

Comparación del potencial radiosensibilizante de nanoplateformas basadas en puntos de carbono pasivadas con iones de alto número atómico para el tratamiento de cáncer

Valentina Leguizamón Gutiérrez

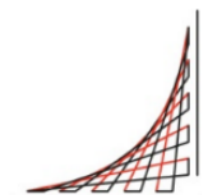
Trabajo Dirigido

Tutores

**Alejandro Oyono Ondo Méndez, PhD
Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD**



**Universidad del
Rosario**



**ESCUELA
COLOMBIANA
DE INGENIERÍA
JULIO GARAVITO**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2023**

Agradecimientos

A mi madre, Yuly Patricia Gutiérrez, por ser mi fuente inagotable de motivación y fuerza. Sus palabras de aliento "tú siempre puedes", que me han acompañado desde que tengo memoria, han sido mi inspiración para levantarme cuando las cosas no salían como esperaba. Gracias por ayudarme a construir este sueño desde el día 0 y por ser mi mayor motivación.

A Santi por su apoyo y escucha constante. Su disposición para trasnochar conmigo y su apoyo incondicional han sido un verdadero tesoro. Cada vez que me preguntaba "¿Cómo vas, hermana?", sentía su genuino interés en mi progreso. Sus consejos y su perspectiva fresca han sido muy valiosos en este camino. Gracias, Santi, por estar ahí para mí.

A Superpa, Ricardo Rodríguez, por su apoyo incondicional. Desde el momento en que elegí este camino lleno de emociones encontradas y la primera reunión de padres en la universidad, hasta cada vez que regresaba emocionada del laboratorio en altas horas de la noche. Gracias por siempre estar ahí para nosotros.

A mis abuelos, Tía Zamira, Adolfo, Salo y Mate por estar siempre a mi lado, brindándome su cariño incondicional, motivándome a dar lo mejor de mí y compartiendo conmigo la alegría de cada logro. Este logro es también de ustedes, porque cada paso que he dado ha sido enriquecido por el amor y la confianza que me han brindado.

A Carlos por contagiarme su inmensa pasión por la investigación y motivarme a realizar este trabajo dirigido. Le agradezco por enseñarme todo lo que necesitaba para iniciar mi camino en el laboratorio, y por ser mi editor, apoyo, colega, confidente, equipo y complemento. Siempre estuvo ahí para revisar mis ideas, escuchar mis preocupaciones y para compartir sus propios sueños y metas. Gracias a su presencia constante, me sentí respaldada y motivada a alcanzar mis objetivos. Has sido una parte fundamental en el logro de este trabajo dirigido y en mi crecimiento no solo como investigadora sino también como persona.

Agradezco a mis tutores, Alejandro Oyono Ondo Méndez y Diana Consuelo Rodríguez Burbano, por su dedicación y compromiso. Es gracias a su apoyo, guía y sabiduría compartida que he podido enfrentar los desafíos y superar obstáculos en este emocionante viaje académico. Cada aporte y enseñanza recibida ha sido un cimiento sólido que me ha permitido crecer como investigadora y como persona.

También quiero agradecer sinceramente a Gabriela, Samuel, Lina, Harold, Hanna, Juan y Sonia, por estar siempre dispuestos a compartir conocimientos, resolver dudas y trabajar en cada desafío que se nos presentaba. Juntos hemos superado obstáculos y celebrado logros, y cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en mi vida. No podría haber llegado a este punto sin su colaboración y apoyo constante. Esta tesis no solo representa mi esfuerzo individual, sino también el resultado del trabajo en equipo y la sinergia que hemos creado juntos.

Índice general

Agradecimientos	I
1. Introducción	1
2. Objetivo de la investigación	3
2.1. Pregunta de investigación	3
2.2. Objetivos	3
2.2.1. General	3
2.2.2. Específicos	3
3. Estado del arte	4
3.1. Radioterapia	4
3.2. Puntos de carbono	6
4. Metodología	8
4.1. Síntesis de puntos de carbono (PC)	8
4.1.1. Síntesis de puntos de carbono dopados con gadolinio PC:Gd ³⁺	10
4.1.2. Síntesis de puntos de carbono dopados con gadolinio y codopados con iterbio PC:Gd ³⁺ /Yb ³⁺	10
4.2. Caracterización de los puntos de carbono	11
4.2.1. Espectroscopía UV-Vis	11
4.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	12
4.3. Evaluación del cambio en la supervivencia celular y determinación del daño en el ADN	12
4.3.1. Evaluación del cambio en la supervivencia celular	13
4.3.2. Ensayo Cometa	14
5. Resultados y discusión	18
5.1. Caracterización de los puntos de carbono	18
5.1.1. Espectro de absorción	18
5.1.2. Espectros de emisión	19
5.1.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	20
5.2. Evaluación del cambio en la supervivencia celular	20
5.3. Determinación del daño en el ADN	23
6. Conclusiones	27
7. Recomendaciones y trabajos futuros	28

Capítulo 1

Introducción

El cáncer es una enfermedad metabólica compleja que afecta a millones de personas en todo el mundo debido al crecimiento y propagación descontrolada de células anormales en el cuerpo [1]. Uno de los mayores desafíos en su tratamiento es el hecho de que puede originarse en distintos tejidos a partir de mutaciones genéticas y procesos biológicos, lo que genera una amplia variedad de tipos de cáncer cada uno con características únicas. Sin embargo, los investigadores han avanzado significativamente en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares subyacentes al cáncer. Gracias a esto, se han desarrollado nuevas terapias dirigidas y enfoques de medicina personalizada, lo que ofrece nuevas esperanzas en la lucha contra esta enfermedad [2].

Entre las nuevas terapias dirigidas y enfoques de medicina personalizada que se han desarrollado para el tratamiento del cáncer, la nanotecnología surge como un campo prometedor, ya que utiliza materiales y dispositivos a escala nanométrica para llevar a cabo funciones específicas en el cuerpo. En el contexto de la radioterapia, se ha investigado y desarrollado un enfoque utilizando nanopartículas como agentes radiosensibilizadores para mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer [3]. La estrategia se basa en la incorporación de elementos químicos de alto número atómico en una estructura nanométrica. Al exponer estas nanopartículas a la radiación, se produce un aumento en la absorción de rayos X en los tejidos tumorales, lo que genera una mayor liberación de electrones de baja energía. Estos electrones, a su vez, generan una mayor cantidad de radicales libres capaces de causar daños en el ADN de las células tumorales [4].

A diferencia de otros enfoques que utilizan nanomateriales de metales pesados, que pueden tener limitaciones debido a su potencial de dañar los tejidos sanos al tener contacto directo, los puntos de carbono (PC) se han destacado como una plataforma terapéutica prometedora. Estas nanopartículas tienen la ventaja de ofrecer una buena biocompatibilidad, baja toxicidad y la capacidad de acumularse selectivamente en el tejido tumoral después de su administración sistémica [5]. Además, tienen la capacidad de ser funcionalizados con metales pesados, lo que permite potenciar las propiedades beneficiosas de ambos. En la literatura se ha informado que la pasivación de los puntos de carbono (PC) con gadolinio (Gd^{3+}) ha demostrado mejorar su capacidad como radiosensibilizadores en la radioterapia del cáncer de mama [6]. Sin embargo, se requiere más investigación para determinar la eficacia y seguridad de estos agentes, así como para abordar los posibles efectos secundarios y la toxicidad potencial de las nanopartículas. Por lo tanto, en el marco de los convenios de la Agencia Universitaria de la Francofonía (AUF), que involucra a la Universidad del Rosario, Concordia University (Canadá) y Université Côte d'Azur (Francia), con financiamiento de la Agencia Universitaria de la Francofonía (AUF), el objetivo de este trabajo es evaluar y comparar el potencial de radiosensibilización en cultivos tumorales utilizando tres tipos de puntos de carbono: puntos de carbono sin dopaje (PC), puntos de carbono dopados con gadolinio (PC: Gd^{3+}) y puntos de carbono co-dopados con gadolinio e iterbio (PC: Gd^{3+}/Yb^{3+}).

La contribución de este trabajo dirigido será significativa en el campo de la ciencia de materiales y la aplicación de la nanotecnología en la investigación biomédica. A través de la caracterización y evaluación de nanoplataformas dopadas con iones lantánidos, se espera generar nuevos conocimientos sobre su capacidad para mejorar la eficacia de la radioterapia en el tratamiento del cáncer.

Además, se busca acercar la estrategia del uso de nanoplataformas como agentes teranósticos a la implementación de ensayos clínicos, lo que podría tener un impacto importante en la práctica médica y en la lucha contra el cáncer. Los resultados de esta investigación se publicarán en un artículo científico, con el objetivo de fomentar nuevos proyectos que permitan optimizar la respuesta a las terapias actuales y futuras para el tratamiento del cáncer.

Capítulo 2

Objetivo de la investigación

2.1. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto del dopaje con iones lantánidos de alto peso molecular en la capacidad de los puntos de carbono para actuar como radiosensibilizantes en el tratamiento del cáncer mediante radioterapia?

2.2. Objetivos

2.2.1. General

Comparar el potencial efecto radiosensibilizante de tres modelos distintos de puntos de carbono (PC, PC:Gd³⁺, y PC:Gd³⁺/Yb³⁺), con el objetivo de evaluar su posible aplicación en el tratamiento del cáncer.

2.2.2. Específicos

- Caracterizar las propiedades físicas y químicas de tres tipos de puntos de carbono; sin dopaje y pasivados con iones de alto peso molecular (PC, PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺/Yb³⁺), con el fin de obtener información detallada sobre sus propiedades ópticas, químicas y características superficiales.
- Evaluar el cambio en la supervivencia celular en la línea U87 y en cultivos primarios de glioblastoma G200 antes y después de la irradiación, utilizando ensayos *in vitro*.
- Cuantificar el daño en el ADN utilizando modelos *in vitro* en líneas celulares y cultivos primarios.

Capítulo 3

Estado del arte

El cáncer es un conjunto de enfermedades genéticas causadas por mutaciones que afectan la regulación del crecimiento y la diferenciación celular [7]. Estas mutaciones son capaces de activar genes oncogénicos o inactivar genes encargados de la supresión de tumores, lo que conduce a la formación de células anormales que crecen y se dividen de manera descontrolada [8]. Estas células anormales logran evadir los mecanismos de control del crecimiento celular, resistir a la apoptosis (muerte celular programada) y pueden diseminarse a otros tejidos y órganos a través del sistema circulatorio o linfático, lo que se conoce como metástasis [1].

El cáncer representa una problemática crítica en salud pública debido a su impacto humano y económico. Las tasas de mortalidad han aumentado en todo el mundo, principalmente por la falta de opciones terapéuticas efectivas para muchos tipos de cáncer y la detección tardía [7]. Según el informe de 2020 del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC), en 2020 se estimaron 19.3 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, y se espera que esta cifra aumente a 28.4 millones en 2040. Además, se estima que hubo 10 millones de muertes por cáncer en 2020, y se espera que esta cifra aumente a 16.4 millones en 2040 [9].

En el contexto específico de Colombia, el cáncer es la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). En 2020, se estimaron 113.221 nuevos casos de cáncer en el país, con 54.987 muertes relacionadas con esta enfermedad [10]. Estas cifras reflejan la magnitud del desafío que enfrenta el país en la lucha contra el cáncer y resaltan la necesidad de la obtención y desarrollo de conocimientos y herramientas científicas y médicas que mejoren la efectividad de los tratamientos actuales.

3.1. Radioterapia

La radioterapia es una de las opciones terapéuticas más destacadas en la lucha contra el cáncer. Más del 50 % de los pacientes con cáncer reciben radioterapia, lo que la convierte en uno de los métodos más utilizados en el tratamiento del cáncer [11]. Este tratamiento actúa mediante la administración de una dosis efectiva de radiación ionizante en el tejido tumoral para destruir las células cancerosas y puede ser utilizado en combinación con otros tratamientos, como la cirugía o la quimioterapia [12]. Su mecanismo de acción reside en la interacción entre las radiaciones ionizantes y los tejidos, generando emisiones secundarias de partículas cargadas.

La dosis de radiación en la radioterapia depende del tipo, tamaño y ubicación del tumor. En la radioterapia convencional, las dosis típicas oscilan entre 1.8 a 2.0 Grays (Gy) por fracción, administradas en múltiples sesiones para tratar diferentes tipos de cáncer [13]. Cada fracción es una sesión

de tratamiento que se administra en un día específico. La dosis total de radiación recibida durante el tratamiento puede variar entre 30 a 70 Gy [14]

La investigación actual busca mejorar la eficacia del tratamiento mediante el aumento de las dosis focalizadas. La radioterapia focalizada de alta dosis ha sido objeto de estudio, donde dosis de 6 a 10 Gy por fracción se aplican de manera más selectiva y precisa. En este sentido, técnicas estereotáxicas como la Radioterapia X-Knife y el CyberKnife han demostrado ser eficaces, permitiendo administrar dosis de hasta 30 Gy (X-Knife) y hasta 60 Gy por fracción (CyberKnife) de manera no fraccionada, sin requerir múltiples sesiones [15]. Estos avances buscan mejorar la precisión y efectividad del tratamiento, brindando opciones más personalizadas para los pacientes que enfrentan el cáncer.

