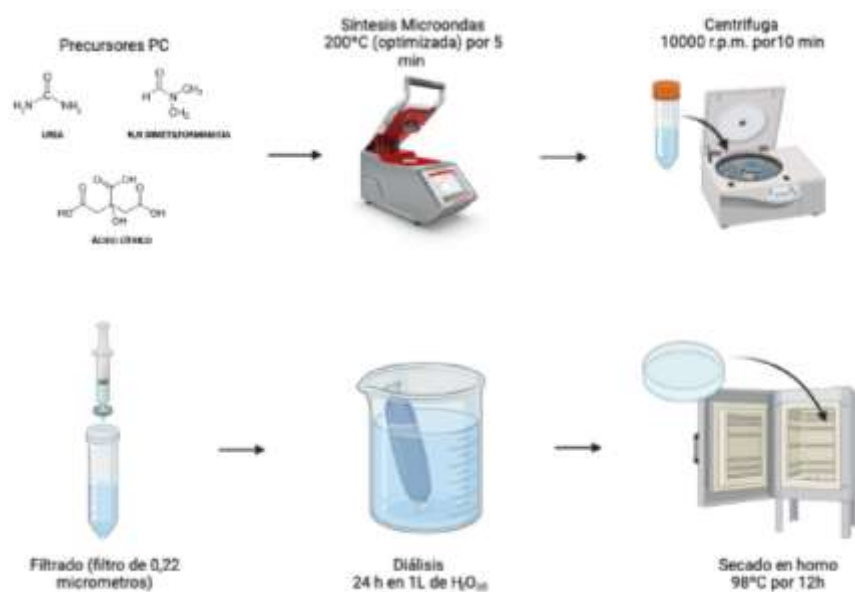


Figura 8. Procedimiento para la síntesis de PC por medio del método de microondas.

5.1.2. Incorporación del Gd³⁺ como dopante (PC:Gd³⁺)

De acuerdo al objetivo del desarrollo de una nanoplataforma con alta carga electrónica, es necesario incluir el uso de co-dopantes. En este caso, se usaron lantánidos para funcionalizar la superficie de la nanopartícula, específicamente el ion gadolinio (Gd). Para sintetizar PC:Gd³⁺ se usó el mismo enfoque expuesto en la sección 5.1.1, a una temperatura de 200°C y un tiempo de reacción de 5 minutos. Como fuente de iones de Gd³⁺ se usó ácido dietilentriaminopentaacético gadolinio (iii) sal dihidrógeno hidrato (Aldrich, 97%) el cual se incorporó en una concentración del 5 % con respecto al peso inicial de reactivos [65]. La solución se sonicó por 20 minutos (Elmasonic Easy 30H) y se hace reaccionar en el microondas variando la temperatura de 200°C, usando un tiempo de reacción de 5 minutos. La purificación del producto de la reacción se centrifuga a 10000 r.p.m. por 10 minutos (ThermoScientific mySPIN12). El sobrenadante se filtra (Minisart MY 25 PTFE f 0,22 mm) y se lleva a diálisis por 24h en 1L de agua destilada con agitación magnética. La solución dializada se llevó al horno a 100°C por 12h. Los PC fueron guardados a 4°C para su posterior uso. El procedimiento de preparación de la reacción se muestra en la Figura 9. En la Tabla 1, se presentan las cantidades precursores y solventes usados [66].

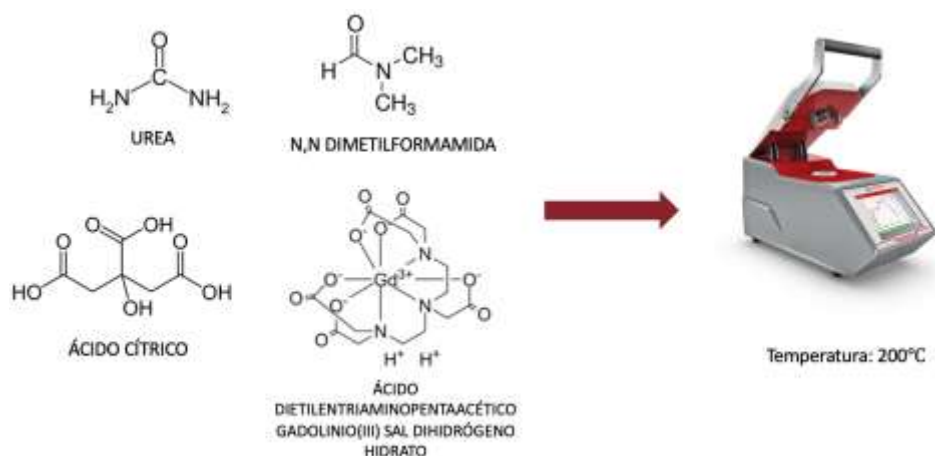


Figura 9. Síntesis de los PC:Gd³⁺ por medio del método de microondas a una temperatura de 200°C.

Tabla 1. Cantidad de reactivos y solventes para sintetizar PC y PC:Gd³⁺.

% peso Gd ³⁺	m Gd ³⁺ (g)	m ácido cítrico (g)	m urea (g)	V de N,N dimetilformamida (mL)	V H ₂ O (mL)
0	0	0,6	1,2	6	0
5	0,09	0,51	1,2	5,5	0,5

5.1.3. Introducción de Yb³⁺ como co-dopante (PC:Gd³⁺, Yb³⁺)

Como se mencionó en la sección anterior, se implementaron iones lantánidos para funcionalizar las nanopartículas y así aumentar su potencial en el efecto radiosensibilizador. De manera que se implementación de Yb³⁺ como co-dopante. Se exploraron dos procedimientos sintéticos para obtener PC:Gd³⁺, Yb³⁺ el primero de ellos basado en las secciones anteriores por el método de microondas; el segundo, reportado en la literatura y basado en el uso de un tubo de condensación [65]. Finalmente, el método para sintetizar la nanoplateforma (PC:Gd³⁺, Yb³⁺) se optimizó de acuerdo a las propiedades ópticas obtenidas.

5.1.3.1. Método de microondas (para la obtención de PC: Gd³⁺, Yb³⁺)

Se sintetizó PC:Gd³⁺, Yb³⁺ por el método de microondas usando cloruro de iterbio (III) hexahidrato (99,9%) como precursor de Yb³⁺, siguiendo el procedimiento de la sección anterior 5.1.2, a temperatura de 200°C (Figura 10). El producto de reacción fue purificada siguiendo el mismo proceso reportado anteriormente y conservada a 4°C para su posterior uso.

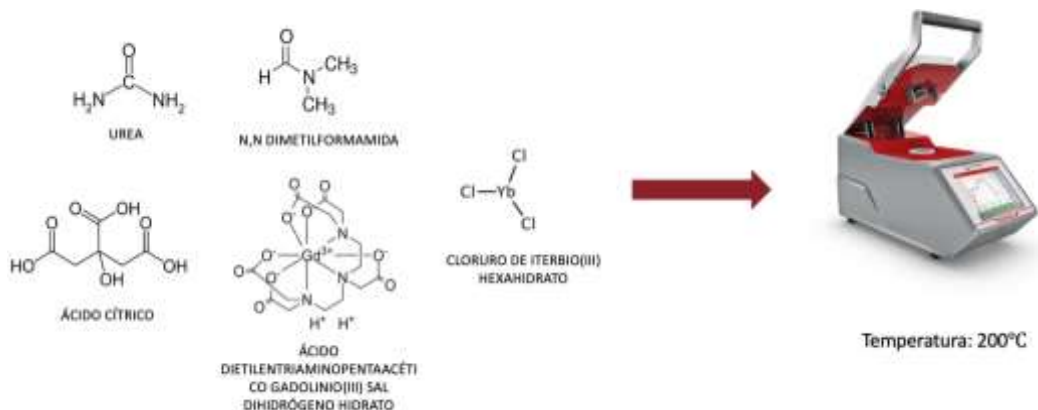


Figura 10. Síntesis de los PC:Gd³⁺, Yb³⁺ por medio del método de microondas.

5.1.3.2. Método de tubo de condensación para co-dopaje (PC: Gd³⁺, Yb³⁺)

Basado en D. K. Ji et al. se mezcló 7mL de una solución de PC:Gd³⁺ a una concentración de 10mg/mL con cloruro de iterbio (III) hexahidrato (99.9%) como precursor de Yb³⁺. Esta solución se agitó por 2h a 65°C en una plancha, posteriormente se realizó diálisis y se secó como se reportó en los casos anteriores [67]. Como se puede observar en la Figura 11.

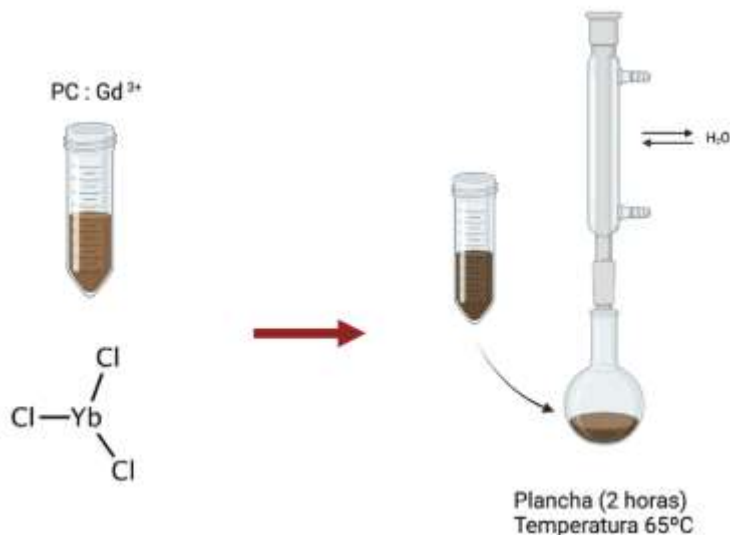


Figura 11. Síntesis de los PC:Gd³⁺, Yb³⁺ por medio del método de plancha

5.1.4. Caracterización de las nanoplataformas

5.1.4.1. Espectroscopia UV-Vis

Las propiedades ópticas de absorción de las nanopartículas PC, PC:Gd³⁺, PC:Gd³⁺, Yb³⁺ fueron caracterizadas usando espectrofotómetro UV – Vis FLAMES-S-

XR1-ES. Los espectros de absorción fueron obtenidos con soluciones acuosas de PC, PC, PC:Gd³⁺, PC:Gd³⁺,Yb³⁺ a una concentración de 0.05mg/mL, fueron medidos a temperatura ambiente en una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico en un rango de 200 a 800nm usando lámparas de UV de deuterio y luz visible de tungsteno. Los datos fueron procesados a través del software Prism®.

5.1.4.2. Espectroscopia de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron a través de un Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek) y espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES. Los datos fueron obtenidos con soluciones acuosas de PC, PC:Gd³⁺, PC:Gd³⁺,Yb³⁺ a una concentración de 0.05mg/mL. Los datos fueron procesados a través del software Prism®.

5.1.4.3. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

Se realizó el estudio del tamaño y morfología a través de la técnica de microscopía de fuerza atómica. Las muestras PC, PC:Gd³⁺, PC:Gd³⁺,Yb³⁺ fueron dispersadas en agua destilada a una concentración de 5mg/mL y de la misma manera se dispersaron en EtOH, y las medidas fueron tomadas con las nanoplataformas dispersas en EtOH por su dispersión en este medio. Se tomaron imágenes a diferentes tamaños de scanner y se obtuvo la imagen de la topografía de cada muestra. Por último, las imágenes fueron obtenidas mediante el software ImageJ® para conocer los tamaños promedios encontrados.

5.1.4.4. Potencia Z

Con el fin de caracterizar la carga superficial de la nanoplataforma, se midió el potencial ζ , por medio del equipo Litesizer 500 (Anton Paar) con cmPALS patentado, las soluciones acuosas de PC, PC:Gd³⁺, PC:Gd³⁺,Yb³⁺ a una concentración de 0.01 mg/mL. La temperatura de medición se mantuvo constante en 25°C.

5.1.4.5. Espectroscopia infrarroja

Se obtuvieron los espectros FTIR se midieron en un ATR en el espectrofotómetro Nicolet iS5 System (Thermo Fisher Scientific Inc). Las muestras PC, PC:Gd³⁺, PC:Gd³⁺,Yb³⁺ se secaron previamente, usando 10mg de masa por muestra. Por último, los datos son tratados en el software OriginLab®.

Las muestras fueron lavadas con acetona y EtOH para asegurar que los reactivos fueran eliminados y para su posterior uso en los estudios de citotoxicidad. En cada lavado se agregó 2mL de acetona o EtOH, se agitó por 5 minutos y se centrifugo a 12000 r.p.m. por 20 min. El pellet fue eliminado y el proceso se repitió 5 veces.

5.2. Fase 2: Estudios de citotoxicidad en PC, PC: Gd³⁺, PC:Gd³⁺,Yb³⁺ en diferentes líneas celulares y cultivos primarios

Con el fin de conocer la biocompatibilidad de las nanoplataformas sintetizadas se realizan estudios de citotoxicidad a través de estudios: estudio de citotoxicidad por MTT y ensayo de exclusión por azul tripán. Las nanopartículas fueron diluidas en agua destilada usando una concentración de 10mg/mL y filtradas posteriormente (filtro 0,22µm). Para estas pruebas, se usaron 4 líneas celulares y 2 cultivos primarios recolectados por investigadores y estudiantes del Semillero de Investigación SiBio de la Universidad del Rosario. Las características se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción de líneas celulares y cultivos primarios usados en los estudios de citotoxicidad. (* correspondiente a líneas celulares y cultivos primarios del semillero SiBio de la universidad del Rosario)

Líneas Celulares – Cultivo Primario	Características
3T3	Fibroblastos de ratón embrionario
VERO	Células epiteliales del riñón de un mono verde africano
HT29	Células endoteliales de cordón umbilical
U87	Células de glioblastoma humano
G200*	Glioblastoma grado IV, paciente masculino 43 años.
G298*	Glioblastoma grado IV, paciente femenina 63 años

5.2.1. Estudio de citotoxicidad de las nanoplataformas por MTT (Bromuro de Tetrazolio Azul de Tiazolilo)

En este ensayo por MTT, el bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo es reducido metabólicamente por la enzima mitocondrial succinato-hidrogenasa a formazan el cual presenta un color azul característico. Este compuesto permite observar la funcionalidad de las células a través del metabolismo de la mitocondria de manera tal que los cuerpos celulares teñidos de azul corresponden a las células viables después del tratamiento con las diferentes nanoplataformas. Se sembraron 10000 células de cada línea celular usada en 200µL de medio completo y se incubaron por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Pasadas 24h se añadieron los tratamientos según muestra la Tabla 3. Adicionalmente, se usaron 6 pozos que representaron los controles positivos (pozos donde se agrega H₂O₂) y negativos (pozos en los que no se agrega ningún tratamiento). Después de 24h se extrae el medio de cada uno de los pozos, se introduce la solución de MTT y posterior a 4h se disuelven los cristales de formazan formados con DMSO. Finalmente, se midió la absorbancia mediante espectrometría UV-Vis en función de la

concentración generada por la reducción del Bromuro de Tetrazolio Azul de Tiazolilo. Todo el procedimiento se representa en la Figura 12. Para el análisis estadístico de esta prueba, se realizó un prueba ANOVA de dos vías comparando los resultados por cada triplicado y entre las líneas celulares usadas. Este estudio se realizó por medio del software Prism®.

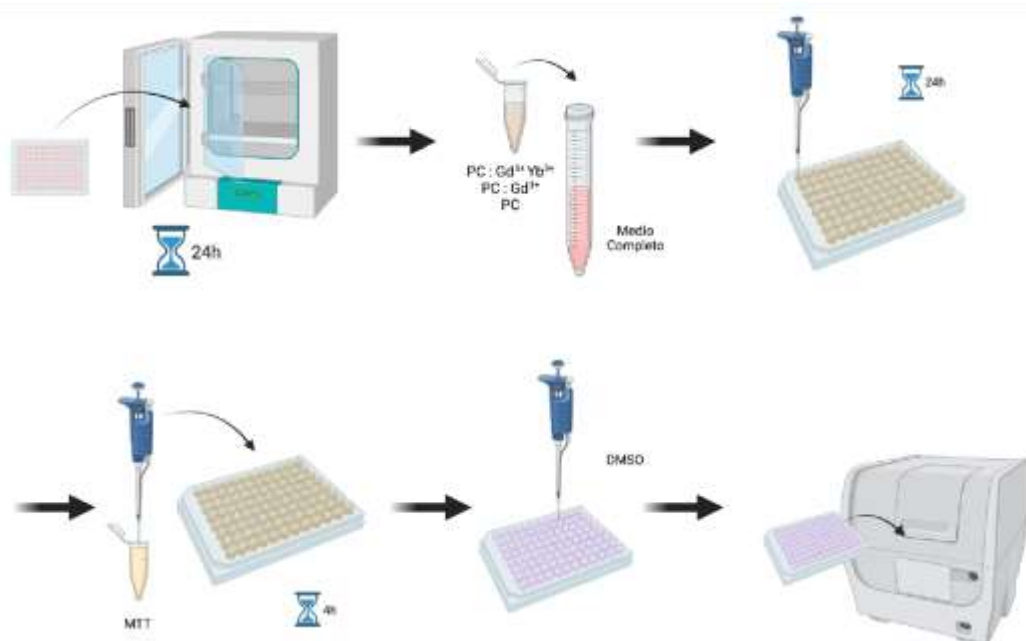


Figura 12. Procedimiento ensayo MTT

Tabla 3. Ensayos de citotoxicidad realizados en las nanoplateformas desarrolladas, concentración usada y líneas celulares.

	Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Líneas celulares (3T3, VERO, HT29, U87)	PC	50, 125. 250 y 500
	PC:Gd ³⁺	50, 125. 250 y 500
	PC:Gd ³⁺ , Yb ³⁺	250

En la Figura 13, se muestra la representación gráfica del ensayo MTT, realizado en una caja de Petri donde se añadieron los tratamientos (PC, PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺, Yb³⁺) a diferentes concentraciones. Este método se realizó en líneas celulares, inicialmente en PC y PC:Gd³⁺ y posteriormente a una concentración en la nanoplateforma PC:Gd³⁺, Yb³⁺ de acuerdo a los resultados obtenidos inicialmente.

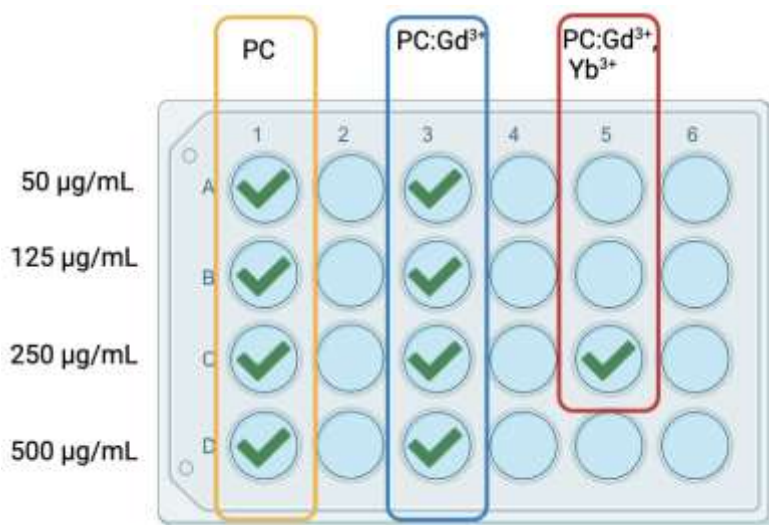


Figura 13. Representación gráfica del montaje realizado en el ensayo MTT en líneas celulares de 3T3, VERO, HT29 y U87, cada caja de color representa un tratamiento usado y en la parte izquierda se denotan las concentraciones de las nanoplateformas.

5.2.2. Estudio de citotoxicidad por ensayo de azul tripán

El ensayo de azul tripán busca medir el daño de celular, debido a la disrupción de la membrana celular, a través de la tinción con este reactivo [68]. Para realizar este ensayo se sembraron 20.000 células en cajas de 6 pozos. Se incubaron por 24h a 37°C con 5% de CO₂, transcurrido este tiempo se adicionaron las nanopartículas como se muestra en la Tabla 4. Estos tratamientos se incubaron durante 24h, posteriormente se retiró el medio de cada pozo y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se despegaron las células con Tripsina (0,25%), después de 3 minutos se agregó medio completo, esta solución se centrifugó, el pellet fue resuspendido en 1mL de medio completo y se tomó 10µL de esta solución junto con 10µL de azul tripán. Esta mezcla se llevó a la cámara de Neubauer y se calculó la cantidad de células usando un contador automático celular (CytoSMART). Con el software CytoSMART® fueron obtenidos los valores de las células vivas y el total de células, encontrando la viabilidad celular para cada una de las condiciones. Todo el procedimiento se representa en la Figura 14. Para el análisis estadístico de esta prueba, se realizó un prueba ANOVA de dos vías comparando los resultados por cada triplicado y entre las líneas celulares usadas. Este estudio se realizó por medio del software Prism®.

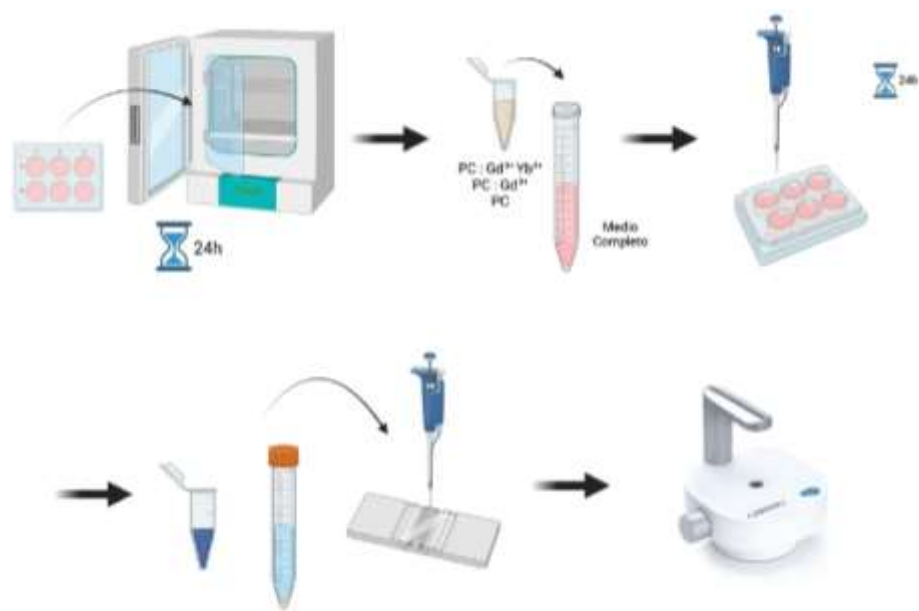


Figura 14. Procedimiento ensayo azul tripán

Tabla 4. Ensayos de citotoxicidad realizados en las nanoplataformas desarrolladas, concentración usada y líneas celulares/cultivos primarios.

Tratamiento	Concentración (µg/mL)		
PC	50 a 500	250	250
PC:Gd ³⁺	N/A	250	250
PC:Gd ³⁺ , Yb ³⁺		250	250
	Líneas celulares (3T3, VERO, HT29, U87)	Cultivo primario (G200)	Cultivo primario (G298)

En la Figura 15 se muestra la representación gráfica del ensayo de azul tripán, realizado en una caja de Petri donde se añadieron los tratamientos (PC, PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺, Yb³⁺) a diferentes concentraciones. Inicialmente, estos tratamientos fueron evaluados por este método en líneas celulares para observar el comportamiento, posteriormente se probaron en cultivos primarios de pacientes con gliomas para obtener un mayor acercamiento al objetivo de este proyecto.

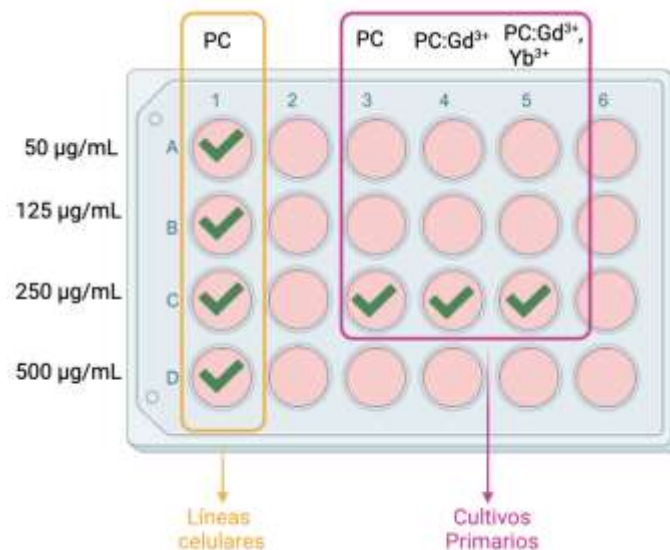


Figura 15. Representación gráfica del montaje realizado en el ensayo MTT en líneas celulares de 3T3, VERO, HT29 y U87 en el cuadro amarillo, y por parte del cuadro violeta son los ensayos realizados a una concentración en cultivos primarios.

5.3. Fase 3: Irradiación de los tratamientos con Rayos X

Con el fin de explorar el posible efecto radiosensibilizante de las nanoplateformas desarrolladas, se realizaron pruebas de irradiación con Rayos X. En este caso se usaron los tratamientos PC y PC:Gd³⁺, con la línea celular U87 y el cultivo primario G200, irradiando estas muestras y observando la capacidad de proliferación celular postirradiación.

Tabla 5. Estandarización del ensayo de irradiación de los tratamientos

	Dosis (Gy)	Cantidad de células por cada dosis	Concentración de NP (ug/mL)	Tratamientos
U87	0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10	50.000	250	Sin PC, PC PC:Gd ³⁺
G200				Sin PC PC PC:Gd ³⁺

Los tratamientos fueron irradiados en base a la Tabla 5. Inicialmente en una caja Petri se sembraron 100.000 células, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta llegar al 80% de confluencia. Después de 24 horas, se retiró el medio y se agregaron

las soluciones de nanoplateformas. De nuevo se incubaron 24h y se realizó el conteo de las células tratadas y controles, y se agregaron 10000 células en un falcon de 15mL para su irradiación (el cual contiene 5mL de medio completo más células por cada dosis de radiación). Estas muestras fueron irradiadas por fotones de energía de 6MV en dosis convencionales de 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy en un acelerador lineal de uso clínico (Linear Accelerator TrueBeam dual, VARIAN Medical Systems) Figura 17. El método de irradiación fue estandarizado en el Centro de Control del Cáncer. En este caso se crearon dos protocolos de acuerdo a los tratamientos (PC, PC:Gd³⁺, PC:Gd³⁺,Yb³⁺) y dosis de Rayos X. Al finalizar la radiación, se sembraron en placas de 6 pozos haciendo triplicados por cada dosis. Finalmente, las células se incubaron por 15 días para caracterizar la proliferación celular generada en este tiempo y se tiñeron para permitir el conteo de las colonias postirradiación en cada pozo. Todo el procedimiento se representa en la Figura 16.

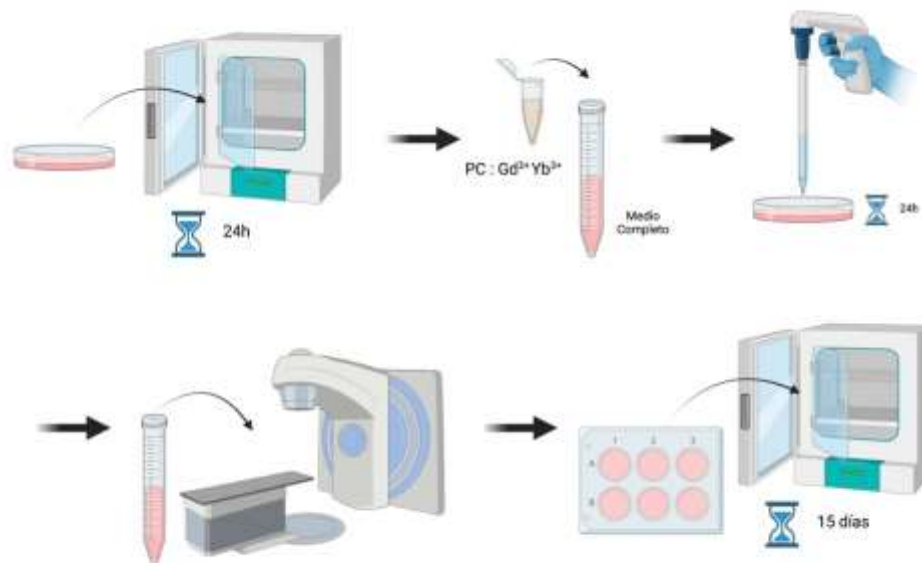


Figura 16. Procedimiento usado para irradiar los tratamientos en las líneas celulares y cultivos primarios.



Figura 17. Montaje de las pruebas de irradiación de las células y tratamientos en el equipo VARIAN Medical System de Rayos X. Centro de control de Cáncer.

Se buscó determinar la proliferación celular, es decir la capacidad de las células de formar colonias post-irradiación. Esta información se obtuvo a partir de teñir y fijar las células a la caja mediante formalina 10% por 30 minutos, para contar las colonias (más de 50 células) presentes por cada dosis de irradiación. Estos datos se procesan con el software ImageJ® y se analizan con el apoyo del software Prism®.

Para calcular la fracción de supervivencia se utilizaron los datos obtenidos para la cantidad de colonias y las células sembradas, en relación al control de 0 Gy.

$$FS = \frac{(ES) \text{ muestra}X}{(ES) \text{ control}} \quad (1)$$

Donde (ES) muestra representa la eficiencia de sembrado de la muestra a una dosis y (ES)control la eficiencia de sembrado de la muestra control.

$$ES = \frac{\text{Colonias}}{\text{Células sembradas}} * 100 \quad (2)$$

Para la ecuación anterior, ES representa la relación entre colonias y células sembradas mostrada en porcentaje.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El glioblastoma es un tumor localizado en el sistema nervioso central, clasificado por la OMS como un tumor de grado IV debido a su agresividad y a la infiltración de los tejidos. Por ello, el tratamiento a pacientes con este tipo de tumor se basa en la combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, su localización no permite hacer una resección completa mediante el procedimiento quirúrgico. Para el caso de la quimioterapia, su eficacia es limitada debido a que la penetración de sustancias y fármacos a través de los capilares cerebrales de la barrera hematoencefálica que protege el cerebro eliminando posibles amenazas o enlenteciendo el proceso de paso. Por último, la radioterapia presenta dificultades debido a la capacidad del tumor puede resistir la radiación [69].

Con el fin de superar estos desafíos, se han realizado avances e investigaciones en el ámbito de los nanomateriales como posibles agentes radiosensibilizadores para este tipo de aplicaciones. En este caso, se usaron puntos de carbono, nanopartículas introducidas en 2004 que han ido ganando impulso debido a características como la biocompatibilidad, las propiedades ópticas, el tamaño y los diferentes métodos de síntesis. Además, pueden funcionalizarse o doparse con fármacos y diversas heteroátomos, en particular lantánidos. Las propiedades de los PC y la elevada carga electrónica de iones como los lantánidos permite considerar estas nanoplataformas como posibles agentes radiosensibilizadores.

En este apartado, se muestran los resultados obtenidos al sintetizar nanoplataformas basadas en PC dopadas con iones lantánidos, para ser usadas como agentes radiosensibilizadores en tratamiento de pacientes con glioblastoma.

6.1. Fase 1: Desarrollo de nanoplataformas con potencial radiosensibilizante

Los puntos de carbono se sintetizaron por el método “*bottom up*”, usando un procedimiento de reacción por microondas. Este método permite la formación de PC por medio de la descomposición de las moléculas debido la radiación electromagnética, en un corto tiempo y con la opción de cambiar las propiedades de los PC de acuerdo al tiempo y componentes usados.

6.1.1. Desarrollo de un protocolo base para síntesis de PC

Los parámetros de síntesis para la obtención de los PC a partir de urea y ácido cítrico fueron establecidos como se muestra en Tabla 6.

Tabla 6. *Parámetros usados en la síntesis de PC*

Parámetros

Solvente	N,N dimetilformamida ((CH ₃) ₂ NCH)
Precursor de C	Ácido crítico C ₆ H ₈ O ₇
Precursor de N	Urea (CO(NH ₂) ₂)
Tiempo de reacción	5min
Temperatura	200°C

Inicialmente, se realizó una variación de la temperatura de reacción entre 160°C a 200°C considerando los antecedentes reportados en la literatura. Las propiedades ópticas de absorción de cada uno de los productos obtenidos después de cada reacción fueron caracterizados por espectroscopía UV-Vis.

