

**NANOPARTÍCULAS Y RADIOTERAPIA: ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO
RADIOSENSIBILIZADOR DE PUNTOS DE CARBONO DOPADOS CON IONES Gd^{3+} EN
CÉLULAS DERIVADAS DE GLIOBLASTOMA (U87)**

Laura Marcela Jiménez Gallego

Tutores:

Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD

Alejandro Oyono Ondo Méndez, PhD



**Universidad del
Rosario**



UNIVERSIDAD

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2022**

**NANOPARTÍCULAS Y RADIOTERAPIA: ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO
RADIOSENSIBILIZADOR DE PUNTOS DE CARBONO DOPADOS CON IONES Gd^{3+} EN
CÉLULAS DERIVADAS DE GLIOBLASTOMA (U87)**

Laura Marcela Jiménez Gallego

Trabajo final de maestría presentado como requisito para optar al título de:
Magister en Ingeniería biomédica

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2022**

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sinceramente a todas las personas que con su apoyo y compañía hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

En especial a mis tutores Diana Consuelo Rodríguez y Alejandro Oyono Ondo por su paciencia, tiempo y dedicación y a todo el grupo de investigación de la Universidad del Rosario por su acompañamiento a nivel académico y personal.

También quiero agradecer a mi madre Elizabeth Gallego y a mi pareja Julio Aguirre por todo el apoyo durante esta fase de mi vida y por la motivación que me han brindado para culminar esta etapa.

Agradezco a la Universidad del Rosario y a la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito por la formación recibida durante estos años y la dedicación para formar profesionales con altas capacidades.

RESUMEN

El glioblastoma es uno de los tumores más agresivos y de difícil tratamiento, debido a su ubicación, su morfología y su comportamiento radioresistente. Al estar ubicado en el cerebro, no es posible extirparlo completamente durante el procedimiento quirúrgico, por lo cual, en la mayoría de los casos es necesario utilizar tratamientos adyuvantes como la radioterapia después de la cirugía. Sin embargo, al generar resistencia a este tratamiento los riesgos de crecimiento y propagación del tumor son muy altos, lo cual, genera la necesidad de implementar un agente radiosensibilizador que permita potenciar los efectos de la radioterapia. En este trabajo se evaluó el efecto radiosensibilizador de puntos de carbono dopados con iones Gd^{3+} (PC- Gd^{3+}) en células derivadas de glioblastoma (U87). Los PC- Gd^{3+} fueron sintetizados a través de un proceso solvotérmico y fueron caracterizados con estudios de espectroscopia UV – Vis y mediciones de potencial zeta. Durante la fase experimental, se demostró la biocompatibilidad de los PC- Gd^{3+} por medio del ensayo MTT, pues a diferentes concentraciones los PC- Gd^{3+} no generaron citotoxicidad en las células cancerosas. Después de demostrar la biocompatibilidad de los puntos de carbono, se realizaron ensayos para determinar la capacidad de proliferación celular y se calculó el daño en el material genético después de exponer las líneas celulares incubadas con los PC- Gd^{3+} a radiaciones ionizantes. Con estos experimentos se demostró un efecto radiosensibilizador de los PC- Gd^{3+} en condiciones específicas en la línea celular U87 y se evidenció una tendencia a disminuir la proliferación celular y aumentar el daño en material genético celular en las muestras que se trataron con PC- Gd^{3+} . Este trabajo es un trabajo inicial que permite establecer bases de experimentación para poder continuar estudiando el potencial radiosensibilizador de la nanoplateforma desarrollada.

Palabras Clave – Radioterapia; Puntos de carbono; Gadolinio; Radiosensibilización; Glioblastoma.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. General.....	12
3.2. Específicos	12
4. MARCO TEÓRICO	13
5. METODOLOGÍA	18
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
6.1. Síntesis y caracterización de PC-Gd ³⁺	23
6.2. Viabilidad celular.....	26
6.3. Capacidad de proliferación celular	27
6.4. Daño en el material genético celular	29
7. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS	34
8. CONCLUSIONES	35
9. REFERENCIAS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo metodología.....	18
Figura 2. Espectro de absorción puntos de Carbono de glicina variando el tiempo de reacción donde el eje X representa las longitudes de onda de excitación de las muestras y el eje y muestra la cantidad de luz absorbida en cada muestra.....	23
Figura 3. Espectros de emisión PC en función de longitudes de excitación de 300 a 700 nm. A) Reacción de 6 horas; B) Reacción de 8 horas; C) Reacción de 10 horas y D) Reacción de 12 horas	24
Figura 4. Solución resultante de la síntesis de PC-Gd ³⁺ bajo radiación con luz UV.....	25
Figura 5. Espectro de absorción de los PC sintetizados en función de la concentración inicial de ácido gadopentético introducido en la reacción de 10 horas.....	25
Figura 6. Ensayo de viabilidad celular MTT de los PC-Gd ³⁺ a diferentes concentraciones en la líneas celulares U87 y MCF-7 (valores mayores a 80% representan células viables).....	27
Figura 7. Curva fracción de supervivencia (FS) en las líneas celulares U87 y MCF-7 al ser sometidas a radioterapia en conjunto con PC-Gd ³⁺	277
Figura 8. Fracción de supervivencia (FS) en las líneas celulares U87 y MCF-7 al ser sometidas a radioterapia en conjunto con PC-Gd ³⁺	27
Figura 9. Imágenes de Cometas de las líneas celulares U87 y MCF-7 con y sin PC-Gd ³⁺ después de ser expuestos a radiaciones de 0, 6, 16 y 20 Gy.....	30
Figura 10. Ensayo de Cometa línea celular U87: Porcentaje de ADN en la cola en relación con la dosis de radiación para muestras con y sin PC-Gd ³⁺	31
Figura 11. Ensayo de Cometa línea celular MCF-7: Porcentaje de ADN en la cola en relación con la dosis de radiación para muestras con y sin PC-Gd ³⁺	31
Figura 12. Ensayo de Cometa líneas celulares MCF-7 y U87: Porcentaje de ADN en la cola en relación con la dosis de radiación para muestras con y sin PC-Gd ³⁺ para las muestras irradiadas con 6, 16 y 20 Gy.....	32

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variaciones cantidad de soluto en la reacción de los puntos de carbono dopados con gadolinio	19
Tabla 2. Cantidad de células sembradas por dosis de radiación.....	21

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la rápida división de células anormales en el cuerpo, que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos [1]. Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y el 70% de estas muertes se registran en países de ingresos medios y bajos [2]. La radioterapia es uno de los tratamientos sugeridos para la erradicación de células anormales. Esta terapia se fundamenta en el uso de radiaciones ionizantes como rayos X, rayos γ ó partículas altamente cargadas que poseen la energía suficiente para ionizar especies atómicas y moleculares [3], [4]. Al interior de la célula, la radioterapia puede generar daño directamente en el material genético al depositar la energía emitida en el ADN o indirectamente a través de radicales libres, producto de la interacción de las radiaciones ionizantes y las moléculas de agua de la célula, potencializando procesos de muerte celular o senescencia [3]. Sin embargo, la eficiencia de este tratamiento no es igual para todos los tipos de cáncer. Existen células cancerosas que presentan resistencia a los efectos de las radiaciones ionizantes, evitando que su integridad celular se vea afectada. Esto se conoce como radioresistencia y como consecuencia los procesos de multiplicación celular y diseminación a otras partes del cuerpo persisten [4].

Un ejemplo de este tipo de cáncer es el Glioblastoma (GBM), el cual se forma en las células gliales del sistema nervioso en el cerebro. El tratamiento del GBM enfrenta una gran dificultad debido a su ubicación, su morfología y su comportamiento radioresistente, lo que lo convierte en uno de los tumores más agresivos y de difícil tratamiento [5]. El pronóstico de supervivencia de los pacientes diagnosticados con GBM es de 12 a 24 meses aproximadamente después de ser tratados [6] y en raras ocasiones, aproximadamente el 10% del total de los casos, el pronóstico de supervivencia ha sido de 5 años posterior al tratamiento [7]. Este tipo de cáncer se trata siguiendo el protocolo de Stupp [8], el cual se inicia con un procedimiento quirúrgico en el que se busca extraer la mayor parte del tumor sin comprometer tejido sano del cerebro; posteriormente, se utiliza radioterapia y quimioterapia para atacar las partes restantes del tumor no extraídas debido a su ubicación y a su morfología [9]. En el tratamiento particular de GBM, los procedimientos postquirúrgicos se limitan a la radioterapia debido a que agentes quimioterapéuticos presentan una gran dificultad para acceder al cerebro debido a la barrera hematoencefálica. Esta barrera es altamente selectiva y evita la introducción de este tipo de fármacos, limitando su función [10].

Con el fin de aumentar el efecto de la radioterapia y disminuir el daño generado en los tejidos sanos, diversos grupos de investigación se han enfocado en optimizar este tratamiento utilizando agentes radiosensibilizadores que sensibilicen las células cancerosas ante las radiaciones ionizantes, generando muerte celular o impidiendo su división [3]. Una alternativa de agente radiosensibilizadores surge del uso de materiales con dimensiones en la escala nanométrica, como nanopartículas (NPs), las cuales, gracias a su tamaño y dependiendo de las características de su superficie, pueden llegar a atravesar la membrana celular y distribuirse en el citoplasma celular [11]. Para el caso particular del diseño de nanoagentes radiosensibilizadores se ha explorado el uso de nanopartículas metálicas formadas a partir de átomos de alto número atómico (Z). Los átomos, al interactuar con radiaciones ionizantes pierden electrones, los cuales quedan libres en el medio e interactúan con otras estructuras, afectando su estabilidad. Si la energía liberada es lo suficientemente alta puede generar radiación difusa, esta interactúa con

los átomos cercanos alterando su estructura [3],[12],[13]. Los átomos con alto Z tienen mayor cantidad de electrones, por lo tanto, la interacción con las radiaciones ionizantes es mayor y la liberación consecutiva de electrones es más frecuente.

La capacidad radiosensibilizadora de las nanopartículas metálicas de oro y plata ha sido ampliamente estudiada. Varios estudios han demostrado la efectividad de las NPs basadas en oro para mejorar los efectos generados por la radioterapia [48]. No obstante, en algunos estudios *in vivo* se observa que la mayoría de las NPs de oro, sin importar el tamaño, se acumulan en órganos como el hígado, los pulmones y el bazo de los ratones inyectados [14], [15]. Las NPs basadas en plata también han demostrado que pueden servir para optimizar la radioterapia [16],[17],[18]. Sin embargo, los mecanismos biológicos que generan estas nanopartículas en las células no son muy claros, y se ha demostrado que la plata es menos inerte y biocompatible que el oro [19].

Otra potencial alternativa en exploración es el uso de NPs basadas en Gadolinio (GdNPs). Estas nanopartículas han mostrado su capacidad en radioterapia como agentes radiosensibilizadores [20], [21]. El Gd es un lantánido usado como componente principal de los agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética (MRI) [22]. El potencial de las GdNPs como agente radiosensibilizador ha sido evaluado a través de experimentos *in vitro* e *in vivo* en estudios en los que se ha demostrado mejoras en los efectos de citotoxicidad causados por la radiación por medio de diferentes mecanismos y disminución en el crecimiento de los tumores [23]. El estado de oxidación del Gd es 3+, por lo que en la naturaleza se encuentra en su forma iónica (Gd^{3+}) en minerales [62]. La presencia de estos iones en el organismo puede causar efectos tóxicos en los riñones y causar fibrosis sistémica nefrogénica en pacientes que presenten disfunción renal [24]. No obstante, en un estudio realizado por Chen et al. se demuestra que al encapsular Gd^{3+} en puntos de carbono (PC), la liberación de Gd^{3+} es mínima incluso en condiciones biológicas muy agresivas [25].

Los PC son nanomateriales compuestos por carbono. Debido a sus propiedades ópticas, su inercia y su biocompatibilidad han llamado la atención del área de biomateriales para aplicaciones biomédicas [26],[27],[28]. Sus dimensiones son menores a 10 nm, son fotoestables y presentan propiedades de fluorescencia [29],[30]. Los PC tienen aplicaciones biomédicas bastante amplias, han sido propuestos para que puedan ser usados en la adquisición de imágenes biológicas por fluorescencia [31], etiquetado biológico [32], biosensores [33], entrega de medicamentos [34], transfección genética [35] y terapias fotodinámicas [36], entre otras.

Al encapsular el Gd en PCs se garantiza su no liberación como ion libre. Chen et al., han reportado que al estar encapsulado dentro de la estructura molecular de los PCs, la fuga de estos iones en medios biológicos es mínima incluso cuando se ven expuestos a cambios extremos en el pH y de temperatura, sin afectar las propiedades del Gd^{3+} [25]. Adicionalmente, se ha demostrado que al encapsularlo, estos PC tienen tamaños menores a liposomas y microcápsulas [33], lo que puede permitir un mejor tránsito en ambientes biológicos.

Es por esto que en este proyecto se analizó el posible efecto radiosensibilizador de PC dopados con Gd^{3+} (PC- Gd^{3+}) en células derivadas de glioblastoma (U87). Este análisis se realizó experimentalmente con PC- Gd^{3+} sintetizados en el laboratorio de Bioquímica de la Universidad del Rosario. El posible efecto radiosensibilizador de los PC- Gd^{3+} se estudió en líneas celulares U87 y de cáncer de mama MCF-7. Esta última se utilizó como control positivo a la radioterapia, debido a que el cáncer de mama a diferencia del GBM responde muy bien a los tratamientos de

radiación, incluso, en algunos casos dependiendo de las características del tumor, este tipo de cáncer se trata solamente con radioterapia [37].

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El GBM es uno de los tipos de cáncer más agresivos y de difícil tratamiento, debido a su morfología, su ubicación y su comportamiento radioresistente. Aunque este tipo de cáncer no es uno de los más comunes, la esperanza de vida de los pacientes diagnosticados con GBM es muy baja, de 12 a 24 meses aproximadamente para pacientes después de ser tratados [6] y en algunos casos excepcionales de 5 años solamente para el 10% del total de los casos [7].

El uso de NPs como agentes radiosensibilizadores suponen un gran potencial para mejorar el pronóstico de vida en los pacientes con este tipo de cáncer; sin embargo, aún no se han elucidado con claridad todos los procesos que pueden ocurrir internamente en la célula como consecuencia de la interacción radiación-NPs [42].