En general en la radioterapia, se espera deteriorar el ADN de las células cancerosas mediante dos vías: en primer lugar, por ruptura de la doble cadena y, en segundo lugar, por daño indirecto a causa de los radicales procedentes de la radiólisis del agua a nivel celular [16] [17]. Como resultado, las células cancerosas cuyo ADN está dañado sin posibilidad de reparación dejan de dividirse y mueren. Esta destrucción celular causada por la radiación depende de la transferencia lineal de energía (LET), la dosis total, la tasa de fraccionamiento y la radiosensibilidad de las células o tejidos objetivo [18] [17].

Aunque la radioterapia es un tratamiento eficaz contra el cáncer, presenta limitaciones que pueden afectar la salud del paciente. Por un lado, al no ser un tratamiento selectivo, la radiación que se dirige a destruir las células tumorales también causa que los tejidos normales no cancerosos que rodean al tumor también puedan sufrir algún grado de daño en su ADN, causando efectos secundarios indeseados [11]. Asimismo, existe un límite en la cantidad de radiación que se puede administrar sin causar daño irreversible a los tejidos sanos [19]. Adicionalmente, una parte de esta radiación suministrada puede escapar de las células y no ser depositada en el tumor, reduciendo su efectividad en la destrucción de este.

Otra dificultad importante de la radioterapia es la resistencia del cáncer a la radiación. Esto ocurre debido a la mutación de las células cancerosas o a la localización del tumor en una zona de difícil acceso. Por tanto, es necesario desarrollar estrategias como el uso de radiosensibilizadores que logren mejorar la eficacia del tratamiento aumentando la dosis de radiación localizada en el tumor, evitando el tejido sano adyacente y aprovechando la energía depositada, lo que representa uno de los principales desafíos de la radioterapia para maximizar su eficacia y minimizar los efectos secundarios en el paciente.

Los radiosensibilizadores pueden clasificarse en tres categorías en función de sus estructuras: moléculas pequeñas, macromoléculas y nanomateriales. Los últimos, surgen como una alternativa de gran interés y su eficacia radica en que al introducir elementos químicos de alto número atómico en una estructura de tamaño nanométrico, y exponerlos a la radiación, dichas estructuras son capaces de reemitir radiación secundaria para que efectivizar la dosis de radiación recibida por el paciente [3]. Este suceso se puede explicar mediante el efecto fotoeléctrico, que implica la absorción de un fotón por un electrón y la producción de electrones del átomo [20], y el coeficiente de absorción de rayos X (μ). Este coeficiente representa la relación entre la energía de rayos X incidente (E) y el número atómico (Z) de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\rho Z^4}{AE^3} \quad (3.1)$$

donde ρ y A corresponden a la densidad y la masa atómica de los materiales, respectivamente. De modo que el cambio en el número atómico provoca un cambio significativo en el coeficiente de absorción de rayos X (μ) [5], y postula a las nanoestructuras con alto número atómico como materiales radiosensibilizantes ideales para mejorar la radioterapia tradicional, ya que son capaces de aumentar la absorción de rayos X en los tejidos locales y liberar eficazmente electrones de baja energía para generar más radicales libres, y la energía (depositada eficazmente por los radicales libres y los electrones) puede

causar daños en el ADN [4].

Al exponer las células cancerosas a los nanomateriales funcionalizados con metales pesados antes de la radiación, estas se concentran en la célula cancerosa y aumentan la captación de radiación. La radiación que normalmente escapa de la célula ahora (Figura 3.1 a.) impacta la nanopartícula, generando una reemisión que promueve el daño indirecto al impactar en forma de electrones libres a las moléculas de agua circundantes, generando radiólisis que afecta por la vía indirecta al ADN. Además, las nanopartículas también pueden promover el daño directo, aumentando así la eficacia de la radiación y reduciendo la dosis necesaria para eliminar el tumor (Figura 3.1 b). Basados en lo anterior, numerosos estudios se han enfocado en los nanomateriales de metales pesados para investigar su potencial de radiosensibilización. Sin embargo, un limitante es que suelen causar daños en los tejidos sanos con el contacto directo.

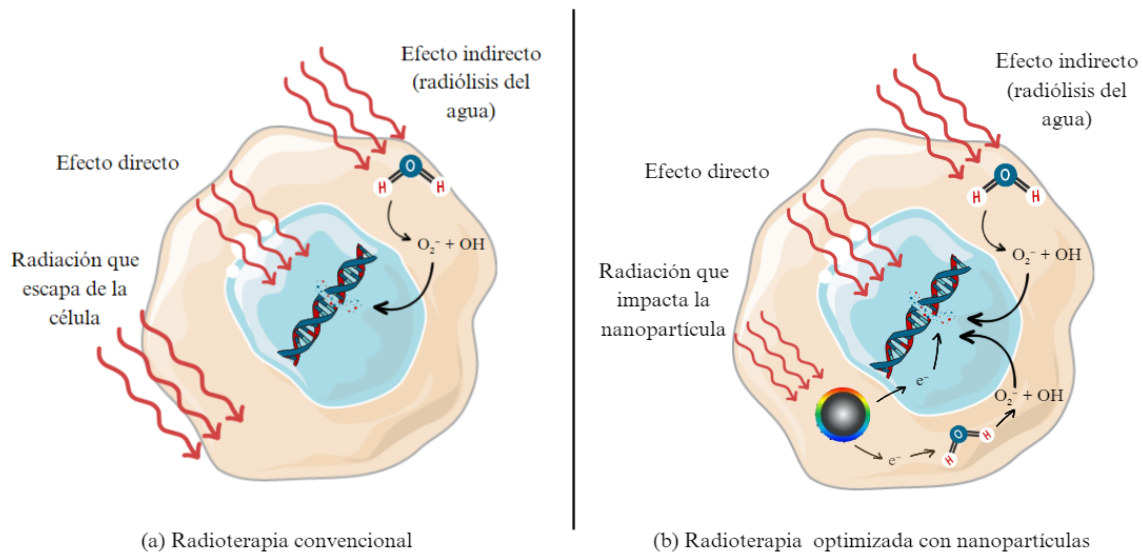


Figura 3.1: a) Mecanismo de acción y efecto de la radioterapia convencional. b) Mecanismo de acción y efecto de la radioterapia optimizada con nanopartículas

3.2. Puntos de carbono

Los puntos de carbono (PC) son nanopartículas compuestas por átomos de carbono con un tamaño inferior a 10 nanómetros, que se caracterizan por su gran área superficial y se postulan como una alternativa prometedora ante las dificultades que enfrentan los radiosensibilizadores [21]. Los PC pueden presentar composiciones estructurales diferentes, dependiendo de sus precursores, solventes y métodos de síntesis, lo que a su vez puede afectar propiedades como su fotoluminiscencia [22]. Adicionalmente, se ha informado que es posible mejorar sus propiedades físicas y ópticas propias mediante la pasivación de su superficie, lo que puede tener un impacto significativo en su desempeño en diversas aplicaciones como la bioimagen, y liberación controlada de fármacos [23].

En este contexto, se ha demostrado que los puntos de carbono pasivados con iones de alto número atómico pueden potenciar el efecto fotoeléctrico, el coeficiente de absorción de rayos X (μ) y el efecto Compton, lo que a su vez intensifica las subsiguientes emisiones de electrones secundarios y especies reactivas de oxígeno (ROS), y de esta manera, mejorar los efectos de la radioterapia convencional

[24]. El efecto Compton hace referencia a la variación de la frecuencia y longitud de onda de un fotón después de interactuar con un electrón libre. El efecto se debe a la colisión entre el fotón y el electrón, que provoca que el electrón sea expulsado de su átomo. La frecuencia del fotón después de la colisión será menor que la frecuencia antes de la colisión, y la longitud de onda del fotón después de la colisión será mayor que la longitud de onda antes de la colisión. La cantidad de energía que pierde el fotón es igual a la energía cinética del electrón expulsado.

Estudios recientes han descrito el uso de nanopartículas basadas en iones lantánidos como el gadolinio (Gd^{3+}), que han demostrado una gran capacidad para actuar como agentes de contraste en resonancia magnética [5] y aumentar el daño celular y la dosis localizada en el tumor, lo que se asocia con una mayor eficacia terapéutica [25] [26]. De igual manera, se ha demostrado que el ion gadolinio (Gd^{3+}) puede ser utilizado en tratamientos contra el cáncer y que también puede combinarse con otras tierras raras, como el iterbio (Yb^{3+}). Zhao, Y., et al., llevaron a cabo un estudio donde encontraron que una nanoplataforma basada en puntos de carbono dopada con Yb y Gd, sintetizada a través de la ruta solvotérmica a $200^{\circ}C$ durante 10 horas, demostró una alta absorción de rayos X y tuvo un efecto positivo en el contraste de imágenes médicas [27] [28]. Lo anterior se debe a que, las nanopartículas también pueden reemitir la energía absorbida en forma de fotones cuando los electrones en su estructura se excitan a niveles de energía más altos y luego regresan a su estado de energía original, lo que resulta de gran utilidad para la detección y visualización de células cancerosas durante el tratamiento. Además, encontraron que esta nanoplataforma mostró una excelente biocompatibilidad, lo que la hace prometedora para su uso en aplicaciones médicas, especialmente en la mejora del diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Capítulo 4

Metodología

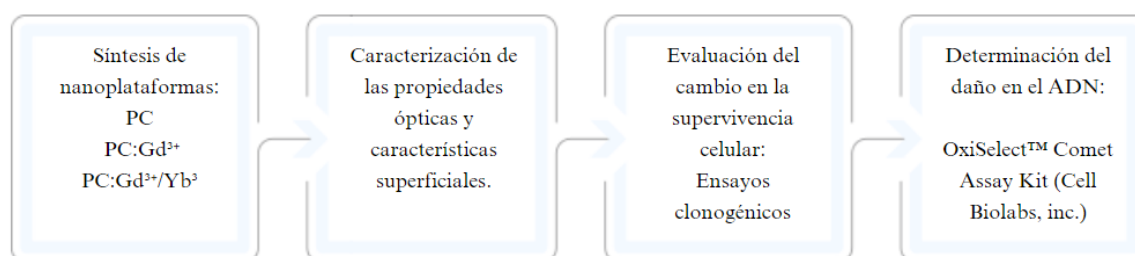


Figura 4.1: Diagrama de flujo para la metodología propuesta

La Figura 4.1 ilustra el diagrama de flujo que se utilizará para llevar a cabo las cuatro etapas principales en este trabajo dirigido. La primera etapa consiste en la síntesis de las nanoplateformas, seguida de la caracterización de sus propiedades ópticas y superficiales. La tercera etapa implica la evaluación del cambio en la supervivencia celular, mientras que la cuarta etapa tiene como objetivo la determinación del daño en el ADN.

4.1. Síntesis de puntos de carbono (PC)

El protocolo de síntesis de puntos de carbono (PC) se basa en la investigación realizada durante el desarrollo del proyecto: Nanotecnología aplicada a la sensibilización tumoral, llevado a cabo por los investigadores del Semillero de Investigación en Bioquímica, Cáncer y Radiobiología (SiBio) y el Semillero de Investigación en Biomateriales para Aplicaciones Biomédicas (SyNERGIA).

Las nanopartículas se sintetizan mediante el método de reacción por microondas (Anton Paar, Microwave 50). La síntesis por microondas es un método de síntesis química en la que los precursores se exponen a radiación electromagnética de alta frecuencia. Esto causa una agitación en las moléculas y una fricción entre ellas, lo que resulta en una ruptura de los enlaces químicos y la formación de nuevas especies. Estas condiciones de alta temperatura y presión favorecen la reacción química entre los precursores, lo que resulta en la formación de la nanopartícula deseada.

En la síntesis se utilizaron 1.2 g de úrea (Sigma Aldrich, 99,5%), 0.6 g de ácido cítrico monohidratado (Scharlau) y 6mL de dimetilformamida como solvente. La Figura 4.2 presenta la estructura molecular de los precursores utilizados en la síntesis, lo que resulta fundamental para comprender y

caracterizar las nuevas especies formadas en este proceso. El conocimiento de la estructura molecular de los precursores permite identificar las posibles reacciones químicas y los productos de las mismas, lo que a su vez permite controlar y optimizar la síntesis de los nanomateriales. Además, esta información es útil para la interpretación de los resultados obtenidos en las distintas técnicas de caracterización, como la espectroscopía FTIR.