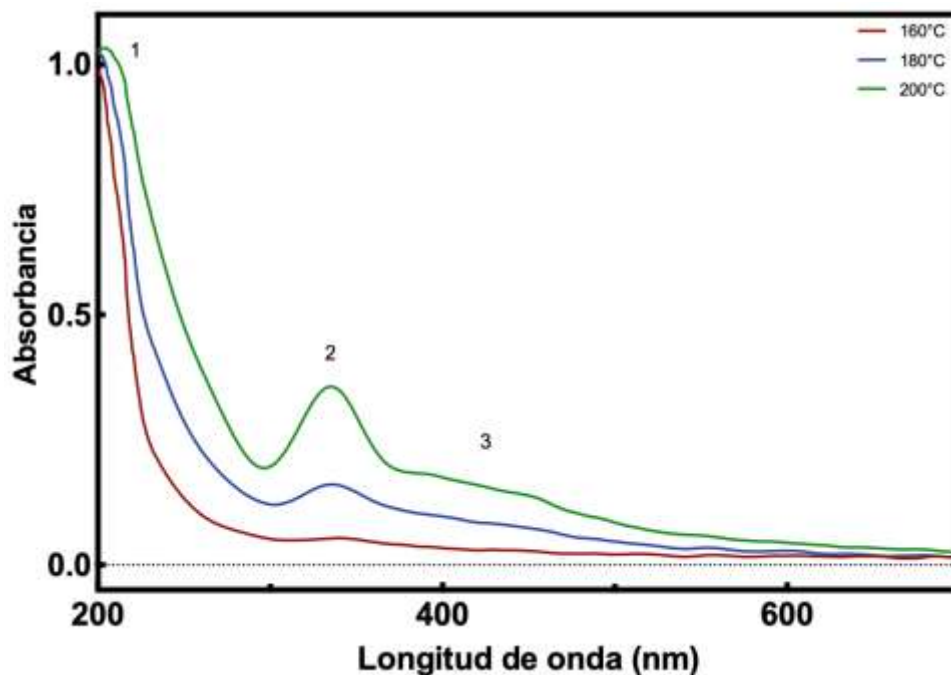
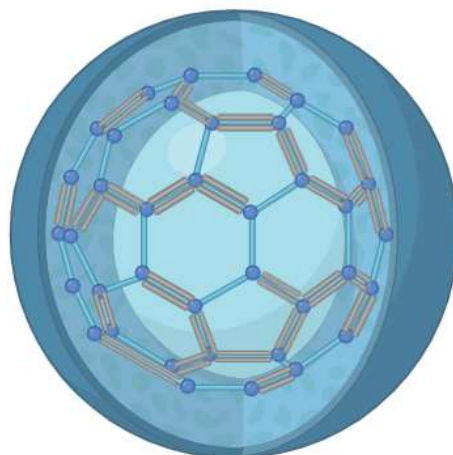


Figura 18. Espectros de absorción de soluciones acuosas de PC (concentración 0,05 mg/mL) sintetizados en función de la temperatura de reacción.

En la Figura 18, se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorción de los PC a diferentes temperaturas. En los espectros se observan tres bandas: se exhibe una amplia banda marcada con el número 1 ubicada entre 200nm y 300nm, atribuida a los enlaces C=C que se dan dentro del core de los PC y que generan una transición $\pi \rightarrow \pi^*$. La banda 2, se encuentra entre 300nm y 400nm, donde se presentan transiciones $n \rightarrow \pi$ correspondientes a enlaces -CO. Por último, la banda 3 que muestra un pequeño hombro entre 400nm a 500nm, es asociada a los enlaces -CN. Se puede observar que a medida que aumenta la temperatura se observa un incremento en la intensidad de las bandas. Esto se debe a la creación de enlaces, la cual se da a diferentes temperaturas a 160°C, se genera la creación de amidas del ácido cítrico junto a la urea, al aumentar la temperatura también incrementa la

deshidratación, desamonización y la deshidrogenización del ácido cítrico y así la formación de cadenas de aminas [70]. Por esta razón y posterior al análisis de temperatura respecto a la respuesta óptica de los PC, se consideró seleccionar 200°C como estándar para estas reacciones.



● Carbono

Figura 19. Representación gráfica de PC. En esta estructura, también hay presencia de heteroátomos de nitrógeno, oxígeno y grupos funcionales en la superficie de la nanoplateforma.

Continuando con la caracterización de las propiedades ópticas de los PC, se midió el espectro de emisión de las nanopartículas obtenidas con una temperatura de reacción de 200°C, resultado que se muestra en la Figura 20. De acuerdo a la información obtenida en la gráfica de absorción de los PC (Figura 18) se observa la máxima absorción de fotones en el rango de 200nm y 400nm, por lo tanto se irradia esta nanoplateforma con una longitud de onda de 365nm, de esta manera los PC exhiben fluorescencia en el rango de 400 a 650 nm, de acuerdo al mecanismo de fluorescencia presentado anteriormente esta emisión representa la transición de los electrones desde el nivel HOMO hasta los estados superficiales y LUMO. La fotoluminiscencia de los PC muestra un pico en 550nm.

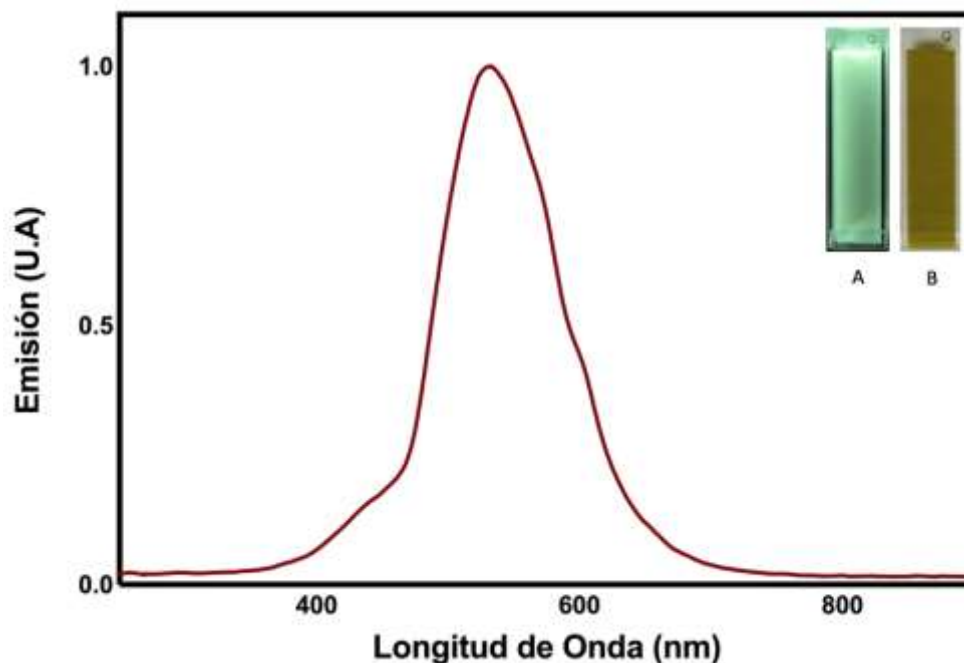


Figura 20. Espectro de emisión de una solución acuosa de PC (concentración de 0,05 mg/mL) sintetizados a 200°C a partir de N, N dimetilformamida, urea y ácido cítrico ($\lambda_{EXC} = 365\text{nm}$). Las imágenes dentro del espectro muestran A. Con exposición de luz UV a $\lambda_{EXC} = 365\text{nm}$, B. Sin exposición de luz UV.

Se caracterizó la morfología y tamaño promedio de PC por medio de la técnica de AFM, en el modo contacto que permite la reconstrucción de la topografía de la muestra. En la Figura 21, se muestran los resultados tomados a diferentes tamaños de scanner (10 μm , 1500nm y topología). En la parte A, se pueden identificar especies nanoparticuladas de color blanco en la escala de 300nm, su tamaño fue calculado con el software ImageJ®, reportando un valor promedio de $41,1 \pm 34,5$ nm (en el Anexo 3 se observan los valores obtenidos en el software). La técnica de AFM también permite generar una reconstrucción en 3D correspondiente a la parte B. Por último, en la parte C se muestra una reconstrucción de la rugosidad de la superficie de la muestra, esta distribución muestra un pico en la estructura a 10nm. Las imágenes indican estructuras con diferentes distribuciones de tamaño debido a la los enlaces generados por las interacciones electrostáticas y la formación de los puentes de hidrógeno entre las nanopartículas propio de la diversidad de elementos usados en los precursores y solventes.

Es importante resaltar que la técnica de AFM no es una técnica específica para caracterizar este tipo de nanoplataformas, se recomienda usar la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) [71] y otras técnicas como Dispersión dinámica de luz [72].

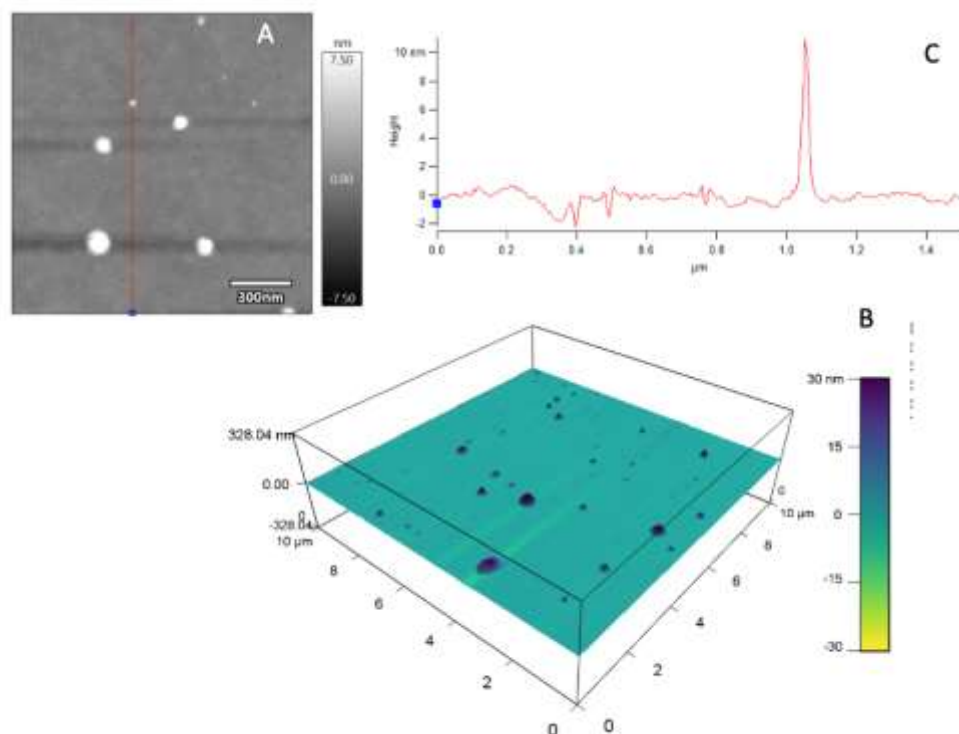


Figura 21. Imagen obtenidas en microscopia de fuerza atómica. A. Imagen obtenida en 2D a una resolución de 300nm, en blanco se muestran los PC, B. Distribución de rugosidad de la muestra. C. Imagen de profundidad a ± 30 nm.

Para determinar los grupos funcionales presentes en la superficie de los PC, se usó la técnica de espectroscopia de infrarrojo. En este caso, la técnica se basa en conocer la frecuencia de vibración de las muestras en polvo y con esta información relacionar la frecuencia con el tipo de enlace que se encuentra en la superficie de los PC. En la Tabla 7, se muestran los valores que relacionan los enlaces, grupos funcionales. Frecuencia de vibración [73].

Tabla 7. Enlaces atribuidos a las frecuencias de vibración en espectroscopia de infrarrojo.

Tipo de Enlace	Grupos Funcionales	Frecuencia (cm^{-1})
N – H	Amidas y aminas (primarias y secundarias)	3500-3100 1640-1550
O – H	Ácidos carboxílicos	3400-2400
C = O	Carbonilos	1800-1650
C = C	Aromáticos	1650-1450
C – H	Enlaces CH_3	1450-1375
C – O	Amidas Ácidos carboxílicos	1680 – 1630 1300 - 1000
C – N, C = N	Aminas	1350 – 1000 - 1600

De acuerdo a la información de las frecuencias de vibración y a los espectros obtenidos en la Figura 22, se encontró la presencia de grupos carbonilos, amina y C-H, correspondientes a vibraciones en el rango de 3250 y 2750 cm^{-1} los cuales son comunes en este tipo de nanomateriales basadas en carbono; también las vibraciones generadas entre 1800 y 1600 cm^{-1} se atribuyen a los enlaces C=O; y por último, los enlaces C=N, N=O basados en los precursores usados, los cuales son ricos en N. Lo que concuerda y hace relación con los precursores que se usaron al sintetizar los PC.

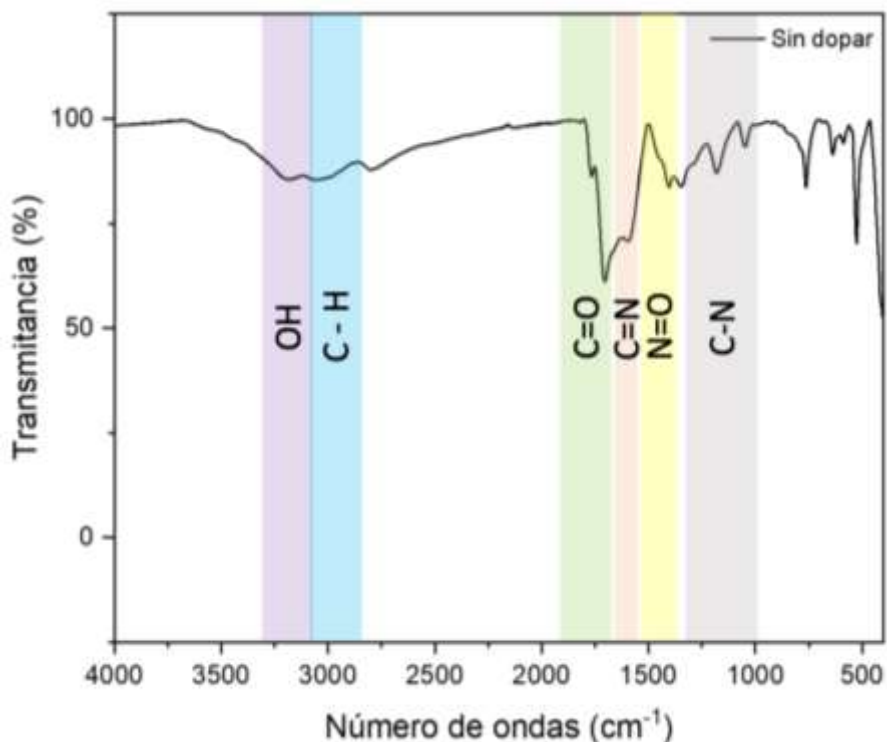


Figura 22. Espectro infrarrojo de PC sintetizados a 200°C a partir de N,N dimetilformamida, urea y ácido cítrico.

La carga superficial de los PC sintetizados se midió a partir de la técnica potencial z, esta solución acuosa evidencio un valor de -35,02 con una desviación estándar de ± 2 mV. Esto refleja que la superficie de los PC presenta carga negativa, posiblemente por la presencia de grupos funcionales con átomos electronegativos como el nitrógeno y el oxígeno. Hallazgo que concuerda con la información obtenida de los espectros de absorción mostrada anteriormente.

6.1.2. Incorporación de Gd^{3+} como dopante (PC: Gd^{3+})

Con el fin de incrementar la nube electrónica de la nanoplateforma para aumentar las probabilidades de interacción con los Rayos X, se incorporó ácido dietilentiainopentaacético gadolinio (iii) sal dihidrógeno hidrato como fuente de Gd^{3+} en el proceso sintético. En este caso, corresponde al ion Gd^{3+} , cuyo número atómico brinda a la nanoplateforma un aumento de carga electrónica que concuerda con la aplicación de este proyecto. Es importante resaltar que el gadolinio ha sido usado en aplicaciones biomédicas, un ejemplo se presenta en Sancey et al., donde se sintetizaron nanopartículas basados en gadolinio para aplicaciones teranósticas en tratamiento contra el cáncer, las cuales se eliminan a través de la orina comprobando así su capacidad de ser biodegradables [74].

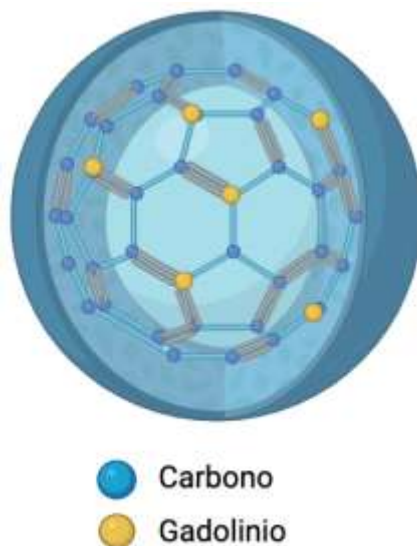


Figura 23. Representación gráfica de los PC: Gd^{3+} , En esta estructura, también hay presencia de heteroátomos de nitrógeno, oxígeno y grupos funcionales en la superficie de la nanoplateforma.

Los PC: Gd^{3+} fueron sintetizados por medio del método de microondas, siguiendo el procedimiento reportado en la sección 6.1.1. La nanoplateforma PC: Gd^{3+} muestra tres bandas de absorción como se muestra en la Figura 24. La primera banda marcada con el número 1 y ubicada entre 200nm y 300nm, es atribuida a los enlaces C=C que se dan dentro del core de los PC (transición $\pi \rightarrow \pi^*$). La segunda banda entre 300nm y 400nm, con transiciones $n \rightarrow \pi$ correspondientes a enlaces -CO. Por último, la tercera banda entre 400nm a 500nm generada por los enlaces -CN y confirma la presencia de heteroátomos como nitrógeno y oxígeno que provienen de los precursores usados. Esta última banda, al ser comparada con la Figura 18, presenta una mayor amplitud lo que corresponde a la transición de los electrones otorgados por la molécula fuente de gadolinio.