Diversos grupos de investigación han utilizado GdNPs como agentes radiosensibilizadores en experimentos *in vitro* e *in vivo*, en los que se han demostrado incrementos en los efectos de citotoxicidad causados por la radiación y disminución en el crecimiento de los tumores [23]; Mowat et al. realizaron experimentos *in vitro* para evaluar los efectos de GdNPs y encontraron mejoras en la muerte celular de células de GBM después de su exposición a radiaciones de rayos X y rayos γ [38]; en otro estudio realizado por Le Duc et al. se encontró que las GdNPs inyectadas en los tumores de cerebro de ratas mejoraron la supervivencia de estas al ser tratadas con radiaciones ionizantes [39]. Sin embargo, una dificultad que se encontró en la literatura es la falta de estudios sistemáticos que permitan replicar los experimentos realizados y compararlos para generar estándares y métodos válidos que garanticen la seguridad de estas aplicaciones en los pacientes [40].

Los iones de Gd^{3+} , como se mencionó anteriormente, pueden generar efectos tóxicos en los riñones de los pacientes que sufren insuficiencia renal, sin embargo, los PC solucionan este problema pues encapsulan el Gd de tal manera que la liberación de este es mínima. Además, los PC han causado gran interés en el área investigativa al demostrar una amplia variedad de características que les permiten ser usados en el campo clínico para diagnóstico, etiquetado biológico, biosensores, entrega de medicamentos, transfección genética y terapias fotodinámicas, entre otros. Adicionalmente debido a su tamaño, biocompatibilidad y flexibilidad para su síntesis prometen un gran potencial como agente radiosensibilizador en conjunto con elementos con alto Z como el Gd, el cual ha sido utilizado como agente de contraste para MRI. Por estas razones, los PC- Gd^{3+} representan un agente radiosensibilizador prometedor. Sin embargo, al ser un tema tan reciente, falta realizar estudios de manera sistémica que permitan validar la información presentada en los estudios ya realizados. Esto con el fin de asegurar que estos nanomateriales puedan ser usados en experimentos *in vitro* e *in vivo* de manera segura y que generen el efecto de radiosensibilización esperado para poder empezar a realizar estudios clínicos [40].

Como se mencionó anteriormente, el GBM es un tipo de cáncer muy agresivo con un pronóstico de vida muy baja para los pacientes diagnosticados con este tipo de cáncer [6]. Debido a la ubicación, y morfología de este cáncer, lograr la extirpación completa del tumor es imposible durante la cirugía y debido a su radioresistencia la radioterapia adyuvante no genera los efectos deseados y el tumor puede volver a crecer. Por esta razón es de gran importancia implementar un agente radiosensibilizador que potencie los efectos de la radioterapia logrando evitar que las células cancerosas se sigan dividiendo y así lograr aumentar la esperanza de vida de los pacientes con este tipo de cáncer y conjuntamente su calidad de vida.

En este estudio se evaluó el posible comportamiento radiosensibilizador de PC-Gd³⁺, los cuales fueron sintetizados en este estudio utilizando como referencia el estudio realizado por Du et al., en el que sintetizan PC-Gd³⁺ para realizar radioterapia guiada con MRI *in vivo* en ratones portadores de tumores de cáncer de hígado, y se concluye que los PC-Gd³⁺ son excelentes agentes de contraste para realizar radiaciones localizadas guiadas y al mismo tiempo, se demostró un efecto radiosensibilizador de estos [41]. En el estudio realizado por Du et al., los parámetros de síntesis no se encuentran especificados, de manera que en este proyecto se realizan variaciones en los tiempos de reacción y en la cantidad de solutos con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la síntesis de los PC. Los parámetros establecidos para la síntesis de los PC se mencionan claramente en la metodología (Sección 5.1) para asegurar la posible replicación de este proceso.

Antedicho, el principio terapéutico de la radioterapia se basa en causar daño directa o indirectamente en el material genético de las células, llevándolas a muerte celular o afectando su capacidad de división. Por esta razón, para probar el posible efecto radiosensibilizador de los PC-Gd³⁺ se evaluará la capacidad de proliferación y el daño en el material genético de las células después de ser expuestas a radiaciones ionizantes con los PC-Gd³⁺; con esto se busca conocer el posible efecto radiosensibilizador de los PC-Gd³⁺ al exponerlos a radiaciones ionizantes en la línea celular U87.

El desarrollo de este proyecto permite conocer los posibles efectos radiosensibilizadores de los PC-Gd³⁺ en la línea celular U87 al tratarla con radioterapia. Además, gracias a la estandarización del protocolo de síntesis de los PC-Gd³⁺, este estudio permite que otros grupos de investigación puedan replicar el proceso de síntesis con el fin de validar los resultados encontrados o que puedan realizar estudios futuros con los mismos PC-Gd³⁺.

Llevar a cabo este proyecto también permite ahondar más en materiales radiosensibilizadores que puedan ayudar a potenciar los efectos de la radioterapia en pacientes diagnosticados con algún tipo de cáncer tan agresivos y con tan baja esperanza de vida como lo es el GBM, pues un agente radiosensibilizador adecuado podría prolongar la vida de estos pacientes y evitar los daños colaterales y los efectos secundarios que causan las altas dosis de radioterapia.

Adicionalmente, al estudiar el posible efecto radiosensibilizador de los PC-Gd³⁺ se pueden identificar o descartar materiales y procesos utilizados para desarrollar agentes radiosensibilizadores que puedan ser utilizados en conjunto con la radioterapia.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar el efecto radiosensibilizador de PC-Gd³⁺ en células de la línea celular U87.

3.2. Específicos

- Estandarizar el protocolo de síntesis y caracterización de PC- Gd³⁺.
- Identificar los cambios en la viabilidad celular y en la capacidad de proliferación de la línea celular U87, al irradiarla en presencia de PC-Gd³⁺.
- Determinar el daño en el material genético que genera la interacción entre las radiaciones ionizantes y los PC-Gd³⁺, en cultivos celulares de la línea U87.

4. MARCO TEÓRICO

El glioma, es un tipo de tumor que se desarrolla a partir de las células gliales. Las células gliales son células del sistema nervioso que se encargan principalmente de brindar soporte al funcionamiento de las neuronas dando soporte físico y estructural, aislando unas de otras, suministrando nutrientes y oxígeno, ayudando a limpiar el sistema nervioso de células muertas y regulando la transmisión de información entre las neuronas.

Los gliomas pueden ser benignos o malignos; los tumores benignos o de bajo grado se conocen como astrocitomas, ependimomas u oligodendrogliomas, cuyo nombre varía según la célula glial exacta a partir de la que se generan, y se caracterizan por ser tumores bien diferenciados. Los astrocitomas, se clasifican según su nivel de anomalía, siendo I el grado más bajo y IV el más alto [43].

La OMS define que, un astrocitoma de grado IV o de mayor grado [44] es un GBM, un tipo de tumor maligno y de rápido crecimiento. Según la asociación de tumores de cerebro (*Brain Tumor Association*), los GBM se encuentran generalmente en los hemisferios del cerebro, y con menor frecuencia, en cualquier otra parte del encéfalo o en la médula espinal. Se reproducen rápidamente y se encuentran conectados a un gran número de vasos sanguíneos [9]. Según su ubicación y tamaño pueden generar los siguientes signos y síntomas en los pacientes: dolor de cabeza, náuseas, vómitos, confusión, disminución en la función cerebral, pérdida de memoria, cambio de personalidad, irritabilidad, problemas de equilibrio, problemas en la visión o pérdida de la visión, dificultades en el habla y convulsiones.

Las células de GBM, a diferencia de otras células cancerosas, presentan una tendencia a mutar y anular o disminuir los efectos de los genes supresores de tumores [45], convirtiéndolos en uno de los tipos de cáncer más agresivos. Este tipo de cáncer es más común en pacientes entre 45 y 65 años y afecta más a los hombres que a las mujeres. Aunque no es un tipo de cáncer muy común, el pronóstico de supervivencia de los pacientes diagnosticados con GBM es de 12 a 24 meses aproximadamente después de ser tratados y en algunos casos atípicos, del 10% del total de los casos, de 5 años posterior al tratamiento. En niños con tumores de grado alto, los tratamientos tienden a tener mejores resultados que en los adultos; la supervivencia de 5 años para los niños es de aproximadamente el 25% [44].

Como se mencionó anteriormente, este tipo de cáncer se trata comúnmente siguiendo el protocolo de Stupp, en el que, la intervención quirúrgica es el primer tratamiento que se realiza para extirpar la mayor cantidad posible del tumor y reducir los síntomas provocados. Sin embargo, la mayoría de tumores de este tipo no pueden ser extirpados en su totalidad debido a su ubicación y a su morfología. Las células de los GBM se caracterizan por tener forma de "tentáculos" al igual que las células del sistema nervioso, afectando el tejido circundante sano y funcional del cerebro, dificultando una extirpación completa [8].

En adultos, generalmente se administra radioterapia seguido a la cirugía y en niños se administra quimioterapia hasta los 3 ó 4 años cuando sus cerebros están más desarrollados para tolerar la radioterapia [9]. Debido a la ubicación del GBM, la quimioterapia presenta una gran dificultad para actuar en el cerebro debido a la barrera hematoencefálica, que es altamente selectiva y evita que los fármacos utilizados en este tipo de tratamientos ingresen al cerebro, limitando su función y efectividad [10]. Existen algunos medicamentos como la temozolomida que

tiene una penetración razonable en la barrera hematoencefálica [6]. Sin embargo, este tratamiento se administra en conjunto con radioterapia.

La radioterapia utiliza radiaciones ionizantes provenientes de fuentes como rayos X, rayos γ o partículas de alta energía para dañar el material genético de las células, matándolas o evitando que se multipliquen. La radiación ionizante se refiere a la energía emitida a través de rayos o partículas cargadas capaces de ionizar átomos neutros, es decir, capaces de generar pares ion-electrón, afectando la estructura y estabilidad atómica; a su vez, si este electrón que queda libre y cargado, tiene la energía suficiente, puede causar el mismo efecto en otro átomo, generando una reacción en cadena hasta que se pierde la energía necesaria para estas modificaciones. Cuando estas radiaciones ionizantes interactúan con las células se generan cambios estructurales principalmente en el ADN celular que pueden provocar la muerte celular o la inviabilidad celular [3], [4].

La energía utilizada en radioterapia puede provenir de una fuente externa como un equipo acelerador de partículas o de una fuente interna al depositar partículas de alta energía dentro del cuerpo. El tratamiento y la fuente de energía dependen del tipo del cáncer del paciente y del pronóstico de éste. La mayoría de tipos de cáncer responden según lo esperado a la radioterapia, por ejemplo, las células de cáncer de mama se ven altamente afectadas por las radiaciones ionizantes, causando muerte celular o evitando que estas células se sigan multiplicando y que el tumor crezca. La efectividad de esta forma terapéutica es tal que, en algunos casos, dependiendo del tipo de tumor y de las características, se evitan los tratamientos quirúrgicos y se controla el cáncer solo con radioterapia [43]. Sin embargo, existen otro tipo de células cancerosas que han desarrollado mecanismos de protección y reparación para contrarrestar los daños causados por las radiaciones ionizantes. Estas células tienen la capacidad de repararse a sí mismas para seguir dividiéndose incontroladamente [4].

Las células de GBM presentan este comportamiento dificultado su tratamiento en pacientes. Por esta razón, en las últimas décadas diversos grupos de investigación se han enfocado en optimizar y especificar este tratamiento utilizando agentes radiosensibilizadores como fármacos, que buscan sensibilizar las células cancerosas ante las radiaciones ionizantes [19]. Sin embargo, en el campo clínico, algunos de estos radiosensibilizadores han mostrado ser altamente tóxicos para los tejidos sanos, por esta razón, su implementación se encuentra limitada [46]. Una solución reciente para optimizar los efectos de la radioterapia es el uso de nanopartículas (NPs), partículas de tamaño nanométrico que según su síntesis varían en composición, características fisicoquímicas y por tanto en las aplicaciones en las que pueden ser potencialmente utilizadas. En el campo del tratamiento del cáncer han demostrado generar beneficios, aumentando el efecto de las radiaciones ionizantes específicamente en el área del tumor y minimizando los efectos secundarios [46],[47]. Algunos de los materiales más utilizados para evaluar el efecto radiosensibilizador son basados en: Oro, Plata, Platino, Gadolinio, Hierro y otras NPs basadas en aleaciones de varios tipos de metales [48].

Las NPs de oro han demostrado un gran potencial como agente teranóstico, de diagnóstico y de terapia, debido a su número Z y a su alta biocompatibilidad en medios biológicos. Yan Lui et al., realizaron diversos estudios con NPs de oro en los cuales demostraron un aumento significativo en la muerte celular de células de carcinoma de cuello uterino humano en conjunto con radiaciones ionizantes [63]. En otro estudio realizado *in vivo* en ratones con cáncer de mama inducido, Hainfeld et al., evidenciaron una mejora de un año en la supervivencia de los ratones

tratados con NPs de oro en comparación con los ratones que solo recibieron radioterapia [64]. Otros estudios se han enfocado en evaluar la relación entre el tamaño de las NPs de oro y sus efectos a nivel biológico [65], [66]. A pesar de que las NPs de oro han sido altamente estudiadas durante la última década y se ha demostrado su potencial efecto radiosensibilizador no se ha logrado implementar el uso clínico de estas [67] según Sohyoung Her et al. Esto se debe principalmente a preocupaciones y dudas sobre la seguridad del paciente y sobre la eficacia *in vivo* en seres humanos. Yan Lui et al. en otro estudio posterior demostraron que la exposición a la radiación de las NPs de oro es proporcional a la formación de agregados [68].

Las NPs de plata, al igual que las de oro, han sido altamente estudiadas y se ha demostrado su efecto radiosensibilizador en experimentos *in vivo* e *in vitro* en diferentes tipos de cáncer. Huang et al., demostraron mejoras en la muerte celular en células de cáncer gástrico [69]; Lu et al., también demostraron este efecto en células de adenocarcinoma de mama [70]. En otro experimento *in vitro* realizado en ratones con glioma inducido se observó que el tiempo de supervivencia de los ratones tratados con las NPs fue mayor comparado al de la muestra de ratones sin NPs después de ser tratados con radioterapia [71]. Sin embargo, aunque las NPs de plata demostraron buenos resultados y un efecto radiosensibilizador, la plata es un elemento menos inerte y biocompatible que el oro por lo cual las preocupaciones sobre la seguridad de los pacientes y su eficiencia son mayores con este tipo de NPs. [19]

Otros materiales como el platino y el hierro también han sido utilizados para evaluar su posible efecto radiosensibilizador, aunque, no han sido tan estudiados como las NPs de oro y de plata. Las NPs de platino en varios estudios realizados por Porcel et al., demostraron un efecto radiosensibilizador al potenciar la ruptura del ADN al utilizar NPs de platino y diferentes tipos de radiaciones ionizantes [72], [73], [74], [75]. Sin embargo, otros estudios realizados por Jawaid et al., concluyeron que el uso de estas NPs disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno por lo que disminuye la muerte celular [76], [77]. Por otra parte, el hierro tiene un $Z = 26$ relativamente bajo al compararlo con el Z del oro, plata o platino, por esta razón, en la mayoría de experimentos en los cuales se ha evaluado su posible efecto radiosensibilizador, las NPs se han diseñado en combinación con otros metales o se han realizado experimentos bajo condiciones específicas [78], [79], [80], [81], [82]. Las NPs de hierro han demostrado principalmente un gran potencial en aplicaciones teranósticas como: terapia fototérmica, terapia fotodinámica, hipertermia magnética y como agentes de contraste [83] [84] [85] y aunque han demostrado un gran potencial en aplicaciones médicas, en múltiples estudios se han encontrado efectos tóxicos en las células generados por las NPs de hierro [86].