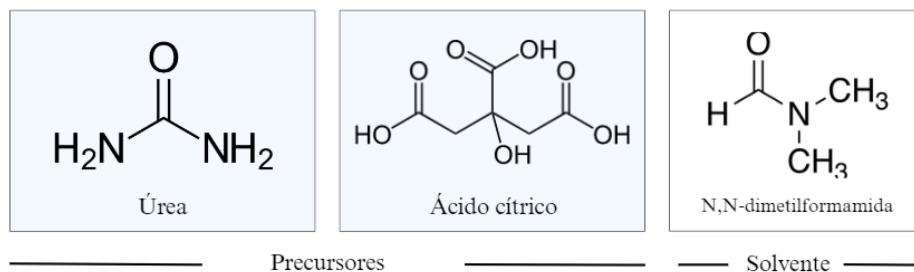


Figura 4.2: Estructura molecular de los precursores utilizados en la síntesis los puntos de carbono (PC)

Las figuras 4.4 y 4.3 evidencian las etapas de preparación de los reactivos, la reacción por microondas y la purificación del resultado de la síntesis. En la etapa de reacción es necesario realizar un adecuado pesaje de los reactivos y solventes (Figura 4.4,a), los cuales se mezclan y homogeneizan por medio de sonicación y agitación vortex (Figura 4.4,b).

Posteriormente, se realiza la reacción por microondas de 3ml de la mezcla durante 10 minutos a una temperatura de 200 °C en la configuración As Fast as Possible (AFAP) (Figura 4.4,c), garantizando un calentamiento homogéneo. El resultado se purifica mediante centrifugación, filtrado de sobrenadante (0.2 μL) y el uso de membranas de diálisis por 24 horas en una plancha de agitación con cambio de agua cada 12 horas (Figura 4.4,d).

Luego, se realiza un primer secado de la mezcla filtrada en una caja de petri en el horno por 12 horas a 98 °C (Figura 4.4,e). La siguiente etapa es una purificación complementaria mediante 2 lavados con etanol absoluto al 99% en relación 1.5:1 (volumen de muestra : volumen de etanol) y dos con acetona en relación 1.5:1 (volumen de muestra : volumen de acetona) (Figura 4.4,f). Finalmente, se introduce la muestra en el horno a 100 °C (Figura 4.4,g).

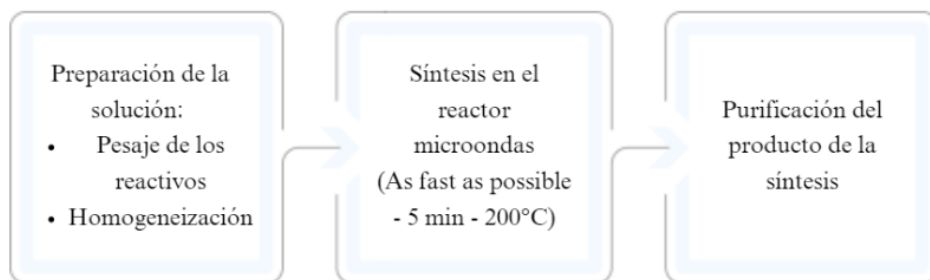


Figura 4.3: Diagrama de flujo. Síntesis de puntos de carbono, reacción asistida por microondas

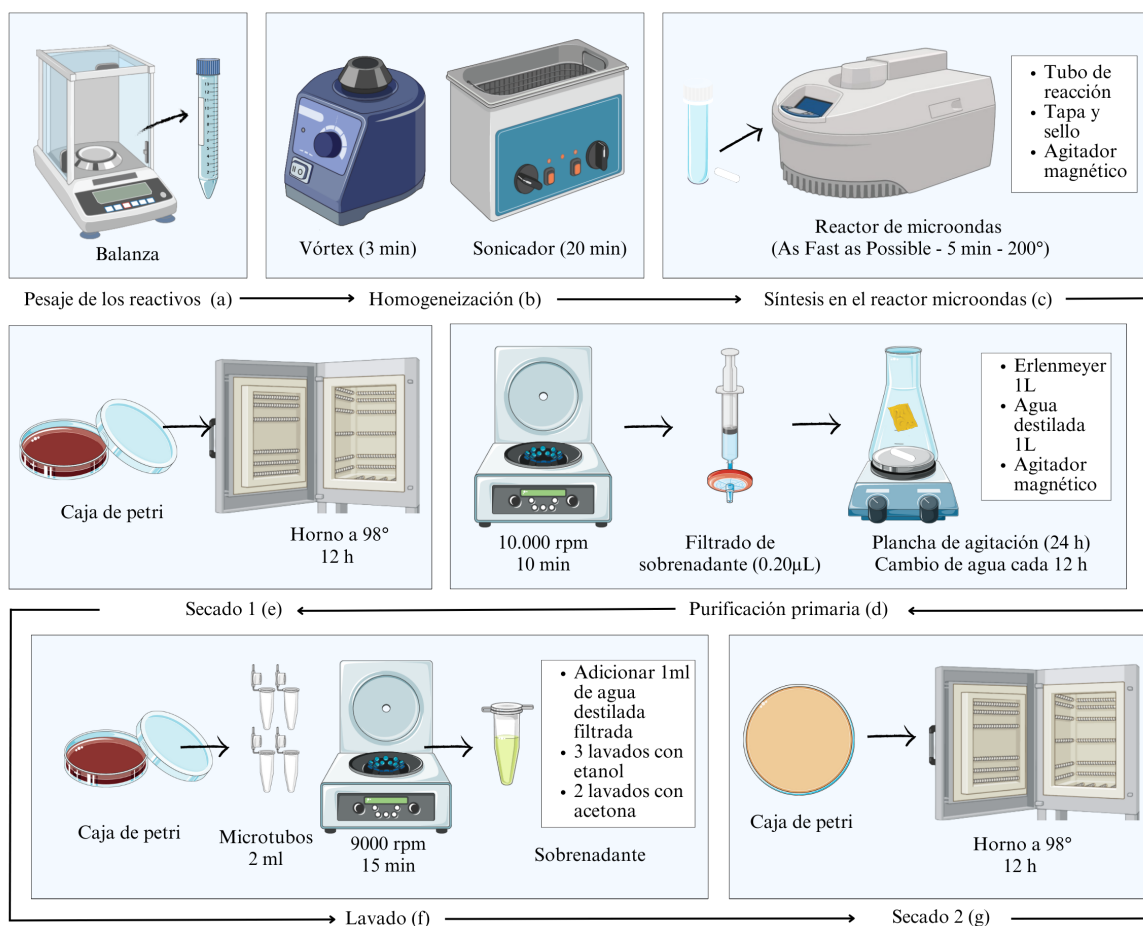


Figura 4.4: Síntesis de puntos de carbono, reacción asistida por microondas

4.1.1. Síntesis de puntos de carbono dopados con gadolinio PC:Gd³⁺

Para la síntesis de puntos de carbono dopados con gadolinio PC:Gd³⁺, se llevará a cabo un dopaje con gadolinio (Gd³⁺) en el protocolo de síntesis presentado en la sección anterior 4.1. El dopaje con gadolinio se realizará durante el proceso de síntesis utilizando el método de síntesis asistido por microondas. En particular, se añadirá una cantidad correspondiente a 0.09g de reactivo de gadolinio al sistema de reacción durante la síntesis, se reducirá la cantidad de dimetilformamida a 5.5 mL y se añadirán 0.5 mL de agua destilada.

El dopaje con gadolinio tiene como objetivo introducir átomos de gadolinio en la estructura cristalina del material sintetizado. Esto implica la sustitución de algunos átomos de la estructura del material original con átomos de gadolinio, lo que puede conducir a cambios en las propiedades físicas y químicas del material, como su capacidad de absorción de radiación.

4.1.2. Síntesis de puntos de carbono dopados con gadolinio y codopados con iterbio PC:Gd³⁺/Yb³⁺

Para la funcionalización de los puntos de carbono, se realizará una modificación al protocolo de síntesis previamente presentado, mediante la implementación del codopaje de gadolinio e iterbio. Este

proceso de codopaje se llevará a cabo durante la síntesis utilizando un sistema de microondas. En esta etapa, se añadirán 0.09 g de gadolinio e 0.09 g de iterbio como reactivos, siguiendo el mismo procedimiento establecido en la síntesis original. Se reducirá la cantidad de dimetilformamida a 5.5 mL y se añadirán 0.5 mL de agua destilada.

El codopaje de gadolinio e iterbio podría resultar en una mayor eficacia terapéutica en aplicaciones de radioterapia. Lo anterior ya que, a nivel químico, el dopaje de gadolinio e iterbio puede influir en la estructura y las propiedades del material, como la estabilidad y la biodistribución.

4.2. Caracterización de los puntos de carbono

En la Figura 4.5 se muestra un diagrama de flujo que se siguió para realizar las caracterizaciones en la Universidad del Rosario, específicamente en el Laboratorio de Bioquímica en el área de proteínas, para el caso de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, y en el Laboratorio de Bioinstrumentación para los espectros de absorción y emisión. Las concentraciones utilizadas para los espectros de absorción y emisión fueron de $0.05 \mu\text{g} / \text{ml}$ para cada tipo de puntos de carbono (PC).

Asimismo, en el análisis de espectroscopia infrarroja se utilizó una muestra seca de 0.2 mg de cada tipo de punto de carbono. Todos los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, asegurando condiciones controladas y reproducibles para obtener resultados precisos y confiables.

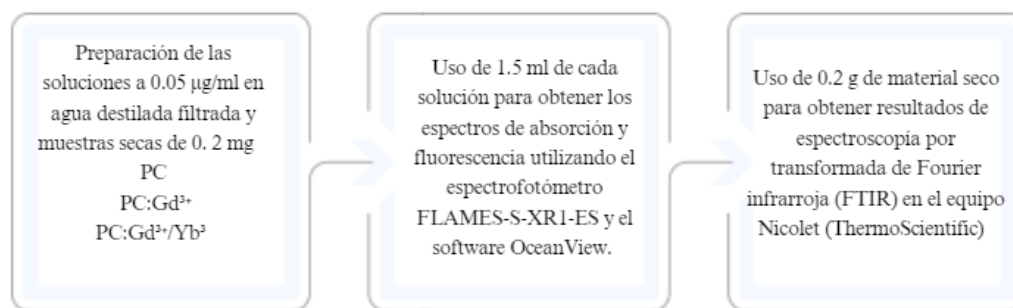


Figura 4.5: Diagrama de flujo. Caracterización de puntos de carbono

4.2.1. Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis es una técnica analítica que utiliza la luz ultravioleta y visible para identificar y cuantificar sustancias. La luz es absorbida por las moléculas de la sustancia, y la cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de la sustancia. Se utiliza para determinar las propiedades ópticas de los puntos de carbono, lo que permite obtener información sobre su huella óptica. Esto se logra a través de la medición de los espectros de absorción y fluorescencia utilizando el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES y el software OceanView.

Para realizar las mediciones se deben preparar soluciones de $0.05 \text{ mg}/\text{ml}$ en agua destilada de cada tipo de punto de carbono. Para la medición de fluorescencia, se transfieren $300 \mu / \text{L}$ a un triplicado de pozos por cada muestra y se realiza la medición bajo una excitación de 365 nm y un rango de emisión de 400 nm a 900 nm empleando el lector multimodal Cytation (Biotek). En el espectro de absorción, se realiza la medición de 2 ml de muestra en la celda de cuarzo utilizando el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES para el rango de 400 a 700 nm .

4.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía por transformada de Fourier infrarroja (FTIR) es una técnica analítica que se utiliza para identificar los grupos funcionales presentes en una muestra y para determinar su estructura química mediante el proceso matemático de Transformada de Fourier. En esta técnica, el equipo Nicolet (ThermoScientific) hace pasar radiación infrarroja a través de la muestra y registra la cantidad de radiación absorbida en función de la longitud de onda mediante el software OMNIC.

En la caracterización de puntos de carbono, la espectroscopía FTIR es útil para medir las propiedades superficiales de las nanoplataformas, ya que permite identificar los grupos funcionales que están presentes en la superficie de las partículas. Estos grupos pueden provenir tanto de la síntesis de los puntos de carbono como de las moléculas que se adsorben sobre su superficie. Por ejemplo, la presencia de bandas características de los grupos de carboxilato y amina en el espectro FTIR de las nanoplataformas puede indicar la formación de complejos entre los precursores y los iones metálicos.

4.3. Evaluación del cambio en la supervivencia celular y determinación del daño en el ADN

Tanto para el ensayo de cometa como los ensayos clonogénicos, se utiliza el mismo protocolo de irradiación que se muestra en las figuras 4.6 4.7 4.8. Los experimentos biológicos se llevaron a cabo utilizando cultivos tumorales de glioblastoma U87 y G200, así como HT29, un cultivo tumoral de adenocarcinoma de colon humano. La inclusión de HT29 como control se realizó con el fin de observar y comparar el comportamiento diferencial entre los diferentes cultivos tumorales.

Este protocolo se divide en tres días. En el primero, se realiza el sembrado celular y se revisa la confluencia del cultivo base (4.6 a). Luego, se realiza la succión del medio y el lavado con PBS (4.6 b). Las células se incuban durante 5 minutos con la enzima accutase (4.6 c), y se realiza el conteo celular usando el equipo Corning Cell counter (4.6 d). Se deben sembrar entre 200.000 y 500.000 células en una caja de Petri, y esto se incuba durante 24 horas (4.6 e).

En el día 2, se realiza el tratamiento de las células con las nanoplataformas. Se prepara la solución de cada una a partir del medio y una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Se preparan 4 cajas: una de control sin puntos de carbono, una con PC, otra con PC:Gd³⁺ y la última con PC:Gd³⁺/Yb³⁺ (4.7), las cuales se incuban durante las siguientes 24 horas.