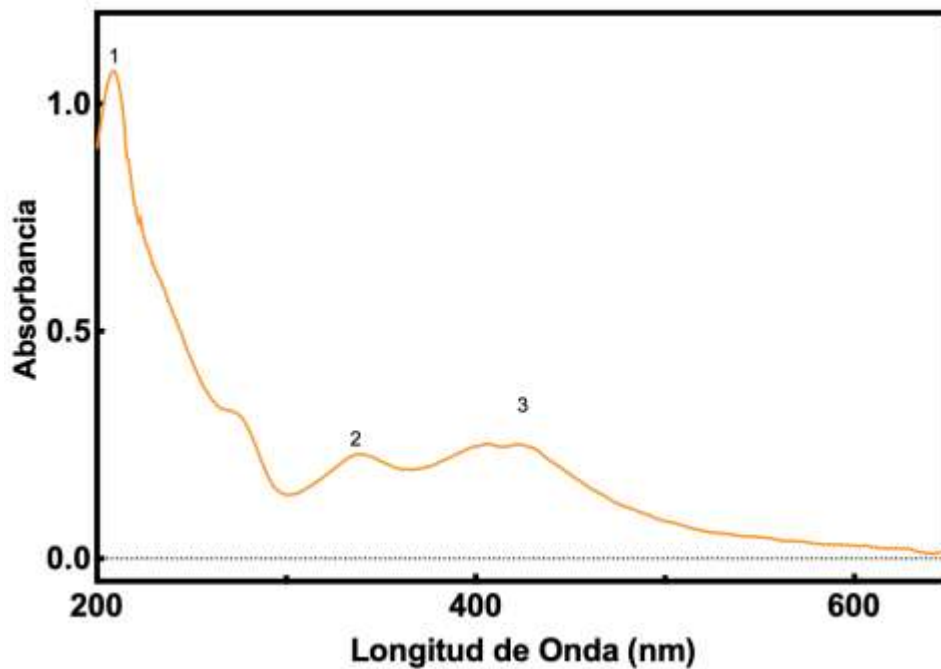


Figura 24. Espectros de absorción de soluciones acuosas de PC:Gd³⁺ (concentración 0,05 mg/mL).

El espectro de emisión de los PC:Gd³⁺ al ser irradiadas con luz UV a una longitud de excitación de 365nm, la cual fue seleccionada en base a la absorción que muestra una banda más amplia desde respecto a los PC (Figura 25). Los PC exhiben fluorescencia de fotones cuyas longitudes de onda se encuentran entre 400nm a 650nm con un máximo de fluorescencia de 550nm, esta respuesta se debe a la transición de los electrones desde el nivel HOMO hasta los estados superficiales generando así fluorescencia.

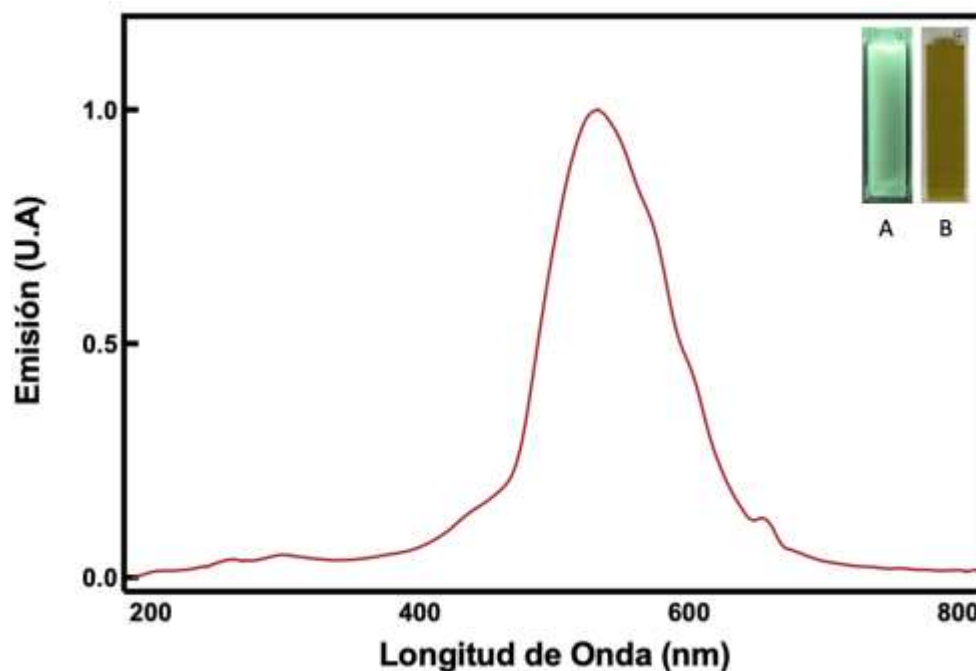


Figura 25. Espectro de emisión de una solución acuosa de PC:Gd³⁺ (concentración de 0,05 mg/mL) sintetizados a 200°C a partir de urea, ácido dietilentriaminopentaacético gadolinio (iii) sal dihidrógeno y ácido cítrico ($\lambda_{EXC} = 365\text{nm}$). Las imágenes dentro del espectro muestra la muestra en una celda de cuarzo A. Con exposición a luz UV a $\lambda_{EXC} = 365\text{nm}$, B. Sin exposición a luz UV.

La topografía y tamaño de los PC:Gd³⁺ se caracterizaron por AFM, en el método de contacto que permite la reconstrucción de la topografía de la muestra. En la Figura 26, se muestran los resultados tomados para esta muestra a diferentes tamaños de scanner (10 μm , 1500nm y topología). En la parte A, correspondiente a la imagen obtenida en 2D en una escala de 300 nm, se exhiben diferentes especies nanoparticuladas cuyos tamaños fueron determinadas con apoyo del software ImageJ® dando un acercamiento de tamaño de $34,8 \pm 8,1\text{nm}$ (en el Anexo 4 se observan los valores obtenidos por el software ImageJ®). Por parte de la reconstrucción 3D de la muestra se encuentra en la parte de B. Y por último, en la parte C se puede observar la rugosidad de la muestra, observando dos picos a 20 nm y 30 nm. Es importante considerar, que estos tamaños pueden variar de acuerdo a la técnica de preparación de la muestra y los solventes usados en la toma de las imágenes.

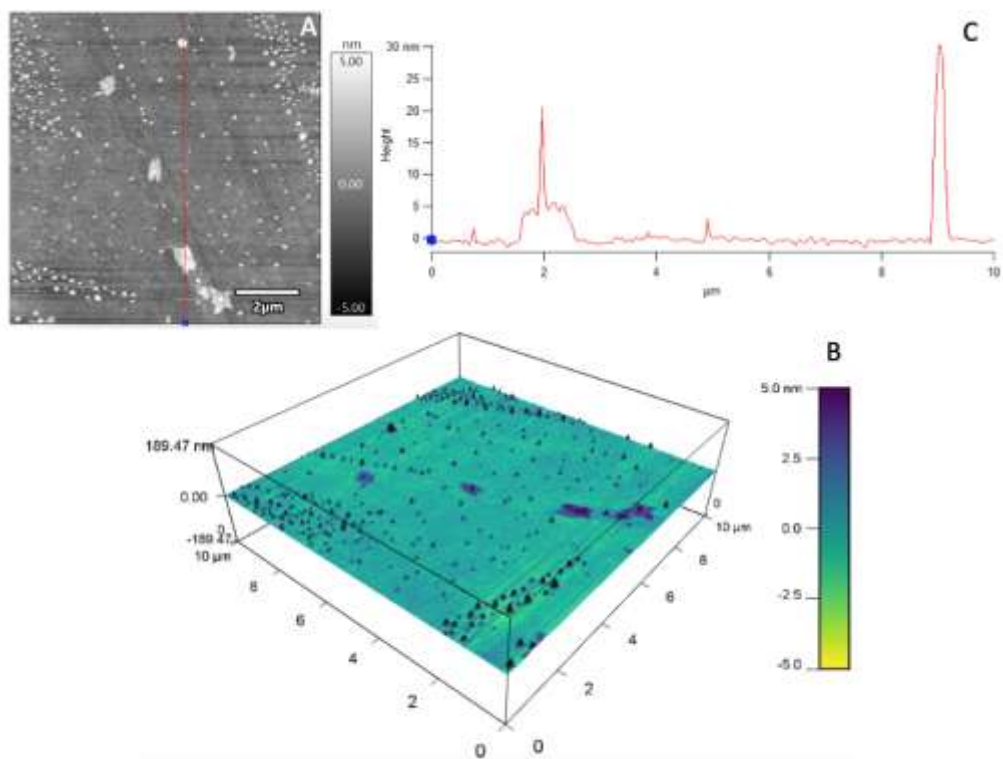


Figura 26. Imagen obtenidas en microscopia de fuerza atómica. A. Imagen obtenida en 2D a una resolución de 300nm, en blanco se muestran los PC:Gd³⁺, B. Distribución de rugosidad de la muestra. C. Imagen de profundidad a ± 30 nm.

Los grupos funcionales presentes en su superficie de los PC:Gd³⁺ se estudiaron a través de espectroscopia de infrarrojo (FTIR)(Figura 27). encontrando: en 3100 cm⁻¹ se encontró un pico característico de los enlaces -OH y en 3000 cm⁻¹ se observa un pico menor que se asocia con enlaces -CH; en el rango de 1750cm⁻¹ y 1000cm⁻¹ se encontraron 4 principales picos correspondientes a enlaces -C=O, -C=N, -N=O y finalmente -C-N.

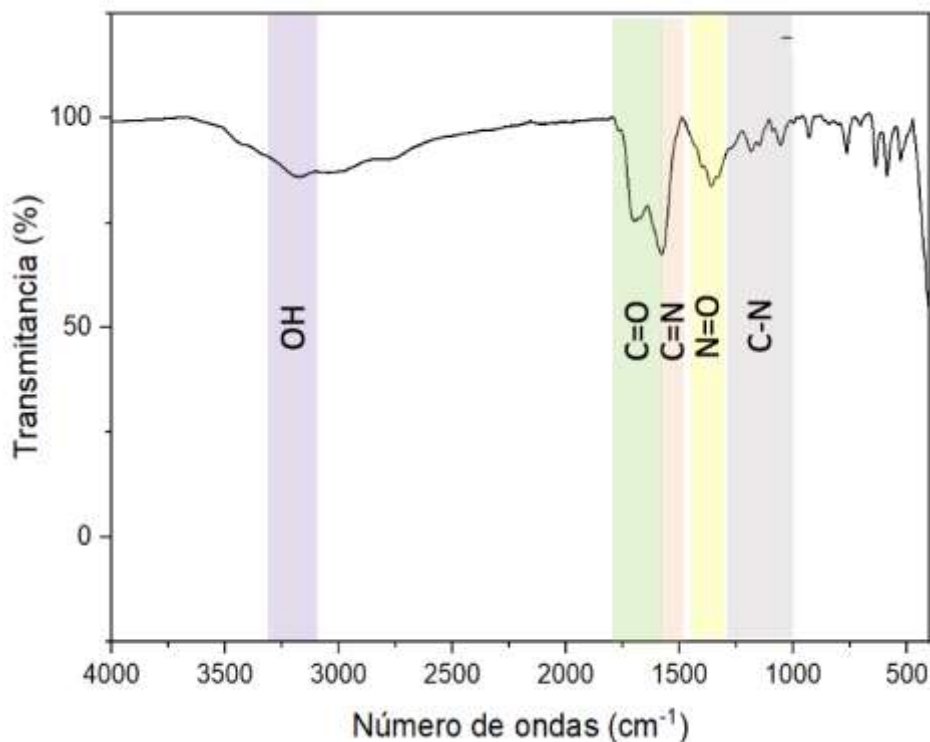


Figura 27. Espectro infrarrojo de PC:Gd³⁺.

Se midió la carga superficial de PC:Gd³⁺ obteniendo un valor de $-33,9 \pm 0,7$ mV, que representa la presencia de amidas y carboxilos en la superficie de la nanopartícula, propias de sus precursores y enlaces formados a través de las síntesis, información que es consistente con las bandas de absorción obtenidas para esta nanoplateforma.

6.1.3. Introducción de Yb³⁺ como co-dopante (PC:Gd³⁺, Yb³⁺)

Con el objetivo de incrementar la probabilidad de aumentar las emisiones secundarias en la radioterapia y así potenciar su efecto a través de las nanoplateformas, se realizó la introducción Yb³⁺ como co-dopante. Este fue considerado por su alto número atómico e inclusión en aplicaciones biomédicas. Yuci C et al., estudiaron la citotoxicidad de nanopartículas con iterbio en un ensayo *in vivo* para ser usado como medio de contraste en toma de imágenes médicas, observando que esta nanopartículas no generan daños en las células. Así mismo, se usó en etiquetado y seguimiento de hidrogeles, permitiendo su localización *in vivo* [67].

En este caso, se sintetizaron PC:Gd³⁺,Yb³⁺, por medio de dos diferentes métodos: el primero de ellos busca co-dopar la nanoplateforma usando el método de microondas e incorporando el cloruro de iterbio (III) hexahidrato con el fin de obtener enlaces en el core de la nanoplateforma. El segundo fue funcionalizar la superficie con Yb³⁺, iniciando con una solución acuosa de PC:Gd³⁺, calentada en una plancha mientras se

incorporaba el cloruro de iterbio (III). Con el método 1 los iones de Yb^{3+} se ubican en el core de la nanoplateforma principalmente, mientras que en el método 2 estos iones se pueden ubicar en menor frecuencia en el core de la nanoplateforma, y la mayor parte de los enlaces se ubican en la superficie Figura 28.

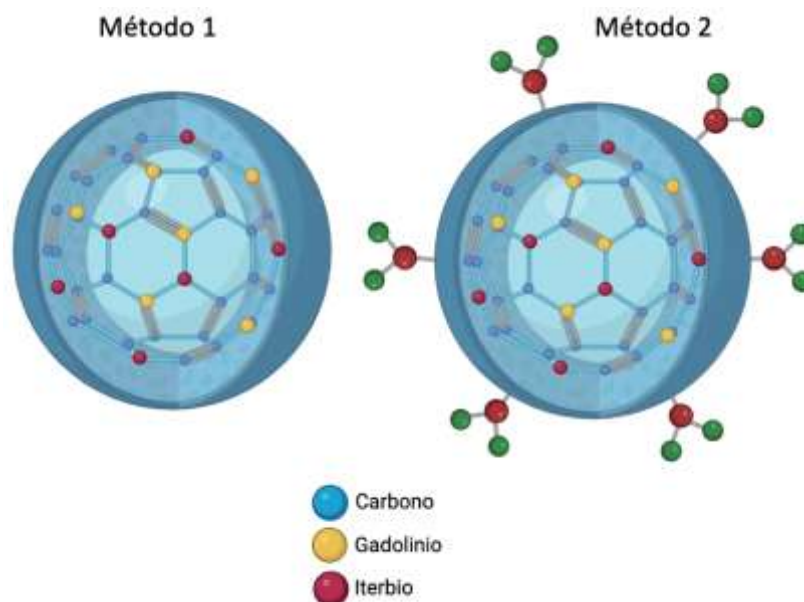


Figura 28. Métodos de dopaje y funcionalización de los PC: Gd^{3+} , Yb^{3+}

Para las nanoplateformas sintetizadas por los dos métodos, se realizaron pruebas de caracterización de sus propiedades ópticas. Inicialmente, se midieron los espectros de absorción de las nanoplateformas sintetizadas por el método 1 ($\text{PC}:\text{Gd}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$), donde se observan tres bandas: en la primera ubicada entre 200 nm a 300 nm correspondiente a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, atribuidos a los enlaces $\text{C}=\text{C}$ dentro del core; la segunda banda, de 300 nm a 400 nm exhibe una transición de $n \rightarrow \pi$, atribuidos a los enlaces $-\text{CO}$; la banda 3, ubicada entre 400nm y 500nm se asocia a los enlaces $-\text{CN}$ (Figura 29).

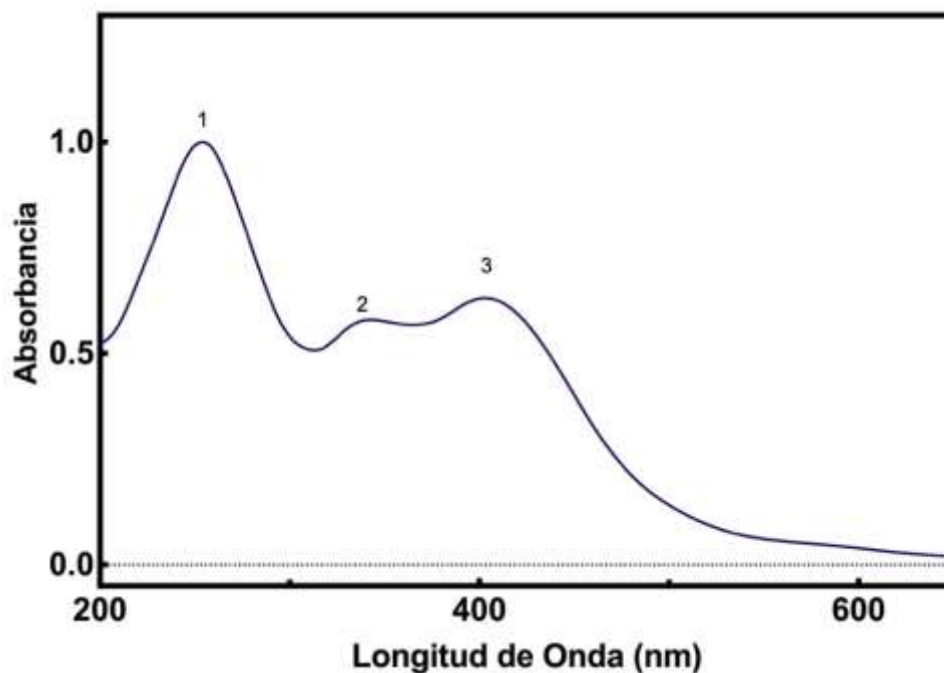


Figura 29. Espectro de absorción de soluciones acuosas de PC:Gd³⁺, Yb³⁺ método 1 (concentración de 0,05 mg/mL).