Una característica relevante de los componentes de estas NPs es su número atómico (Z), un indicador de la cantidad aproximada de electrones de un átomo en su estado estable. Las radiaciones ionizantes interactúan principalmente con los electrones de los átomos, pues éstas emiten niveles de energía capaces de arrancar y desplazar electrones de su órbita atómica [3],[4]. Por lo tanto, entre mayor número de electrones haya en el medio irradiado, mayor será la interacción de las radiaciones ionizantes con éste; además, esta liberación de electrones consecutiva libera energía que puede ser emitida en todas las direcciones y generar radiación difusa o ser absorbida por otras estructuras del medio dependiendo de su carga energética, por lo que teóricamente implica un mayor efecto desestabilizante en la estructura atómica del medio irradiado [3],[12],[13].

Entre los materiales estudiados en la literatura, también se encuentra el Gd, el cual se destaca al ser usado hace unas décadas y actualmente como agente de contraste para imágenes de resonancia magnética (MRI) [22]. El Gd es un lantánido con $Z = 64$, y con un alto potencial terapéutico, es decir puede ser utilizado para diagnosticar y para tratamientos terapéuticos gracias a su uso como agente de contraste y a su gran potencial como agente radiosensibilizador [20], [21].

En la literatura, las NPs basadas en Gd se han reportado como causantes de mejoras en los efectos de citotoxicidad causados por la radiación y disminución en el crecimiento de los tumores [23]. Mowat et al., estudiaron los efectos de GdNPs y encontraron aumento en la muerte celular tanto en radiaciones con rayos X como en radiaciones con rayos γ [38]; en otro estudio realizado por Duc et al., encontraron que las GdNPs mejoraron la supervivencia de ratas con tumores de cerebro al ser tratadas con radiaciones ionizantes [29]. En un estudio realizado en la línea celular CT26 de células de adenocarcinoma de colon se demostró una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), indicando un efecto radiosensibilizador de las nanopartículas de GdNPs [49]. Este efecto radiosensibilizador también ha sido observado por diferentes grupos de investigación por medio de experimentos *in vitro* en diferentes líneas celulares [39], [50], [51], [52], [53].

El Gd es un elemento que solo se encuentra en la naturaleza de forma combinada. En su forma iónica, los iones de Gadolinio (Gd^{3+}), al estar libres en el organismo, pueden causar efectos tóxicos y generar daños en los riñones de los pacientes que sufran disfunción renal causando fibrosis sistémica nefrogénica [24]. Sin embargo, en un estudio preclínico realizado por Sancey et al., en ratones se demostró que las GdNPs no causaron toxicidad y fueron eliminados rápidamente del cuerpo por medio de los riñones [87]. Asimismo, en otro estudio preclínico realizado en primates no-humanos por Kotb et al., también se demostró que estas NPs fueron eliminadas a través de los riñones en aproximadamente una semana después del día inicial de tratamiento y dos semanas después del día inicial se evaluaron todos los órganos vitales y no se encontraron rastros de las NPs [88].

Los PC son nanomateriales compuestos por carbono que han generado gran interés debido a sus dimensiones, sus propiedades ópticas, su estabilidad coloidal y su biocompatibilidad [26], [27], [28]. Sus dimensiones son menores a 10 nm, son fotoestables y presentan propiedades de fotoluminiscencia [29], [30]. Los PC tienen aplicaciones biomédicas bastante amplias, pueden ser usados en imágenes biológicas [31], etiquetado biológico [32], biosensores [42], entrega de medicamentos [34], transfección genética [35] y terapias fotodinámicas [36], entre otros. Además, debido a sus dimensiones y al estar compuestos principalmente por carbono, la probabilidad de que los PC pueden camuflarse en medios biológicos de una manera más fácil que otros tipos de nanopartículas es mayor. También es importante mencionar que pueden ser sintetizados a partir de materiales que estén compuestos de carbono. Al combinar estos nanomateriales con un agente de contraste con propiedades radiosensibilizadoras se obtiene un potencial agente terapéutico, que podría ser utilizado en diferentes aplicaciones biomédicas.

Los PC dopados con Gd^{3+} (PC- Gd^{3+}) han sido estudiados en las últimas décadas por grupos de investigación para analizar los efectos de luminiscencia en imágenes de resonancia magnética [41], efectos para entrega de medicamentos, marcaciones, entre otros, aprovechando al máximo las propiedades ópticas que los PC ofrecen y el conocimiento que se tiene sobre el Gd^{3+} en el cuerpo humano. En un estudio realizado por Xi He et al., se investigó el uso de PC- Gd^{3+} como agente terapéutico combinando habilidades de entrega de genes y en el uso de toma de imágenes multimodales. Los PC- Gd^{3+} demostraron una buena biocompatibilidad y sus

propiedades ópticas de fluorescencia duraron por varios días en diferentes condiciones de pH, además se demostró que los PC-Gd³⁺ generaron imágenes de MRI más claras que algunos agentes de contraste utilizados [89]. En otro estudio realizado *in vivo* e *in vitro* se concluyó que los PC-Gd³⁺ tienen un gran potencial para ser utilizados como agentes de contraste para MRI del corazón y también para realizar terapia guiada con imágenes, adicionalmente, los PC-Gd³⁺ fueron fácilmente eliminados del cuerpo de los ratones por medio de los riñones sin causar efectos tóxicos [90]. De igual manera, en un estudio realizado por Chen et al., se demostró que al encapsular Gd³⁺ en puntos de carbono (PC), la liberación de Gd³⁺ es mínima incluso en condiciones biológicas muy agresivas como cambios en el pH, en la temperatura, entre otros [25], convirtiéndose en una opción más adecuada para trabajar en ambientes biológicos y evitar riesgos como la liberación de Gd³⁺ en el organismo.

Los PC-Gd³⁺ también han sido estudiados como posibles agentes radiosensibilizadores, Fengyi et al., demostraron que estos PC son excelentes agentes de contraste para realizar radioterapia guiada por MRI y presentan un efecto radiosensibilizador pues se observó un control favorable del tumor en muestras *in vivo* para las condiciones tratadas con PC [91]. Xiaofen Ma et al., también demostraron el efecto radiosensibilizador de PC dopados con Gd³⁺ *in vivo* en ratones con cáncer de pulmón inducido, pues la inhibición del crecimiento del tumor fue mucho mayor en los ratones tratados con PC que en los ratones que solo recibieron radioterapia, además, al realizar imágenes de MRI se observó que la captación de PC del tumor es muy alta lo cual favorece el efecto radiosensibilizador de los PC-Gd³⁺ [92].

Para los pacientes diagnosticados con GBM, la implementación de un agente radiosensibilizador podría aumentar su esperanza de vida y así mismo mejorar su calidad de vida. Los PC-Gd³⁺ representan un posible agente radiosensibilizador que podría potenciar los efectos de la radioterapia en células radioresistentes como el GBM, por lo tanto, en este proyecto se sintetizaron PC-Gd³⁺ y se realizaron experimentos con el fin de evaluar el efecto radiosensibilizador de estos.

5. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de este proyecto de investigación se llevaron a cabo cuatro fases principales: (i) síntesis y caracterización de PC-Gd³⁺; (ii) exposición de las células a PC-Gd³⁺; (iii) irradiación y (iv) pruebas experimentales; en donde se incluyeron, análisis de viabilidad celular, capacidad de proliferación celular y daño en el material genético.



Figura 1. Diagrama de flujo metodología

5.1 Síntesis y caracterización de PC-Gd³⁺

Los PC-Gd³⁺ fueron sintetizados a través del método de síntesis de solvotérmica. Dicho método se basa en formar nanoestructuras al exponer solventes a presiones y temperaturas por encima de su punto crítico, haciendo que la solubilidad de los precursores utilizados aumente. Para esta síntesis se utiliza el ácido gadopentético, Gd-DPTA, (Sigma Aldrich, 97%) como agente precursor del gadolinio, glicina (Fisher Scientific, 99%) como agente precursor del carbono, y etanol y agua destilada como solventes. Se utilizaron 0.5 g de glicina y 0.5 g de ácido gadopentético dispersados en 10 mL de etanol y 10 mL de agua destilada seguido de un proceso de sonicación por 10 minutos para homogenizar la solución. Esta solución se transfirió a un recipiente de teflón de 100 ml con un agitador magnético sellado en una autoclave de acero inoxidable.

Para aumentar la temperatura de la solución, se utilizó una plancha de calentamiento a 200°C con agitación magnética constante con diferentes intervalos de tiempo: 6, 8, 10 y 12 horas con el fin de hallar el tiempo óptimo para la reacción. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos para separar las partículas de mayor tamaño no estables y se recolectó el sobrenadante. Posteriores pasos de purificación incluyeron filtración (filtro Millex-GP Filter, 0.22 µm) y diálisis por 24 horas. El producto final se secó en un horno al vacío aproximadamente por 12 horas y se diluyó en agua destilada estéril.

Las variaciones en el tiempo de reacción se realizaron sin el agente precursor del gadolinio por lo cual la cantidad de soluto en las reacciones iniciales correspondió a 1 g de Glicina como precursor del carbono. Después de hallar el tiempo óptimo de reacción se incorporó el ácido gadopentético de la siguiente manera:

Tabla I.

Variaciones cantidad de soluto en la reacción de los puntos de carbono dopados con gadolinio

Reacción	Glicina (g)	Ácido gadopentético (g)
0 %	1	0
10 %	0.9	0.1
20 %	0.8	0.2
30 %	0.7	0.3
40 %	0.6	0.4
50 %	0.5	0.5

La cantidad de ácido gadopentético y de glicina fue variada para hallar las concentraciones adecuadas de cada uno de los precursores para los PC- Gd³⁺. Estos valores se determinaron después de caracterizar los PC-Gd³⁺ y evaluar la concentración que presentó mejores propiedades ópticas. Adicionalmente, se realizaron experimentos de viabilidad celular con cada una de las condiciones con el fin de evaluar si la variación de esta afectaba la integridad de las células.

Para la caracterización de los PC se realizan estudios de espectroscopia UV – Vis para determinar las propiedades ópticas de absorbancia y fluorescencia. Para lo cual se utilizó el espectrofotómetro UV – Vis FLAMES-S-XR1-ES con ayuda del software Ocean View. Los PC-Gd³⁺ disueltos en agua destilada se llevaron a una concentración de 0,05 mg/mL y se colocaron en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico para tomar mediciones en rangos de 200 a 800 nm. Los datos fueron procesados a través del software Prism®. Para obtener los espectros de fluorescencia se utilizó el equipo Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek) y el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES con la ayuda del software Ocean View.

La carga superficial se obtuvo a través de mediciones de potencial zeta por medio del equipo Litesizer 500 (Anton Paar) con cmPALS patentado. Las muestras se llevaron a una concentración de 0,1 mg/mL y fueron introducidas en una celda Univette a una temperatura de 25°C con un índice de refracción de 1,33.

5.2 Exposición de las líneas celulares U87 y MCF-7 a los PC-Gd³⁺

Para cultivar las células de glioblastoma (U87) y de cáncer de mama (MCF-7), se utiliza medio de cultivo rico en glucosa (DMEM) de Sigma-Aldrich con suero fetal bovino 10% y antibiótico 1% en una incubadora con 5% CO₂ y a 37°C proporcionando las condiciones óptimas para las necesidades celulares. Las líneas celulares se sembraron en cajas Petri, aproximadamente 500.000 células por caja, y se esperó entre 48 y 72 horas hasta que las células alcanzasen el 80% de confluencia para incorporar los PC-Gd³⁺. Los PC-Gd³⁺ se adicionaron a los cultivos celulares en concentraciones que variaron entre 0 y 500 µg/mL para los experimentos de viabilidad celular y a una concentración de 500 µg/mL para los experimentos realizados para determinar la capacidad de proliferación celular y el daño en el material genético. Para todos los experimentos realizados el tiempo de incubación de los PC-Gd³⁺ con las líneas celulares fue de 24 horas previo a los experimentos.

5.4 Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el ensayo de MTT [54], el cual se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan). Este compuesto de color azul permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas pues la cantidad de formazan producido es directamente proporcional al número de células viables. La cantidad de formazan se puede calcular al realizar una lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm; para esta medición se utilizó el equipo Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek).

Para el desarrollo de este ensayo se utilizaron cajas de 96 pozos en las que se sembraron 10.000 células en 200 μL de medio completo (DMEM) y se dejaron incubando a 5% CO_2 y a 37°C por 24 horas. Pasado este tiempo los PC-Gd³⁺ fueron añadidos de la siguiente manera: De las reacciones 0%, 30%, 40% y 50% de PC-Gd³⁺ mencionadas en la Tabla I se evaluaron concentraciones de 50 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$ y se utilizó un control negativo al cual no se le agregaron PC.

Después de 24 horas de incubación de cada condición, se colocaron 20 μL del reactivo del kit (MTT). Los pozos se dejaron incubar por 3 horas y seguido a esto se agregó el solvente DMSO. La caja de 96 pozos fue cubierta y se puso a agitar durante 15 minutos. Finalmente, la absorbancia se midió mediante espectrometría UV – Vis para determinar la cantidad de formazan producido para cada condición. Para evaluar la viabilidad celular se utilizaron en el experimento tres muestras por condición y se realizaron tres replicas.

5.3 Irradiación

La irradiación de las líneas celulares se dividió en dos condiciones principalmente: sin PC-Gd³⁺ y con PC-Gd³⁺ para ambas líneas celulares. Las muestras con PC-Gd³⁺ fueron incubadas con una concentración de PC de 500 $\mu\text{g/mL}$. Después de dejar incubando las líneas celulares U87 y MCF-7 con y sin PC en cajas de Petri por 24 horas, las muestras fueron transportadas a 4°C en neveras portátiles al Centro de Control de Cáncer en Bogotá en tubos Falcon cada uno con 50.000 células por tubo. Las células fueron irradiadas con fotones de energía de 6MV en dosis convencionales de 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy, y en dosis de radioterapia ablativa de 14, 16 y 20 Gy. Para el proceso de irradiación se utilizó un acelerador lineal de uso clínico (Linear Accelerator TrueBeam dual, VARIAN Medical Systems). Las muestras fueron irradiadas en los tubos Falcon en un simulador físico hecho en parafina, diseñado por el equipo de radioterapia del centro hospitalario, el cual por su densidad electrónica parecida a la del agua garantiza el equilibrio electrónico y la homogeneidad de dosis en la muestra [59].