En el día 3, se lleva a cabo la irradiación de las células. Se realiza el lavado con la enzima, como en el día 1, se incuba y se realiza el conteo celular mediante el equipo Corning Cell counter. Se preparan 8 tubos por línea celular, 2 por cada condición, una sin irradiación y la otra irradiada con 6 Gy. En cada tubo se deben colocar 100.000 células dispersas en 5 mL de medio. Todos los tubos se llevan al centro de control de cáncer donde se irradian los 4 tubos de 6 Gy.

Después de la irradiación, se siembran las células en una caja de 6 pozos, como se muestra en la figura 4.8, y se procede a la incubación. El ensayo se realiza por triplicado y el número de células depende de la eficiencia de la formación de colonias de cada línea celular, esta se ajusta a un número que permita el posterior conteo de las colonias. Para el caso de las líneas U87 y el cultivo primario G200 se sembraron 200 células de las condiciones no irradiadas y 1200 para las condiciones irradiadas. A partir de las células que no fueron sembradas, se inicia el protocolo del ensayo de cometa.

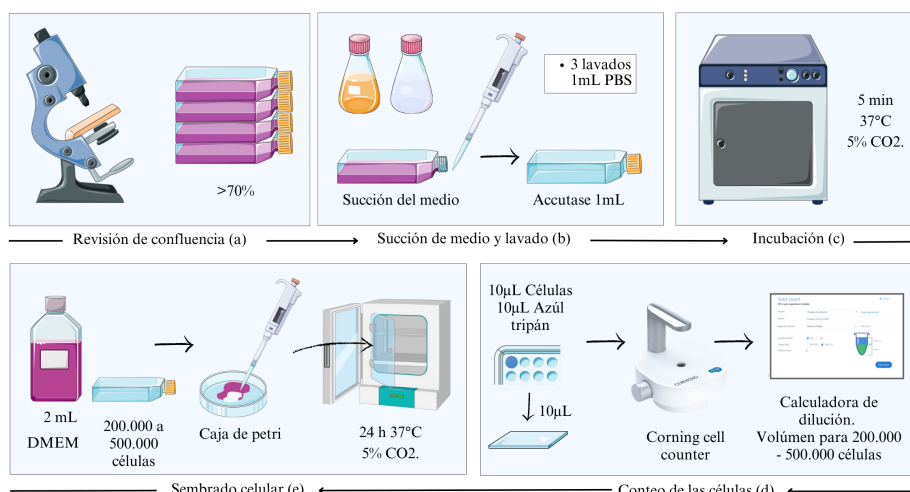


Figura 4.6: Día 1. Protocolo de irradiación

4.3.1. Evaluación del cambio en la supervivencia celular

Los ensayos clonogénicos son una técnica ampliamente utilizada en la investigación y evaluación de la supervivencia celular después de la irradiación. Este ensayo tiene como objetivo detectar y evaluar la capacidad de las células para producir un alto número de progenie a partir de una única célula.

En este tipo de ensayo, los mecanismos clave que se ponen en juego son la pérdida de integridad reproductiva y la inhabilidad para proliferar de manera indefinida. Cuando las células son expuestas a una noxa, como la irradiación, algunas células pueden seguir viviendo y replicándose durante una o dos generaciones antes de detener sus divisiones y volverse reproductivamente inactivas.

Sin embargo, en contraste, existen células denominadas clonogénicas que conservan su capacidad para dividirse y proliferar, y estas células tienen el potencial de formar colonias. Para considerar una célula como clonogénica, debe poder generar al menos 50 células clonales en una colonia, derivadas de una única célula. Esto implica que la célula tuvo al menos 5-6 generaciones de replications sucesivas.

En este ensayo, como se menciona en el día 3 del protocolo de irradiación, las células se tratan con dosis de radiación 0 Gy y 6 Gy y luego se siembran en placas de cultivo. El número de colonias formadas después del periodo de 14 días de incubación a 37°C se utiliza como una medida de la supervivencia celular después de la irradiación.

Conteo de colonias

Al finalizar los 14 días las células se deben teñir y fijar. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo y se llevaron a cabo tres lavados con 2 ml de PBS 1x para eliminar cualquier residuo. A continuación, se procedió a la adición de 2 ml de formaldehído al 8% en PBS 1x y se dejó la muestra a temperatura ambiente durante 30 minutos para la fijación. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada para eliminar el formaldehído residual.

Luego, se añadió 1 ml de cristal violeta y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Durante este período, el cristal violeta permitió la tinción de las células y la visualización de las mismas. Finalmente, se recuperó el colorante utilizado y se llevó a cabo un lavado abundante con agua para eliminar cualquier exceso de tinte y asegurar una correcta visualización de las colonias para su conteo.

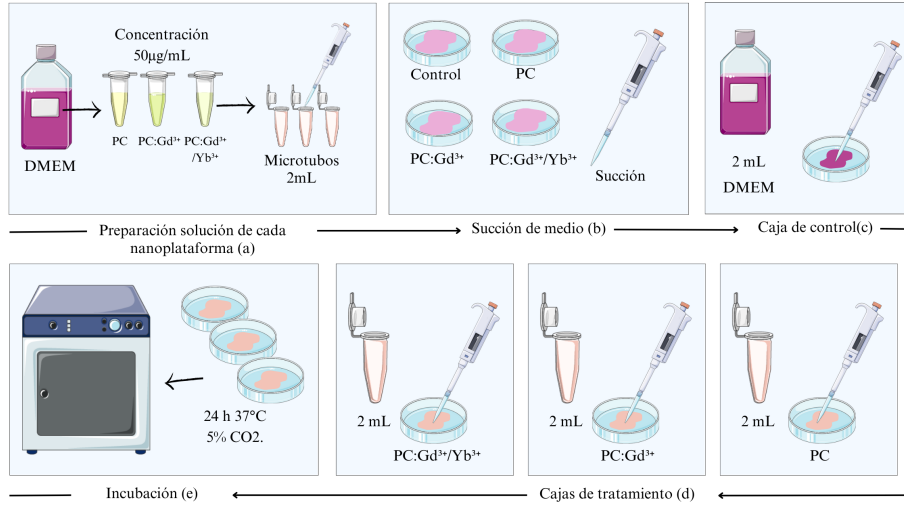


Figura 4.7: Día 2. Protocolo de irradiación

El conteo del número de colonias se realizó de forma manual. Se marcó punto a punto las zonas que a criterio propio corresponden a las colonias teñidas de la caja de cultivo de 6 pozos y se registraron los resultados.

Para la construcción del diagrama de barras para el análisis de la supervivencia celular, se considera la eficiencia de sembrado (ES) definida como el porcentaje dado por el número de colonias compuestas de por lo menos 50 células en relación con el número de células sembradas

$$ES = \frac{C}{M} \quad (4.1)$$

donde C corresponde al número de colonias y M el número de células sembradas por pozo. Posteriormente, se determina la fracción de supervivencia (FS) definida como la relación de eficiencia de sembrado para una dosis determinada en relación con la dosis de control (Células no tratadas, 0 Gy).

$$FS = \frac{ES(d)}{ES(0)} \quad (4.2)$$

donde ES(d) corresponde a la eficiencia de sembrado tras la dosis de 6 Gy Y ES(0) a la eficiencia de sembrado del control, que corresponde al promedio de colonias de las células de control a 0 Gy.

La información es analizada con el software GraphPad Prism.

4.3.2. Ensayo Cometa

El ensayo de cometas es una técnica que se utiliza para evaluar el efecto de diferentes tratamientos en la integridad del ADN de las células. Para llevar a cabo el ensayo de cometas se utilizó el kit Oxiselect™ Comet Assay [29]. Como preparación del ensayo, se derritió agarosa al baño María en una plancha a una temperatura de 150 a 200°C. Se prepararon soluciones de agua destilada, PBS 1X y etanol, las cuales se enfriaron adecuadamente. Se prepararon las soluciones de buffer de lisis y buffer de electroforesis. Se marcaron los microtubos y las láminas, y se diseñó el experimento. A continuación, se colocaron 100 µL de agarosa en los microtubos correspondientes y se mantuvieron en un baño seco a 37°C.

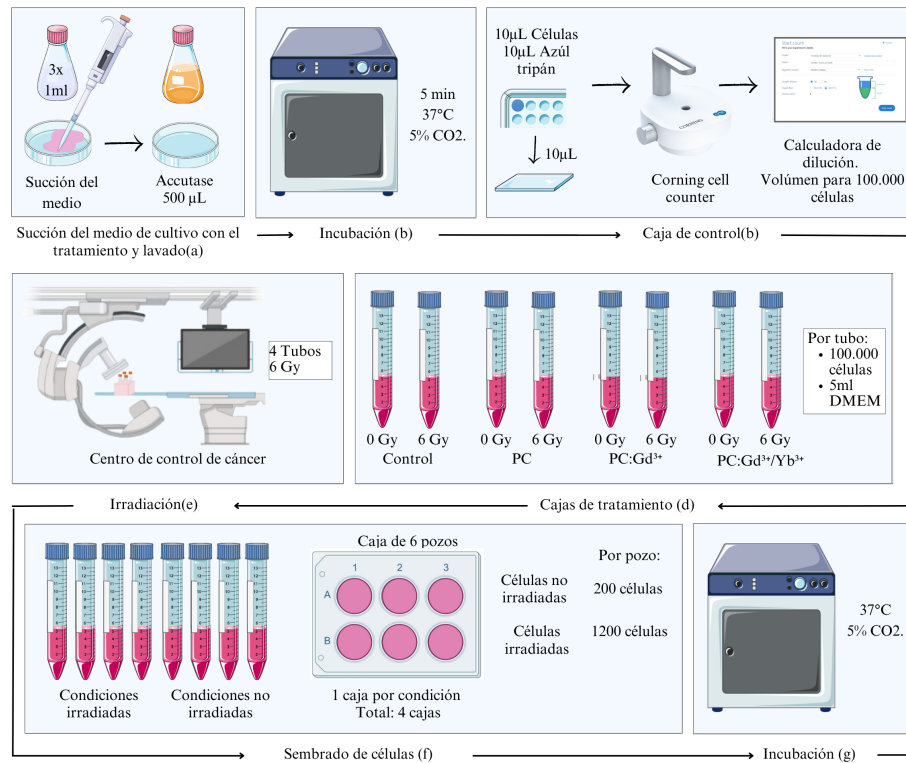


Figura 4.8: Día 3. Protocolo de irradiación

El protocolo para el ensayo de cometas continuó como se describe en la figura 4.9 con la centrifugación de las células en cultivo a 2000 revoluciones durante 5 minutos. Se aspiró cuidadosamente el sobrenadante sin perturbar el pellet celular. Se añadió 1 mL de PBS 1X frío al pellet y se resuspendió antes de transferirlo a los microtubos (1 mL). Las muestras se centrifugaron a 700 g durante 2 minutos y se mantuvo la cuña del Eppendorf hacia arriba como referencia visual del pellet. Se aspiró el sobrenadante, dejando el pellet intacto.

Posteriormente, se agregó el volumen de PBS 1X frío necesario para obtener una concentración de 100,000 células por mililitro y se resuspendieron las células. Las células se transfirieron a los tubos de Eppendorf con el gel de agarosa en una proporción de 1:10. Luego, se colocó la solución en los pozos de las láminas, asegurando una cobertura completa. Las láminas se colocaron en un recipiente cubierto con papel de aluminio y se enfriaron en la nevera a 4°C durante 15 minutos para su solidificación.

A continuación, se llenó el recipiente con el buffer de lisis y se mantuvo en la nevera a 4°C durante 30 minutos, permitiendo la desnaturalización del ADN durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente, se llenó el recipiente con la solución alcalina, llevándolo nuevamente a la nevera a 4°C durante otros 30 minutos. Para la electroforesis alcalina, se sumergieron las láminas en el buffer de electroforesis alcalino y se aplicó una corriente constante de aproximadamente 1 V/cm durante 30 minutos. Después de la electroforesis, las láminas se neutralizaron en agua fría durante 2 minutos (dos veces), seguido de un baño de 5 minutos en etanol frío. Por último, se retiraron las láminas y se dejaron secar protegidas de la luz.