Por parte del espectro de absorción de los PC:Gd³⁺, Yb³⁺ sintetizados por el método 2, se observa un cambio significativo en las bandas características de las nanoplateformas sintetizadas y mostradas anteriormente. En la Figura 30, se puede observar que los centros ópticos vistos en las anteriores nanoplateformas no están definidos debido a la posible liberación de los heteroátomos por la funcionalización del Iterbio, lo que se pudo generar una posible coraza de cloruros de iterbio que no permite ver específicamente las transiciones sino un solo ensanchamiento de la banda. Por esta razón y para evitar que los iones de Yb³⁺ puedan ser liberados de la superficie, se eligen la nanoplateforma sintetizada por el método 1. En el Anexo 1, se muestra la caracterización completa del producto obtenido por el método 2.

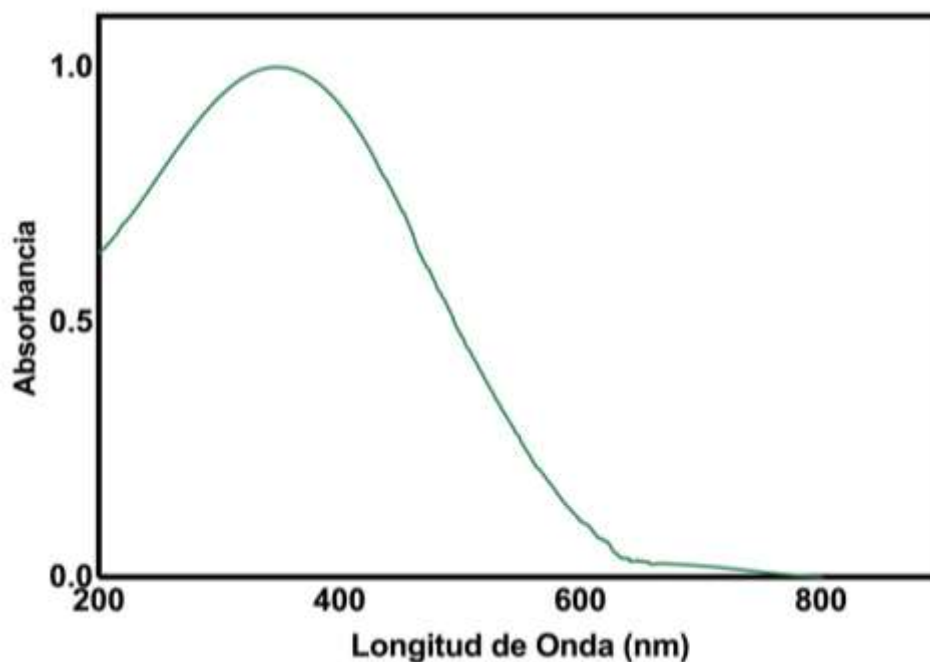


Figura 30. Espectro de absorción de soluciones acuosas de PC:Gd³⁺, Yb³⁺ método 2 (concentración de 0,05 mg/mL).

En la Figura 31, se muestra el espectro de emisión de PC:Gd³⁺, Yb³⁺ obtenido al irradiar la muestra con luz UV con una longitud de onda de excitación 365nm, exhibiendo una longitud de onda 400nm a 650nm, con un máximo de fluorescencia en aproximadamente 550nm. De acuerdo al mecanismo de fluorescencia, se observa la transición de los electrones desde el nivel HOMO hasta los diferentes estados superficiales que se obtienen al agregar heteroátomos a la nanoplateforma.

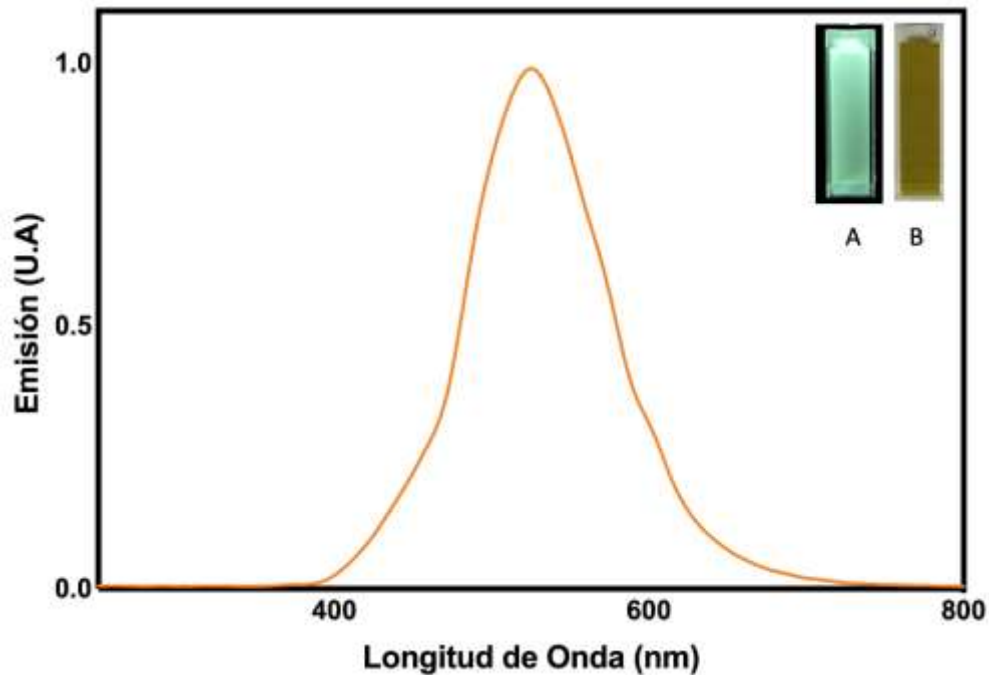


Figura 31. Espectro de emisión de una solución acuosa de PC:Gd³⁺, Yb³⁺ (concentración de 10mg/mL) sintetizados a 200°C a partir de N, N dimetilformamida, urea, ácido dietilentiainopentaacético gadolinio (iii) sal dihidrógeno, cloruro de iterbio (III) y ácido cítrico ($\lambda_{EXC} = 365\text{nm}$). Las imágenes dentro del espectro muestra la muestra en una celda de cuarzo: A. Con exposición de luz UV a $\lambda_{EXC} = 365\text{nm}$, B. Sin exposición de luz UV.

La topografía y tamaño de los PC:Gd³⁺, Yb³⁺ se midieron por AFM, en el método de contacto que permite la reconstrucción de la topografía de la muestra. En la Figura 32, se muestran los resultados tomadas para esta muestra a diferentes tamaños de scanner (10 μm , 1500nm y topología). En la parte A, correspondiente a la imagen obtenida en 2D en una escala de 300nm, se exhiben diferentes nanopartículas cuyos tamaños fueron medidas por medio del software ImageJ® dando un acercamiento de tamaño de $27 \pm 21\text{nm}$ (en el Anexo 5 se observan los valores obtenidos por el software ImageJ®). Por parte de la reconstrucción 3D de la muestra se encuentra en la parte de B. Y por último, en la parte C se puede observar la rugosidad de la muestra, observando un pico a 10nm.

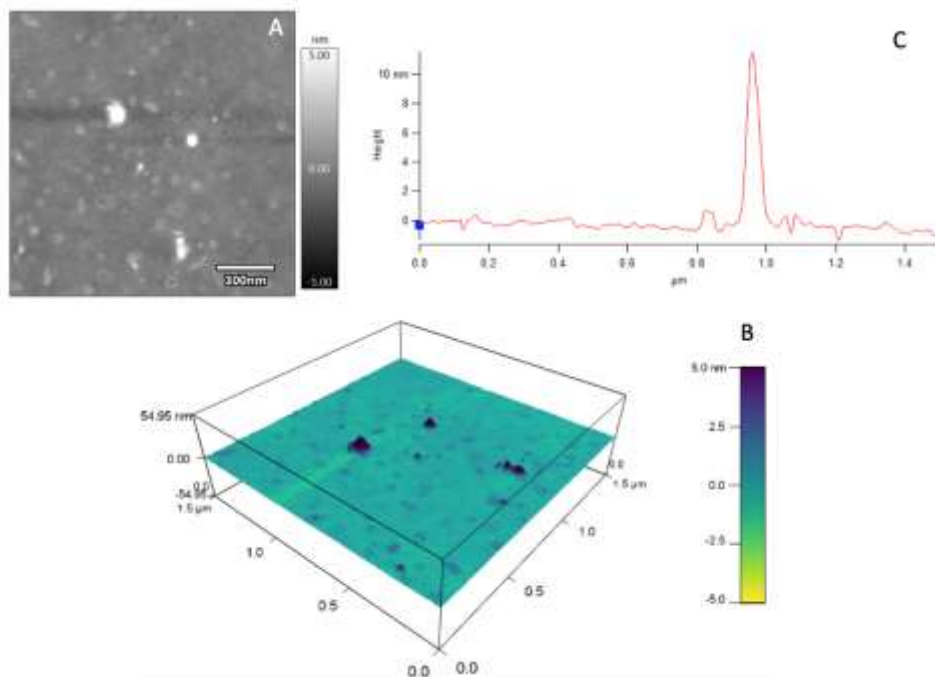


Figura 32. Imagen obtenidas en microscopia de fuerza atómica para PC:Gd³⁺, Yb³⁺. A. Imagen obtenida en 2D a una resolución de 300nm, en blanco se muestran las nanoplateformas. B. Distribución de rugosidad de la muestra. C. Imagen de profundidad a ± 30 nm.

Como se muestra en la Figura 33, siguiendo con la caracterización de la nanoplateforma PC:Gd³⁺, Yb³⁺ se estudiaron los grupos funcionales presentes en su superficie a través de la técnica de espectroscopia de infrarrojo (FTIR), encontrando: en 3100cm⁻¹ se encontró un pico característico de los enlaces -OH y en 3000 cm⁻¹ se observa un pico menor que se asocia con vibraciones -C-H; en el rango de 1750cm⁻¹ y 1000cm⁻¹ se encontraron 4 principales picos correspondientes a enlaces -C=O, -C=N, -N=O y finalmente -C-N.

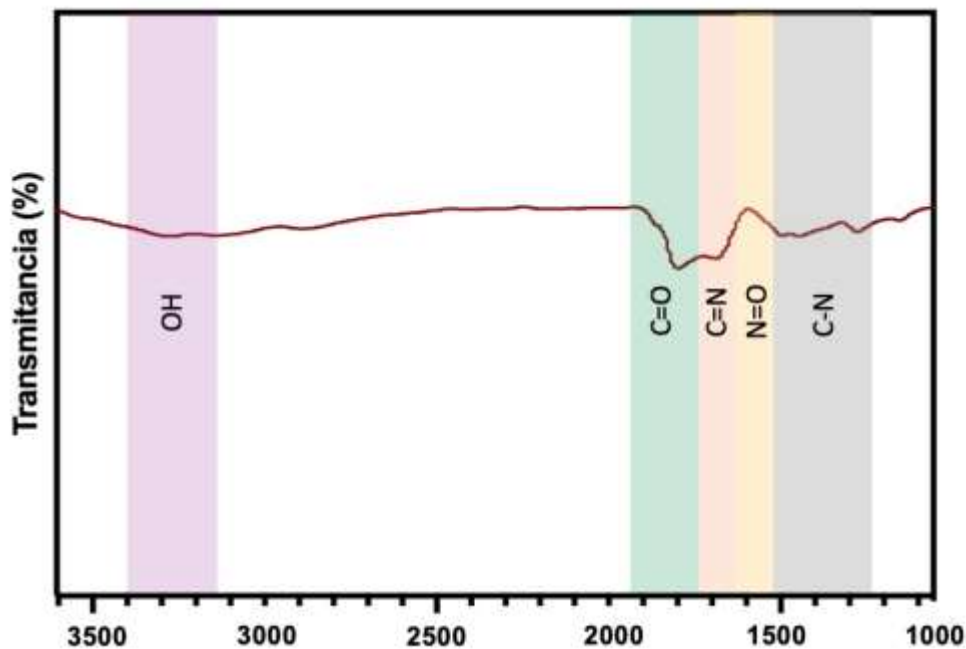


Figura 33. Espectro infrarrojo de PC:Gd³⁺, Yb³⁺.

De igual manera, se evaluó el valor del potencial z obteniendo como resultado un valor de $-32,7 \pm 0,83$ mV, mostrando una leve disminución del valor obtenido en el caso de PC y PC:Gd³⁺ probablemente asociado a la incorporación de más cargas positivas en la superficie por el procedimiento de codopado.

6.2. Fase 2: Estudios de citotoxicidad en PC, PC: Gd³⁺, PC: Yb³⁺, PC:Gd³⁺,Yb³⁺ en diferentes líneas celulares y cultivos primarios

Una vez fueron sintetizadas y caracterizadas las nanoplateformas, se busca evaluar la biocompatibilidad a través de pruebas de citotoxicidad en líneas celulares y cultivos primarios expuestas estas nanopartículas.

6.2.1. Estudio de citotoxicidad de las nanoplateformas por MTT (Bromuro de Tetrazolio Azul de Tiazolilo)

Con el fin de estudiar el efecto citotóxico de PC, PC:Gd³⁺, PC:Gd³⁺,Yb³⁺ en líneas celulares y cultivos primarios en función de la concentración por medio de la prueba de MTT (Sección 5.2.1 - Tabla 3). En este caso la viabilidad celular encontrada está dada por la acción mitocondrial de las células viables cuando se introduce el reactivo. Para este experimento se establecieron 2 controles: el positivo que son las células sin PC o sin PC:Gd³⁺ y el segundo las células de control negativo correspondientes a las células que se les agregó H₂O₂. En Figura 34, se muestran los resultados obtenidos al evaluar

el efecto citotóxico de los PC y los PC:Gd³⁺) a diferentes concentraciones en las líneas celulares en función de la concentración, respectivamente.

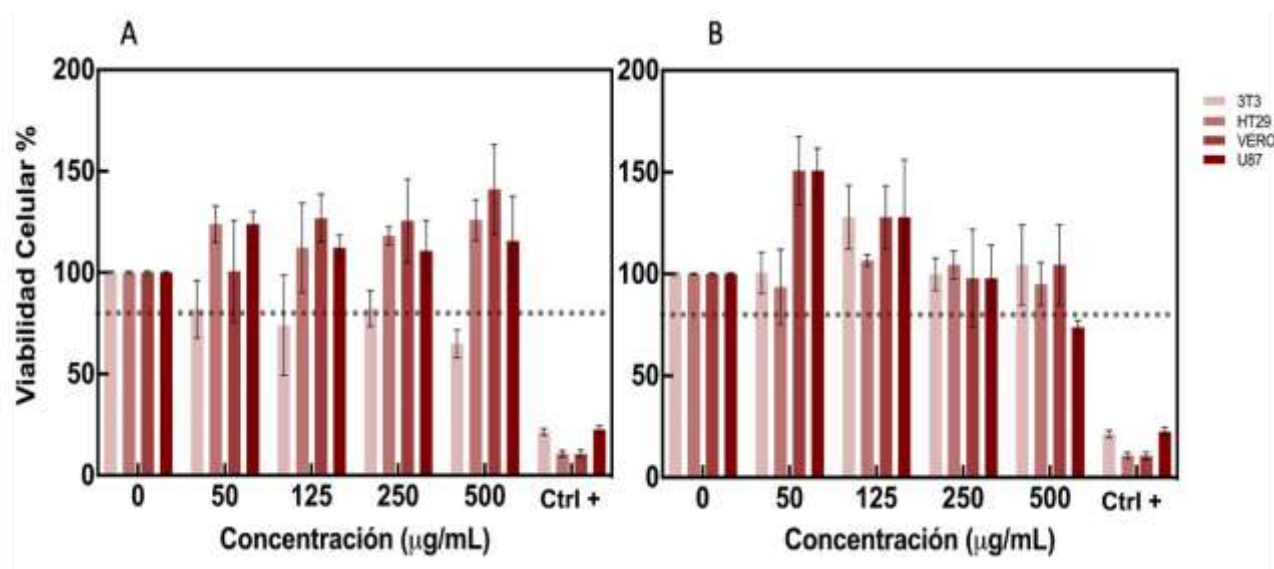


Figura 34. Prueba de MTT en líneas celulares con tratamientos de nanopartículas concentraciones de 0 a 500µg/mL. A. PC B. PC : Gd³⁺

En el ensayo MTT se analizaron dos líneas celulares no cancerosas. En el caso de las células 3T3, fueron expuestas a PC se observa una viabilidad celular para las 4 concentraciones usadas, dicha viabilidad es menor al 80% lo que permite concluir que estas células son no viables [4]. Sin embargo, cuando esta línea celular es expuesta a los PC:Gd³⁺ se evidencia viabilidad celular por encima del 80% a todas las concentraciones. La segunda línea celular no cancerosa, son las VERO, las cuales mostraron un comportamiento similar en los dos tratamientos (PC y PC:Gd³⁺). En las 4 concentraciones de nanopartículas usadas la viabilidad celular fue mayor al 80% y en algunos casos sobrepasa el control negativo del 100% comprobando que este tipo de nanopartículas no interfiere en el metabolismo celular y permite el crecimiento de estas células.