5.5 Capacidad de proliferación celular

Para determinar la capacidad de proliferación celular posterior a la radiación se realizó el ensayo de clonogenicidad. Para este ensayo se sembraron las células tratadas a razón de 200 células por cada Gy de irradiación en cajas de seis pozos, por triplicado, y se dejaron por 14 días en incubación en un medio de 5% de CO_2 a 37°C, en atmósfera húmeda para permitir la formación de colonias. Transcurrido este periodo, las células fueron fijadas con paraformaldehído y teñidas con cristal violeta por 30 min. Después fueron lavadas con agua destilada para eliminar los

excesos de tinción y poder contar las colonias formadas durante ese periodo para cada condición, considerando solamente colonias de más de 50 células.

El sembrado de las células posterior a la radiación se realizó de la siguiente manera:

Tabla 2.
Cantidad de células sembradas por dosis de radiación.

Dosis de radiación (Gy)	Cantidad células sembradas
0 (Control)	200
1	200
2	400
4	800
6	1200
8	1600
10	2000
14	2800
16	3200
20	4000

El número de colonias y la cantidad de células sembradas permiten calcular la fracción de supervivencia (FS) de las células cancerosas teniendo como referencia la muestra control de 0 Gy. La FS se define como la relación entre la eficiencia de sembrado (ES) de una dosis determinada en relación con la muestra control (ecuación 1), y la ES es el porcentaje del número de colonias en relación con el número de células sembradas (ecuación 2) [55].

$$FS = \frac{(ES)_{muestraX}}{(ES)_{control}} \quad (1)$$

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

Para este experimento se evaluaron tres muestras por condición y el experimento se replicó tres veces.

5.6 Daño en el material genético celular

Para determinar el daño en el material genético se desarrolló el ensayo de cometa [56]. El principio de esta técnica se basa en que, al someter las células a un campo eléctrico, las hebras del ADN de una célula que han sufrido rupturas migrarán más rápido hacia el polo positivo que las hebras intactas, formando una imagen semejante a un cometa.

Para este ensayo, se utilizaron las muestras irradiadas con 0, 2, 6, 10, 16 y 20 Gy con y sin PC-Gd³⁺ de las líneas celulares U87 y MCF-7 utilizadas en el ensayo de clonogenicidad mencionado anteriormente. Para este ensayo se recogió 1 mL de las muestras previamente expuestas a radiación en tubos eppendorf, se centrifugaron para remover el sobrenadante y se adiciono PBS

1X a 4°C, este proceso de centrifugado y lavado con PBX se repitió tres veces con el fin de remover los residuos de medio para no afectar los reactivos del ensayo de cometa. En medio de cada lavado, las células fueron centrifugadas para asegurar que solo se retirara el sobrenadante. Estas células se mezclaron con agarosa en una proporción 1:10, (10 µL de células: 100 µL de agarosa) y se ubicaron en láminas de microscopio pre-tratadas para facilitar la adhesión de la agarosa. Posteriormente, las células fueron incubadas en buffer de lisis 1X durante 1 hora y luego por 30 minutos en una solución alcalina. Seguido a esto, las células fueron expuestas a electroforesis a 1 V/cm durante 30 minutos para que las hebras del ADN que han sufrido rupturas migren hacia el polo positivo siguiendo el principio de esta técnica. Finalmente, las láminas se lavaron 2 veces con agua destilada fría y 1 una vez con etanol frío al 70% dejándolas secar completamente mínimo durante 1 día. Para poder observar las imágenes de los cometas estos fueron teñidos con un intercalante fluorescente Vista Green, se dejaron secando a 4°C durante 1 a 3 horas y se observaron en el equipo Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek).

Para poder determinar el daño genético causado por las radiaciones ionizantes y los PC-Gd³⁺ se calculó el porcentaje de ADN en la cola (%ADN), valor directamente proporcional al daño causado en el material genético. El cálculo del %ADN en la cola se realizó por medio del programa OpenComet®, un software de acceso libre diseñado por Gyori BM et al., [58] que determina los parámetros de los cometas al proporcionarle las imágenes de estos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Síntesis y caracterización de PC

Para la caracterización de los PC sintetizados a partir de glicina se realizaron estudios de espectroscopia UV – Vis para determinar las propiedades ópticas de absorbancia y fluorescencia. Los espectros de absorción se midieron en un espectrofotómetro UV – Vis FLAMES-S-XR1-ES con ayuda del software Ocean View®. En la figura 2, se presenta los espectros de absorción obtenidos en función de los tiempos de reacción experimentados para la producción de PC, en donde la reacción de 10 horas presenta mayor área bajo la curva, indicando el favorecimiento de transiciones electrónicas de absorción por parte de los PC. Por este motivo, se selecciona el tiempo de reacción de 10 horas para las síntesis posteriores.

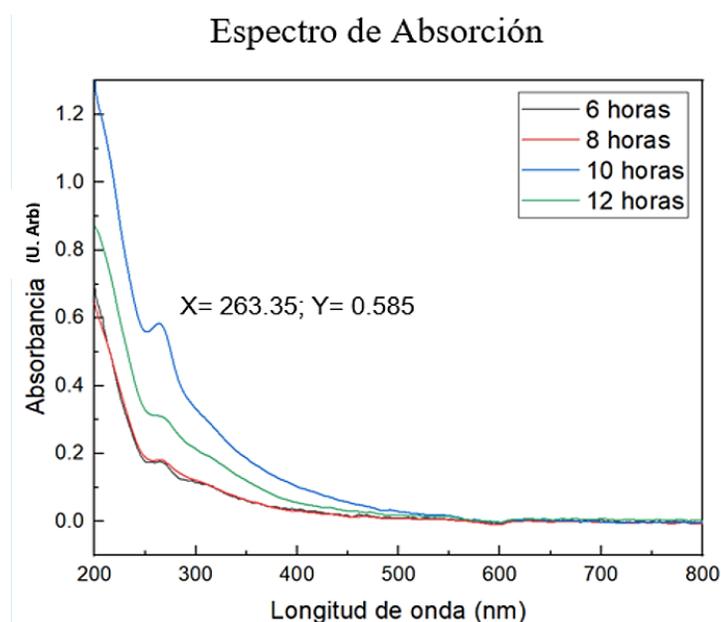


Figura 2. Espectro de absorción puntos de carbono sintetizados a partir de glicina en función del tiempo de reacción.

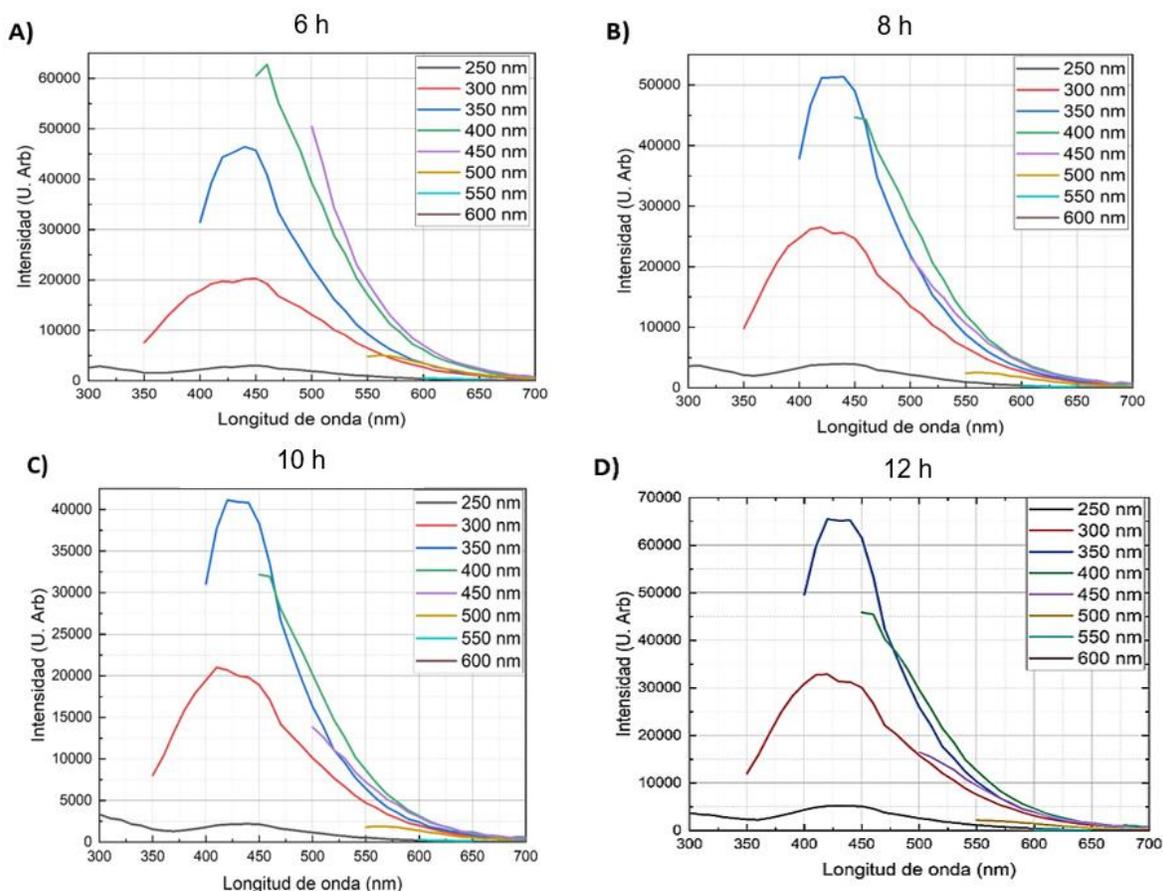


Figura 3. Espectros de emisión PC en función de longitudes de excitación de 300 a 700 nm. A) Reacción de 6 horas; B) Reacción de 8 horas; C) Reacción de 10 horas y D) Reacción de 12 horas.

Los espectros de fluorescencia se midieron en el equipo Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek) en función de la longitud de onda de excitación en un rango de 300 a 700 nm. En la figura 3, se pueden observar los diferentes espectros de emisión de las reacciones en función del tiempo de reacción de 6 a 12 horas. Para las reacciones de 6, 8, 10 y 12 horas se puede observar que al excitar los PC con una longitud de excitación de 350 nm, todas las muestras presentan una banda de emisión con un máximo entre 420 y 450 nm concordando con la luminiscencia observada al exponer los PC bajo irradiación de luz UV (Figura 4) generando una luz azul visible al ojo humano y corroborando la información hallada en la literatura sobre las propiedades ópticas de los PC [29], [30].

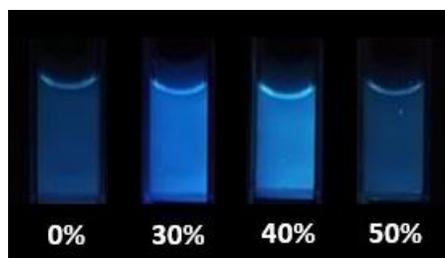


Figura 4. Solución resultante de la síntesis de PC-Gd³⁺ bajo radiación con luz UV para las reacciones 0% (Sin Gd), 30%, 40% y 50% (ver Tabla I).

Después de determinar el tiempo óptimo de la reacción, 10 horas, se realizó un estudio de optimización de la cantidad de ácido gadopentético a utilizar en el procedimiento de síntesis. Las cantidades experimentadas utilizadas se muestran en la sección 5.1 en la Tabla I. En la figura 5, se pueden observar los espectros de absorción de las reacciones de 0 a 50%, en donde se encuentran para las reacciones con ácido gadopentético de 10% a 50% bandas con valores máximos entre los 200 y 300 nanómetros y otras bandas de menor absorbancia entre los 300 y 400 nm. Las bandas presentes en el espectro de absorción permiten identificar las transiciones de los electrones de la superficie y del interior de los puntos de carbono, a los que se les atribuyen transiciones relacionados al enlace C=C y el enlace -C=O [57], la presencia de estos enlaces confirma la propiedad óptica de fluorescencia de los PC, puede ser igualmente corroborada al observar la figura 4, en la que se muestra que al excitar los PC con longitudes de onda de baja energía se produce luz visible para el ojo humano.

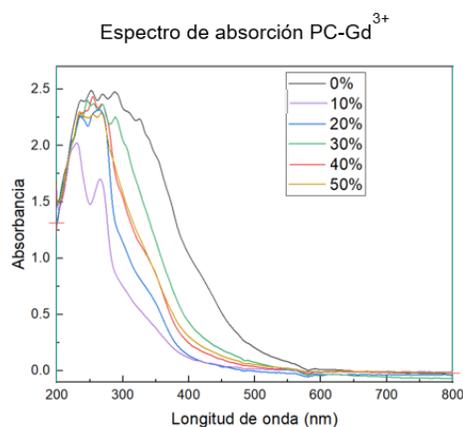


Figura 5. Espectro de absorción de los PC sintetizados en función de la concentración inicial de ácido gadopentético introducido en la reacción de 10 horas.

Al comparar la banda de la reacción 0% (sin ácido gadopentético) con las demás bandas, se puede observar una reducción en la amplitud de éstas, indicando un cambio estructural causado por el ácido gadopentético; esto se espera, debido a que se está agregando un componente nuevo a la reacción inicial, el cual hace que los enlaces que se forman durante la reacción sean diferentes y lo cual demuestra que el Gd se introduce en la red de átomos como un donante. Por eso hay un cambio en el entorno químico y por tanto en la distribución de enlaces y sus niveles de energía. Al observar las demás bandas se evidencia que el comportamiento del espectro de absorción se mantiene demostrando que en los PC-Gd³⁺ hay una gran cantidad de enlaces C=C

y de enlaces C=O según la revisión realizada por Mengli Liu [57]. El espectro de absorción para las reacciones con ácido gadopentético se mantiene entre los 200 y 400 nm por esto el color observado en la figura 4 al exponer los PC-Gd³⁺ a luz UV.

La carga superficial de los PC-Gd³⁺ se determina con mediciones de potencial zeta y se obtiene un promedio de $3,38 \pm 0,85$. El potencial z indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión [60] y su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones [61]. Los PC-Gd³⁺ demuestran un comportamiento estable, se dispersan adecuadamente en agua y en el medio celular, esto garantiza una larga circulación en medios biológicos y al ser almacenados a 4°C no hay formación de agregados debido a su estabilidad.