Finalmente, las láminas se tiñeron en un buffer de tinción proporcionado en el kit, se eliminó el exceso de tinte y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se realizó la captura y procesamiento de las

imágenes, con el fin de cuantificar los parámetros del momento de la cola y el porcentaje de ADN en la cola. Al menos 50-100 células se analizan por muestra. En el presente trabajo dirigido se seleccionó el parámetro del momento de la cola ya que ha sido sugerido como un índice apropiado del daño en el ADN al considerar tanto la migración del material genético como la cantidad relativa de ADN en la cola [29] [30]

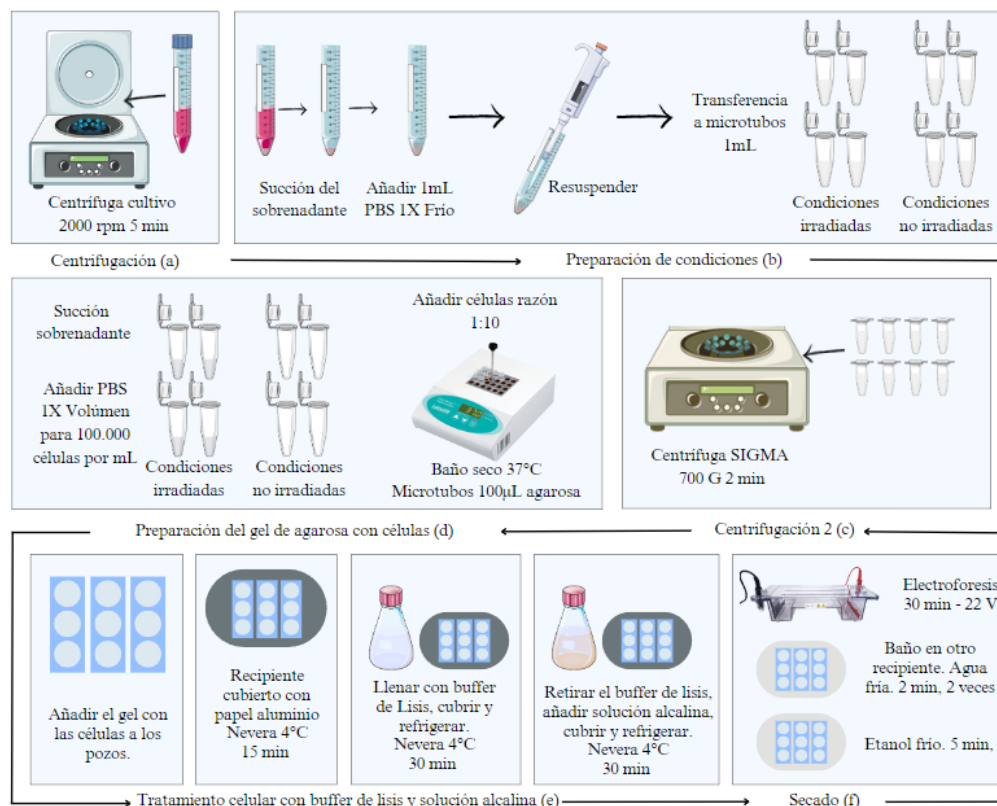


Figura 4.9: Protocolo. Ensayo de cometas

Procesamiento de las imágenes

Para el procesamiento de las imágenes de cometas obtenidas durante el ensayo para cada línea celular se utilizó el software OpenComet, un software de código abierto especialmente diseñado para el análisis cuantitativo de ensayos de cometa. Este software permite el análisis cuantitativo de imágenes de cometas, lo que facilita la medición de los parámetros propuestos.

En el ensayo de cometa, se pueden observar diferentes tipos de cometas que pueden ser clasificados según sus características morfológicas [31].

- Cometa sin daño (Grado 0) Fig. 4.10,a. Presenta una cabeza redondeada y no evidencia ningún daño significativo en el ADN.
- Cometa de cabeza (Grado 1) Fig. 4.10,b. Exhibe una cabeza redondeada y una cola que se extiende desde la misma.

- Cometa de cola (Grado 2) Fig. 4.10,c. Se diferencia del cometa de cabeza por tener una cabeza más pequeña y una cola más prominente.
- Cometa con cabeza difusa (Grado 4) Fig. 4.10,d. Presenta una cabeza no claramente definida y una distribución difusa. puede indicar daño severo en el ADN, como roturas de doble cadena. Esta condición dificulta la evaluación precisa de los parámetros en este tipo de cometa.

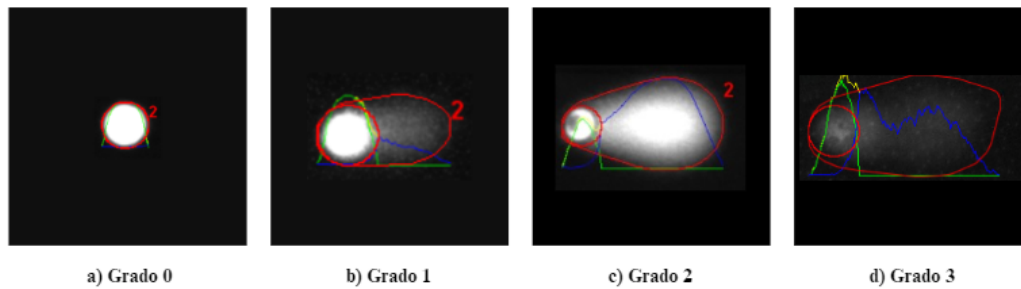


Figura 4.10: Clasificación de cometas. Imágenes del autor procesadas por el software OpenComet

En el procesamiento de los resultados del ensayo de cometas se describe en el diagrama de flujo presentado en la figura 4.11, se llevó a cabo una etapa de eliminación de los cometas que no correspondían a los tres primeros tipos de cometas descritos anteriormente (Cometa sin daño, Cometa de cabeza y Cometa de cola). Esta eliminación se realizó con el objetivo de asegurar que solo se analizaran y cuantificaran los cometas relevantes para el estudio.

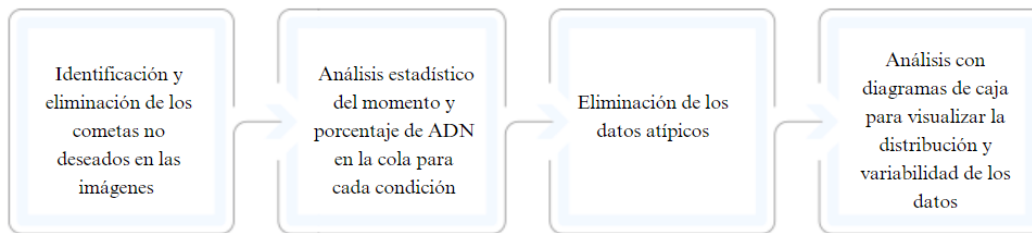


Figura 4.11: Diagrama de flujo. Procesamiento de imágenes de cometas

Una vez eliminados los cometas no deseados, se utilizó un software específico para realizar un análisis estadístico de los datos obtenidos. Este software permitió identificar y eliminar los datos atípicos, es decir, aquellos valores que se desviaban significativamente de la tendencia general de los datos. La eliminación de los datos atípicos ayudó a obtener resultados más confiables y representativos del ensayo de cometas.

El software utilizado para el análisis estadístico pudo proporcionar diversas herramientas y métodos para identificar y eliminar los datos atípicos, como pruebas de normalidad, análisis de desviación estándar y métodos de detección de valores extremos.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1. Caracterización de los puntos de carbono

5.1.1. Espectro de absorción

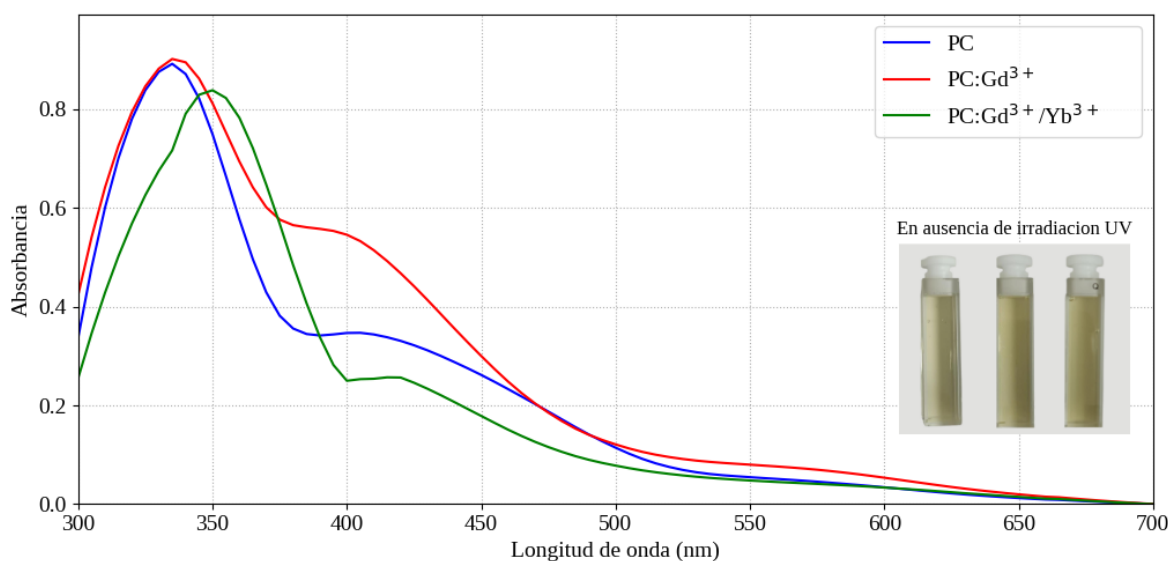


Figura 5.1: Espectro de absorción para los puntos de carbono PC, PC:Gd³⁺ Y PC:Gd³⁺/Yb³⁺

El gráfico de absorción del espectro de los puntos de carbono muestra un pico en la región UV, y la longitud de onda del pico dependerá del tipo de punto de carbono. La figura 5.1 muestra los resultados obtenidos utilizando una muestra con una concentración de 0.05 mg/ml en agua, lo que permite evaluar los grupos funcionales presentes en el núcleo de carbono de las mismas.

Los puntos de carbono tienen una transición n-p* en la banda de 300 a 400 nm, lo que significa que los electrones pueden pasar de la banda de valencia a la banda de conducción cuando absorben un fotón de luz con una longitud de onda que coincide con la diferencia de energía entre las dos bandas [32]. El gadolinio y el iterbio son metales de tierras raras que poseen un gran número de electrones susceptibles de excitación por la luz. Cuando se dopan en puntos de carbono, pueden generar niveles de energía adicionales en la banda de conducción, lo que provoca un desplazamiento del pico de absorción

hacia longitudes de onda más largas. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que el mayor desplazamiento del pico de absorción ocurre en los puntos de carbono dopados con gadolinio y codopados con iterbio PC:Gd³⁺/Yb³⁺. Estos dopantes introducen cambios en la estructura electrónica de los puntos de carbono, lo que se refleja en una absorción máxima en los 350 nm.

5.1.2. Espectros de emisión

El espectro de fluorescencia de los puntos de carbono 5.2 representa la intensidad de la luz emitida en función de la longitud de onda. Este espectro de emisión es el resultado del proceso de recombinación que se produce cuando los puntos de carbono absorben la luz. En el momento de la absorción, un electrón se excita desde la banda de valencia a la banda de conducción, dejando un hueco en la banda de valencia. Posteriormente, el electrón y el hueco se recombinan, liberando energía en forma de luz. La longitud de onda de la luz emitida viene determinada por la diferencia de energía entre las bandas de valencia y de conducción.

La longitud de onda máxima de emisión en los puntos de carbono puede variar en función de factores como el tipo y tamaño específicos de los puntos de carbono, así como la presencia de agentes dopantes. En el caso del dopaje con gadolinio PC:Gd³⁺, se ha observado que el pico de emisión se desplaza hacia 520 nm, mientras que para PC:Gd³⁺/Yb³⁺ se desplaza hasta los 560 nm. Este desplazamiento puede atribuirse a la influencia del gadolinio y el iterbio, que introducen niveles de energía adicionales en los puntos de carbono, lo que afecta al proceso de recombinación y altera la energía de la luz emitida.

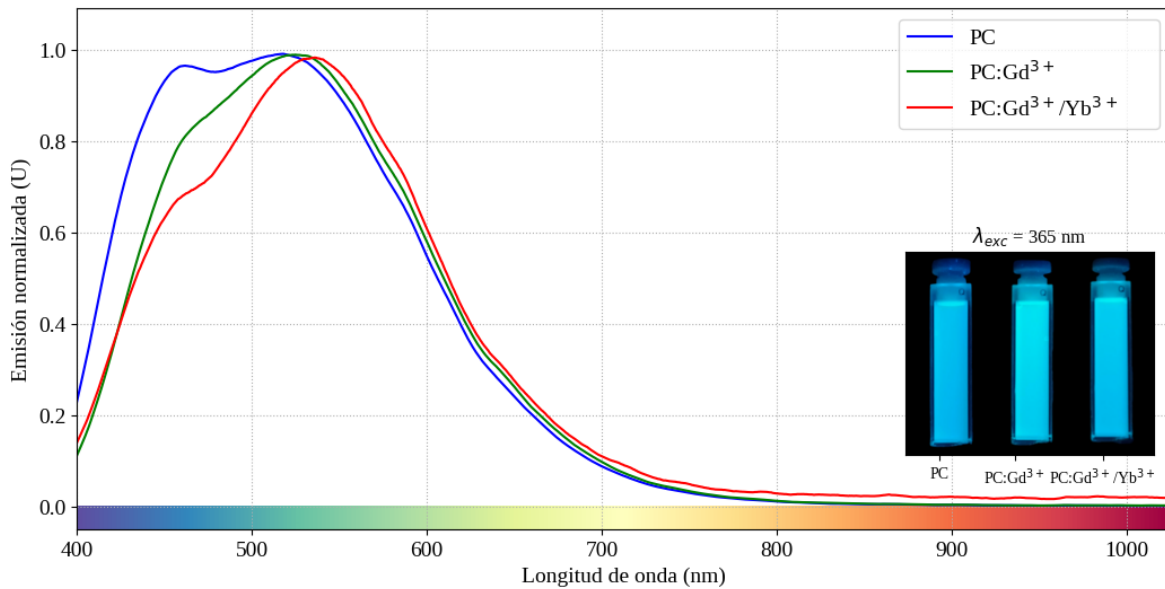


Figura 5.2: Espectro emisión para los puntos de carbono PC, PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺Yb³⁺

Se realizó el cálculo del porcentaje de emisión de los colores azul, cian, verde y rojo para cada tipo de punto de carbono, encontrando que todas muestran una mayor emisión en el rango verde. Además, se observó que los PC tienen el mayor porcentaje de emisión en azul, mientras que los porcentajes de rojo no cambian significativamente. Este análisis del porcentaje de color es coherente con la apariencia que se observa en las imágenes de fluorescencia bajo la irradiación de 365 nm en la esquina inferior de la figura 5.2, donde los PC se ven predominantemente azules y los PC:Gd³⁺ tienen una apariencia más verdosa.