Por otra parte, para las líneas celulares cancerosas se analizó el comportamiento en las células HT29 que muestra una mayor viabilidad al ser tratadas por los PC que por los PC:Gd³⁺. Sin embargo, para las cuatro concentraciones en los dos tratamientos con las nanoplateformas se evidencio una viabilidad celular mayor al 80%. Así mismo, para la segunda línea celular cancerosa correspondiente a U87 se evidenció una viabilidad celular mayor al 80% en la mayoría de los casos. Cuando las células fueron expuestas a los PC:Gd³⁺ en la concentración de 500µg/mL se evidencia una baja viabilidad celular, por esta razón se recomienda usar la concentración de 250

$\mu\text{g/mL}$ para los tratamientos de nanoplateformas debido a su comportamiento similar al mostrado por las células de control negativo.

Se realizó una prueba ANOVA con el fin de analizar los resultados obtenidos en el ensayo MTT. Esta prueba estadística busca determinar si existe relación entre la viabilidad celular presentada y las diferentes líneas celulares y concentraciones usadas. Para este análisis se establecen dos hipótesis nulas: la primera, “NO existe relación entre la viabilidad celular y la concentración de PC y PC:Gd³⁺” y la segunda es “NO existe relación entre la viabilidad celular y las líneas celulares usadas” De los resultados obtenidos en esta prueba estadística se dice que si el valor de la estadística F es mayor al valor crítico de F ($F > F_{\text{crit}}$) se rechaza la hipótesis nula.

De acuerdo a los resultados de esta prueba (Tabla 8), para evaluar la primera hipótesis nula se compararon los datos obtenidos en las diferentes líneas celulares observando que en $F < F_{\text{crit}}$, por tanto la hipótesis nula es rechazada y se confirma que la concentración afecta significativamente la viabilidad. Con respecto a la segunda hipótesis nula, se estudiaron los datos obtenidos respecto a las concentraciones y se encontró que $F < F_{\text{crit}}$ lo que representa una diferencia significativa entre las viabilidades de las diferentes líneas celulares.

Tabla 8. Resultados prueba ANOVA para ensayo MTT de PC y PC : Gd³⁺

Variables Independientes	PC			PC:Gd ³⁺		
	P valor	F _{crit}	F	p valor	F	F _{crit}
Concentraciones	< 0,001	77,53	3,106	0,0137	52,07	18,513
Línea Celular	< 0,001	30,18	3,422	0,0025	42,66	7,709

Buscando un compromiso entre no citotoxicidad (pre-irradiación) y una alta concentración de tierras raras en las nanoplateformas para incrementar la probabilidad de tener un efecto radiosensibilizante, se eligió una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ para evaluar la viabilidad celular de PC:Gd³⁺, Yb³⁺ en la línea celular de glioma U87 por el método de MTT. En la Figura 35, se observa la viabilidad celular obtenida para esta nanoplateforma respecto al control positivo y negativo, muestra una fracción de viabilidad mayor al 80% comprobando la biocompatibilidad de esta nanoplateforma en base a la concentración usada en la línea celular U87.

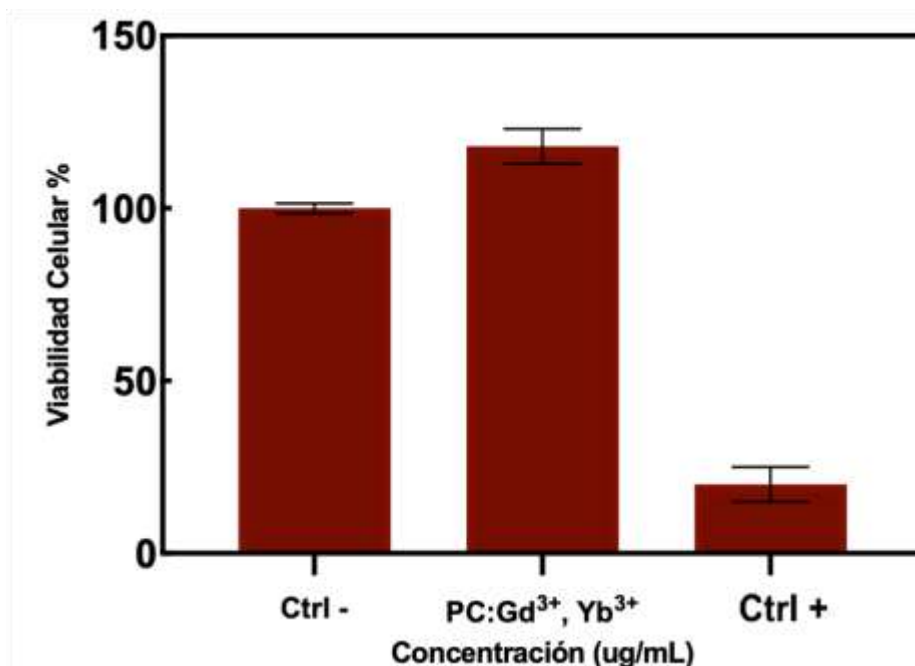


Figura 35. Prueba de MTT para PC:Gd³⁺, Yb³⁺ a una concentración 250 µg/mL.

Se realizó una prueba ANOVA de 1 vía para analizar los datos obtenidos usando una hipótesis nula "NO hay diferencias significativas entre la viabilidad celular de la línea U87 expuesta a los tratamientos de PC:Gd³⁺, Yb³⁺ y el control negativo ". En la Tabla 9, se muestran los datos obtenidos en esta prueba. Encontrando un valor $F > F_{cri}$, lo que confirma la hipótesis nula y permite establecer que no hay diferencias significativas entre las viabilidades de los métodos.

Tabla 9. Resultados prueba ANOVA para ensayo MTT para PC:Gd³⁺, Yb³⁺

Variables Independientes	PC		
	P valor	F _{cri}	F
Concentraciones	0,3737	1,16	5,143

6.2.2. Estudio de citotoxicidad por ensayo de azul tripán

Inicialmente, el ensayo azul tripán se realizó de acuerdo a la Sección 5.2.1 - Tabla 3. Este ensayo permite conocer la viabilidad celular por medio de la tinción de la células causada por daño en la membrana celular. A partir de los datos obtenidos en el ensayo con las líneas celulares a diferentes concentraciones, inicialmente se estandarizó una concentración de trabajo, que posteriormente fue usada en los cultivos primarios. En la Figura 36, se evidenció que para las líneas celulares VERO, 3T3 y HT29 la viabilidad celular fue menor que el 80% en cada una de las condiciones, sin embargo se observa que en la

línea celular U87 el comportamiento en las concentraciones 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ es diferente, con valores de viabilidad mayores al 80%.

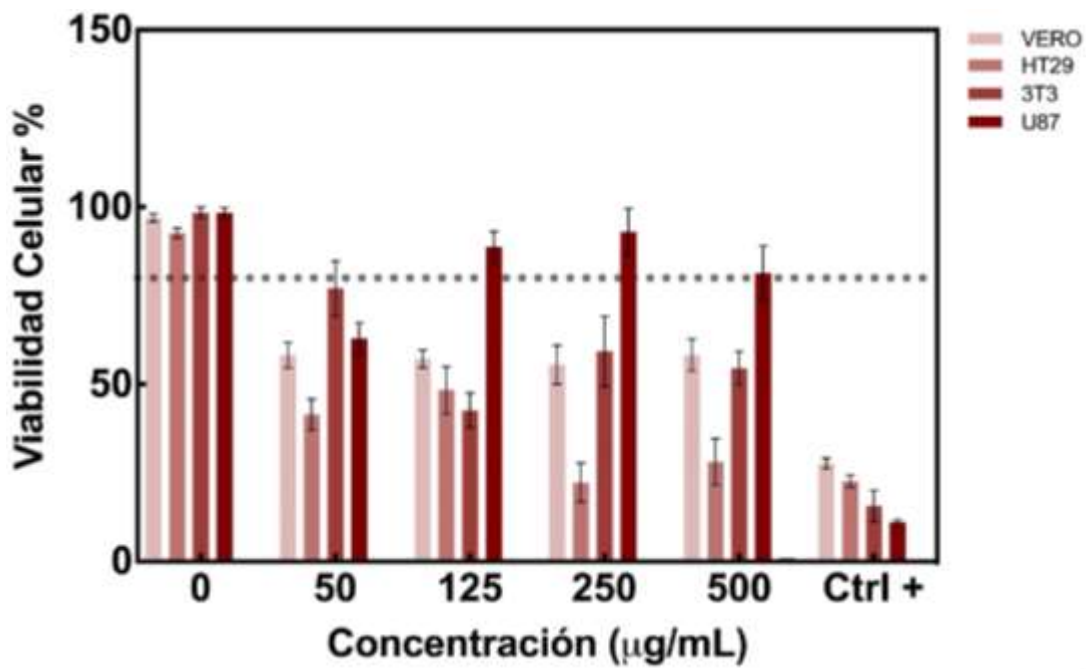


Figura 36. Ensayo de azul tripán en líneas celulares a diferentes concentraciones de PC.

Posteriormente, con los datos obtenidos y analizados en la prueba de azul tripán con las líneas celulares, específicamente de las células U87 a la concentración de $250\mu\text{g/mL}$. A partir de este valor, se realizaron las pruebas de evaluación de citotoxicidad en los cultivos primarios G200 y G298 correspondientes a gliomas de pacientes etapa IV: en el caso G200 los valores de viabilidad celular en PC y PC: Gd^{3+} se acerca al 80%, mostrando un bajo efecto citotóxico. En el caso de los cultivos primarios correspondientes a G298, se muestra una mayor sensibilidad por parte de las células hacia los diferentes tratamientos, donde se observa una disminución en el valor de la viabilidad celular con valores cercanos al 70%. Dicha información, se encuentra sintetizada en la Figura 37.

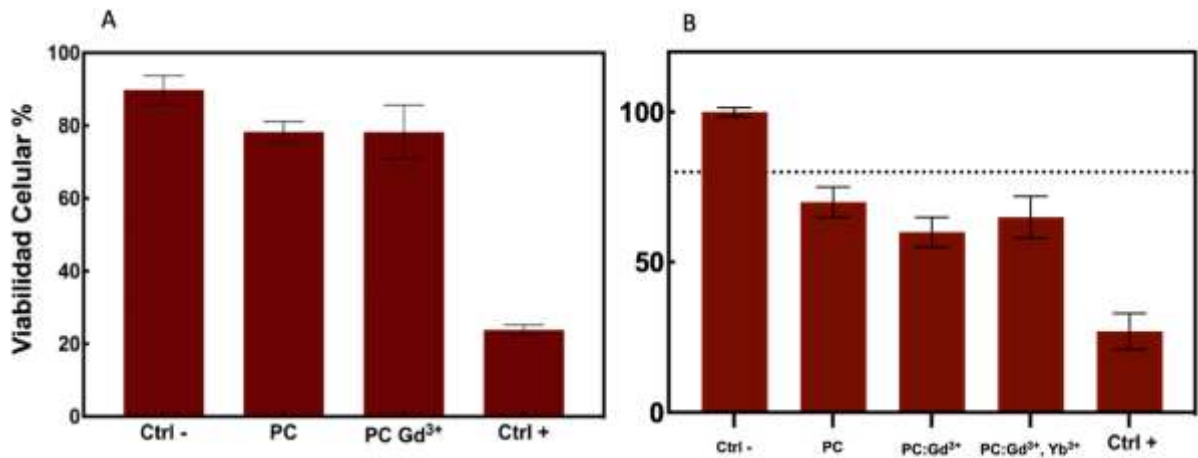


Figura 37. Prueba de azul tripán para: A: PC, PC:Gd³⁺ en G200 a concentraciones de 250 µg/mL. B: PC, PC:Gd³⁺, PC : Gd³⁺, Yb³⁺ en G298 a concentraciones de 250 µg/mL.

6.3. Fase 3: Irradiación de los tratamientos con Rayos X

Para evaluar los efectos de las radiaciones ionizantes en la proliferación de la línea celular U87 y los cultivos primarios G200 y G698 en presencia de PC y PC:Gd³⁺, las células fueron irradiadas con dosis convencionales (Capítulo 5.3, Tabla 5). En el caso de las células U87 se sembraron e incubaron por 15 días mientras que los cultivos primarios debido a su velocidad de crecimiento y creación de colonias, se incubaron por 10 días. Se realizó el conteo de colonias para obtener la ES y FS para cada uno de los tratamientos. Las curvas de supervivencia calculadas para la irradiación en la línea celular U87 para las 3 condiciones (sin PC, PC y PC:Gd³⁺), evidencian que en la dosis de 6 y 8 Gy la fracción de supervivencia en la condición de U87 sin PC es mayor que en los otros dos casos (Figura 38). Esto se puede atribuir a la presencia de las nanoplateformas en las células que generan electrones secundarios causando un daño mayor en el ADN de estas células, evitando su correcta proliferación y evitando la creación de colonias.

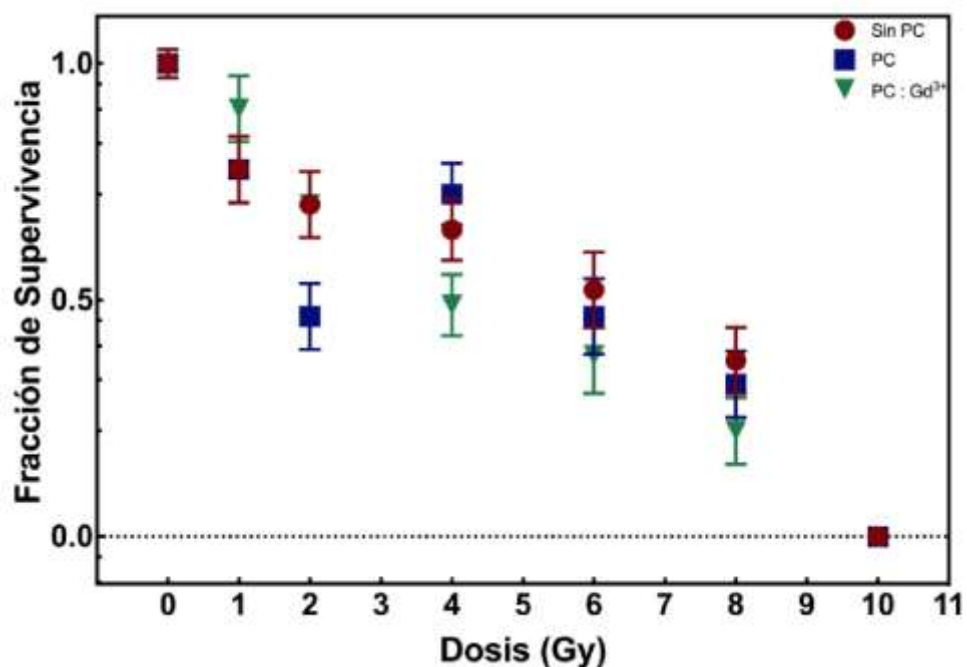


Figura 38. Fracción de supervivencia de la línea U87 con los tratamientos de sin PC y con PC, con PC:Gd³⁺ al ser irradiadas con dosis convencionales.

El ensayo de irradiación se evaluó también en los cultivos primarios G200 y G298 (Capítulo 5.3, Tabla 5). En la Figura 39, se observa la relación entre la fracción de supervivencia entre dos tratamientos, con referencia a la parte A: se comparan los valores obtenidos cuando se introducen los PC y cuando no están presentes, en 4 Gy se observa un valor menor en la proliferación celular cuando son tratadas con PC. Por otra parte, en la parte B se comparó el comportamiento de la fracción celular entre los tratamientos con PC:Gd³⁺ y sin estos, donde en 4 Gy se observa una disminución considerable entre los dos tratamientos, lo que puede atribuirse al efecto radiosensibilizador de la nanoplateforma debido a su alta carga electrónica que puede causar un aumento en el daño del ADN de las células cancerosas, dañando su proceso de división y proliferación.