6.2. Viabilidad celular

Para el ensayo de MTT se seleccionaron las reacciones con mayor cantidad de ácido gadopentético (30, 40 y 50%) más un control de PC sin ácido gadopentético (0%) y un control de viabilidad celular de una muestra sin PC. Para las muestras con PC se evaluó la viabilidad celular con las siguientes concentraciones en las líneas celulares U87 y MCF-7: 0, 50, 250 y 500 µg/mL. Para todas las condiciones evaluadas, se realizaron tres réplicas de cada condición durante el experimento, y se realizaron tres experimentos en total. El valor obtenido de la muestra control para cada línea celular sin ácido gadopentético y sin PC para cada experimento se tomó como viabilidad celular al 100% pues estos controles son cultivos celulares viables y sin ningún agente externo que afectara su viabilidad. Para poder comparar las demás condiciones con la muestra control, todos los valores se dividieron sobre el valor de la muestra control con el fin de normalizar todos los resultados obtenidos para cada experimento y cada condición y comparar en porcentajes los cambios en la viabilidad celular de las demás condiciones teniendo como referencia la muestra control.

La viabilidad celular no se vio afectada por el aumento de la concentración de los PC-Gd³⁺ ni por las variaciones de ácido gadopentético en las diferentes reacciones (reacciones 0%, 30%, 40% y 50%), como se puede observar en la figura 6. Al realizar los análisis estadísticos con la prueba t-student para muestras normales pareadas no se encontró diferencia significativa en la viabilidad celular de ninguna de las muestras con PC-Gd³⁺ en diferentes concentraciones al compararlas con la muestra control. Cada condición se comparó individualmente con la muestra control.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la interacción entre las células y los PC-Gd³⁺ no genera toxicidad, pues la viabilidad es mayor o igual al 80% para todas las condiciones. Los resultados obtenidos corroboran la literatura y los estudios en los cuales se han desarrollado PC-Gd³⁺ y se ha demostrado su biocompatibilidad [26], [27], [28]. Específicamente en el estudio desarrollado por Du Fengyi et al., [41] del cual se basa el proceso de síntesis de los PC-Gd³⁺ generados en este proyecto.

Al comparar el comportamiento entre las reacciones de 30%, 40% y 50% no se evidencia disminución en la viabilidad celular a mayor cantidad de ácido gadopentético. Por esta razón, se utiliza la concentración de 500 µg/mL de los PC con mayor cantidad de ácido gadopentético, de 50%, para realizar los experimentos posteriores con radiaciones ionizantes.

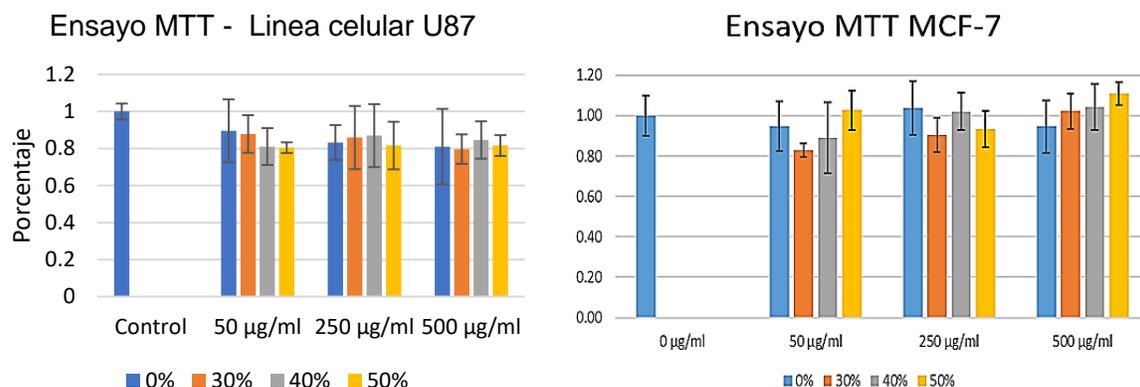


Figura 6. Ensayo de viabilidad celular MTT de los PC-Gd³⁺ a diferentes concentraciones en las líneas celulares U87 y MCF-7 (valores mayores a 80% representan células viables) con su respectiva desviación estándar para cada condición. En este experimento se analizaron tres muestras por condición, y el experimento se realizó tres veces.

6.3. Capacidad de proliferación celular

La capacidad de proliferación celular se evaluó por medio del ensayo de clonogenicidad con el cual se puede determinar si las células después de ser irradiadas en muestras con y sin PC-Gd³⁺ pueden seguir dividiéndose y multiplicándose. En este experimento se utilizaron muestras con y sin PC-Gd³⁺ con el fin de analizar los efectos radiosensibilizadores de los PC Gd³⁺.

En la figura 7, se puede observar la gráfica logarítmica de la curva de supervivencia de las células U87 y MCF-7 con y sin PC-Gd³⁺ después de ser irradiadas con diferentes dosis. Para ambas líneas celulares se utiliza como control la muestra 0 Gy, la cual no es sometida a radiación y con la cual se determina una fracción de supervivencia (FS) de 100% (10⁰) pues al ser una muestra que no fue expuesta a radiaciones ionizantes representa un comportamiento normal de proliferación de células cancerosa. Este control se hizo para ambas condiciones 0 Gy con y sin PC-Gd³⁺.

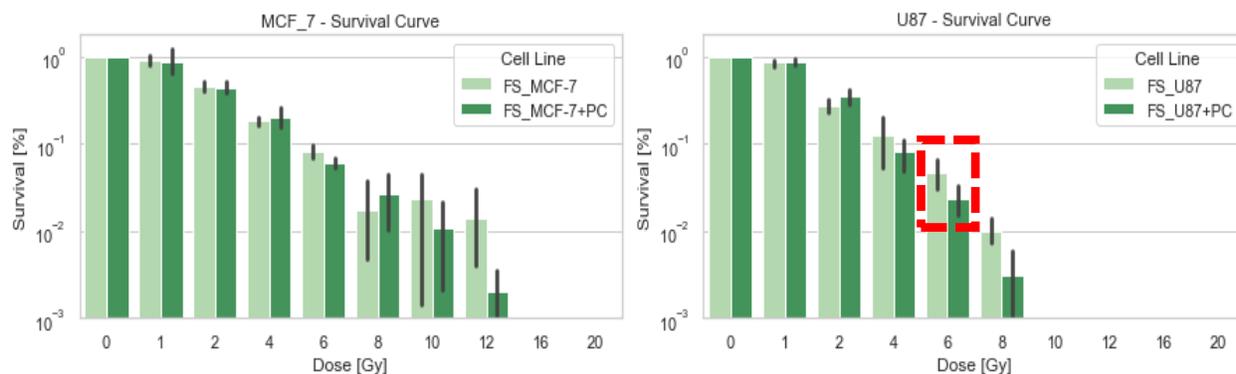


Figura 7. Curva fracción de supervivencia (FS) en las líneas celulares U87 y MCF-7 al ser sometidas a radioterapia en conjunto con PC-Gd³⁺ con su respectiva desviación estándar para cada condición evaluada. 10⁰ representa el 100% de FS. Para este experimento se realizaron tres replicas por condición y el experimento se realizó por triplicado. La caja punteada roja corresponde a la muestra en la cual se encontró una diferencia significativa entre las condiciones con y sin PC con la prueba estadística t-student para muestras normales pareadas.

Igualmente, en la figura 8 se pueden observar las gráficas logarítmicas de la FS de las líneas U87 y MCF-7 para evidenciar de una manera más sencilla los cambios de la FS en relación a las dosis de radiación y a la presencia de PC-Gd³⁺, además, se excluyen los valores de FS menores a 10⁻³ del eje y pues estos valores corresponden a FS menores al 1% respecto a la muestra control con FS 10⁰ (FS 100%). En ambas graficas se puede ver como a medida que la dosis de radiación aumenta la FS de ambas líneas celulares se ve más afectada, de igual manera, se puede observar como para cada condición de dosis de radiación las muestras con PC presentan una FS más afectada que las muestras sin PC.

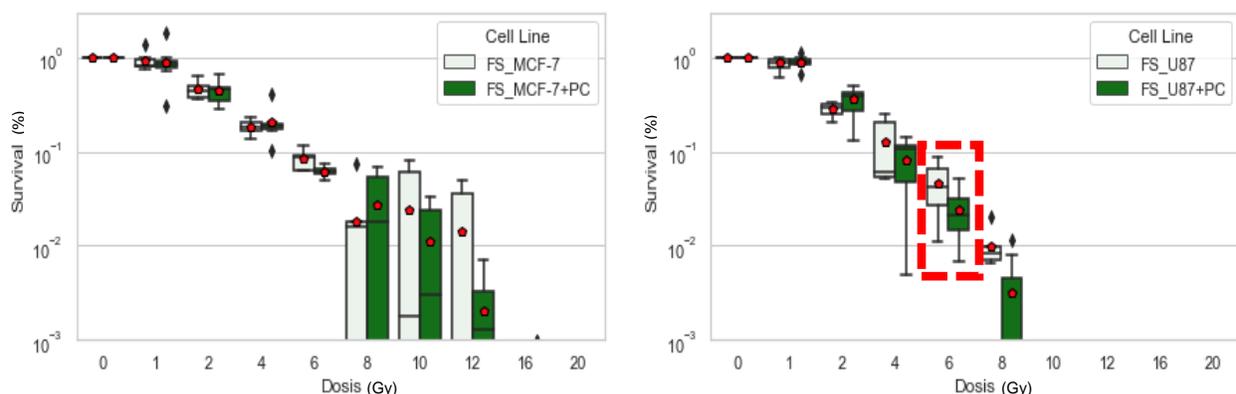


Figura 8. Fracción de supervivencia (FS) en las líneas celulares U87 y MCF-7 al ser sometidas a radioterapia en conjunto con PC-Gd³⁺ con su respectiva desviación estándar para cada condición evaluada. 10⁰ representa el 100% de FS. Para este experimento se realizaron tres replicas por condición y el experimento se realizó por triplicado. La caja punteada roja corresponde a la muestra en la cual se encontró una diferencia significativa entre las condiciones con y sin PC con la prueba estadística t-student para muestras normales pareadas.

Para las muestras irradiadas con 1 y 2 Gy no se observa una disminución notoria entre las muestras con PC y las muestras sin PC. Al comparar las tendencias con los resultados estadísticos de la prueba t-student para muestras normales pareadas no se encontró una diferencia significativa entre ambas muestras.

En la línea celular U87 las muestras irradiadas con dosis de 4, 6 y 8 Gy muestran una menor FS en presencia de PC-Gd³⁺ indicando un posible efecto radiosensibilizador de los PC con dosis terapéuticas mayores a 2 Gy. El mismo comportamiento se observa en las muestras de 10 y 12 Gy para la línea celular MCF-7. Sin embargo, al analizar los resultados estadísticos con la prueba t-student para muestras normales pareadas, solo se encontró diferencia significativa en la muestra de 6 Gy de la línea U87 entre las muestras con y sin PC (ver recuadro rojo en las figuras 7 y 8). Para las demás condiciones mencionadas anteriormente, aunque no se encontró una diferencia significativa estadísticamente, si se puede observar una tendencia biológica plausible, lo cual podría mostrar cierto efecto de radiosensibilización de los PC-Gd³⁺ que podría ser estudiado variando algunos parámetros en la síntesis o aumentando la concentración de PC en la muestra levemente sin saturar el medio celular.

Para las dosis más altas de radiación de 16 y 20 Gy la FS es 0 para ambas líneas celulares, este comportamiento es esperado independientemente de la presencia de PC-Gd³⁺, pues estas dosis afectan a gran escala el material genético de las células. Estas dosis son utilizadas con el fin de destruir tumores y debido a su finalidad solo pueden ser usadas en condiciones muy específicas

pues si el tumor se encuentra muy cerca de órganos y tejidos sanos estos también se verán afectados. Por ejemplo, la radioterapia ablativa se puede utilizar para tratar cáncer de páncreas o de hígado si estos no se encuentran muy cerca del estómago [93]. Para el caso del GBM debido a los efectos colaterales que generan estas dosis tan altas en los tejidos sanos del cerebro no es viable utilizarlas en terapia [94], [95]. Sin embargo, se utilizan en este proyecto con el fin de comparar el comportamiento de las células de GBM a altas dosis de radiación y a dosis menores con los PC-Gd³⁺.

Al comparar el comportamiento entre ambas líneas celulares con y sin PC-Gd³⁺, se puede observar un comportamiento similar entre algunas condiciones específicas como 1 Gy y 6 Gy, y en la mayoría de las condiciones 1, 2, 6, 10 y 12 Gy para la línea celular MCF-7 y 4, 6 y 8 Gy para la línea celular U87 que las condiciones con PC-Gd³⁺ la FS es menor en comparación a la condición con la misma dosis de radiación sin PC-Gd³⁺. Al analizar los datos estadísticos con la prueba t-student para muestras normales no pareadas entre ambas líneas celulares no se encontró una diferencia significativa entre el comportamiento de la línea celular U87 y la línea celular MCF-7 para las condiciones de 1 a 8 Gy, sin embargo, para poder realizar un análisis estadístico más exacto es necesario contar con todas las condiciones a comparar, por lo cual, con el análisis estadísticos realizado no es posible establecer adecuadamente si existe una diferencia significativa o no entre ambas líneas celulares. Al observar la figura 7 se puede notar una tendencia en la línea celular U87 a tener valores de FS menores para las mismas dosis de irradiación en comparación con la línea MCF-7. También, se puede observar que para las muestras irradiadas con dosis de 1 Gy hasta los 8 Gy la FS se vio más afectada en la línea celular U87 con PC-Gd³⁺ que para las demás condiciones. Todos los resultados y análisis estadísticos se encuentran en la sección anexo al final del documento en el link compartido.

Aunque estadísticamente no se haya encontrado una diferencia significativa entre todas las condiciones evaluadas este resultado no cierra la posibilidad de que estos PC-Gd³⁺ puedan tener un efecto radiosensibilizador, pues hay muchos factores que pueden influir en el comportamiento de las células al estar expuestas PC-Gd³⁺ y al ser irradiadas, en especial, la línea celular U87 debido a su comportamiento característico de radioresistencia. Además, en el estudio *in vivo* e *in vitro* realizado por Du et al., con PC-Gd³⁺ al evaluar los resultados estadísticamente no se encuentran diferencias significativas entre las condiciones que ellos aplican, pero biológicamente se observó como las muestras con PC presentaban una menor FS, inhibiendo el crecimiento de colonias. En los resultados *in vivo* si se demostró una diferencia significativa entre la supervivencia de los ratones tratados con PC y los ratones tratados solamente con radioterapia, siendo mayor la supervivencia en los ratones con PC. Finalmente, Du et al., concluyen que los PC-Gd³⁺ si tienen efecto radiosensibilizador [41].