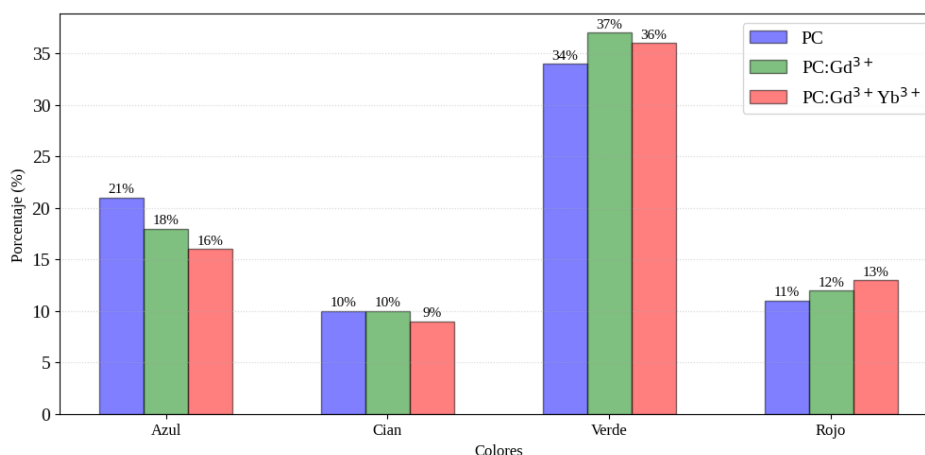


Figura 5.3: Porcentaje de emisión de colores Azul, Cian, Verde y Rojo para los puntos de carbono PC, PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺Yb³⁺

5.1.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La caracterización superficial mediante FTIR de muestras secas de los puntos de carbono (PC), PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺Yb³⁺ se presenta en las figuras 5.4, 5.5 y 5.6, respectivamente. Estas figuras muestran los espectros FTIR de los precursores y de cada punto de carbono, resaltando los picos característicos observados. Las intensidades relativas de estos picos pueden variar según el tipo de precursor, el tamaño y el dopante utilizado. En el caso de los puntos de carbono (PC), el espectro del ácido cítrico muestra un pico de estiramiento C=O pronunciado, indicando la presencia de un grupo ácido carboxílico. Por otro lado, el espectro de la urea muestra un pico de estiramiento N-H fuerte, sugiriendo la presencia de un grupo amida. En el espectro del PC, se puede observar un pico de estiramiento C=C intenso, lo cual indica que el PC tiene una hibridación sp².

Al examinar las figuras correspondientes a los espectros de los puntos de carbono PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺Yb³⁺, se aprecia un comportamiento vibracional similar, lo cual se atribuye a la presencia de componentes de síntesis comunes entre ellos. Los grupos funcionales presentes entre las vibraciones generadas en el rango de 1690 cm⁻¹ y 1500 cm⁻¹ se relacionan con los enlaces C=O y C=C. Esta región es importante porque permite identificar la presencia de grupos carbonilos y alquenos. Además, se observan vibraciones relevantes en el rango de 1200 a 1400 cm⁻¹, correspondientes a la presencia de grupos carbonilo (C=O), grupos alcoxi (C-O) y grupos alquilo (C-C). Estos grupos son relevantes en la caracterización de las nanopartículas debido a su influencia en las propiedades físicas y químicas de los puntos de carbono.

5.2. Evaluación del cambio en la supervivencia celular

En la figura 5.7 a. se puede observar la gráfica de las fracciones de supervivencia del primer estudio de las células G200. Se establece como control la muestra de células sin tratamiento con puntos de carbono y que no fue expuesta a radiación ionizante, ya que representa un comportamiento normal de proliferación de células tumorales. Al analizar las condiciones irradiadas, se observó una disminución considerable en las fracciones de supervivencia en comparación con el control. Se encontró que las fracciones más bajas se observaron en las células tratadas con PC y PC:Gd³⁺, siendo todas las fracciones de supervivencia inferiores a 0.1. Estos resultados sugieren que tanto PC como el PC:Gd³⁺ son efectivos en reducir la supervivencia celular cuando se exponen a la radiación.

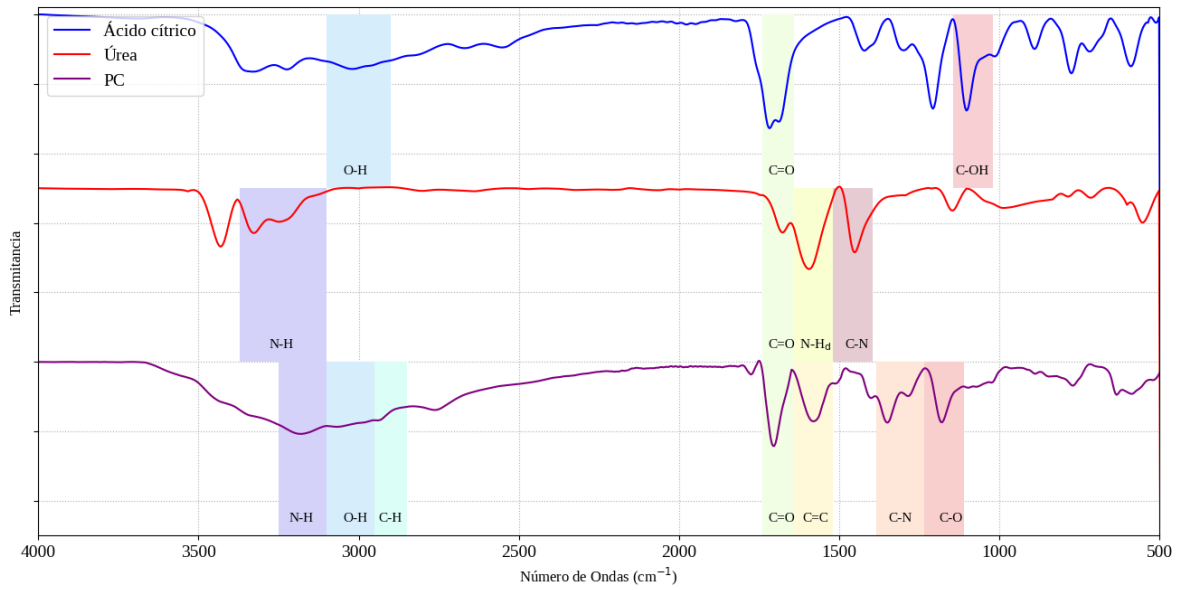


Figura 5.4: FTIR, puntos de carbono PC

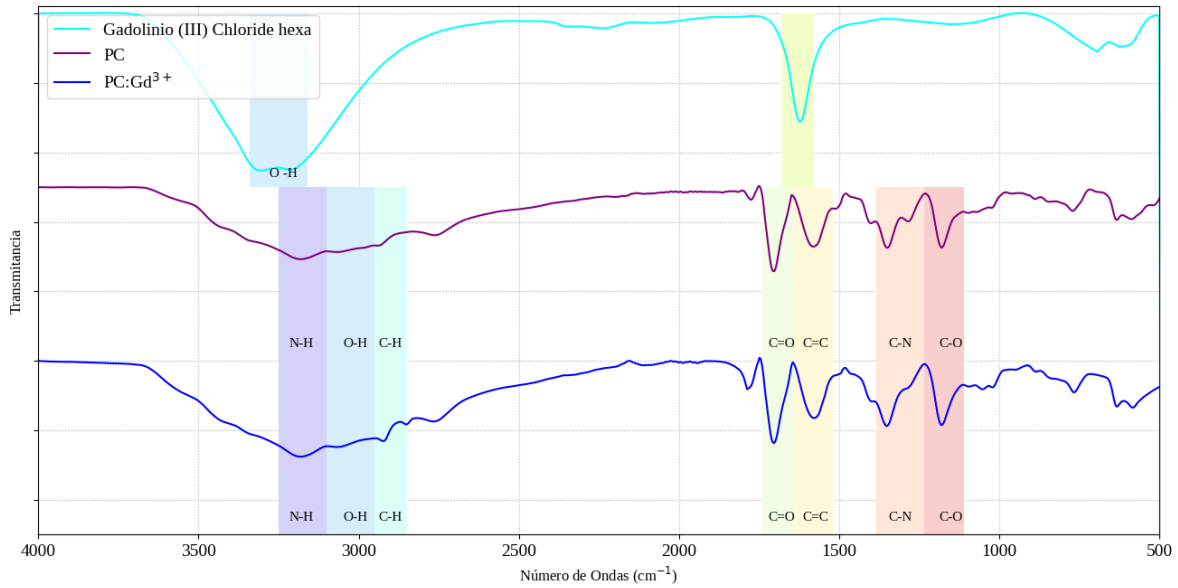


Figura 5.5: FTIR, puntos de carbono PC: Gd^{3+}

En el segundo ensayo realizado con cultivo primario G200 5.7 b., se observó un comportamiento coherente con respecto a las condiciones no irradiadas. Se evidenció que las células tratadas con PC presentaron una menor supervivencia en comparación con las tratadas con iterbio PC: $\text{Gd}^{3+}\text{Yb}^{3+}$, y se encontró una mayor supervivencia en las células tratadas con gadolinio PC: Gd^{3+} .

En general, en comparación con el primer ensayo, se observó que todas las fracciones de supervivencia en el segundo ensayo fueron menores y se encontraron por debajo del control a 6 Gy, lo cual indica una mayor susceptibilidad de las células a la irradiación en este caso. Lo anterior no es una

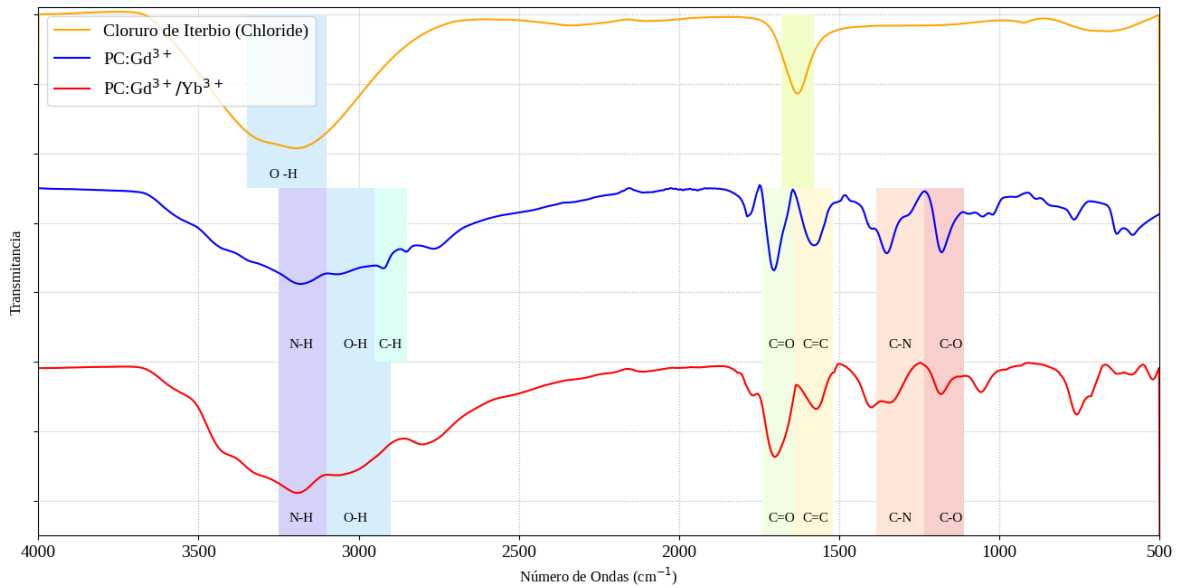


Figura 5.6: FTIR, puntos de carbono PC:Gd³⁺Yb³⁺

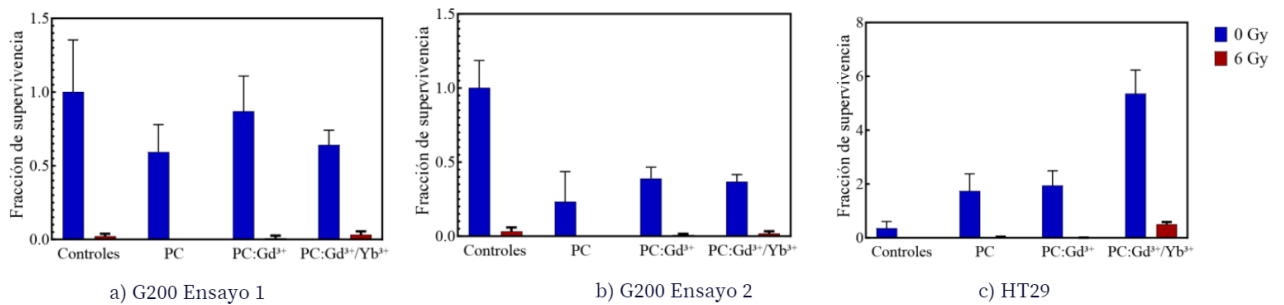


Figura 5.7: Fracciones de supervivencia a) G200 Ensayo 1, b) G200 Ensayo 2 c) HT29

respuesta biológica esperada dada la naturaleza de este tipo de cultivo que es altamente resistente a la radiación.