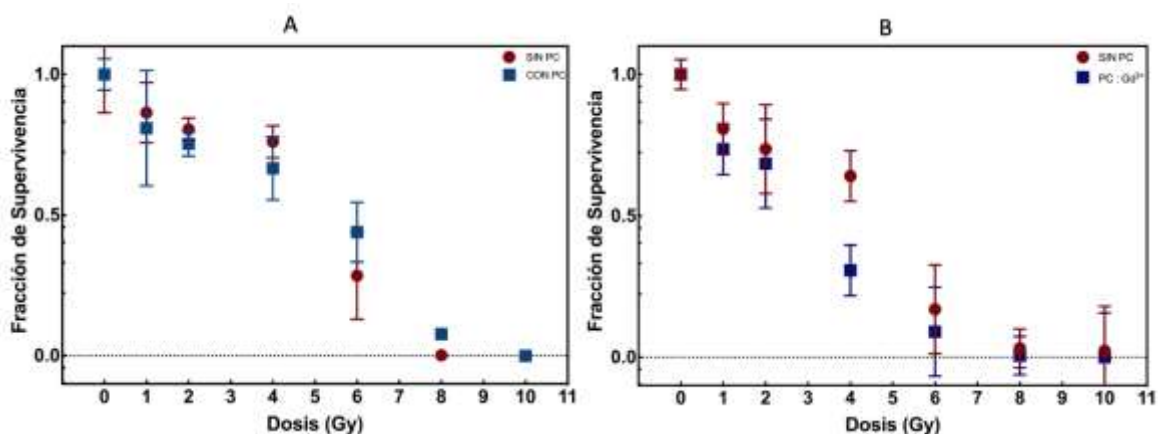


Figura 39. Fracción de supervivencia del cultivo primario G200 al ser irradiadas con dosis convencionales en tratamientos A. Sin PC y PC B. Sin PC y PC : Gd³⁺

Finalmente, en la Tabla 10, Tabla 11 y Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de este proyecto de una manera resumida. La Tabla 10, muestra los hallazgos de la caracterización de las nanoplateformas. Por parte de la Tabla 11, se observan los datos obtenidos en las pruebas de citotoxicidad. Y finalmente, la Tabla 12, muestra las pruebas realizadas para la irradiación con Rayos X.

Tabla 10. Resumen de los datos obtenidos en la caracterización de las nanoplateformas

NP	Absorción	Emisión (PL)	Tamaño	FTIR	Potencial Z
PC	3 bandas: 200nm – 300nm 300nm – 400 nm 400nm-500nm	550nm	41,1 ± 34 nm	C-H C=O C=N N=O	-35,02 ± 2 mV
PC:Gd ³⁺	3 bandas: 200nm – 300nm 300nm – 400 nm 400nm-500nm	550nm	34,8 ± 8,1 nm	-OH -CH -C=O -C=N -N=O -C-N	-33,9 ± 0,7 mV
PC:Gd ³⁺ ,Yb ³⁺	3 bandas: 200nm – 300nm 300nm – 400 nm 400nm-500nm	550nm	27 ± 21 nm	-OH -CH -C=O -C=N -N=O -C-N	-32,7 ± 0,83 mV

Tabla 11. Resumen de las pruebas y resultados realizadas en el estudio de la citotoxicidad. En color naranja se señalan los valores de viabilidad menores al 80%, con verde las viabilidades mayores al 80% y sin color son las pruebas que no se realizaron.

NP	MTT 3T3	MTT VERO	MTT HT29	MTT U87	AZUL 3T3	AZUL VERO	AZUL HT29	AZUL U87	AZUL G200	AZUL G298
----	---------	----------	----------	---------	----------	-----------	-----------	----------	-----------	-----------

PC											
Concentración n (µg/mL)	0										
	50										
	125										
	250										
	500										
PC:Gd ³⁺											
Concentración (µg/mL)	0										
	50										
	125										
	250										
	500										
PC:Gd ³⁺ ,Yb ³⁺											
Concentración n (µg/mL)	0										
	50										
	125										
	250										
	500										

Tabla 12. Resumen de las pruebas realizadas en irradiación a 0, 1, 2, 4, 6, 8.y 10 Gy.

NP	U87	G200
Sin PC		
PC		
PC:Gd ³⁺		
PC:Gd ³⁺ ,Yb ³⁺		

7. CONCLUSIONES

El cáncer es un problema de salud mundial, afecta a millones de personas anualmente con sus diferentes formas y grados de agresividad. Dentro de los tipos de cáncer, se encuentra el glioblastoma un tumor cerebral que presenta múltiples dificultades de tratamiento, por su capacidad de infiltración en los tejidos, ubicación y resistencia a los tratamientos convencionales como la radioterapia. Dadas estas limitaciones, se han buscado soluciones en los avances y nuevas investigaciones en el área de nanotecnología para ser introducidas como agentes radiosensibilizadores en este tipo de aplicaciones.

Los PC son un tipo de nanopartículas que fueron introducidas en el 2004 y han venido tomando fuerza por sus características como biocompatibilidad, propiedades ópticas, tamaño y diferentes métodos de síntesis. Adicionalmente, su capacidad de ser funcionalizados o dopados por fármacos y diferentes estructuras, como iones de alto número atómico específicamente lantánidos. El complemento entre las propiedades de los PC y la alta carga de electrones en iones como los lantánidos, permiten considerar estas nanoplateformas como agentes radiosensibilizadores.

El desarrollo de este estudio se dividió en tres fases. En primer lugar, se logró consolidar satisfactoriamente los protocolos de síntesis de tres nanoplateformas basadas en PC. Adicionalmente se introdujeron iones de Gd^{3+} e Yb^{3+} como dopantes y co-dopantes. La caracterización de las nanoplateformas logró tener una idea de los materiales desarrollados, sus propiedades ópticas, además de un acercamiento a la estructura, tamaño y carga. Inicialmente, se estandarizó exitosamente el método de reactor microondas a $200^{\circ}C$ para esta síntesis, usando precursores ricos en N lo cual generó para las tres nanoplateformas tres bandas de absorción entre 200 nm hasta los 600 nm, de la misma manera los espectros de emisión en los tres casos exhibieron una banda desde 400 nm hasta 680nm, con un pico en 550 nm de fluorescencia.

También se confirmó la presencia de enlaces O-H, C=O, C=N, N=O y C-N por medio de espectroscopia de infrarrojo, esta información permite una aproximación a la los enlaces creados después de la síntesis y sus posibles interacciones con otros heteroátomos. Información que se puede comprobar con el valor del potencial z se midió en las nanoplateformas obteniendo valores para PC igual a $-35,02 \pm 2$ mV, PC: Gd^{3+} igual a $-33,9 \pm 0,6$ mV y por último para PC: Gd^{3+} , Yb^{3+} de $-32,7 \pm 0,83$ mV, estos datos permiten conocer la variación de las cargas superficiales de las nanoplateformas y los cambios que sufre de acuerdo a las moléculas o heteroátomos agregadas. El tamaño de esta nanoplateforma se calculó con imágenes de microscopia de fuerza atómica encontrando un tamaño promedio para los PC es de $41 \pm 34,5$ nm, en el caso de los PC: Gd^{3+} es de $16,3 \pm 12,2$ nm y para los PC: Gd^{3+} , Yb^{3+} es de $26,8 \pm$

21,4 y $15,4 \pm 12,7$ nm. Aunque esta información se puede verificar por otros métodos más exactos como TEM, se puede observar una variación entre los tamaños obtenidos en las tres nanoplateformas lo que se puede dar por la agregación de los nanomateriales en el momento de la toma de las imágenes.

Por otra parte, para confirmar la citotoxicidad de la PC, PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺,Yb³⁺ se realizaron dos ensayos, por medio de la prueba de MTT se observó que no se presenta citotoxicidad en las líneas celulares U87, VERO y HT29 cuando las concentraciones de las nanoplateformas varían desde 50µg/mL hasta 500µg/mL, mostrando un mayor porcentaje de viabilidad en la concentración de 250µg/mL en la línea U87. Una vez se estandarizó este valor, se realizó el ensayo de exclusión por azul tripán en la línea celular U87 y en los cultivos primarios G200 y G698 identificando que no se presenta citotoxicidad en PC, PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺,Yb³⁺. Por último, la irradiación de estos tratamientos se realizó en U87, G200 y G698 a dosis convencionales encontrando una disminución en la fracción de supervivencia entre las células irradiadas sin tratamientos y a las que se les agregó algún tratamiento, especialmente en el valor de 4 Gy de dosis de radiación.

De acuerdo al objetivo planteado en este proyecto, se logró observar el potencial radiosensibilizador de la nanoplateforma sintetizada basada en PC y dopada con iones lantánidos (Gd³⁺,Yb³⁺) para el tratamiento de glioblastomas en un modelo *in vitro*. Además, puede ser una base para continuar estudiando este tipo de nanomateriales en aplicaciones biomédicas.

8. TRABAJOS FUTUROS

En este apartado, se presentan observaciones que se relacionan con líneas en las que se podría apuntar hacia el seguimiento de este trabajo. Para este proyecto se desarrollaron 3 nanoplateformas basadas en puntos de carbono y dopadas/co-dopadas con iones lantánidos cuya citotoxicidad fue evaluada y se realizaron pruebas de irradiación con el fin de identificar un posible potencial agente radiosensibilizador. En el primer enfoque y hacia un corto plazo, se planea caracterizar las nanoplateformas desarrolladas con otras técnicas como Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS), para conocer más información sobre la forma, y composición de las nanoplateformas. Esto ampliaría de manera importante la caracterización fisicoquímica de estas. Por otra parte, de acuerdo con la parte biológica se espera realizar ensayos de cometas con los resultados de estas irradiaciones para conocer el daño generado en el ADN de los diferentes tratamientos, así como ampliar la irradiación con dosis ablativas como 14, 16 y 20 Gy. Así mismo, generar contenido científico que exhiba los resultados obtenidos y aportar información para la aplicación de nanoplateformas en el tratamiento del cáncer. Por otra parte, es importante conocer el mecanismo de internalización y el mecanismo de endocitosis de las nanopartículas, aprovechando así la fluorescencia propia de los PC, características que permitirán conocer la forma de liberación de los heteroátomos cuando la nanoplateforma es irradiada.

La segunda línea enfocada a un mediano plazo, se buscará optimizar el método de aplicación de la nanoplateforma desarrollada para lograr llegar a sitios específicos y evaluar el características como tiempo de eliminación, dosis recibida, posición específica y determinar el régimen de administración de la nanoplateforma para maximizar la eficacia terapéutica. Este trabajo podría considerarse en modelos *in vivo*. Así mismo, consolidar una base de datos estadísticos que soporten el estudio como se ha venido trabajando en trabajo de grado de Baquero Castillo, Karol Julissa titulado Estudio de la citotoxicidad de puntos de carbono dopados con Gd^{3+} , dónde se realizó un estudio de MTT en líneas celulares con los PC: Gd^{3+} y se desarrolló un estudio estadístico a profundidad con los datos de citotoxicidad obtenidos [75].

Finalmente, a largo plazo se puede plantear el diseño de un protocolo para realizar un ensayo clínico en el que se permita analizar el efecto radiosensibilizador de las nanoplateformas desarrolladas, cumpliendo con todos los aspectos regulatorios, comités de ética de las entidades y autorización por parte de los pacientes. Así mismo, realizar la presentación de los resultados de este ensayo clínico en conferencias científicas y publicación de los hallazgos en revistas médicas revisadas por pares. Por medio de este primer pilar, se busca lograr la optimización de la terapia para pacientes diagnosticadas con glioblastoma y así brindarles una esperanza

REFERENCIAS

- [1] “Glioblastoma: Symptoms, Causes, Treatment & Prognosis.” Accessed: Apr. 15, 2024. [Online]. Available: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/17032-glioblastoma>
- [2] A. Shergalis, A. Bankhead, U. Luesakul, N. Muangsin, and N. Neamati, “Current challenges and opportunities in treating glioblastomas,” *Pharmacol Rev*, vol. 70, no. 3, pp. 412–445, Jul. 2018, doi: 10.1124/PR.117.014944/-/DC1.
- [3] P. Hu *et al.*, “Gadolinium-Based Nanoparticles for Theranostic MRI-Guided Radiosensitization in Hepatocellular Carcinoma,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 7, p. 368, Nov. 2019, doi: 10.3389/FBIOE.2019.00368.
- [4] S. Vijayakumar and S. Ganesan, “In vitro cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents,” *J Nanomater*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/734398.
- [5] J. Liu, R. Li, and B. Yang, “Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications,” *ACS Cent Sci*, vol. 6, no. 12, pp. 2179–2195, Dec. 2020, doi: 10.1021/acscentsci.0c01306.
- [6] “Cáncer.” Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [7] “What Is Cancer? - NCI.” Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [8] E. Casals, M. F. Gusta, M. Cobaleda-Siles, A. Garcia-Sanz, and V. F. Puentes, “Cancer resistance to treatment and antiresistance tools offered by multimodal multifunctional nanoparticles,” *Cancer Nanotechnol*, vol. 8, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1186/S12645-017-0030-4.
- [9] “Tumor cerebral primario en adultos: MedlinePlus enciclopedia médica.” Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007222.htm>
- [10] P. Retif *et al.*, “Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters,” *Theranostics*, vol. 5, no. 9, p. 1030, 2015, doi: 10.7150/THNO.11642.
- [11] S. Bao *et al.*, “Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response,” *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 756–760, 2006, doi: 10.1038/nature05236.
- [12] “Chemotherapy: Uses, Side Effects, and Procedure.” Accessed: May 04, 2022. [Online]. Available: <https://www.healthline.com/health/chemotherapy>
- [13] N. institute Nature, “Radiation Therapy to Treat Cancer,” National Institute. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>
- [14] L. Sancey *et al.*, “The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy,” *Br J Radiol*, vol. 87, no. 1041, Sep. 2014, doi: 10.1259/BJR.20140134.
- [15] M. W. Dewhirst, Y. Cao, and B. Moeller, “Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response (Nature Reviews Cancer (2008) 8, (425-437)),” *Nat Rev Cancer*, vol. 8, no. 8, p. 654, Aug. 2008, doi: 10.1038/NRC2438.
- [16] R. Carruthers and A. J. Chalmers, *Increasing the Therapeutic Ratio of Radiotherapy*. 2017.

- [17] "RADIOTERAPIA | PDF | Terapia de radiación | Tratamientos contra el cáncer." Accessed: May 04, 2022. [Online]. Available: <https://www.scribd.com/presentation/49424794/RADIOTERAPIA>
- [18] P. Wardman, "Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy," *Clin Oncol*, vol. 19, no. 6, pp. 397–417, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.CLON.2007.03.010.
- [19] H. Wang, X. Mu, H. He, and X. D. Zhang, "Cancer Radiosensitizers," *Trends Pharmacol Sci*, vol. 39, no. 1, pp. 24–48, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.TIPS.2017.11.003.
- [20] Y. Chen, J. Yang, S. Fu, and J. Wu, "Gold Nanoparticles as Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy," *Int J Nanomedicine*, vol. 15, p. 9407, 2020, doi: 10.2147/IJN.S272902.
- [21] W. Cai, T. Gao, H. Hong, and J. Sun, "Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology," *Nanotechnol Sci Appl*, vol. 1, p. 17, Sep. 2008, doi: 10.2147/NSA.S3788.
- [22] E. Pagáčová *et al.*, "Challenges and Contradictions of Metal Nano-Particle Applications for Radio-Sensitivity Enhancement in Cancer Therapy," *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 588*, vol. 20, no. 3, p. 588, Jan. 2019, doi: 10.3390/IJMS20030588.
- [23] F. Du *et al.*, "Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors," *Biomaterials*, vol. 121, pp. 109–120, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.07.008.
- [24] N. Durán, M. B. Simões, A. C. M. De Moraes, W. J. Fávaro, and A. B. Seabra, "Nanobiotechnology of Carbon Dots: A Review," *J Biomed Nanotechnol*, vol. 12, no. 7, pp. 1323–1347, Jul. 2016, doi: 10.1166/JBN.2016.2225.
- [25] D. Bouzas-Ramos, J. Cigales Canga, J. C. Mayo, R. M. Sainz, J. Ruiz Encinar, and J. M. Costa-Fernandez, "Carbon Quantum Dots Codoped with Nitrogen and Lanthanides for Multimodal Imaging," *Adv Funct Mater*, vol. 29, no. 38, Sep. 2019, doi: 10.1002/adfm.201903884.
- [26] Y. Zhao *et al.*, "Facile preparation of double rare earth-doped carbon dots for mri/ct/fi multimodal imaging," *ACS Appl Nano Mater*, vol. 1, no. 6, pp. 2544–2551, Jun. 2018, doi: 10.1021/ACSANM.8B00137/SUPPL_FILE/AN8B00137_SI_001.PDF.
- [27] "What is Cancer? | Cancer Basics | American Cancer Society." Accessed: Apr. 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/what-is-cancer.html>
- [28] "Cancer." Accessed: Apr. 15, 2024. [Online]. Available: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- [29] J. Olsen, O. Basso, and H. T. Sørensen, "What is a population-based registry?," *Scand J Public Health*, vol. 27, no. 1, p. 78, 1999, doi: 10.1177/14034948990270010601.
- [30] L. E. Contreras, "EPIDEMIOLOGÍA DE TUMORES CEREBRALES," *Revista Médica Clínica Las Condes*, vol. 28, no. 3, pp. 332–338, May 2017, doi: 10.1016/J.RMCLC.2017.05.001.
- [31] "Glioblastoma Multiforme – Symptoms, Diagnosis and Treatment Options." Accessed: Apr. 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Glioblastoma-Multiforme>
- [32] "Glioblastoma | Brain tumours | Cancer Research UK." Accessed: Apr. 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/brain-tumours/types/glioblastoma>