6.4. Daño en el material genético celular

Para evaluar el daño en el material genético, se realizó el ensayo de cometa, el cual se basa en que, al someter las células a un campo eléctrico, las hebras de ADN que han sufrido rupturas migrarán más rápido hacia el polo positivo que las hebras que están intactas. Formando una imagen semejante a un cometa, en donde el destello y largo de la cola del cometa es proporcional a la cantidad de ADN dañado. Este experimento se realizó tres veces para cada línea celular con tres réplicas para cada condición.

En la figura 9, se puede observar para las células irradiadas con 16 y 20 Gy para la línea celular U87 una imagen similar a un cometa para ambas condiciones con y sin PC. Evidenciando daño en el ADN celular después de ser expuestas a radioterapia. Entre mayor sea la cola y más

luminiscente, mayor es el daño causado. Es importante aclarar que los cometas presentados en la figura 9 fueron seleccionados intencionalmente para mostrar el comportamiento ideal esperado de cada una de las condiciones, pues no todos los cometas de células irradiadas a una misma dosis son iguales. Debido a esto, para poder analizar el daño en el material genético de una muestra se debe hacer un análisis cuantitativo midiendo el porcentaje de ADN en la cola de la mayoría de cometas posibles de una muestra, esto con el fin de obtener una representación asertiva del comportamiento de la muestra en general.

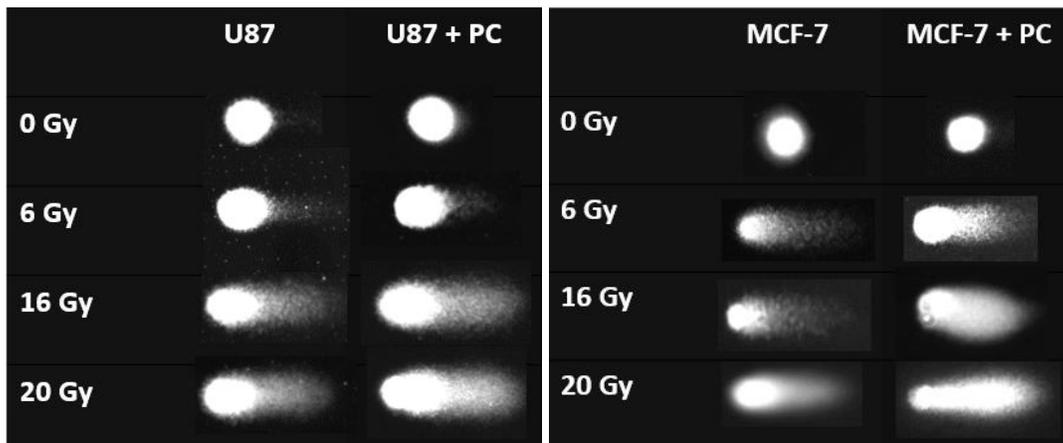


Figura 9. Imágenes de Cometas de las líneas celulares U87 y MCF-7 con y sin PC-Gd³⁺ después de ser expuestos a radiaciones de 0, 6, 16 y 20 Gy.

Para poder determinar el daño en el material genético causado por las radiaciones ionizantes y los PC-Gd³⁺ se calculó el porcentaje de ADN en la cola (%ADN), valor directamente proporcional al daño causado en el material genético. El cálculo del %ADN en la cola se realizó por medio del programa OpenComet®, un software de acceso libre diseñado por Gyori BM et al [58], que determina los parámetros de los cometas al proporcionarle las imágenes de estos, estas imágenes son tomadas con la función del microscopio de fluorescencia del equipo Lector Multimodal Cytation 3 (Bio Tek).

En la figura 9, al comparar los cometas de las condiciones de 6, 16 y 20 Gy con la muestra control de 0 Gy para ambas líneas celulares se puede hacer notoria la diferencia entre estos, pues para la muestra control (0 Gy) no se evidencia daño en el ADN, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad celular y de capacidad de proliferación.

En las figuras 10 y 11 se muestra el %ADN en la cola de los cometas en cada una de las condiciones evaluadas para las líneas celulares U87 y MCF-7 respectivamente. Para la línea celular U87 las células de las muestras irradiadas con 6, 10, 16 y 20 Gy en su mayoría tienen un %ADN en la cola mayor que las muestras sin PC, también presentan valores más extremos de %ADN en la cola mostrando un posible efecto radiosensibilizador en la línea celular U87. Sin embargo, aproximadamente el 50% de las células de las muestras irradiadas con 6 y 16 Gy para las condiciones con PC tienen un %ADN en la cola igual o menor al 20%, lo cual significa que este porcentaje de las células no sufrió gran daño en el ADN y la probabilidad de recuperación es mayor a menor daño causado. Por otra parte, al comparar estas condiciones entre las muestras con PC y las muestras sin PC, si se puede ver que algunas células alcanzaron mayor daño en el ADN celular.

Para comparar las diferentes condiciones estadísticamente se utilizó la prueba Wilcoxon, con la cual se encontró una diferencia significativa en la línea celular U87 para las condiciones con y sin PC irradiadas a 10 Gy (ver figura 10, condición 10 Gy*). Para las condiciones de 6, 16 y 20 Gy no se encontró diferencia significativa estadísticamente, para las dosis de 16 y 20 Gy esto se espera pues al ser dosis tan altas y utilizadas con el objetivo de destruir las células se espera un daño en el material genético muy alto independiente de la presencia de PC-Gd³⁺. Una posible explicación de los resultados obtenidos para la condición de 6 Gy puede ser debido al comportamiento radioresistente de esta línea celular y a los métodos que utilizan estas células para responder a las radiaciones, probablemente a dosis bajas de irradiación la respuesta celular es más rápida y efectiva para reparar los daños causados.

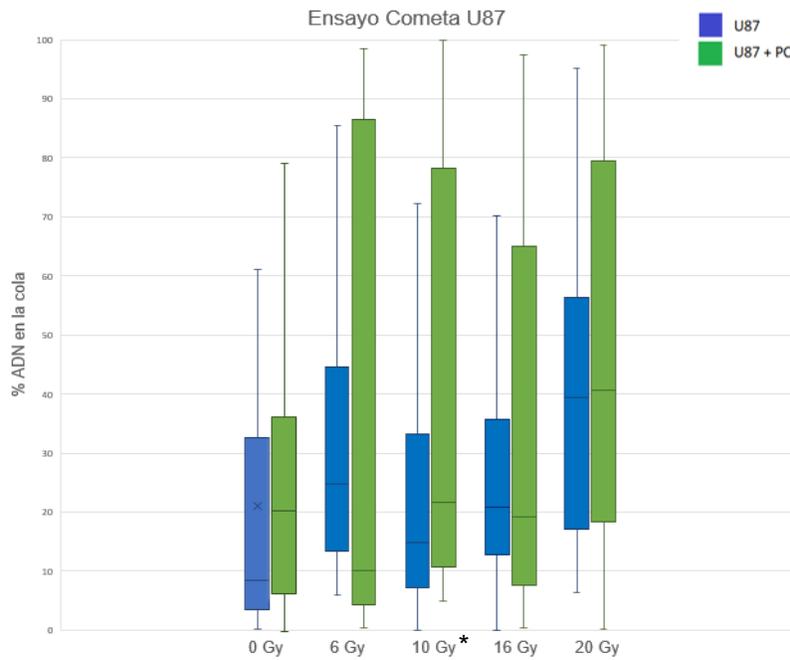


Figura 10. Ensayo de Cometa línea celular U87: Porcentaje de ADN en la cola en relación con la dosis de radiación para muestras con y sin PC-Gd³⁺. Para este experimento se realizaron tres replicas por condición y el experimento se realizó por triplicado.

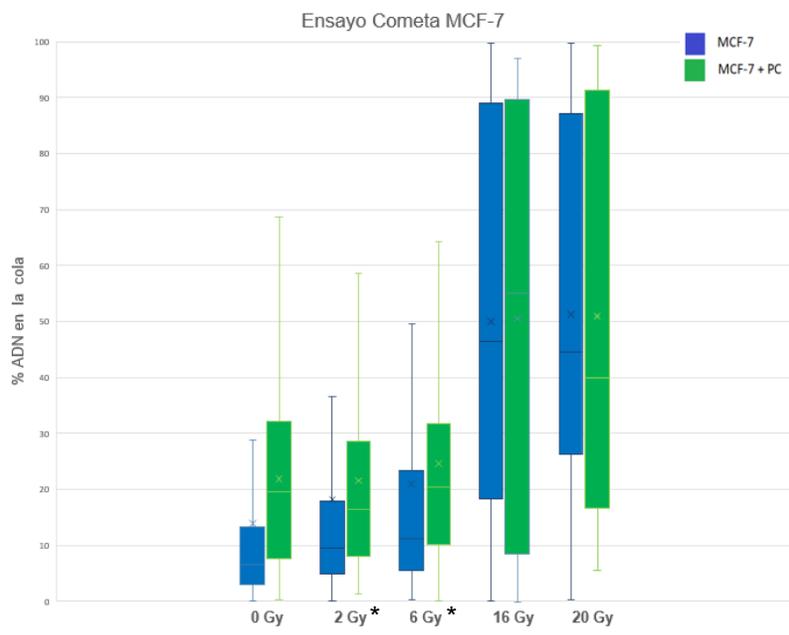


Figura 11. Ensayo de Cometa línea celular MCF-7: Porcentaje de ADN en la cola en relación con la dosis de radiación para muestras con y sin PC-Gd³⁺. Para este experimento se realizaron tres replicas por condición y el experimento se realizó por triplicado.

Por otra parte, al observar la figura 11, el comportamiento de la línea celular MCF-7 en presencia de PC-Gd³⁺ muestra que la mayoría de las células sufrieron un mayor daño en el ADN que las que no tienen PC. Para las muestras de 2 y 6 Gy se puede observar una tendencia en las células a tener mayor %ADN en la cola que las muestras sin PC. Para las muestras de 16 y 20 Gy con y sin PC-Gd³⁺ el comportamiento presenta una tendencia similar entre ambas condiciones lo cual se espera debido a la alta dosis de radiación que reciben ambas muestras independientemente de la presencia de PC-Gd³⁺.

Estadísticamente, para las muestras de 2 y 6 Gy se encontró una diferencia significativa entre las condiciones con y sin PC mostrando un efecto radiosensibilizador de los PC-Gd³⁺, el cual también se evidencia gráficamente en los resultados (ver figura 11, condiciones 2 Gy* y 6 Gy*). Para las muestras 16 y 20 Gy no se encontró una diferencia significativa para las condiciones con y sin PC, al igual que en la línea celular U87, concordando con lo mencionado anteriormente pues con estas dosis se espera un daño en el material genético muy alto independientemente de la presencia de PC-Gd³⁺.

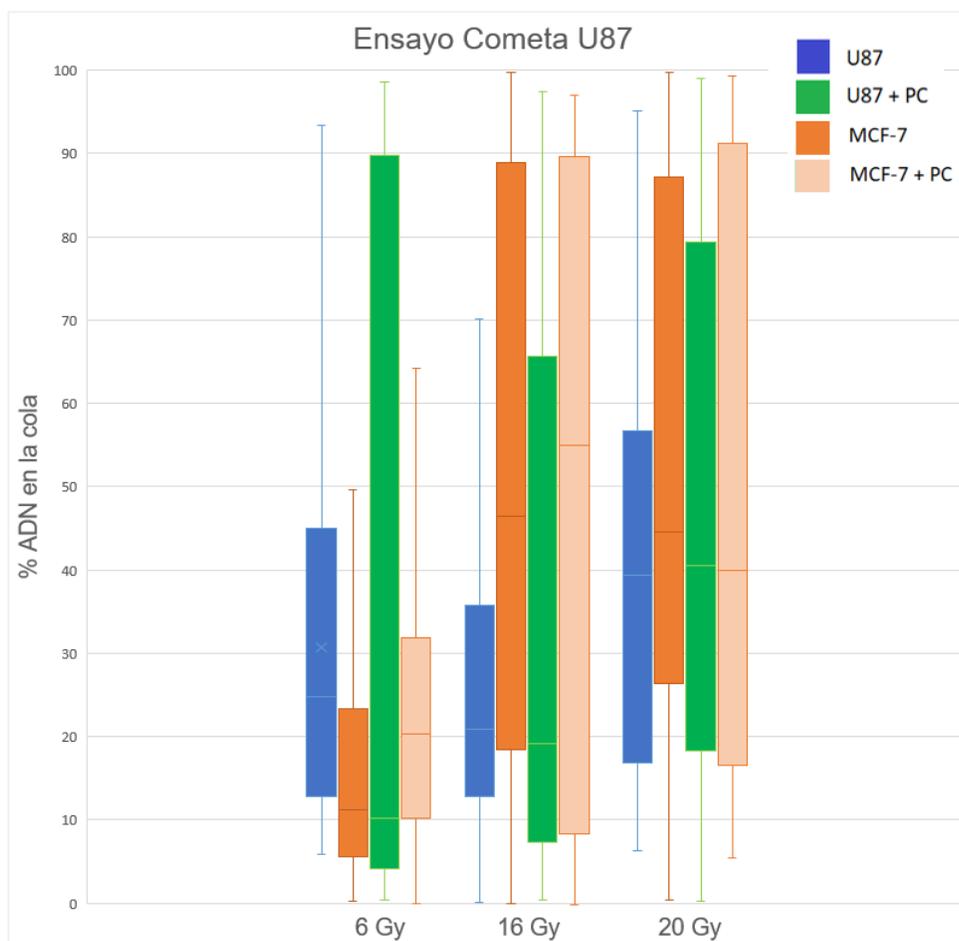


Figura 12. Ensayo de Cometa líneas celulares MCF-7 y U87: Porcentaje de ADN en la cola en relación con la dosis de radiación para muestras con y sin PC-Gd³⁺ para las muestras irradiadas con 6, 16 y 20 Gy.

Al comparar el %ADN en la cola de la línea celular U87 con la línea MCF-7 para las condiciones de 6, 16 y 20 Gy con la prueba estadística de Wilcoxon no se encontró una diferencia significativa entre ambas líneas celulares. Al observar la figura 12 se puede evidenciar que el %ADN en la cola es mayor para las muestras con PC que para las muestras sin PC en ambas condiciones. Sin embargo, con los resultados obtenidos no fue posible hacer estas comparaciones adecuadamente pues no se pudieron obtener todos los datos para todas las condiciones en ambas líneas celulares. Durante el desarrollo del experimento algunas muestras no quedaron con el número de células especificadas en el protocolo, limitando los resultados. Esto pudo ser causado por errores en el pipeteo, al mover las células de un recipiente a otro, errores de conteo celular o pérdida de las células en alguna fase de lavado o durante el proceso de electroforesis, en el cual se aplica voltaje a las células adheridas en agarosa por 30 minutos, y si esta no queda fijada adecuadamente a la lámina, las células se pueden despegar y perderse en el buffer de electroforesis.