Con el fin de analizar los resultados se aplicó la prueba Shapiro-Wilk, una prueba estadística utilizada para determinar si un conjunto de datos está distribuido normalmente. El estadístico de la prueba es un estadístico W, que es una medida de la desviación de los datos de la distribución normal. El valor p es la probabilidad de obtener un estadístico W tan extremo o más que el observado, suponiendo que los datos se distribuyen normalmente.

En los resultados del ensayo 1, el estadístico W para el primer conjunto de datos es 0,9130 y el valor p es 0,4985. El estadístico W del segundo conjunto de datos es 0,9891 y el valor p es 0,9527. Para el ensayo 2, el estadístico W del primer conjunto de datos es 0,8032 y el valor p es 0,1080. El estadístico W del segundo conjunto de datos es 0,9791 y el valor p es 0,8969. Para ambos casos, los valores p son superiores a 0,05, por lo que no podemos rechazar la hipótesis nula de que los conjuntos de datos, es decir condiciones irradiadas y no irradiadas, se distribuyen normalmente.

A pesar de que los datos parecen seguir una distribución normal, se debe tener en cuenta que el hecho de tener un grupo de control irradiado a 6 Gy tan cercano a las condiciones con tratamiento puede enmascarar el efecto de las nanoplateformas dopadas con iones lantánidos, dificultando la obtención de una conclusión clara sobre su efecto radiosensibilizante.

En el caso específico de la línea celular HT29 (ver Figura 5.7) c. , se observó que las fracciones de supervivencia estuvieron por encima del control. Este resultado inesperado indica que las condiciones experimentales del ensayo pueden estar presentando inconvenientes o interferencias que afectan la interpretación de los datos. Es importante destacar que, al tener un grupo de control que no muestra el comportamiento esperado y al normalizar los datos respecto a este grupo, existe el riesgo de llegar a una conclusión errónea sobre el efecto radiosensibilizante de las nanoplateformas dopadas con iones lantánidos.

Para abordar este desafío, será crucial revisar y optimizar las condiciones experimentales, asegurándose de que todos los parámetros y procedimientos estén controlados rigurosamente. Además, considerar la inclusión de un grupo de control adecuado y realizar análisis comparativos adicionales para verificar y validar los resultados obtenidos. Esto permitirá obtener una interpretación más precisa y confiable de los datos, evitando cualquier posible sesgo o interpretación errónea que pueda surgir debido a las condiciones experimentales actuales.

5.3. Determinación del daño en el ADN

Se han realizado dos ensayos de cometa para evaluar el daño en el ADN de los 3 tipos de puntos de carbono PC, PC:Gd³⁺ y PC:Gd³⁺Yb³⁺ en células tumorales. Las imágenes de cometa representativas de cada condición se muestran en las figuras 5.8 y 5.9 para las líneas celulares U87 y G200 respectivamente.

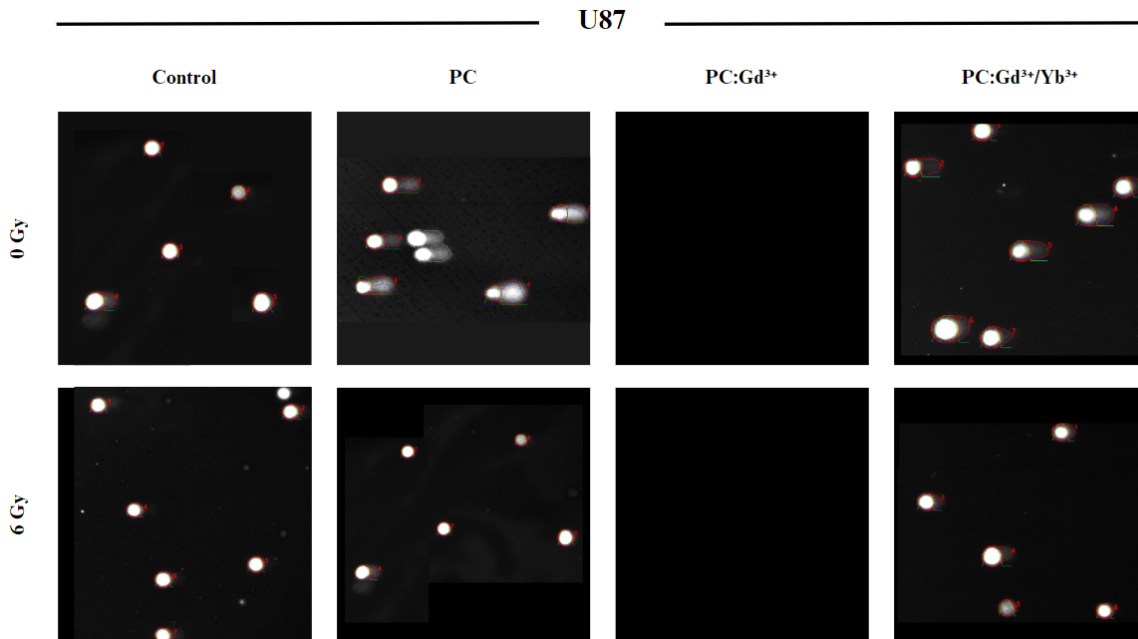


Figura 5.8: Imágenes de los cometas representativos. Ensayo células U87

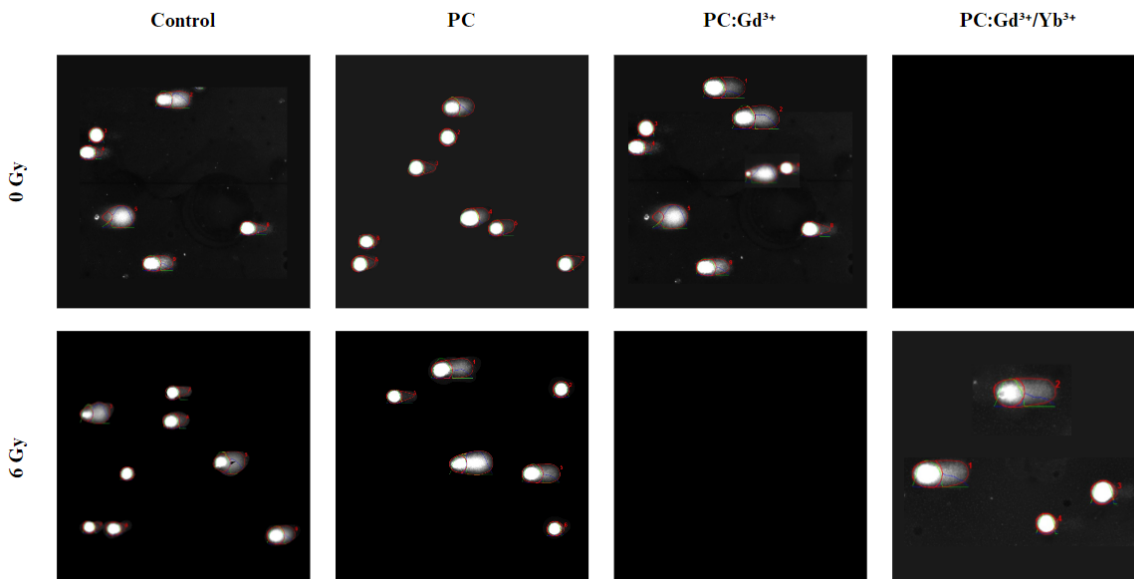


Figura 5.9: Imágenes de los cometas representativos. Ensayo células G200

Como se observa en la figura 5.8, durante el ensayo de U87 se encontró una dificultad en la detección de cometas en los pozos correspondientes a PC:Gd^{3+} 0 Gy y PC:Gd^{3+} 6 Gy. Esta ausencia de cometas se atribuye al desprendimiento de los geles de agarosa durante la electroforesis o la neutralización. Es importante destacar que esta situación plantea un desafío en la evaluación de los efectos del tratamiento con PC:Gd^{3+} en estas condiciones específicas.

Por otro lado, en el ensayo de G200, también se enfrentó a la dificultad de no detectar cometas en los pozos de PC:Gd^{3+} 6 Gy y $\text{PC:Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ 6 Gy. Esta falta de cometas también está relacionada con el desprendimiento de los geles de agarosa durante la electroforesis o la neutralización. Al igual que en el ensayo de U87, esta situación plantea un desafío en la evaluación de los efectos de los tratamientos en estas condiciones y resalta la importancia de realizar mejoras en los protocolos experimentales.

Los resultados obtenidos en cada ensayo se analizaron mediante violin plots para el porcentaje de ADN y el momento de la cola (píxeles), como se muestra en las figuras 5.10 y 5.11 para las líneas celulares G200 y U87, respectivamente.

En la figura 5.10, se puede apreciar que el mayor porcentaje de ADN se encuentra en las condiciones no irradiadas, lo cual es inesperado y no coincide con la respuesta biológica esperada. Esta observación también contrasta con los resultados encontrados en el ensayo de supervivencia celular. Estas discrepancias sugieren que los datos obtenidos podrían no reflejar adecuadamente la realidad de las condiciones estudiadas, lo que plantea interrogantes sobre la fiabilidad de los resultados para la determinación del daño en el ADN en esta línea celular (G200).

Es crucial abordar esta aparente contradicción y considerar cuidadosamente las posibles causas que puedan estar afectando los resultados. Es posible que ciertas variables experimentales o condiciones del ensayo no estén siendo controladas adecuadamente, lo que podría estar generando distorsiones en

los datos.

Para obtener resultados más confiables y esclarecer esta discrepancia, se sugiere revisar y ajustar las condiciones experimentales, asegurándose de seguir un protocolo riguroso y estandarizado. Además, considerar la realización de réplicas adicionales para obtener una mayor robustez en los resultados y realizar análisis estadísticos más detallados para detectar posibles fuentes de variabilidad.

En la figura 5.11, se presentan los violin plots que representan el momento de la cola y el porcentaje de ADN en el ensayo de células U87. Analizando los resultados, del momento de la cola se observa una variabilidad en los datos representada por la desviación estándar en cada grupo. Para el grupo de control 0 Gy, la desviación estándar es de 0.5630, mientras que para el grupo de control 6 Gy es de 5.493. Estos valores indican la dispersión de los datos alrededor de la mediana en cada grupo, siendo mayor en el grupo de control 6 Gy.

En cuanto a los grupos tratados con PC, se encuentran desviaciones estándar de 25.80 píxeles para PC, 9.289 píxeles para PC 6 Gy, 14.83 píxeles para PC:Gd³⁺/Yb³⁺ 0 Gy y 23.73 píxeles para PC:Gd³⁺/Yb³⁺ 6 Gy. Estos valores indican una dispersión considerable en los datos de estos grupos, sugiriendo una variabilidad en los momentos de la cola medidos.

La mediana, por otro lado, representa el valor central de los datos en cada grupo. Los valores de mediana correspondientes son 0.2842 píxeles para el grupo de control 0 Gy, 3.327 píxeles para el grupo de control 6 Gy, 16.02 píxeles para el grupo de PC, 7.088 píxeles para el grupo de PC 6 Gy, 10.90 píxeles para el grupo de PC:Gd³⁺/Yb³⁺ 0 Gy, y 18.96 píxeles para el grupo de PC:Gd³⁺/Yb³⁺ 6 Gy.