- [33] “Glioblastoma Multiforme – Symptoms, Diagnosis and Treatment Options.” Accessed: Apr. 15, 2024. [Online]. Available: <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Glioblastoma-Multiforme>
- [34] P. Y. Wen *et al.*, “Glioblastoma in adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions,” *Neuro Oncol*, vol. 22, no. 8, pp. 1073–1113, Aug. 2020, doi: 10.1093/NEUONC/NOAA106.
- [35] A. Dréan *et al.*, “Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma,” *Expert Rev Neurother*, vol. 16, no. 11, pp. 1285–1300, Nov. 2016, doi: 10.1080/14737175.2016.1202761.
- [36] R. Daneman and A. Prat, “The Blood–Brain Barrier,” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, no. 1, Jan. 2015, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A020412.
- [37] “Radiation Therapy for Glioma | Memorial Sloan Kettering Cancer Center.” Accessed: Apr. 18, 2024. [Online]. Available: <https://www.mskcc.org/cancer-care/types/glioma/glioma-treatment/radiation-therapy-glioma>
- [38] W. A. Hall *et al.*, “Magnetic resonance linear accelerator technology and adaptive radiation therapy: An overview for clinicians,” *CA Cancer J Clin*, vol. 72, no. 1, pp. 34–56, Jan. 2022, doi: 10.3322/CAAC.21707.
- [39] “Radiotherapy - NHS.” Accessed: Apr. 18, 2024. [Online]. Available: <https://www.nhs.uk/conditions/radiotherapy/>
- [40] Y. Prezado and L. B. ID17, “Fundamentos físicos y efectos biológicos de la radioterapia con radiación sincrotrón,” *Revista de Física Médica*, vol. 11, no. 1, Jun. 2010, Accessed: Apr. 18, 2024. [Online]. Available: <https://revistadefisicamedica.es/index.php/rfm/article/view/88>
- [41] M. J. LaRiviere and N. Vapiwala, “Radiation Therapy,” *Penn Clinical Manual of Urology, Third Edition*, pp. 704-734.e5, Oct. 2022, doi: 10.1016/B978-0-323-77575-5.00028-9.
- [42] R. Antoni and L. Bourgois, “Quantities and Fundamental Units of External Dosimetry,” pp. 1–42, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-48660-4_1.
- [43] M. Li, X. Song, J. Zhu, A. Fu, J. Li, and T. Chen, “The interventional effect of new drugs combined with the Stupp protocol on glioblastoma: A network meta-analysis,” *Clin Neurol Neurosurg*, vol. 159, pp. 6–12, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.CLINEURO.2017.05.015.
- [44] D. Kwatra, A. Venugopal, and S. Anant, “Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer,” *Transl Cancer Res*, vol. 2, no. 4, pp. 330–342, Aug. 2013, doi: 10.3978/J.ISSN.2218-676X.2013.08.06.
- [45] L. Gong, Y. Zhang, C. Liu, M. Zhang, and S. Han, “Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy,” *Int J Nanomedicine*, vol. 16, p. 1083, 2021, doi: 10.2147/IJN.S290438.
- [46] E. A. Wright and P. Howard-Flanders, “Acta Radiologica The influence of oxygen on the radiosensitivity,” 2010, doi: 10.3109/00016925709170930.
- [47] “Antisense oligonucleotides targeting human telomerase mRNA increases the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells.” Accessed: Apr. 19, 2024. [Online]. Available: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2014.3105>
- [48] X. Yang, M. Yang, B. Pang, M. Vara, and Y. Xia, “Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine,” *Chem Rev*, vol. 115, no. 19, pp. 10410–10488, Oct. 2015, doi:

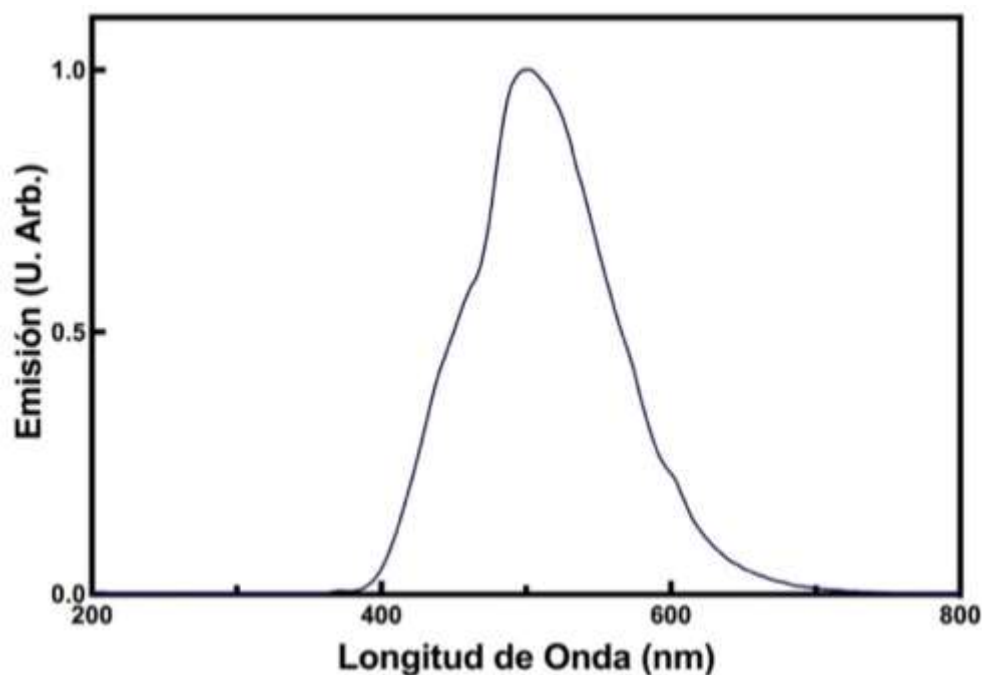
10.1021/ACS.CHEMREV.5B00193/ASSET/ACS.CHEMREV.5B00193.FP.PNG_V03.

- [49] K. Morita *et al.*, "Characterization of titanium dioxide nanoparticles modified with polyacrylic acid and H₂O₂ for use as a novel radiosensitizer," *Free Radic Res*, vol. 50, no. 12, pp. 1319–1328, Dec. 2016, doi: 10.1080/10715762.2016.1241879.
- [50] L. Cui, S. Her, G. R. Borst, R. G. Bristow, D. A. Jaffray, and C. Allen, "Radiosensitization by gold nanoparticles: Will they ever make it to the clinic?," *Radiotherapy and Oncology*, vol. 124, no. 3, pp. 344–356, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.RADONC.2017.07.007.
- [51] K. Morita *et al.*, "Characterization of titanium dioxide nanoparticles modified with polyacrylic acid and H₂O₂ for use as a novel radiosensitizer," *Free Radic Res*, vol. 50, no. 12, pp. 1319–1328, Dec. 2016, doi: 10.1080/10715762.2016.1241879.
- [52] M. P. Antosh *et al.*, "Enhancement of radiation effect on cancer cells by gold-pHLIP," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 112, no. 17, pp. 5372–5376, Apr. 2015, doi: 10.1073/PNAS.1501628112/SUPPL_FILE/PNAS.1501628112.SAPP.PDF.
- [53] S. Sagbas and N. Sahiner, "Carbon dots: preparation, properties, and application," *Nanocarbon and its Composites: Preparation, Properties and Applications*, pp. 651–676, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-08-102509-3.00022-5.
- [54] "Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications | ACS Central Science." Accessed: Jun. 25, 2021. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acscentsci.0c01306>
- [55] S. N. Baker and G. A. Baker, "Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 49, no. 38, pp. 6726–6744, Sep. 2010, doi: 10.1002/ANIE.200906623.
- [56] T. Sabri, P. Pawelek, and J. A. Capobianco, "Dual Activity of Rose Bengal Functionalized to Albumin-Coated Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles: Targeting and Photodynamic Therapy," 2018, doi: 10.1021/acsami.8b08919.
- [57] M. Vedhanayagam, I. S. Raja, A. Molkenova, T. Sh. Atabaev, K. J. Sreeram, and D.-W. Han, "Carbon Dots-Mediated Fluorescent Scaffolds: Recent Trends in Image-Guided Tissue Engineering Applications," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 10, p. 5378, May 2021, doi: 10.3390/ijms22105378.
- [58] F. Yan, Z. Sun, H. Zhang, X. Sun, Y. Jiang, and Z. Bai, "The fluorescence mechanism of carbon dots, and methods for tuning their emission color: a review," *Microchimica Acta*, vol. 186, no. 8, pp. 1–37, Aug. 2019, doi: 10.1007/S00604-019-3688-Y/METRICS.
- [59] N. Javed and D. M. O'Carroll, "Carbon Dots and Stability of Their Optical Properties," *Particle & Particle Systems Characterization*, vol. 38, no. 4, p. 2000271, Apr. 2021, doi: 10.1002/PPSC.202000271.
- [60] J. D. S. Fonseca *et al.*, "Fluorescent Carbon Dots Illuminate Hydrogen Peroxide Detection: A Promising Approach," *2023 IEEE Colombian Workshop BioCAS, ColBioCAS 2023 - Conference Proceedings, 2023*, doi: 10.1109/COLBIOCAS59270.2023.10280969.
- [61] J. Wang and J. Qiu, "A review of carbon dots in biological applications," *Journal of Materials Science 2016 51:10*, vol. 51, no. 10, pp. 4728–4738, Feb. 2016, doi: 10.1007/S10853-016-9797-7.
- [62] M. L. Liu, B. Bin Chen, C. M. Li, and C. Z. Huang, "Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications," *Green Chemistry*, vol. 21, no. 3, pp. 449–471, Feb. 2019, doi: 10.1039/C8GC02736F.

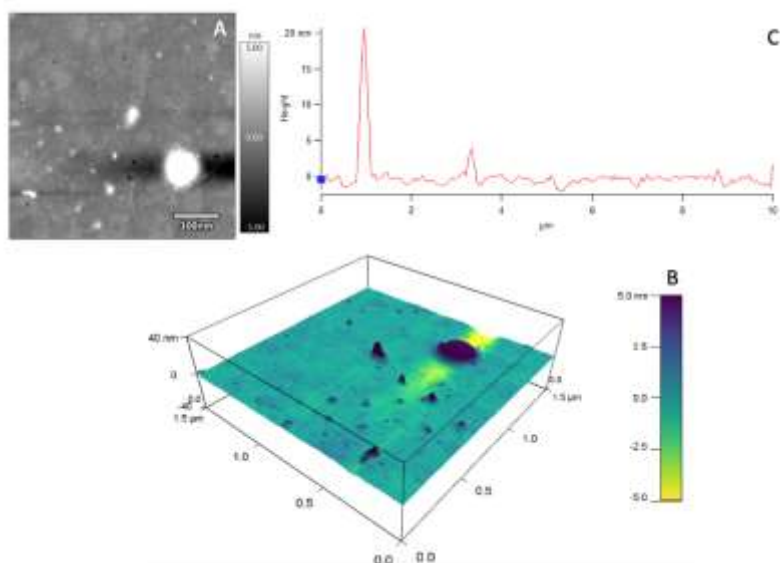
- [63] T. V. De Medeiros, J. Manioudakis, F. Noun, J. R. Macairan, F. Victoria, and R. Naccache, "Microwave-assisted synthesis of carbon dots and their applications," *J Mater Chem C Mater*, vol. 7, no. 24, pp. 7175–7195, Jun. 2019, doi: 10.1039/C9TC01640F.
- [64] J. Zhou *et al.*, "Carbon dots doped with heteroatoms for fluorescent bioimaging: a review," *Microchimica Acta 2016 184:2*, vol. 184, no. 2, pp. 343–368, Dec. 2016, doi: 10.1007/S00604-016-2043-9.
- [65] Y. Shi *et al.*, "Facile synthesis of gadolinium (III) chelates functionalized carbon quantum dots for fluorescence and magnetic resonance dual-modal bioimaging," *Carbon N Y*, vol. 93, no. iii, pp. 742–750, 2015, doi: 10.1016/j.carbon.2015.05.100.
- [66] "Gadolinium | What Is Gadolinium & What Is It Used for in MRIs?" Accessed: May 04, 2022. [Online]. Available: <https://www.drugwatch.com/gadolinium/>
- [67] Y. C. Dong *et al.*, "Ytterbium Nanoparticle Contrast Agents for Conventional and Spectral Photon-Counting CT and Their Applications for Hydrogel Imaging," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 14, no. 34, pp. 39274–39284, Aug. 2022, doi: 10.1021/ACSAMI.2C12354/SUPPL_FILE/AM2C12354_SI_001.PDF.
- [68] "Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP Conteo celular y evaluación de viabilidad," 2008.
- [69] M. Mannino and A. J. Chalmers, "Radioresistance of glioma stem cells: Intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'?", 2011, doi: 10.1016/j.molonc.2011.05.001.
- [70] T. Ogi, K. Aishima, F. A. Permatasari, F. Iskandar, E. Tanabe, and K. Okuyama, "Kinetics of nitrogen-doped carbon dot formation via hydrothermal synthesis," *New Journal of Chemistry*, vol. 40, no. 6, pp. 5555–5561, Jun. 2016, doi: 10.1039/C6NJ00009F.
- [71] P. Rauwel, S. Küüna, S. Ferdov, and E. Rauwel, "A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM," *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/682749.
- [72] Y. Zhou *et al.*, "Photoluminescent Carbon Dots: A Mixture of Heterogeneous Fractions," *ChemPhysChem*, vol. 19, no. 19, pp. 2589–2597, Oct. 2018, doi: 10.1002/CPHC.201800248.
- [73] M. Stoia, R. Istrate, and C. Păcurariu, "Investigation of magnetite nanoparticles stability in air by thermal analysis and FTIR spectroscopy," *J Therm Anal Calorim*, vol. 125, no. 3, pp. 1185–1198, Sep. 2016, doi: 10.1007/S10973-016-5393-Y/METRICS.
- [74] L. Sancey *et al.*, "Long-term in Vivo clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection," *ACS Nano*, vol. 9, no. 3, pp. 2477–2488, Mar. 2015, doi: 10.1021/ACS.NANO.5B00552/SUPPL_FILE/NN5B00552_SI_001.PDF.
- [75] K. Julissa *et al.*, "Estudio de la citotoxicidad de puntos de carbono dopados con Gd³⁺," 2022, doi: 10.1/JQUERY.MIN.JS.

ANEXOS

A continuación se muestran los resultados de caracterización de los PC:Gd³⁺,Yb³⁺ sintetizado por el método 2, en el Anexo 1 se muestra el espectro de emisión y los resultados obtenidos a través del AFM, siendo un acercamiento a la morfología y tamaño.



Anexo 1. Espectro de emisión de una solución acuosa de PC:Gd³⁺,Yb³⁺ (concentración de 10mg/mL) sintetizados a 200°C a partir de N, N dimetilformamida, urea, ácido dietiltriainopentaacético gadolinio (iii) sal dihidrógeno, cloruro de iterbio (III) y ácido cítrico ($\lambda_{EXC} = 365nm$). Las imágenes dentro del espectro muestra la muestra en una celda de cuarzo A. Con exposición de luz UV a $\lambda_{EXC} = 365nm$, B. Sin exposición de luz UV.



Anexo 2. Imagen de microscopia de fuerza atómica para los PC:Gd³⁺, Yb³⁺ método 2.

Los siguientes valores fueron obtenidos por ImageJ® en las imágenes obtenidas por AFM, con estos valores se obtuvo el valor promedio de tamaño en cada una de las nanoplateformas.

	PC - AFM	
	ÁREA	LONGITUD (nm)
1	321.237	84,1460
2	227.543	58,5370
3	80.309	18,6550
4	53.540	10,9760
5	227.543	58,6510
6	26.770	3,6590
7	40.155	8,1810
8	321.237	85,3310

Anexo 3. Datos obtenidos por ImageJ® para los PC por AFM.

	PC Gd - AFM	
	ÁREA	LONGITUD (nm)
1	143.879	49,533
2	83.298	27,518
3	98.443	33,136

4	75.726	24,766
5	90.871	30,270
6	121.161	41,369
7	98.443	33,022
8	113.589	38,917

Anexo 4. Datos obtenidos por ImageJ® para los PC:Gd³⁺ por AFM.

C Gd Yb 1- AFM		
	ÁREA	LONGITUD (nm)
1	273.187	66,228
2	227.656	54,680
3	91.062	19,479
4	91.062	19,479
5	75.885	15,583
6	45.531	7,792
7	60.708	11,687
8	91.062	19,479

Anexo 5. Datos obtenidos por ImageJ® para los PC:Gd³⁺Yb³⁺ método 1 por AFM

PC Gd Yb 2 - AFM		
	ÁREA	LONGITUD (nm)
1	41.152	7.407
2	178.326	44.444
3	82.305	18.519
4	54.870	11.111
5	41.152	7.407
6	54.870	11.712
7	54.870	11.111
8	82.305	18.519

Anexo 6. Datos obtenidos por ImageJ® para los PC:Gd³⁺Yb³⁺ método 2 por AFM