Para trabajos futuros es importante garantizar que estos factores sean controlados con el fin de contar con todos los datos esperados para poder hacer un análisis más amplio del comportamiento de los PC-Gd³⁺ como agentes radiosensibilizadores.

7. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

A continuación, se presentan una serie de recomendaciones que permitirán mejorar el análisis de los resultados y del posible comportamiento radiosensibilizador de los PC-Gd³⁺, además también permitirá ampliar los conocimientos y los hallazgos con estos posibles agentes radiosensibilizadores.

Para el desarrollo de todos los experimentos posterior a la radiación sería útil trabajar con diferentes concentraciones de PC con el fin de evaluar el comportamiento y la respuesta de las células ante este tipo de variación. Con la implementación de diferentes concentraciones se podría conocer si hay algún cambio en la respuesta celular o si hay alguna concentración óptima que no cause estrés celular y que potencialice el efecto de la radioterapia.

Es de gran importancia garantizar que en trabajos futuros se pueda contar con todos los resultados para todas las condiciones evaluadas, pues esto garantiza más información y conocimiento del efecto de los PC-Gd³⁺ al ser expuestos a radioterapia. Además, cabe mencionar que a mayor número de réplicas del mismo experimento bajo las mismas condiciones mayor será el entendimiento que se tendrá sobre las células al ser sometidas a estas condiciones.

Para trabajos futuros, se podrían evaluar otros factores que permitan conocer los efectos de estos PC en las células, como por ejemplo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de diferentes vías de muerte celular y apoptosis, entre otros. Identificando más variables que se vean afectadas por la interacción de los PC y las radiaciones ionizantes se pueden desarrollar PC más enfocados en atacar esas variables, ya sean las más radioresistentes o las más sensibles a los efectos de la radioterapia.

Otra variable que se puede mejorar para trabajos futuros son los tiempos de espera a los cuales las células se deben someter desde la preparación de las muestras para ser irradiadas, el tiempo de espera para la radioterapia, los tiempos de traslado de un lugar al otro y de montaje experimental, pues todos estos periodos pueden causar estrés celular y afectar algunas muestras. Una recomendación para agilizar todos estos tiempos de espera es trabajar con más personas con el fin de agilizar la preparación de las muestras, los montajes experimentales y los traslados.

Encontrar un agente radiosensibilizador adecuado requiere de mucho estudio y mucha investigación, por lo cual, los trabajos futuros que se pueden llevar a cabo enfocados solamente en PC-Gd³⁺ como posible agente radiosensibilizados son innumerables, pues hay muchas variables conocidas por analizar y también, muchas variables por conocer en cuanto a la respuesta celular de la línea celular U87.

8. CONCLUSIONES

Los PC-Gd³⁺ sintetizados en el laboratorio demostraron un comportamiento estable, ya que se dispersaron adecuadamente en agua y en el medio celular y no se evidenció formación de agregados al ser almacenados a 4°C. También, durante la caracterización se demostró que al ser excitados con irradiación de luz UV emiten luz azul visible evidenciando propiedades ópticas características de los PC, y al evaluar los espectros de absorción se concluye que hay presencia de enlaces C=C y de enlaces C=O.

Al evaluar los efectos de toxicidad de los PC-Gd³⁺ se demostró que estos a concentraciones de 50, 250 y 500 µg/mL no afectan la viabilidad celular de las células, pues para todas las condiciones evaluadas experimentalmente la viabilidad es mayor o igual a 80%. Sin embargo, en la literatura se recomienda no utilizar concentraciones muy altas debido a que pueden causar saturación en el medio y generar estrés celular.

Posterior a la irradiación de las líneas celulares con los PC-Gd³⁺, en el experimento realizado para evaluar la capacidad de proliferación celular se puede concluir que a dosis bajas de irradiación los PC no mostraron un efecto radiosensibilizador pues la FS para las muestras con PC no mostró una disminución respecto a las muestras sin PC. Para las muestras irradiadas con dosis altas de 16 y 20 Gy tanto para la condición con PC como para la condición sin PC la FS fue de 0, pues estas dosis tienen como objetivo destruir las células cancerosas independiente de factores externos como por ejemplo el uso de PC.

Por otra parte, para las dosis de 4, 6 y 10 Gy para ambas líneas celulares y las dosis de 10 y 12 Gy para la línea MCF-7 se puede concluir un posible efecto radiosensibilizador al implementar los PC-Gd³⁺ ya que se observó una tendencia biológica en la disminución de la FS para las muestras con PC-Gd³⁺. Aunque estadísticamente no se haya demostrado una diferencia significativa entre la mayoría de las condiciones con y sin PC, esto no descarta la posibilidad de que los PC-Gd³⁺ generen un efecto radiosensibilizador, pues si se observa una tendencia biológica al comparar las muestras con y sin PC de cada línea celular y también, al analizar el comportamiento de la línea celular U87 con respecto a la línea celular MCF-7, la cual muestra una FS menor a mismas dosis de irradiación.

Con el ensayo de cometa, el cual se utilizó para determinar el daño en el material genético se encontró que para las condiciones irradiadas con 16 y 20 Gy no hubo una diferencia significativa en el %ADN entre las muestras con y sin PC-Gd³⁺ para ninguna de las líneas celulares pues a dosis tan altas se espera un daño en el material genético muy alto independiente de la presencia de agentes radiosensibilizadores.

Los PC-Gd³⁺ mostraron un efecto radiosensibilizador en la línea celular U87 al ser irradiada a 10 Gy, este efecto pudo ser corroborado estadísticamente con la prueba Wilcoxon demostrando una diferencia significativa entre ambas muestras. Este comportamiento radiosensibilizador también se evidenció en la línea celular MCF-7 al ser expuesta a irradiaciones de menor dosis de 2 Gy y 6 Gy, pues se observó una tendencia en estas muestras a presentar mayor %ADN en la cola y estadísticamente se demostró una diferencia significativa al implementar los PC-Gd³⁺.

Con el desarrollo de este proyecto se puede concluir que los PC-Gd³⁺ sintetizados presentan propiedades ópticas características de los PC; son estables pues se dispersan adecuadamente en agua y en el medio celular y no se evidenció formación de agregados durante su

almacenamiento. También, se puede concluir que los PC-Gd³⁺ son biocompatibles pues no afectan la integridad de las células.

Los PC-Gd³⁺ presentan un efecto radiosensibilizador en algunas condiciones específicas, y presentan una tendencia biológica a disminuir la proliferación celular y a aumentar el daño en el material genético de las células de la línea celular U87 y MCF-7 al ser expuestos a radiaciones ionizantes. Por lo cual, se puede concluir que estos PC-Gd³⁺ presentan un posible efecto radiosensibilizador. Sin embargo, para poder garantizar este comportamiento, se deben realizar múltiples estudios en los cuales se varíen las concentraciones, las líneas celulares, los métodos, entre otros con el fin de asegurar una correcta evaluación del comportamiento de estos.

9. REFERENCIAS

- [1] Instituto Nacional del Cáncer. "El cáncer". [Online]. Disponible en : <http://www.cancer.gov/espanol/cancer>
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012", *International Journal of Cancer*, vol. 136, nº 5, pp. E359–E386, 2014.
- [3] Attix F. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. Madison, Wisconsin: WILEY-VCH Vering GmbH & Co. KGaA, 1986.
- [4] S. Jayaraman y L. H. Lanzl, *Clinical Radiotherapy Physics*, 2ª ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004.
- [5] E. K. Noch, R. Ramakrishna y R. Magge, "Challenges in the treatment of glioblastoma: Multisystem mechanisms of therapeutic resistance.", *World Neurosurgery*, vol. 116, pp. 505–517, 2018.
- [6] Roger Stupp, M.D., Warren P. Mason, M.D., Martin J. van den Bent, M.D., Michael Weller, M.D., Barbara Fisher, M.D., Martin J.B. Taphoorn, M.D., Karl Belanger, M.D., Alba A. Brandes, M.D., Christine Marosi, M.D., Ulrich Bogdahn, M.D., Jürgen Curschmann, M.D., Robert C. Janzer, M.D., Samuel K. Ludwin, M.D., Thierry Gorlia, M.Sc., Anouk Allgeier, Ph.D., Denis Lacombe, M.D., J. Gregory Cairncross, M.D., Elizabeth Eisenhauer, M.D., and René O. Mirimanoff, M.D., "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma", *The New England Journal of medicine*, pp. 987–996, 2005.
- [7] W. Stummer *et al.*, "Prospective cohort study of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide chemotherapy for glioblastoma patients with no or minimal residual enhancing tumor load after surgery", *Journal of neuro-oncology*, pp. 89–97, 2012.
- [8] F. E. Bleeker, R. J. Molenaar y S. Leenstra, "Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma.", *Jornal Neuro-oncology*, pp. 11–27, enero de 2012.
- [9] "Glioblastoma (GBM) - American Brain Tumor Association | Learn More". American Brain Tumor Association. [Online]. Disponible en : https://www.abta.org/tumor_types/glioblastoma-gbm/
- [10] W. M. Pardridge, "Drug transport across the blood-brain barrier", *Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, pp. 1959–1972, noviembre de 2012.
- [11] P.-C. Lin, S. Lin, P. C. Wang y R. Sridhar, "Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials", *Biotechnology Advances*, vol. 32, pp. 711–726, 2014.
- [12] H. Matsudaira, A. M. Ueno y I. Furuno, "Iodine Contrast Medium Sensitizes Cultured Mammalian Cells to X Rays but Not to γ Rays", *Radiation Research*, pp. 144–148, octubre de 1980.
- [13] M. Leung, J. Chow, D. Chithrani, M. lee, B. Oms y D. Jaffray, "Irradiation of gold nanoparticles by x-rays: Monte Carlo simulation of dose enhancements and the spatial properties of the secondary electrons production", *American Association of Physicists in Medicine*, pp. 624–631, 2011.
- [14] G. Sonavane, K. Tomoda y K. Makino, "Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 66, pp. 274–280, octubre de 2008.

- [15] W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. A. M. Sips y R. E. Geertsma, "Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration", *Biomaterials*, vol. 29, pp. 1912–1919, abril de 2008.
- [16] R. Xu *et al.*, "Ag nanoparticles sensitize IR-induced killing of cancer cells", *Cell Research*, pp. 1031–1034, julio de 2009.
- [17] P. Huang *et al.*, "Protein-directed one-pot synthesis of Ag microspheres with good biocompatibility and enhancement of radiation effects on gastric cancer cells", *Nanoscale*, pp. 3623–3626, 2011.
- [18] J. Swanner *et al.*, "Differential cytotoxic and radiosensitizing effects of silver nanoparticles on triple-negative breast cancer and non-triple-negative breast cells", *International Journal of Nanomedicine*, pp. 3937–3953, junio de 2015.
- [19] Y. Liu, P. Zhang, F. Li, X. Jin y W. Chen, "Metal-based NanoEnhancers for future radiotherapy; radiosensitizing and synergistic effects on tumor cells", *Theranostics*, pp. 1824–1849, febrero de 2018.
- [20] Sancey L, Lux F, Kotb S, Roux S, Dufort S, Bianchi A, Crémillieux Y, Fries P, Coll J, Rodriguez-Lafrasse C, Janier M, Dutreix M, Barberi-Heyob M, Boschetti F, Denat F, Louis C, Porcel E, Lacombe S, Le Duc G, Deutsch E, Perfettini J, Detappe A, Verry C, Berbeco R, Butterworth KT, McMahon SJ, Prise KM, Perriat P, and Tillement., "The use of theranostic gadolinium-based nanoproboscopes to improve radiotherapy efficacy", *The British Institute of Radiology*, vol. 87, febrero de 2014.
- [21] F. Lux, L. Sancey, A. Bianchi, Y. Crémillieux, S. Roux y O. Tillement, "Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization.", *Nanomedicine*, vol. 10, n° 11, pp. 1801–1815, febrero de 2015.
- [22] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry y R. B. Lauffer, "Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications", *Chemical Reviews*, vol. 99, n° 9, pp. 2293–2352, 1999.
- [23] D. Francis, G. M. Richards, A. Forouzannia, M. P. Mehta y D. Khuntia, "Motexafin gadolinium: A novel radiosensitizer for brain tumors", *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, pp. 2171–2180, julio de 2009.
- [24] W. A. High, R. A. Ayers, J. Chandler, G. Zito y S. E. Cowper, "Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis", *Journal of the American Academy of Dermatology*, pp. 21–26, 2007.
- [25] H. Chen, G.D. Wang, W. Tang, T. Todd, Z. Zhen, C. Tsang, et al., "Gd-encapsulated carbonaceous dots with efficient renal clearance for magnetic resonance imaging", *Advanced materials*, vol. 26, n° 39, pp. 6761–6766, 2014.
- [26] X. Xu, R. Ray, Y. Gu, H.J. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker, et al., "Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, n° 40, pp. 12736–12737, septiembre de 2004.
- [27] S.N. Baker, G.A. Baker, "Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights", *Angewandte Chemie*, vol. 49, n° 38, pp. 6726–6744, 2010.
- [28] Y.P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K.A. Fernando, P. Pathak, et al., "Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence", *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, n° 24, pp. 7756–7757, 2006.