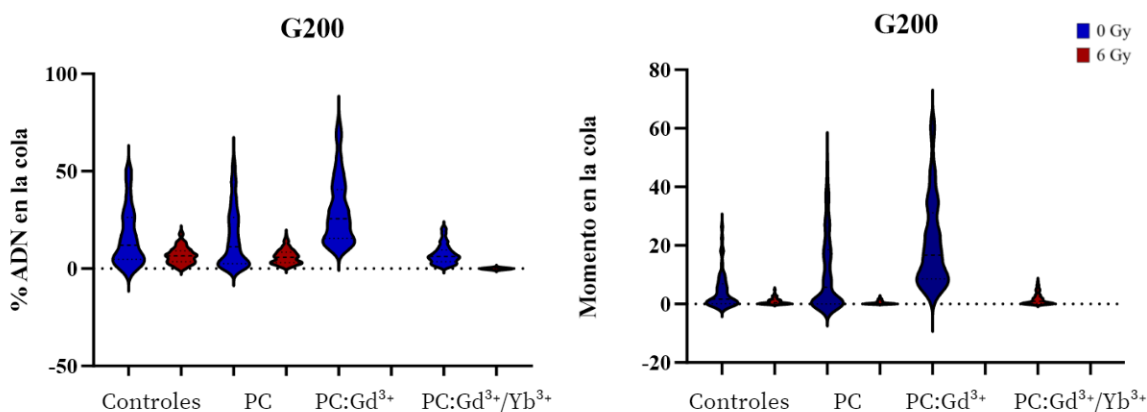


Figura 5.10: Porcentaje de ADN y momento de la cola. Ensayo de células G200

Es importante reconocer que la ausencia de cometas en ciertos pozos presenta limitaciones en la comparación y el análisis de los efectos específicos de los tratamientos evaluados. Además de las discrepancias observadas en los resultados y las contradicciones con las respuestas biológicas esperadas en ambas condiciones, se ha identificado la presencia de una cantidad considerable de datos atípicos en las gráficas, a pesar de haber aplicado un filtrado previo. Esta situación puede afectar significativamente la confiabilidad y precisión de los datos obtenidos.

La presencia de datos atípicos sugiere la posibilidad de que haya factores externos o condiciones experimentales no controladas que estén afectando los resultados. Estos datos atípicos pueden distor-

sionar las conclusiones y dificultar la interpretación adecuada de los hallazgos.

Para mejorar la confiabilidad de los resultados, se recomienda repetir los ensayos en busca de una mayor robustez y consistencia en los datos. Al repetir los experimentos, se puede asegurar una mejor identificación y manejo de los datos atípicos, así como la detección de cualquier error o interferencia en el proceso experimental.

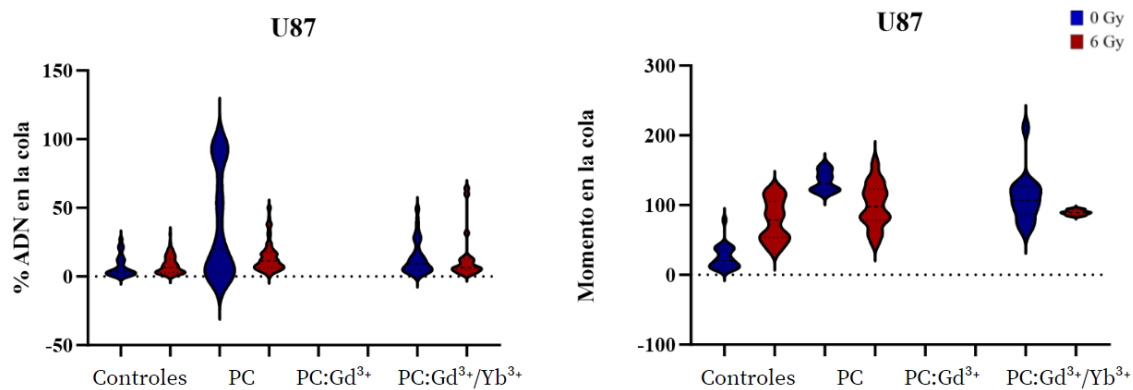


Figura 5.11: Porcentaje de ADN y momento de la cola. Ensayo de células U87

Capítulo 6

Conclusiones

Las pruebas de caracterización óptica y superficial han demostrado de manera concluyente que la síntesis asistida por microondas, siguiendo el protocolo propuesto, ha sido altamente exitosa en la promoción de la formación de puntos de carbono fluorescentes y estables coloidalmente, tanto en medios acuosos como en medio celular. Además, se pudo constatar que estos puntos de carbono no mostraron evidencia de agregación durante su almacenamiento a 4°C, lo que resalta su potencial para mantener su estabilidad y dispersión a largo plazo.

Es importante mencionar que enfrentamos algunas dificultades experimentales que restringieron nuestra capacidad de obtener una respuesta biológica clara sobre el efecto del dopaje en la dosis de 6 Gy para las líneas celulares estudiadas. A pesar de esta limitación, hemos logrado adquirir valiosas lecciones aprendidas a lo largo del proceso de investigación. Estas lecciones son de gran importancia, ya que identificamos oportunidades significativas de mejora que, sin duda, contribuirán al logro exitoso de los objetivos establecidos en el marco del proyecto AUF.

Capítulo 7

Recomendaciones y trabajos futuros

Para futuros trabajos y recomendaciones, se sugiere realizar una caracterización complementaria de los puntos de carbono, empleando técnicas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), que permitirá determinar su tamaño y morfología con mayor precisión. Además, se debe llevar a cabo una calibración rigurosa de los equipos antes de cada protocolo de irradiación para asegurar la exactitud y reproducibilidad de los resultados.

Es esencial analizar las condiciones experimentales cuidadosamente para identificar posibles factores que puedan dañar la integridad de las células tanto antes como después de la irradiación. Estos factores deben ser considerados y controlados adecuadamente para garantizar resultados más confiables y significativos.

Para obtener una visión completa y exhaustiva del efecto radiosensibilizante de los puntos de carbono durante la radioterapia, es necesario asegurarse de contar con todos los resultados para todas las condiciones evaluadas. Esto permitirá obtener más información y conocimiento sobre la respuesta celular a la exposición de los puntos de carbono.

Repetir los ensayos con un mayor número de réplicas por línea celular, como 3, 4, 5 y 6 repeticiones, será de gran utilidad para realizar pruebas estadísticas más sólidas, como ANOVA, T Student y análisis Bayesiano. Estas pruebas de análisis de varianza entre las réplicas permitirán determinar la validez y la consistencia de los resultados obtenidos tanto en los ensayos clonogénicos como en los ensayos cometa.

Adicionalmente, se recomienda evaluar la biocompatibilidad de los puntos de carbono para comprender mejor su posible afectación a la integridad celular. Realizar ensayos específicos para evaluar la respuesta celular y la interacción de los puntos de carbono con las células ayudará a establecer su seguridad y viabilidad en aplicaciones clínicas potenciales.

En conjunto, estos estudios futuros permitirán una mejor comprensión de los efectos de los tratamientos evaluados, así como la optimización de los protocolos experimentales y la caracterización detallada de los compuestos utilizados. Esto contribuirá al desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas en el campo de la radioterapia, mejorando los resultados clínicos y proporcionando nuevas perspectivas en el tratamiento del cáncer.

Bibliografía

- [1] A. C. Society, “What is cancer?,” 2021.
- [2] N. C. Institute, “Understanding cancer,” 2021.
- [3] J. A. Simmons, “Clinical radiotherapy physics.by s jayaraman and l lanzl. pp. xxii 523, 2004 (springer-verlag, berlin) £115.50 isbn 3-540-40284-5,” 2014.
- [4] S. Jelveh and D. B. Chithrani, “Gold nanostructures as a platform for combinational therapy in future cancer therapeutics,” *Cancers*, vol. 3, pp. 1081–1110, 3 2011.
- [5] M. Liu, “Optical properties of carbon dots: A review,” *Nanoarchitectonics*, vol. 1, pp. 1–12, 1 2020.
- [6] M. Zhang, A. Gong, F. Du, L. Zhang, S. Zou, Y. Tan, J. Miao, H. Ju, M. Sun, Y. Gong, C. Wu, and L. Zhang, “Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors,” 2016.
- [7] A. J. B. Garcell, N. B. S. Gámez, R. T. Ginés, M. de los Ángeles Leyva Montero, and A. A. N. Coronel, “Biología del cáncer,” *Correo Científico Médico*, vol. 23, pp. 1394–1416, 2019.
- [8] D. Hanahan and R. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, pp. 646–674, 3 2011.
- [9] J. Ferlay, M. Ervik, F. Lam, M. Colombet, L. Mery, M. Piñeros, A. Znaor, I. Soerjomataram, and F. Bray, “Global cancer observatory: Cancer today,” 2020.
- [10] O. mundial de la salud, “Cáncer,” 2020.
- [11] W. Ngwa, F. Boateng, R. Kumar, D. J. Irvine, S. Formenti, T. Ngoma, C. Herskind, M. R. Veldwijk, G. L. Hildenbrand, M. Hausmann, F. Wenz, and J. Hesser, “Smart radiotherapy biomaterials hhs public access,” *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 97, pp. 624–637, 2017.
- [12] M. E. Miller, *Cancer*. Momentum Press, 2018. Accession Number: 1793979; OCLC: 1032709659; Language: English.
- [13] K. J. Dunn, “Radiotherapy for cancer,” *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 5, no. 8, pp. 489–500, 2008.
- [14] M. Hajizadeh, R. Javadzadeh, E. Hajizadeh, H. Eskandari, A. Ghasemi, A. Maleki, H. Mirkhani, and A. Mirhosseini, “A study on prostate movement and dosimetric variation because of bladder and rectum volumes changes during the course of image-guided radiotherapy in prostate cancer,” *Radiation Oncology*, vol. 15, no. 1, p. 133, 2020.
- [15] A. C. Society, “Radioterapia externa.” <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/radioterapia/radioterapia-externa.html>, Accedido en 2023.

- [16] L. Gong, Y. Zhang, C. Liu, M. Zhang, and S. Han, "Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy," *International Journal of Nanomedicine*, vol. ume 16, pp. 1083–1083–1102, 2021.
- [17] R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, and K. W. Yeoh, "Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 9, pp. 193–199, 2 2012.
- [18] E. J. Hall, "Cancer caused by x-rays—a random event?," *The Lancet. Oncology*, vol. 8, pp. 369–370, 5 2007.
- [19] R. N. C. Jr, A. C. Upton, G. M. Lodde, and S. W. P. Jr, "Radiaciones ionizantes,"
- [20] W. R. Leo and D. G. Haase, "Techniques for nuclear and particle physics experiments," *Am J Phys*, vol. 58, no. 12, pp. 1216–1217, 1990.
- [21] M. J. Molaei, "Carbon quantum dots and their biomedical and therapeutic applications: a review," 2019.
- [22] A. Valizadeh, H. Mikaeili, M. Samiei, S. M. Farkhani, N. Zarghami, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, and S. Davaran, "Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity," 2012.
- [23] P. Namdari, B. Negahdari, and A. Eatemadi, "Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review," *Biomedicine Pharmacotherapy*, vol. 87, pp. 209–222, 3 2017.
- [24] P. Retif, S. Pinel, M. Toussaint, C. Frochot, R. Chouikrat, T. Bastogne, and M. Barberi-Heyob, "Nanoparticles for radiation therapy enhancement: The key parameters," *Theranostics*, vol. 5, pp. 1030–1044, 2015.
- [25] G. L. Duc, I. Miladi, C. Alric, P. Mowat, E. Brauer-Krisch, A. Bouchet, E. Khalil, C. Billotey, M. Janier, F. Lux, T. Epicier, P. Perriat, S. Roux, and O. Tillement, "Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles," *ACS nano*, vol. 5, pp. 9566–9574, 12 2011.
- [26] L. Sancey, F. Lux, S. Kotb, S. Roux, S. Dufort, A. Bianchi, Y. Crémillieux, P. Fries, J.-L. Coll, C. Rodriguez-Lafrasse, M. Janier, M. Dutreix, M. Barberi-Heyob, F. Boschetti, F. Denat, C. Louis, E. Porcel, S. Lacombe, G. L. Duc, E. Deutsch, J.-L. Perfettini, A. Detappe, C. Verry, R. Berbeco, K. T. Butterworth, S. J. McMahon, K. M. Prise, P. Perriat, and O. Tillement, "The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy," *The British Journal of Radiology*, vol. 87, p. 20140134, 9 2014.
- [27] D. Bouzas-Ramos, J. Cigales Canga, J. C. Mayo, R. M. Sainz, J. Ruiz Encinar, and J. M. Costa-Fernandez, "Carbon quantum dots codoped with nitrogen and lanthanides for multimodal imaging," *Advanced Functional Materials*, vol. 29, p. 1903884, September 2019.
- [28] Y. Zhao and et al., "Facile preparation of double rare earth-doped carbon dots for mri/ct/fi multimodal imaging," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 1, p. 2544–2551, June 2018.
- [29] R. P. Singh, "The comet assay: A simple and rapid method to detect dna damage in individual cells," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 10, pp. 2301–2316, 2007.
- [30] N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of dna damage in individual cells," *Experimental Cell Research*, vol. 175, no. 1, pp. 184–191, 1988.
- [31] "Evaluacion de los arándanos como radioprotectores potenciales," *Perspectivas en Nutrición Humana*, vol. 17, no. 1, pp. 11–19, 2015.
- [32] M. Liu, "Optical properties of carbon dots: A review," *Nanoarchitectonics*, vol. 1, pp. 1–12, 1 2020.