- [29] X. T. Zheng, et al., "Glowing graphene quantum dots and carbon dots: Properties, syntheses, and biological applications", *Nano-Micro Small*, vol. 11, n° 14, pp. 1620–1636, 2015.
- [30] M. J. Molaei, "A review on nanostructured carbon quantum dots and their applications in biotechnology", *Talanta*, vol. 196, pp. 456–478, mayo de 2019.
- [31] C. Ding, A. Zhu, Y. Tian, "Functional surface engineering of C-dots for fluorescent biosensing and in vivo bioimaging", *Accounts of Chemical Research*, vol. 47, n° 1, pp. 20–30, 2014.
- [32] C.I. Weng, H.T. Chang, C.H. Lin, Y.W. Shen, B. Unnikrishnan, Y.J. Li, et al., "One-step synthesis of biofunctional carbon quantum dots for bacterial labeling", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 68, n° 1, pp. 1–6, 2015.
- [33] X. Yang, Y. Zhuo, S. Zhu, Y. Luo, Y. Feng, Y. Dou, et al., "Novel and green synthesis of high-fluorescent carbon dots originated from honey for sensing and imaging", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 60, pp. 292–298, 2014.
- [34] Q.L. Wang, X.X. Huang, Y.J. Long, X.L. Wang, H.J. Zhang, R. Zhu, et al., "Hollow luminescent carbon dots for drug delivery", *Carbon*, vol. 59, pp. 192–199, Agosto de 2013.
- [35] C. Liu, P. Zhang, X. Zhai, F. Tian, W. Li, J. Yang, et al., "Nano-carrier for gene delivery and bioimaging based on carbon dots with PEI-passivation enhanced fluorescence", *Biomaterials*, vol. 33, n° 13, pp. 3604–3613, mayo de 2012.
- [36] J. Ge, M. Lan, B. Zhou, W. Liu, L. Guo, H. Wang, et al., "A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation", *Nature Communications*, vol. 5, Agosto de 2014, art. n° 4596.
- [37] Castaneda, S. A., & Strasser, J. (2017). "Updates in the treatment of breast cancer with radiotherapy.", *Surgical Oncology Clinics of North America*, vol. 26, n° 3, pp. 371–382, 2017.
- [38] Mowat P, Mignot A, Rima W, Lux F, Tillement O, Roulin C, et al. "In vitro radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium-based particles on tumour cells", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 11, n° 9, pp. 7833–7839, septiembre de 2011.
- [39] Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Bräuer-Krisch E, Bouchet A, et al. "Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles", *ACS nano*, vol. 5, n° 12, pp. 9566–9574, 2011.
- [40] Subiel A, Ashmore R, Schettino G. "Standards and methodologies for characterizing radiobiological impact of high-Z nanoparticles", *Theranostics*, vol. 6, n° 10, pp. 1651–1671, 2016.
- [41] Du F, Zhang L, Zhang L, Zhang M, Gong A, Tan Y, Miao J, Gong Y, Sun M, Ju H, Wu C, Zou S, "Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors", *Biomaterials*, vol. 121, pp. 109–120, marzo de 2017.
- [42] Falk M. "Nanodiamonds and nanoparticles as tumor cell radiosensitizers-promising results but an obscure mechanism of action", *Annals of Translational Medicine*, vol. 5, n° 1, p. 18, 2017.
- [43] American Brain Tumor Association (2012). *Glioblastoma y astrocitoma maligno* [Online]. Disponible en: <https://www.abta.org/wp-content/uploads/2018/03/glioblastoma-y-astrocitoma-maligno.pdf>
- [44] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, P. Kleihues. "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System", *Acta Neuropathol*, vol. 114,

pp. 97–109, 2007. [En línea]. Disponible: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00401-007-0243-4.pdf>

- [45] C. Krakstad, M. Chekenya. "Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastomas: Opportunities for targeted therapeutics.", *Molecular Cancer*, vol. 9, junio de 2010, art. n° 135. [En línea]. Disponible: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/1476-4598-9-135.pdf>
- [46] Torrisi, L. "Radiotherapy Improvements by Using Au Nanoparticles", *Recent Patents on Nanotechnology*, vol. 9, n° 2, pp. 114–125, 2015.
- [47] Dawidczyk CM, Russell LM, Searson PC. "Nanomedicines for cancer therapy: State-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments", *Frontiers in Chemistry*, vol. 25, n° 2, p. 69, 2014.
- [48] Yan Liu et al. "Metal-based nanoenhancers for future radiotherapy: Radiosensitizing and synergistic effects on tumor cells", *Theranostics*, vol. 8, n° 7, pp. 1824–1849, 2018.
- [49] Seo S-J, Han S-M, Cho J-H, Hyodo K, Zaboronok A, You H, et al. "Enhanced production of reactive oxygen species by gadolinium oxide nanoparticles under core-inner-shell excitation by proton or monochromatic X-ray irradiation: Implication of the contribution from the interatomic de-excitation-mediated nanoradiator effect to dose enhancement", *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 54, n° 4, pp. 423–431, 2015.
- [50] Rima W, Sancey L, Aloy M-T, Armandy E, Alcantara GB, Epicier T, et al. "Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles", *Biomaterials*, vol. 34, n° 1, pp. 181–195, enero de 2013.
- [51] Mignot A, Truillet C, Lux F, Sancey L, Louis C, Denat F, et al. "A Top-Down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-Based silica nanoparticles for theranostic applications", *Chemistry*, vol. 19, n° 19, pp. 6122–6136, 2013.
- [52] Dewi N, Yanagie H, Zhu H, Demachi K, Shinohara A, Yokoyama K, et al. "Tumor growth suppression by gadolinium-neutron capture therapy using gadolinium-entrapped liposome as gadolinium delivery agent.", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 67, n° 6, pp. 451–457, 2013.
- [53] Abdallah NM, Noaman E, Eltahawy NA, Badawi AM, Kandil E, Mansour N, et al. "Anticancer and radiosensitization efficacy of nanocomposite withania somnifera extract in mice bearing tumor cells", *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 17, n° 9, pp. 4367–4375, septiembre de 2016.
- [54] P. Kumar, A. Nagarajan y P. D. Uchil, "Analysis of cell viability by the MTT assay", *Cold Spring Harbor Protocols*, n° 6, 2018.
- [55] H. Rafehi, C. Orłowski, G. Georgiadis, K. Ververis, A. El-Osta, T. Karagianis. "Clonogenic assay: Adherent cells", *Journal of Visualized Experiments*, vol. 49, p. 2573, 2011.
- [56] "OxiSelect™ 96-Well Comet Assay Kit". Cell Biolabs, Inc. [Online]. Disponible en : <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-355-comet-assay-kit.pdf>
- [57] M. Liu, "Optical Properties of Carbon Dots: A review", *Universal Wiser Publisher*, vol. 1, n° 1, 2020.
- [58] BM Gyori, G Venkatachalam, PS Thiagarajan, D Hsu and MV Clement. "OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis", *Redox Biology*, pp. 457–465, 2014.

- [59] Quintero Mejía, Paulo. Estudio in vitro de la supervivencia en células tumorales irradiadas con un acelerador lineal de uso clínico. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Facultad de Ciencias Departamento de Física. 2012.
- [60] Hunter, R. J., Zeta potential, In: Colloid Science: Principles and Applications, (Academic Press, UK, 1988).
- [61] J. B. Mayoral, A. C. Moreno, and E. San Martín-Martínez, "Potencial zeta en la determinación de la carga superficial de liposomas I. INTRODUCCIÓN," *Am. J. Phys. Educ*, vol 8. No. 4, 2014, [Online].
- [62] Pyykkö, P. Magically magnetic gadolinium. *Nature Chem* 7, 680 (2015). <https://doi.org/10.1038/nchem.2287>
- [63] Liu Y, Liu X, Jin X, He P, Zheng X, Dai Z, et al. The dependence of radiation enhancement effect on the concentration of gold nanoparticles exposed to low-and high-LET radiations. *Phys Medica*. 2015; 31: 210-8.
- [64] Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol*. 2004; 49: N309-N315.
- [65] Dou Y, Guo Y, Li X, Li X, Wang S, Wang L, et al. Size-tuning ionization to optimize gold nanoparticles for simultaneous enhanced CT imaging and radiotherapy. *ACS Nano*. 2016; 10: 2536-48.
- [66] Ma N, Wu F-G, Zhang X, Jiang Y-W, Jia H-R, Wang H-Y, et al. Shape-Dependent Radiosensitization Effect of Gold Nanostructures in Cancer Radiotherapy: Comparison of Gold Nanoparticles.
- [67] Her S, Jaffray DA, Allen C. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017 Jan 15; 109: 84-101. doi: 10.1016/j.addr.2015.12.012. Epub 2015 Dec 19. PMID: 26712711.
- [68] Liu Y, Chen W, Zhang P, Jin X, Liu X, Li P, et al. Dynamically-enhanced retention of gold nanoclusters in HeLa cells following X-rays exposure: A cell cycle phase-dependent targeting approach. *Radiother Oncol*. 2016; 119: 544-51.
- [69] Huang P, Yang D-P, Zhang C, Lin J, He M, Bao L, et al. Protein-directed one-pot synthesis of Ag microspheres with good biocompatibility and enhancement of radiation effects on gastric cancer cells. *Nanoscale*. 2011; 3: 3623-6.
- [70] Lu R, Yang D, Cui D, Wang Z, Guo L. Egg white-mediated green synthesis of silver nanoparticles with excellent biocompatibility and enhanced radiation effects on cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 2101-7
- [71] Liu P, Huang Z, Chen Z, Xu R, Wu H, Zang F, et al. Silver nanoparticles: a novel radiation sensitizer for glioma? *Nanoscale*. 2013; 5: 11829-36.
- [72] Porcel E, Liehn S, Remita H, Usami N, Kobayashi K, Furusawa Y, et al. Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology*. 2010; 21:085103.
- [73] Porcel E, Kobayashi K, Usami N, Remita H, Le Sech C, Lacombe S. Photosensitization of plasmid-DNA loaded with platinum nano-particles and irradiated by low energy X-rays. *J Phys Conf Ser*. 2011; 261: 012004.

- [74] Porcel E, Li S, Usami N, Remita H, Furusawa Y, Kobayashi K, et al. Nano-Sensitization under gamma rays and fast ion radiation. *J Phys Conf Ser.* 2012; 373: 012006.
- [75] Schlathölder T, Eustache P, Porcel E, Salado D, Stefancikova L, Tillement O, et al. Improving proton therapy by metal-containing nanoparticles: nanoscale insights. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 1549-56.
- [76] Jawaid P, Rehman MU, Yoshihisa Y, Li P, Zhao QL, Hassan MA, et al. Effects of SOD/catalase mimetic platinum nanoparticles on radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis.* 2014; 19: 1006-16.
- [77] Jawaid P, Rehman MU, Zhao QL, Takeda K, Ishikawa K, Hori M, et al. Helium-based cold atmospheric plasma-induced reactive oxygen species-mediated apoptotic pathway attenuated by platinum nanoparticles. *J Cell Mol Med.* 2016; 20: 1737-48.
- [78] Johannsen M, Thiesen B, Gneveckow U, Taymoorian K, Waldöfner N, Scholz R, et al. Thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external radiation in an orthotopic rat model of prostate cancer. *Prostate.* 2006; 66:97-104.
- [79] Kleinauskas A, Kim J-K, Choi G-H, Kim H-T, Røe K, Juzenas P. Superparamagnetic magnetite nanoparticles for cancer theranostics. *Reviews in Nanoscience and Nanotechnology.* 2012; 1: 271-83.
- [80] Khoei S, Mahdavi SR, Fakhimikabir H, Shakeri-Zadeh A, Hashemian A. The role of iron oxide nanoparticles in the radiosensitization of human prostate carcinoma cell line DU145 at megavoltage radiation energies. *Int J Radiat Biol.* 2014; 90: 351-6.
- [81] Mazur CM, Tate JA, Strawbridge RR, Gladstone DJ, Hoopes PJ. Iron oxide nanoparticle enhancement of radiation cytotoxicity. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 2013; 8584: 85840J.
- [82] Tian J, Chen J, Ge C, Liu X, He J, Ni P, et al. Synthesis of PEGylated ferrocene nanoconjugates as the radiosensitizer of cancer cells. *Bioconjugate Chem.* 2016; 27: 1518-24.
- [83] Di Corato R, Béalle G, Kolosnjaj-Tabi J, Espinosa A, Clément O, Silva AKA, et al. Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes. *ACS Nano.* 2015; 9: 2904-16.
- [84] Espinosa A, Di Corato R, Kolosnjaj-Tabi J, Flaud P, Pellegrino T, Wilhelm C. Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *ACS Nano.* 2016; 10: 2436-46.
- [85] Cazares-Cortes E, Espinosa A, Guigner JM, Michel A, Griffete N, Wilhelm C, et al. Doxorubicin Intracellular Remote Release from Biocompatible Oligo(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylate-Based Magnetic Nanogels Triggered by Magnetic Hyperthermia. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017; 9:25775-88.
- [86] Revia RA, Zhang M. Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances. *Mater Today.* 2016; 19: 157-68.
- [87] Sancey L, Kotb S, Truillet C, Appaix F, Marais A, Thomas E, et al. Long-term in vivo clearance of gadolinium-based AGulX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano.* 2015; 9: 2477-88.
- [88] Kotb S, Piraquive J, Lambertson F, Lux F, Verset M, Di Cataldo V, et al. Safety Evaluation and Imaging Properties of Gadolinium-Based Nanoparticles in nonhuman primates. *Sci Rep.* 2016; 6: 35053.

- [89] He X, Luo Q, Zhang J, Chen P, Wang HJ, Luo K, Yu XQ. Gadolinium-doped carbon dots as nano-theranostic agents for MR/FL diagnosis and gene delivery. *Nanoscale*. 2019 Jul 21;11(27):12973-12982. doi: 10.1039/c9nr03988k. Epub 2019 Jul 2. PMID: 31263818.
- [90] Li Y, Li B, Wang X, Meng Y, Bai L, Zheng Y. Safe and efficient magnetic resonance imaging of acute myocardial infarction with gadolinium-doped carbon dots. *Nanomedicine (Lond)*. 2020 Oct;15(24):2385-2398. doi: 10.2217/nnm-2020-0160. Epub 2020 Sep 11. PMID: 32914700.
- [91] Du F, Zhang L, Zhang L, Zhang M, Gong A, Tan Y, Miao J, Gong Y, Sun M, Ju H, Wu C, Zou S. Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors. *Biomaterials*. 2017 Mar; 121: 109-120. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.008. Epub 2016 Aug 2. PMID: 28086179.
- [92] Ma X, Lee C, Zhang T, Cai J, Wang H, Jiang F, Wu Z, Xie J, Jiang G, Li Z. Image-guided selection of Gd@C-dots as sensitizers to improve radiotherapy of non-small cell lung cancer. *J Nanobiotechnology*. 2021 Sep 22;19(1):284. doi: 10.1186/s12951-021-01018-9. Erratum in: *J Nanobiotechnology*. 2022 Jan 3;20(1):1. PMID: 34551763; PMCID: PMC8456633.
- [93] Memorial Sloan Kettering Cancer Center. "Informacion sobre la radioterapia ablativa". [Online]. Disponible en: <https://www.mskcc.org/es/cancer-care/patient-education/about-ablative-radiation-therapy-liver-and-pancreatic>
- [94] Frosina G. Radiotherapy of High-Grade Gliomas: First Half of 2021 Update with Special Reference to Radiosensitization Studies. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 19;22(16):8942. doi: 10.3390/ijms22168942. PMID: 34445646; PMCID: PMC8396323.
- [95] Carr C.M., Benson J.C., DeLone D.R., Diehn F.E., Kim D.K., Merrell K.W., Nagelschneider A.A., Madhavan A.A., Johnson D.R. Intracranial Long-Term Complications of Radiation Therapy: An Image-Based Review. *Neuroradiology*. 2021;63:471–482. doi: 10.1007/s00234-020-02621-7.

ANEXO

https://drive.google.com/drive/folders/1WIMs_4ORfMz3ZbSxH9qwa-K2YU9MLuT2?usp=share_link